

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie
Studijní program: Biochemie



**Mechanismus působení protinádorových léčiv
v neuroblastomech**

Mechanisms of anticancer drug action in neuroblastomas

Mgr. Tomáš Groh

Disertační práce

Školitel: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Konzultant: prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.

Praha 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část, nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Praha

Podpis:.....

Tomáš Groh

Prohlašuji, že Mgr. Tomáš Groh rozhodujícím způsobem (30-90 %) přispěl ke vzniku všech publikací, které jsou přílohami této disertační práce. Sám provedl většinu experimentů a významně se podílel na jejich plánování, interpretaci výsledků a na sepsání publikací.

Praha

Podpis:.....

Marie Stiborová

Poděkování:

Děkuji zejména své školitelce paní prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za výborné vedení při vypracování disertační práce a panu prof. MUDr. Tomáši Eckschlagerovi, CSc. za cenné rady. Dále také děkuji celému kolektivu laboratoře Kliniky dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze – Motole za skvělou spolupráci. Zejména kolegům MVDr. Janu Hrabětovi, Ph.D. a MUDr. Mohamedu A. Khalilovi za obohacující diskuse nejen o vědě. Děkuji také své rodině v Ústí nad Labem za podporu ve všem, co dělám.

Práce byla vypracována za finanční podpory grantových projektů GAUK č. 635712 a č. 620612; dále za podpory GAČR (projekty P301/10/0356 a 14-8344S).

Obsah

Seznam použitých symbolů a zkratek	7
Abstrakt	10
Abstract.....	11
1 ÚVOD A PŘEHLED PROBLEMATIKY	12
1.1 Neuroblastomy.....	12
1.2 Chemoterapie nádorů.....	13
1.2.1 Alkylační a arylační látky.....	14
1.2.2 Inhibitory mitózy	17
1.2.3 Inhibitory proteosyntézy.....	17
1.2.4 Inhibice biosyntézy nukleových kyselin.....	18
1.3 Inhibitory histondeacetylasy v nádorové terapii.....	18
1.4 Nádory a metabolismus v nádorových buňkách.....	21
1.4.1 Gen <i>N-myc</i> a jeho role v neuroblastomech a metabolismu	24
1.5 Heterogenita nádorové tkáně.....	25
1.6 Hypoxická mikroprostředí v solidních nádorech.....	26
1.7 Nádorové kmenové buňky.....	29
2 CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE	31
3 MATERIÁL A METODY.....	32
3.1 Použité chemikálie.....	32
3.2 Kultivace buněčných linií.....	32
3.3 Testování viability buněk pomocí MTT testu	33
3.4 Sledování viability buněk pomocí systému xCELLigence.....	34
3.5 Detekce apoptózy použitím dvojnásobného značení Annexinem V FITC a propidium iodidem	34
3.6 Stanovení aktivity caspasy-3	35

3.7 Izolace histonů	35
3.8 Stanovení koncentrace proteinů.....	36
3.9 Analýza exprese proteinů pomocí metody Western-blotting	36
3.10 Stanovení koncentrace laktátu	37
3.11 Měření aktivit histondeacetylas a histonacetyltransferas	37
3.12 Experimenty využívající fluorescenční mikroskopii.....	37
3.13 Analýza buněčných neuroblastomových linií elektronovou mikroskopií .	38
3.14 Analýza distribuce fází buněčného cyklu.....	38
3.15 Detekce proteinů CD133, N-myc a pH2AX metodou průtokové cytometrie.....	39
3.16 Izolace DNA a stanovení tvorby aduktů ellipticinu s DNA metodou ³² P- postlabeling.....	40
3.17 Testování klonogenicity neuroblastomových buněk	40
3.18 Kvantifikace exprese proteinu	40
3.19 Indukce apoptózy pomocí UV záření	40
3.20 Statistické vyhodnocení dat	40
4 VÝSLEDKY A DISKUSE	42
4.1 Vliv hypoxie na neuroblastomy.....	42
4.2 Vliv valproátu na expresi proteinů transkripčních faktorů N-myc a HIF- 1α.....	48
4.3 Vliv VPA na acylaci histonů H3 a H4.....	54
4.4 Vliv VPA na expresi proteinu molekuly CD133, specifického znaku kmenových nádorových buněk.....	55
4.5 Vliv etoposidu a VPA na neuroblastomy	61
4.6 Vliv cisplatiny a VPA na neuroblastomy	68
4.7 Vliv cisplatiny a etoposidu v kombinaci s VPA na acylaci histonů H3 a H4 v neuroblastomové linii UKF-NB-4	75
4.8 Vliv ellipticinu a VPA na neuroblastomy.....	77

4.9 Vliv vincristinu a VPA na neuroblastomy.....	78
4.10 Vliv UV záření a VPA na neuroblastomy	79
4.11 Ovlivnění chemorezistence neuroblastomových buněk vůči ellipticinu ...	80
5 ZÁVĚR.....	87
6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	89
7 PŘÍLOHY	97

Seznam použitých symbolů a zkratek

ABC	„ATP binding cassette“
Akt1	„v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1“
APC	buňky prezentující antigen
ATM	„ataxia telangiectasia mutated“
ATR	„ataxia telangiectasia and Rad3-related“
Baf A	bafilomycin A
BRCA1	„breast cancer 1“
BSA	hovězí sérový albumin
CA9	„carbonic anhydrase 9“
CBP	„CREB binding protein“
CDK4	cyklin-dependentní kinasa 4
CI	„Cell Index“
CQ	chloroquin
CT	počítačová tomografie
DAPI	4',6-diamidin-2-fenyindol
DTT	dithiotreitol
ELLI	ellipticin
FDA	Americký ústav pro kontrolu potravin a léčiv
FITC	fluorescein isothiokyanát
GABA	kyselina gamma aminomáselná
GLUT1	transportér glukózy 1
HAT	histonacetyltransferasa
HBSS	„Hanks' balanced salt solution“
HDAC	histondeacetylasa
HIF-1 α	faktor 1 α indukovaný hypoxií
HK1	hexokinasa 1
hRAD51	„DNA repair protein RAD51 homolog 1“
HRE	„hypoxia responsible elements“
HSP90	„heat shock protein“
IL-10	interleukin 10
IMDM	„Iscoe's modified Dulbecco's mediu“

INSS	„International neuroblastoma staging system“
KRAS	„Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog“
LDH-A	laktátdehydrogenasa A
MAX	„myc-associated factor X“
MCT	monokarboxylátový transportér
MDM2	„mouse double minute 2 homolog“
MGCD0103	mocetinostat
MRP1	„multidrug rezistance associated protein 1“
MS-275	entinostat
mTOR	„mammalian target of rapamycin“
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
Myc	„v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog“
NaB	butyrát sodný
NF- κ B	„nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells“
N-myc	„v-myc avian myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived“
ODD	„oxygen-dependent degradation“ doména
PBS	„phosphate buffered saline“
PDH	pyruvátdehydrogenasa
PDK	PDH kinasa
PEP	fosfoenolpyruvát
PI	propidium jodid
PI3K	fosfatidylinositolkinasa 3
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
PPP	pentosofosfátový cyklus
PTEN	„phosphatase and tensin homolog“
RIPA	„radio immuno precipitation assay“
ROS	reaktivní formy kyslíku
SAHA	vorinostat
SDS	dodecylsulfát sodný
TCA	kyselina trichloroctová
TEMED	bis(dimethylamino)ethan

TGF- β	„transforming growth factor β “
Trk	„tropomyosin receptor kinase“
TSA	trichostatin A
VCR	vincristin
VEGFA	„vascular endothelial growth factor A“
VHL	„Von Hippel–Lindau“
VPA	kyselina valproová
W	wortmannin

Abstrakt

Nádorové buňky se obvykle dokážou dynamicky adaptovat na stresové hypoxické prostředí, které je způsobené nedokonalou vaskularizací nádoru. V disertační práci bylo zjištěno, že neuroblastomové nádorové linie UKF-NB-3 a UKF-NB-4 se na hypoxii adaptují zvýšením acetylace histonů. Zvýšená acetylace je obecně spojována s rozvolněním chromatinové struktury, a tím i s transkripční aktivací genů. Dále bylo zjištěno, že hypoxie v těchto liniích mění expresi proteinu transkripčního faktoru N-myc, který je důležitý pro vývoj neuroblastomů. Zodpovědný je i za metabolickou adaptaci, zvýšenou agresivitu a horší prognózu onemocnění.

Inhibitory histondeacetylasy (HDAC) jsou slibné látky s protinádorovým účinkem. Mohou indukovat zástavu buněčného cyklu, diferenciaci či programovanou buněčnou smrt v sensitivních nádorech. V práci byl studován vliv inhibitoru HDAC, valproátu, na expresi proteinů transkripčních faktorů N-myc a faktoru 1α indukovaného hypoxií (HIF- 1α), důležitých pro proliferaci nádorových buněk. Testovaný inhibitor HDAC způsoboval snížení exprese obou transkripčních faktorů, což potvrzuje jeho protinádorový efekt.

Protein CD133 je spojován s fenotypem kmenových nádorových buněk. V disertační práci bylo zjištěno, že zvýšená exprese proteinu CD133 po kultivaci buněk UKF-NB-3 s valproátem je spojená s vyšší rezistencí buněk vůči cisplatině a vincristinu. Zjištěna byla rovněž skutečnost, že valproát v linii UKF-NB-4 nezvyšuje expresi proteinu CD133 v důsledku methylace promotoru P1 a P3 genu pro CD133.

Inhibitory histondeacetylasy jsou klinicky použitelné především v kombinaci s konvenčními cytostatiky. Kultivace buněk linie UKF-NB-4 s cytostatiky, které způsobují poškození DNA těchto buněk, etoposidem, cisplatinou či ellipticinem, v kombinaci s netoxickou koncentrací valproátu, vede k synergistickému efektu těchto léčiv. Cytotoxický efekt studovaných cytostatik se tímto působením výrazně zvýšil.

V poslední části práce byl studován mechanismus chemorezistence buněk linie UKF-NB-4 vůči ellipticinu. Zjistili jsme, že ellipticin indukuje v buňkách tvorbu lysosomů, ve kterých je akumulován. Tím se snižuje jeho cytotoxicita. Narušení funkce lysosomů zvyšuje vazbu ellipticinu na cílové struktury v jádře buněk (DNA), což vede k posílení účinku ellipticinu vůči neuroblastomové linii UKF-NB-4.

Abstract

Cancer cells are able to adapt to different stress factors such as hypoxia, which is caused by insufficient tumor vascularization. An increased acetylation status of histones H3 and H4 in UKF-NB-3 and UKF-NB-4 neuroblastoma cell lines was found to be a mechanism of adaptation of these cells to hypoxia. An increase in acetylation of histones H3 and H4 is suggested to cause changes in the structure of chromatin that lead to activation of gene transcription. In addition, cultivation of tested neuroblastoma cells under hypoxic conditions changes expression of proteins of a transcription factor N-myc, which is essential for development of neuroblastomas. This transcription factor is also responsible for a metabolic adaptation of neuroblastoma cells, increases their aggressiveness and its expression leads to a worse prognosis of the disease. Inhibitors of histone deacetylases (HDAC) are suggested to be the promising agents exhibiting various anticancer effects. They can induce cell cycle arrest, differentiation or programmed cell death in sensitive tumors. In this study, the effect of one of inhibitors of HDACs, valproate, on expression of proteins of transcription factors N-myc and hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) was investigated. Valproate decreases protein levels of both transcription factors in tested neuroblastoma cells, which confirms its anticancer efficiency.

Protein CD133 is a marker of cancer stem cells. The effect of valproate on expression of this protein was tested. Valproate increases protein levels of CD133 in a UKF-NB-3 cell line, which was associated with increased chemoresistance to cisplatin and vincristine in this cell line. In the UKF-NB-4 cell line, an increase in expression of CD133 protein was not produced by valproate, which might be caused by methylation of promoters P1 and P3 of a *PROM1* (CD133) gene. Inhibitors of HDAC are clinically promising, when used in a combination with conventional cytostatics. Cultivation of a UKF-NB-4 neuroblastoma cell line with drugs damaging DNA such as cisplatin, etoposide and ellipticine in a combination with nontoxic concentrations of valproate leads to a synergistic effect of these drugs. In this study, a mechanism of chemoresistance of UKF-NB-4 cell line to ellipticine was also examined. Treatment of ellipticine-sensitive UKF-NB-4 cell line with ellipticine induced cytoplasmic vacuolization and ellipticine is concentrated (sequestered) in these vacuoles. This sequestration results in lower cytoplasmic concentrations of ellipticine, less nuclear accumulation, and lower DNA damage by ellipticine, and therefore also lower toxic effects to these cells.

1 ÚVOD A PŘEHLED PROBLEMATIKY

Nádorová onemocnění jsou jedním z nejčastějších vážných onemocnění lidské populace. Dle Zdravotnické ročenky ČR (1) vydané Ústavem zdravotnických informací a statistiky k roku 2013 představují nádorová onemocnění čtvrtinu všech úmrtí a jsou druhou nejčastější příčinou smrti po kardiovaskulárních onemocněních. I přes rostoucí incidenci tohoto onemocnění, která je do jisté míry dána zvyšující se délkou a stylem života, standardizovaná úmrtnost na nádorová onemocnění v České republice mírně klesá.

Současný světový trend léčby nádorových onemocnění se uchyluje k tzv. cílené léčbě založené na genetické a epigenetické charakterizaci jednotlivých nádorových onemocnění. To povede i přes vysoké finanční náklady k léčbě pacienta vysoce specifickým způsobem, a tím k úspěšnější a citlivější protinádorové personalizované terapii.

1.1 Neuroblastomy

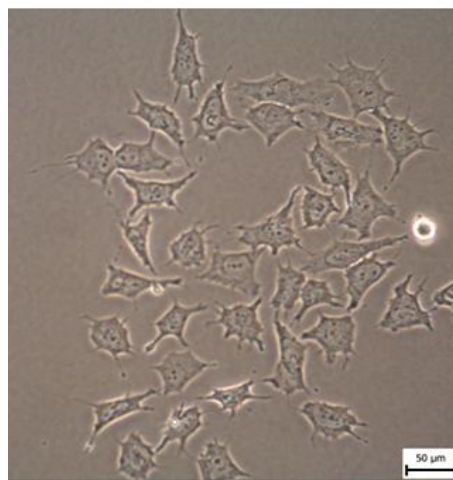
Neuroblastomy jsou nejčastější extrakraniální solidní dětské nádory. Neuroblastomy patří do skupiny embryonálních nádorů vycházejících z buněk neurální lišty, z nichž za fyziologických podmínek vznikají sympatická ganglia a následnou diferenciací například dřeň nadledvin. Neuroblastomy jsou velmi heterogenní skupinou nádorů. Liší se především histologicky – buňky dosahují různého stupně „maturace“, a tedy různého stupně malignity. Neuroblastomy nízkého a středního rizika mohou spontánně či indukovaně diferencovat a regredovat (2).

Výskyt neuroblastomu je nejčastěji v retroperitoneu či v paravertebrálních sympatických gangliích. Klinicky se u dětí projevuje zvětšením břicha, horečkou, ztrátou váhy či obecným neprospíváním. První příznaky u starších pacientů mohou být manifestovány až metastázami. Jako prvotní vyšetření při podezření na vývoj neuroblastomu tedy bývají základní zobrazovací metody jako je ultrazvuk, rentgen a počítačová tomografie (CT). Pro neuroblastom jsou charakteristické specifické prognostické znaky, které umožňují zařazení pacienta do příslušné rizikové skupiny. Jsou to například: věk v době diagnózy, „DNA-ploidie“, amplifikace genu „*v-myc avian myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived*“ (*N-myc*), exprese receptoru „*tropomyosin receptor kinasa*“ (*trk*), delecce chromozomu 1p36 a řada dalších delecí a zmnožení specifických chromozomálních oblastí (3). Na základě vyšetření

pacienta se určí tzv. „staging“ onemocnění [v současnosti u nás dle „International Neuroblastoma Staging System“ (INSS)] a podle stádia a biologického typu se vybere adekvátní léčba (4).

Léčba neuroblastomů sledující „staging“ pacienta se opírá o chirurgický zákrok (alespoň pro získání vzorku nádorové tkáně). Často následuje chemoterapie, u nádorů vysokého rizika kombinovaná s radioterapií a megachemoterapií s následnou transplantací autologních hematopoetických progenitorových buněk (tzv. autologní transplantace kostní dřeně).

Buněčné linie odvozené od neuroblastomů vysokého rizika jsou experimentálním modelem často používaným ve výzkumu (obrázek č. 1).



Obrázek č. 1. Tkáňová kultura lidské neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4.

1.2 Chemoterapie nádorů

Již na začátku 20. století zavedl německý chemik Paul Ehrlich nový pojem pro léčbu nemocí pomocí chemických látek, chemoterapii. V průběhu první světové války byl pozorován efekt yperitu na snížení množství bílých krvinek u vojáků, což bylo dále studováno v souvislosti s léčbou leukémií. Již v polovině minulého století bylo zřejmé, že pro léčbu nádorových onemocnění samotná radioterapie a chirurgický zákrok nestačí. Vznikající mikrometastázy bylo možné eliminovat jen komplexní léčbou, tedy nově zavedenou adjuvantní chemoterapií. Samotný obor léčby nádorů a klinické onkologie je tedy poměrně mladý.

Léčba chemoterapií používá látek syntetických, semisyntetických či přírodních. Vzhledem ke zvýšení účinnosti se při léčbě nádorových onemocnění používají tyto látky

v kombinacích, zavádí se tzv. kombinovaná léčba. Ačkoliv by měl být vždy znám mechanismus účinku jednotlivých chemoterapeutik před použitím v klinické praxi, u většiny cytostatik jsou tyto znalosti získávány až dodatečně. Dostačujícím měřítkem účinnosti určité substance je informace o její toxicitě a účinnosti. Konvenční cytostatika rozdělujeme dle mechanismu účinku do čtyř hlavních kategorií. Jsou to látky cílené na buněčnou DNA, inhibitory biosyntézy nukleových kyselin, inhibitory mitózy a inhibitory proteosyntézy. Jednotlivé látky ovšem zpravidla působí více mechanismy (5).

1.2.1 Alkylační a arylační látky

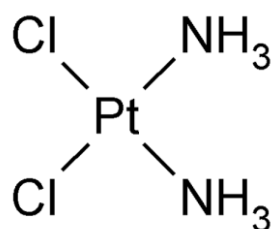
Alkylační a arylační látky mění strukturu a funkci nukleových kyselin. Ovlivňují replikaci a transkripci díky alkylaci nebo arylaci nukleových kyselin. Alkylace a arylace je zásadním mechanismem působení těchto cytostatik. Tyto látky se váží na adenin, cytosin či guanin DNA a mohou tvořit i kovalentní vazbu mezi řetězcí DNA či dvěma molekulami DNA. Vytvořená kovalentní vazba brání fyziologické replikaci DNA a inhibuje buněčné dělení. Buněčné obranné mechanismy mohou tento druh poškození v některých případech opravit vyštěpením pomocí endonukleasy. Některé alkylační a arylační látky inhibují jaderné enzymy - topoisomerasy, zodpovědné za uvolňování torze spirálovité dvoušroubovice DNA. Inhibice těchto enzymů vede k narušení terciární struktury a následně ke zlomům DNA (5). Alkylační a arylační cytostatika jsou vysoce účinná na rychle se proliferující buňky.

Cisplatina

Cisplatina (obrázek č. 2) patří mezi nejpoužívanější cytostatika. Cisplatinou byl první pacient léčený již v roce 1971. Díky vysoké účinnosti je cisplatina používána pro léčení široké škály solidních nádorů. Má ovšem i významné vedlejší účinky, je myelosupresivní, imunosupresivní, neurotoxická – poškozuje sluchový nerv a zvláště nefrotoxická. Vývoj novějších platinových derivátů (oxaliplatin, karboplatin aj.) umožnil snížit některé nežádoucí efekty léčby a částečně překonat chemorezistenci, která může být s léčbou spojena.

Hlavní mechanismus účinku cisplatiny je interkalace do DNA. Cisplatina po bioaktivaci také tvoří adukty s DNA vedoucí dále k tvorbě DNA-protein a DNA-DNA „crosslinku“, a tím poškození DNA. Cisplatina též inhibuje syntézu DNA, transkripci RNA a indukuje apoptózu. Hlavní překážkou v léčbě nádorových onemocnění nejen cisplatinou

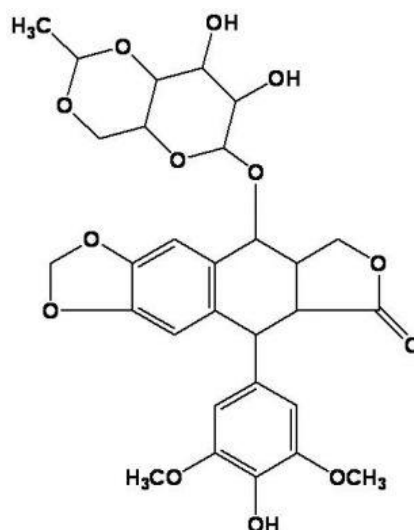
je vznik rezistence. Rezistence vůči cisplatině souvisí se sníženou intracelulární koncentrací tohoto léčiva, která je dána snížením transportu do buněk či naopak zvýšením transportu vně buněk. Zvýšení inaktivace cisplatinu je dalším z mechanismů vzniku rezistence - zvýšené množství glutathionu a metalothioneinů vede ke snížení tvorby aktivní formy cisplatinu v cytoplasmě, a tím i její interakci s jadernou DNA. Také zvýšená oprava poškozené jaderné DNA je považována za další důležitý mechanismus vzniku rezistence vůči cisplatině (6,7).



Obrázek č. 2. Chemická struktura cis-diaminodichlorplatiny (cisplatinu).

Etoposid

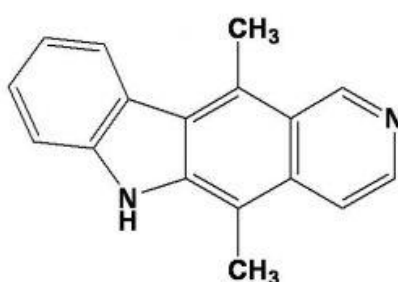
Léčba etoposidem (obrázek č. 3) se začala používat přibližně o deset let později než léčba cisplatinou. Etoposid je derivát podophylotoxinu, látky izolované z naholistu. Hlavním mechanismem účinku je inhibice topoisomerasy II, a tím následná indukce vláknových zlomů v jaderné DNA. Jednovláknové a dvouvláknové zlomy v DNA aktivují proteinkinasy „ataxia telangiectasia and Rad3-related“ (ATR) a „ataxia telangiectasia mutated“ (ATM), které jsou zodpovědné za lokální fosforylaci histonových variant H2AX, znaku dvouřetězcových zlomů (8). Neopravené změny v DNA aktivují proces programované buněčné smrti, apoptózu. Rezistence vůči etoposidu vzniká například mechanismem zvýšení exprese genu „mouse double minute 2 homolog“ (*MDM2*), kódujícího ubiquitinligasu, která váže topoisomerasu II inaktivovanou etoposidem a vede k její degradaci (9).



Obrázek č. 3. Chemická struktura etoposidu; 4'-demethyl-epipodophyllotoxinu 9-[4,6-*O*-(*R*)-ethyliden-beta-D-glukopyranosid], 4'-(dihydrogen fosfátu).

Ellipticin

Ellipticin (obrázek č. 4) je rostlinný alkaloid izolovaný z rostlin čeledi toješťovitých, který sám i jeho deriváty vykazují protinádorový efekt. V klinické onkologii se díky své toxicitě a vysoké hydrofobicitě příliš nepoužívá, v současné době se hledají různé modifikace ellipticinu či konjugace s nanočásticemi, které mají za cíl zvýšit jeho dostupnost v organismu (10). Ellipticin účinkuje díky interkalaci do DNA, inhibici topoisomerasy a tvorbě kovalentních aduktů s DNA (11,12).



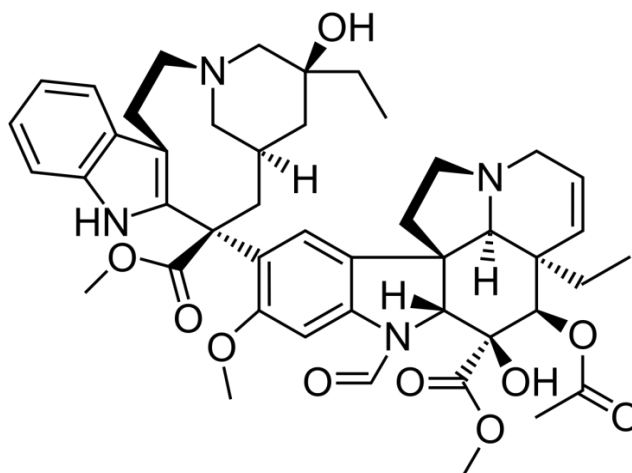
Obrázek č. 4. Chemická struktura ellipticinu, 5,11-dimethyl-6*H*-pyrido[4,3-*b*]karbazolu.

1.2.2 Inhibitory mitózy

Látky ovlivňující strukturu a funkci mikrotubulů zasahují především v průběhu mitózy buněk. Funkce dělicího vřeténka je závislá na správné funkci mikrotubulů. Inhibitory mitózy mění fyziologickou polymerizaci a depolymerizaci mikrotubulů (5).

Vincristin

Vincristin (obrázek č. 5) je látkou ze skupiny tzv. „vinca“ alkaloidů, tedy sloučenin izolovaných z rostliny barvínek. Vincristin se váže na tubulin, a tím znemožňuje jeho polymeraci a indukuje zástavu buněčného cyklu ve fázi mitózy. Díky jinému mechanismu účinku oproti alkylačním látkám jej lze použít pro překonání chemorezistence nádorových buněk (13).



Obrázek č. 5. Chemická struktura vincristinu, (3aR,3a1R,4R,5S,5aR,10bR)-methyl 4-acetoxy-3a-ethyl-9-((5S,7S,9S)-5-ethyl-5-hydroxy-9-(methoxykarbonyl)-2,4,5,6,7,8,9,10-octahydro-1H-3,7-methano[1]azacykloundecino[5,4-b]indol-9-yl)-6-formyl-5-hydroxy-8-methoxy-3a,3a1,4,5,5a,6,11,12-oktahydro-1H-indolizino[8,1-cd]karbazole-5-karboxylátu.

1.2.3 Inhibitory proteosyntézy

Inhibicí proteosyntézy dochází k zástavě buněčného cyklu nádorových buněk a indukci buněčné smrti. Klinicky se z těchto inhibitorů využívá pouze enzym L-asparginasa v léčbě akutní lymfoblastické leukemie. Cílená „deplece“ L-asparaginu a jeho přeměna na amoniak a kyselinu asparagovou vede k buněčné smrti nádorových buněk. Nádorové buňky mají vysoké nároky na spotřebu asparaginu a enzym L-asparginasa způsobí jeho snížení a následné „vyhladovění“ nádorových buněk (14).

1.2.4 Inhibice biosyntézy nukleových kyselin

Inhibice syntézy RNA a DNA může probíhat na několika úrovních. Cytostatické látky mohou mít vliv na biochemické reakce intermediárního metabolismu nukleotidů působením na enzymy v něm zapojené či mohou být inkorporovány do řetězce nukleových kyselin. Patří sem purinová a pyrimidinová analoga, analoga kyseliny listové apod. (5).

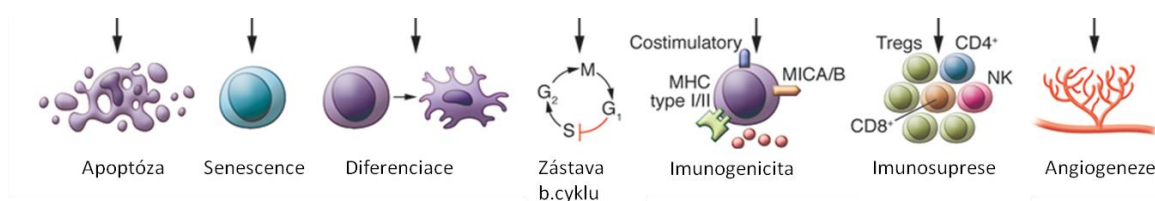
1.3 Inhibitory histondeacetylas v nádorové terapii

Epigenetické změny jsou zdrojem vzniku některých typů chemorezistence nádorových buněk. Epigenetické modifikace ovlivňují transkripci genů a jsou v současné době zkoumány jako slibné protinádorové cíle. Mezi epigenetické modifikace patří acetylace, methylace, fosforylace, ubiquitinylace a sumoylace. Enzymy zodpovědné za epigenetickou regulaci jsou v nádorových buňkách často změněné genovou mutací či změnou exprese enzymu na proteinové úrovni. Díky tomu jsou také některé druhy nádorů citlivé na látky, které zasahují do epigenetických regulací buňky. Mezi ně patří například inhibitory histondeacetylas (HDAC). Mění uspořádání chromatinu inhibicí HDAC a ovlivňují transkripci genů včetně tumorových supresorových genů a protoonkogenů. Rovnováhu mezi acetylací a deacetylací histonů udržují za fyziologických podmínek enzymy HDAC a histonacetyltransferasy (HAT), které katalyzují přenos acetylové skupiny z acetylkoenzymu A na lysiny histonů a také některých nehistonových proteinů (15). U některých nádorových onemocnění byla prokázána zvýšená exprese HDAC, což resultuje v horší prognózu a zkrácením přežití pacientů (13).

Inhibitory enzymů HDAC mohou být dle chemické struktury klasifikovány do čtyř základních skupin. Rozdělujeme hydroxamové kyseliny [např. trichostatin A (TSA), vorinostat (SAHA)], alifatické kyseliny [např. kyselina valproová/valproát sodný (VPA), butyrát sodný (NaB)], benzamidy [např. entinostat (MS-275), mocetinostat (MGCD0103)] a cyklické tetrapeptidy (např. romidepsin, apicidin) (17).

Inhibitory HDAC mohou v buňkách vyvolat mnohočetnou odpověď v závislosti na typu inhibitoru, dávce a typu nádorových buněk (obrázek č. 6).

mechanismy účinku inhibitorů HDAC



Obrázek č. 6. Různé mechanismy účinku inhibitorů HDAC na nádorové buňky. Převzato z (18) a upraveno.

Při nízkých netoxických koncentracích ovlivňují tyto inhibitory HDAC acetylaci histonových proteinů, což souvisí se změnou transkripční aktivity. Mění transkripci přibližně 2-10 % genů (19). Inhibitory HDAC mění acetylaci i nehistonových proteinů a ovlivňují tak jejich stabilitu, aktivitu a interakci s vazebnými partnery. Vyšší koncentrace inhibitorů HDAC indukují různé druhy programovaných buněčných smrtí, apoptózu, senescenci či autofagii (obrázek č. 6). Indukce apoptózy je spojená se změnou transkripce proapoptotických a antiapoptotických genů. Mechanismus aktivace apoptotických drah inhibitory HDAC vychází z vnější receptorové i vnitřní mitochondriální dráhy a také zvýšenou produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS). Inhibice HDAC je často spojená s indukcí exprese tumorového supresoru p21, inhibitoru cyklin-dependentních kinas, což vede k zástavě buněčného cyklu nádorových buněk nejčastěji ve fázi G₀. Zvýšení acetylace histonů v oblasti promotoru genu *p21* usnadňuje navázání transkripčního faktoru a jeho přepis (20). Inhibice HDAC mění chování hypoxických nádorových buněk. Hyperacetylace proteinu „heat shock protein 90“ (HSP90) zvyšuje afinitu jeho vazby na faktor 1 α indukovaný hypoxií (HIF-1 α), což akceleruje jeho degradaci (21).

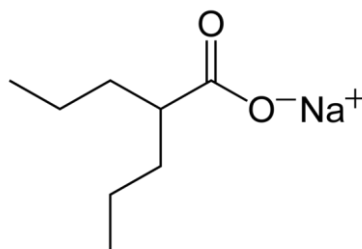
Změna acetylace histonů inhibitory HDAC je v posledních letech intenzivně zkoumána pro své všestranné protinádorové působení. Americký ústav pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) schválil vorinostat, belinostat a romidepsin (inhibitory HDAC) pro léčbu některých T lymfomů. Další inhibitory HDAC jsou v různých fázích klinického testování. V klinické onkologii je léčba nádorových onemocnění kombinací více druhů cytostatik běžná. Na základě testů *in vitro* a *in vivo* se ukazuje, že by především kombinace konvenční chemoterapie s inhibitory HDAC měla mít významný klinický přínos. Vhodná kombinace vede k aditivnímu či dokonce synergistickému efektu při zachování nízkých nežádoucích účinků (22). Jedním z mechanismů potenciace účinku cytostatik je vliv na geny reparační homoloni rekombinace a nehomoloni dvouvláknové reparační. Inhibitory

HDAC snižují expresi genů kódující proteiny reparace jako Ku86, „breast cancer 1“ (BRCA1) či „DNA repair protein RAD51 homolog 1“ (hRAD51) (23,24).

Kyselina valproová

Kyselina valproová a její sůl valproát (obrázek č. 7) byla poprvé syntetizována v roce 1881 americkým chemikem Burtonem (25). V polovině minulého století Georg Carraz objevil antikonvulzivní účinky valproátu a tato látka se tak začala testovat v léčbě epilepsie a později i poruch nálad, depresí a bipolárních poruch (26). Valproát byl jako antiepileptikum schválen ve Francii již v roce 1967. V začátcích byl podáván ve formě kyseliny valproové, později jako sodná či hořečnatá sůl. Z farmakologického hlediska valproát pravděpodobně působí na systém receptorů gamma aminomáselné kyseliny (GABA). Valproát inhibuje transaminasy GABA zodpovědné za degradaci kyseliny gamma aminomáselné, a tím zvyšuje její množství v okolí nervových synapsí, kde působí jako inhibiční neurotransmitter (27). Přesný mechanismus působení je ovšem stále neznámý.

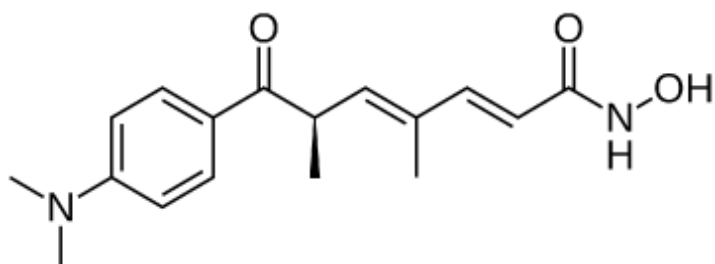
Valproát je v posledních letech zkoumán pro svou aktivitu inhibovat HDAC a z toho plynoucí protinádorový efekt. Je testován pro použití v monoterapii, jeho využití má ale potenciál především v kombinované protinádorové léčbě.



Obrázek č. 7. Chemická struktura valproátu, sodium 2-propylpentanoátu.

Trichostatin A

Trichostatin A (obrázek č. 8) je antifungicidní antibiotikum, látka produkovaná bakteriemi *Streptomyces hygroscopicus*. Antibiotické účinky trichostatinu A byly zjištěny již v roce 1976, kdy byl poprvé izolován (28). Později (v roce 1990) byly zjištěny jeho inhibiční účinky na enzymy HDAC. TSA již v nanomolárních koncentracích zvyšuje acetylaci histonů v savčích buňkách (29).



Obrázek č. 8. Chemická struktura trichostatínu A; 7-[4-(dimethylamino)phenyl]-N-hydroxy-4,6-dimethyl-7-oxohepta-2,4-dienamidu.

1.4 Nádory a metabolismus v nádorových buňkách

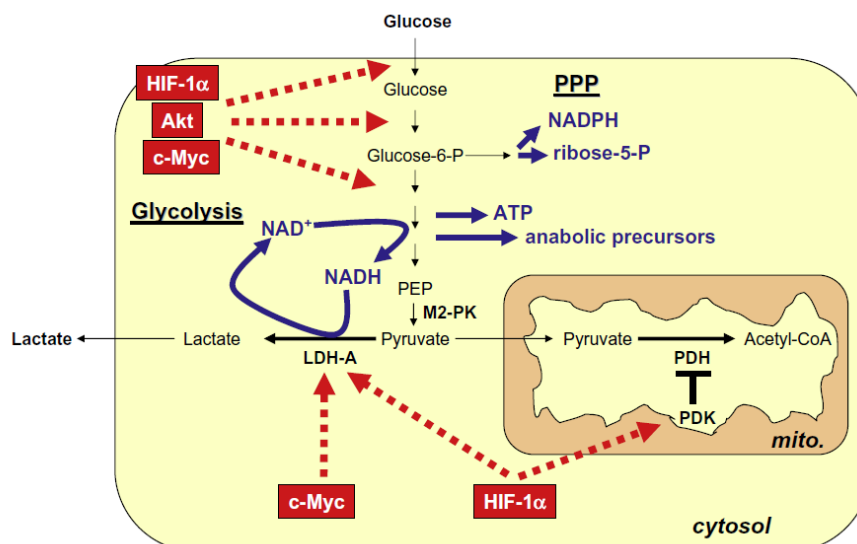
Díky rozvoji metod sekvenace nové generace je zřejmé, že nádorová onemocnění jsou velmi heterogenní lišící se v bodových mutacích, translokacích, amplifikacích či delecích genů. Soubor různých změn může ovšem vést k rozvoji histopatologicky identických nádorů. Mnohačetné změny v genomu buněk zasahují do různých signalizačních drah, což výrazně znemožňuje využití jednotné cílené molekulární léčby a spíše vyžaduje komplexní zásah v rámci jedné buňky. Zásah do nádorového metabolismu, který je podobný tomu v rychle se prolifерujících zdravých buňkách, může být vhodný léčebný cíl. Nádorové buňky jsou ovšem metabolicky flexibilnější a dokáží proliferovat i za velice nepříznivých nutričních podmínek, ke kterým dochází v solidních nádorech díky nedostatečné vaskularizaci (30).

Dang ve své práci (31) teoreticky vysvětluje, jaký mají vztah buněčný metabolismus a nádorová onemocnění. Vychází ze zjištění porovnávající velikosti různých savců (slon a myš) a jejich basální metabolickou spotřebou. Počátek embryonálního vývoje myši a slona je stejný, vajíčko oplozené spermií obou savců má přibližně stejnou velikost. Množství buněčného dělení, které je zapotřebí v průběhu ontogeneze slona a myši, je ale zásadně odlišný. Pokud tedy budeme vycházet z předpokladu, že se s přibývajícím množstvím buněčného dělení zvyšuje pravděpodobnost výskytu mutace a tedy i rozvoje nádorového onemocnění, sloni by měli být dle Danga k nádorovým onemocněním více náchylní. Statistiky ovšem ukazují opak. Tento paradox vysvětluje Dang rozdílným pronikáním živin do tkání velkých a malých zvířat, a tím i basální metabolickou spotřebou. V organismu myši je tedy pronikání živin v celém těle stejnoměrné a metabolická aktivita buněk tedy vyšší, což souvisí s vyšším oxidačním stresem a výskytem mutací, a tím i incidencí nádorů u myši (31,32).

Charakteristický znak metabolismu v nádorových buňkách je anaerobní glykolýza, kterou popsal Otto Warburg již v roce 1926 (33). Oproti normálním buňkám, které většinu metabolické energie získávají přeměnou oxidačně dekarboxylovaného pyruvátu na acetyl koenzym A v dýchacím řetězci v mitochondriích, nádorové buňky dokážou efektivně produkovat velké množství ATP anaerobní glykolýzou v cytoplasmě. Nádorové buňky tak produkují velké množství laktátu i za normoxických podmínek. Zvýšená exprese genů enzymů glykolýzy byla pozorována přibližně v 70 % všech lidských nádorových onemocnění (34). Přeměna pyruvátu na laktát je ovšem méně energeticky výhodná. Nádorové buňky potřebují přijmout větší množství glukózy, které je spojeno s potřebou většího množství transportérů glukózy na membránách buněk. Zvýšený příjem glukózy nádorovými buňkami je využíván pro diagnostiku a vizualizaci nádorů. Používá se deoxyglukóza značená ¹⁸fluorem, která je detekována pozitronovou emisní tomografií a nádorová tkáň je následně digitálně vykreslena.

Otto Warburg při svém pozorování opomenul glutaminolýzu a glutamin, který je nyní považován za další důležitý metabolit a za základní bioenergetický a anabolický substrát v nádorových buňkách (35).

Přímá závislost zvýšené proliferace, invazivity, metastazování nádorových buněk a zvýšené potřeby bioenergetických zdrojů je v současné době jeden z cílů protinádorové terapie. Jakýkoli specifický inhibitor, který selektivně inhibuje klíčové metabolické enzymy, může redukovat nádorovou populaci.



Obrázek č. 9. Glykolýza a metabolická změna v intenzivně proliferujících nádorových buňkách. Za přepis genů enzymů intermediárního metabolismu jsou zodpovědné především transkripční faktory HIF-1 α a „v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog „ (Myc). Dochází tak ke změnám v pentosofosátovém cyklu (PPP) a změnám enzymů jako jsou například: laktátdehydrogenasa A (LDH-A); pyruvátdehydrogenasa (PDH); PDH kinasa (PDK). (PEP) fosfoenolpyruvát; (Akt) „v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1“; (M2-PK) „pyruvate kinase isoenzyme type M2“. Převzato z (36).

Za metabolickou změnu nádorových buněk jsou zodpovědné zejména geny ze skupiny onkogenů a tumorsupresorových genů. Jsou to například geny *Myc*, *HIF-1 α* (obrázek č. 9), „nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells“ (*NF- κ B*), „v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1“ (*Akt1*), fosfatidylinositol kinasa 3 (*PI3K*), „mammalian target of rapamycin“ (*mTOR*) či „Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog“ *KRAS* (37).

Jedním z důvodů tvorby nádorů je bezpochyby nerozpoznání nádorových buněk imunitním systémem. Dochází k nedostatečné stimulaci buněk prezentující antigen (APC), nádorové buňky zvyšují expresi imunopresivních cytokinů [„transforming growth factor β “ (TGF- β), interleukin 10 (IL-10), apod.] a inhibují imunitní odpověď (38,39). Bylo také zjištěno, že extracelulární laktát produkovaný hojně nádorovými buňkami je schopný inhibovat diferenciaci monocytů ve zralé dendritické buňky (40). Navíc buněčná sekrece laktátu pomocí monokarboxylátového transportéru (MCT) je doprovázena přenosem vodíkových kationtů. Snížení extracelulární koncentrace pH v okolí nádorových buněk tak vede k redukci funkce cytotoxických T-lymfocytů (41).

1.4.1 Gen *N-myc* a jeho role v neuroblastomech a metabolismu

Protein N-myc patří do rodiny proteinů Myc, které mohou regulovat přibližně 10 - 15 % celého genomu (42). N-myc je transkripční faktor vázající DNA. Bývá amplifikovaný v části neuroblastomů, tato amplifikace v nádorech značí horší prognózu onemocnění. Amplifikace genu *N-myc* může být extrachromozomální, tvořící v jádře tzv. „double minutes“ či v chromozomech tvoří homogenně se barvící oblasti („homogeneously staining regions“). Amplifikovaného genu *N-myc* je v nádorové buňce průměrně 10-400x více než v buňce zdravé (43).

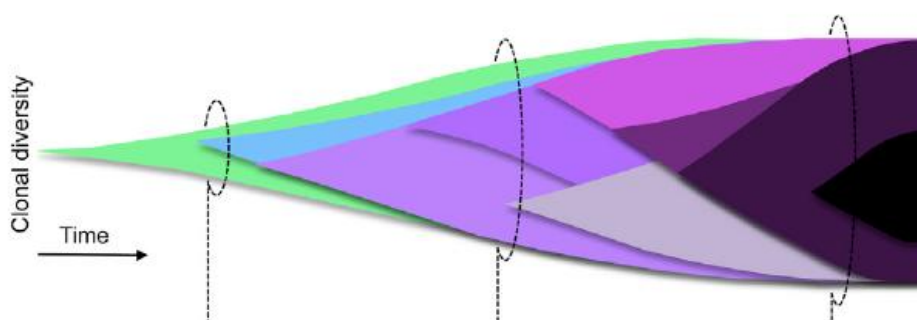
Amplifikace protoonkogenu *N-myc* je pro tvorbu neuroblastomu v některých případech zásadní. Experimenty v transgenních myších ukazují, že samotné zvýšení exprese proteinu N-myc v neuroektodermálních buňkách vede k iniciaci neuroblastomů (44). Naopak cílené snížení exprese *N-myc* použitím „antisense“ oligonukleotidů snížilo proliferaci nádorových buněk linie IMR-32 a množství nádorové tkáně v transgenních myších (45). Gen *N-myc* je díky tomu důležitý cíl protinádorové terapie neuroblastomů. Nicméně k dnešnímu dni není specifická inhibice genu *N-myc* pomocí oligonukleotidů „antisense“ vlákna používána léčebně.

Transkripční faktory z rodiny Myc kontrolují přepis stovek genů a miRNA, které jsou zodpovědné za metabolickou adaptaci buněk, kontrolu buněčného cyklu, apoptózu a proliferaci. Řada studií ukazuje, že Myc je klíčový pro transport glukózy, glykolýzu, glutaminolýzu a syntézu mastných kyselin. Myc také přímo stimuluje přepis genů pro ribosomální biogenezi a metabolismus nukleotidů (31). V průběhu tumorigeneze transkripční faktor N-myc zvyšuje proliferaci buněk aktivací cyklinu D1 a D2 a ovlivněním cyklin-dependentní kinasy 4 (CDK4) (46). Transkripční faktor N-myc přepisuje glykoprotein „multidrug resistance associated protein 1“ (MRP1), který patří do skupiny transportérů „ATP binding cassette“ (ABC) a podílí se na zvýšení chemorezistence nádorových buněk (47). Transkripční faktor Myc zvyšuje expresi genu *HDAC2* či „vascular endothelial growth factor“ (*VEGF*) (48). Protein Myc se váže na elementy „E-box“ v DNA spolu s vazebným partnerem „myc-associated factor X“ (Max). Také další proteiny interagují s Myc. Jsou to například HAT, které zvyšují acetylaci histonů H3 a H4 (49).

Proteinová exprese N-myc je regulována na úrovni fosforylace threoninu v pozici 58 a serinu v pozici 62 v jeho molekule. Fosforylace těchto aminokyselin je důležitá pro stabilitu a aktivitu proteinu N-myc (50).

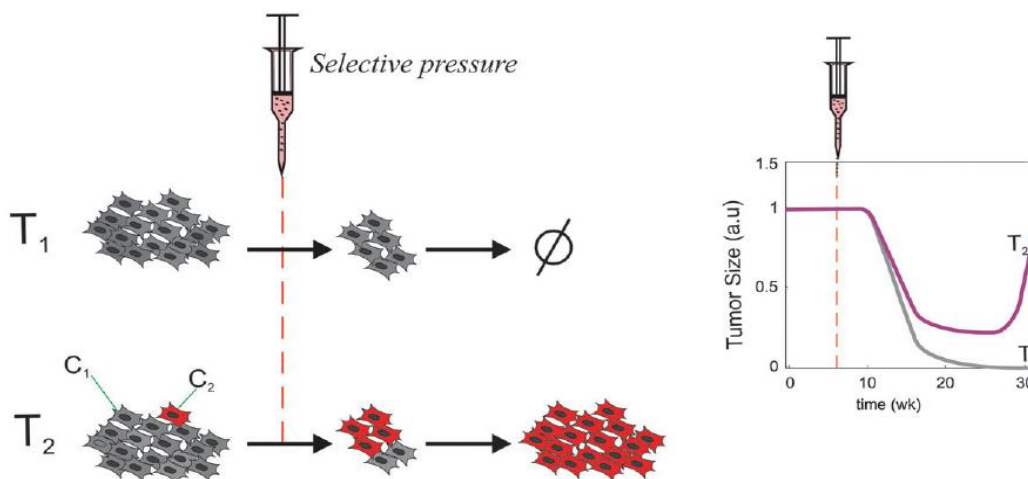
1.5 Heterogenita nádorové tkáně

V posledních letech se část vědecké pozornosti přesunula na sledování heterogenity nádorové tkáně. Nádorová tkáň často vykazuje genetickou i epigenetickou heterogenitu, která tak může být jednou z příčin relapsu nádorového onemocnění. Heterogenita se vztahuje nejen na buňky samotné, ale také na nově vznikající nádorová mikroprostředí s různou dostupností kyslíku, změnami pH či s různými koncentracemi glukózy a jiných metabolitů. Tyto podmínky vytvářejí ideální prostředí pro tzv. mikroevoluci nádorových buněk. Samotný vznik heterogenity nádorové tkáně je přirovnáván k Darwinistické evoluci, kdy některé buňky získají náhodnou mutací výhodu nad ostatními a po nějakém čase expandují (obrázek č. 10) (51).



Obrázek č. 10. Schematické znázornění heterogenní struktury solidních nádorů. Tento model ukazuje hypotetický vývoj různých „subklonů“ nádoru v čase, kdy je na začátku „subklon“ schopný růst nekontrolovaně přes buňky zdravé tkáně (zeleně). Postupem času se vlivem různých selekčních tlaků „vytváří“ subklony schopné adaptace. Převzato a upraveno z (52).

Heterogenita nádoru se odráží v jeho citlivosti na léčbu (obrázek č. 11) (53). Při protinádorové léčbě tak může dojít k selekci klonů nádorových buněk, které neodpověděly na léčbu a po čase mohou způsobit recidivu onemocnění.



Obrázek č. 11. Schematické znázornění léčby dvou obdobných nádorů T1 a T2. Po genotoxickém stresu vyvolaným například chemoterapií dochází k vymizení nádoru T1. Nádor T2 obsahuje subpopulaci buněk C2 geneticky či epigeneticky odlišnou a rezistentní vůči chemoterapii. Ta po určité době roste a získává svoji původní velikost. Převzato z (53).

V této souvislosti vznikl nový fenomén při léčbě nádorových onemocnění. Jedná se o tzv. opakovanou odpověď na léčbu („retreatment response“) na různé druhy cytostatik. Některé nádorové buňky se pravděpodobně při léčbě změny do stavu, kdy dokážou stresové stimuly v podobě protinádorové léčby přežít. Následně se reversibilně vrátí do stavu s vysokou mírou proliferace při zachování citlivosti na původní léčbu. Tato reversibilita může být dána dynamickými epigenetickými změnami přeživších nádorových buněk. Sharma se spolupracovníky popisuje (54), že některé persistující nádorové buňky jsou významně citlivé na epigenetickou změnu indukovanou inhibicí HDAC a poukazuje na jejich terapeutickou důležitost pro zamezení některých případů relapsu nádorových onemocnění.

Giudice se spolupracovníky uvádí (55), že změna acetylace histonů trichostatinem A v nádorových buňkách karcinomů hlavy a krku redukuje množství tzv. nádorových kmenových buněk. Právě ty jsou dle některých teorií zodpovědné za plasticitu nádorů a jejich schopnost sebeobnovy po protinádorové léčbě. Inhibice HDAC by tak mohla být vhodným cílem pro eliminaci populace nádorových kmenových buněk a mohla by redukovat heterogenitu nádorové tkáně.

1.6 Hypoxická mikroprostředí v solidních nádorech

Zabezpečení tkání kyslíkem je za fyziologických podmínek téměř homogenní. Kyslík je nezbytný pro mitochondriální oxidační fosforylaci, která produkuje velké

množství ATP. Rychlý růst solidních nádorů je spojen s nedokonalou vaskularizací, a s tím souvisejícím nedostatečným zásobením buněk kyslíkem. Nádorová hypoxie patří mezi nezávislé prognostické znaky a je často spojena s horší prognózou onemocnění. Nádorové hypoxické mikroregiony jsou charakteristické zvýšenou radio- a chemorezistencí. Hypoxické mikroprostředí umožňuje mutagenezi buněk, a s tím související geneticko-epigenetickou selekci. Nádorové hypoxické buňky se vyznačují také změnou metabolické strategie, která je ovlivněna transkripční změnou zejména transkripčním faktorem HIF-1 α (56). Nádorová hypoxie je jedním z nejlépe charakterizovaných protinádorových cílů, nicméně je stále velkou překážkou v úspěšné léčbě nádorových onemocnění.

Buňky reagují na snížené množství kyslíku zástavou buněčného cyklu, snížením oxidační fosforylace a zvýšením glykolýzy a také produkcí angiogenních faktorů, které stimulují tvorbu kapilár v nádoru, a tím zvyšují přísun kyslíku z krve.

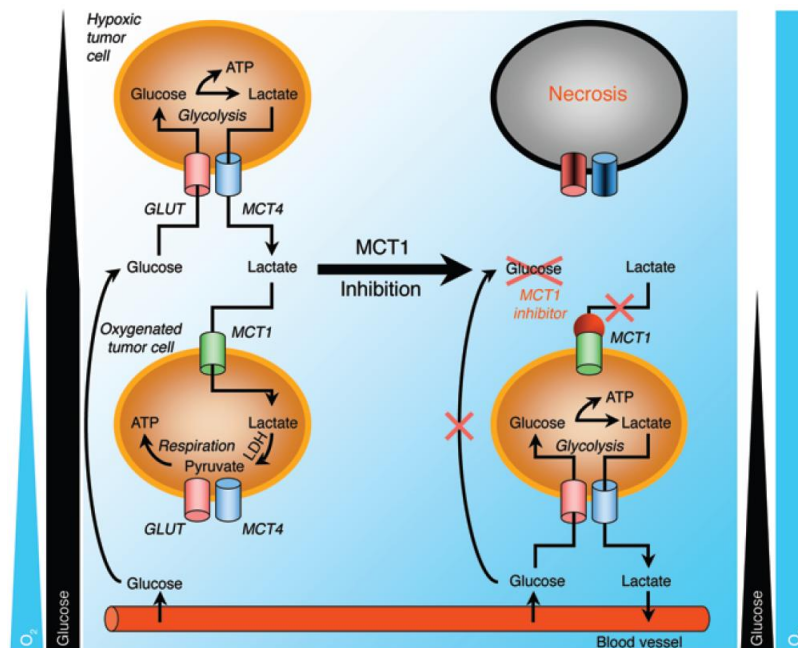
Specifické charakteristiky hypoxického prostředí lze využít jako selektivní nástroj pro aktivaci bioredukčních léčiv. Další možnou strategií pro eliminaci hypoxických buněk je inhibice molekulárních drah zodpovědných za hypoxickou adaptaci. Nádory se adaptují na hypoxii změnou exprese některých genů, přičemž mezi klíčové patří gen *HIF-1 α* , který je ovlivňován koncentrací kyslíku v buňce a determinuje aktivitu transkripčního komplexu HIF. Při nedostatku kyslíku je konstitutivně exprimovaný HIF-1 α stabilizován (aktivita prolylhydroxylasy je inhibována) a translokován do jádra, kde dimerizuje s podjednotkou HIF-1 β a s dalšími koaktivátory [p300, „CREB binding protein“ (CBP)] tvořící aktivovaný transkripční faktor. Ten se váže na „hypoxia responsible elements“ (HRE) a přepisuje geny především hypoxické adaptace. Jsou to například: „vascular endothelial growth factor A“ (VEGFA); transportér glukózy 1“ (GLUT1); LDH-A; hexokinasa 1 (HK1); „carbonic anhydrase 9“ (CA9) a cyclin G2 (57,58). Transkripční faktor HIF-1 α hraje klíčovou roli také za fyziologických podmínek a při adaptaci na nedostatečné zásobení kyslíkem v různých stádiích embryogeneze či ve svalové tkáni.

Zvýšená hladina HIF-1 α je spojena s horší prognózou nádorových onemocnění. Ztráta funkce proteinu „phosphatase and tensin homolog“, (PTEN) či proteinu p53 vede ke zvýšení exprese a stabilizace HIF-1 α i za nehypoxických (normálních) podmínek. Také změny v signální dráze mTOR zvyšují translaci HIF-1 α . Nejzásadnější a nejčastější zvýšení proteinu HIF-1 α je způsobeno ztrátou funkce proteinu „Von Hippel–Lindau“ (VHL). Ztráta či dysfunkce VHL vede k porušení regulační dráhy stabilizace HIF-1 α kyslíkem, a je tudíž transkripčně aktivní i za normoxických podmínek (56). V nádorech je

navíc často změněn gen kódující sukcinátdehydrogenasu a fumaráthydratasu. Jejich změna se může podílet na stabilizaci HIF-1 α díky zvýšení koncentrace intermediátů citrátového cyklu, a tím inhibovat prolyl hydroxylasovou aktivitu (59).

Sonveaux se spolupracovníky ve své práci (60) uvádí zajímavý protinádorový cíl. Jedná se o transportér MCT1, který je zodpovědný za metabolickou symbiózu mezi hypoxickými nádorovými buňkami produkujícími anaerobně laktát. Ten je pomocí MCT1 transportován do aerobních nádorových buněk v části nádoru zásobené kyslíkem (obrázek č. 12). Výměna laktátu mezi hypoxickými a normoxickými buňkami je obdobná fyziologickému zpracování laktátu v buňkách tzv. bílé a červené svaloviny.

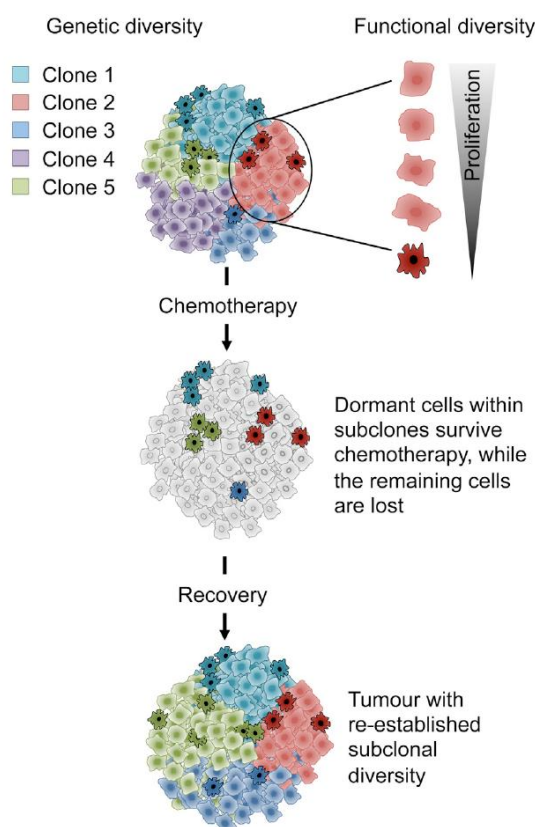
Rezistence k cytostatikům indukovaná hypoxií a zapojení HIF-1 α transkripčního faktoru do tohoto mechanismu je v současné době ve fázi výzkumu. Použitím metody siRNA a umlčení genu *HIF-1 α* vedlo k redukci chemorezistence indukované hypoxií v nádorových buňkách *in vitro* (61).



Obrázek č. 12. Schematické znázornění metabolické symbiózy mezi hypoxickými a normoxickými nádorovými buňkami. Laktát produkovaný hypoxickými buňkami je zpracován aerobními buňkami oxidační fosforylací. Inhibice MCT1 je slibný protinádorový cíl pro redukci populace hypoxických nádorových buněk. (GLUT) transportér glukózy; (MCT) monokarboxylátový transportér; (LDH) laktátdehydrogenasa. Převzato z (60).

1.7 Nádorové kmenové buňky

Tvorba nádorových kmenových buněk je považována za velmi aktuální ovšem dosud nepřilíživě probádané téma. Bylo zjištěno, že nádory bohaté na nádorové kmenové buňky jsou agresivnější, mají horší prognózu a jsou rezistentnější vůči chemoterapii (obrázek č. 13) (62). V současnosti je stále kontroverzní, jakou mají nádorové kmenové buňky molekulovou charakteristiku, jaké mají povrchové znaky apod. Nádorové kmenové buňky jsou charakteristické vyšším transportem toxických látek vně buněk. Je to dáno zvýšeným množstvím transportérů ABC v cytoplasmatické membráně (63).



Obrázek č. 13. Schematické znázornění genetické a funkční heterogenity v rámci jednoho solidního nádoru. Obrázek popisuje další z hypotetických modelů obnovení nádoru po indukci cytotoxického stresu ve formě chemoterapie. Přežijí pouze nádorové kmenové buňky jednotlivých „subpopulací“, které se mohou dále rozrůst. Převzato z (52).

Pro gliomové nádorové kmenové buňky je charakteristický povrchový marker CD133 (prominin-1). Jeho zvýšená exprese je přímo spojena s horší prognózou pacienta (64). Molekula CD133 je transmembránový glykoprotein nacházející se na povrchu normálních i nádorových buněk. Jeho přesná funkce či ligand není v současné době známý.

Protein CD133 je často používaný znak nádorových kmenových buněk u nádorů střev, pankreatu, jater, kůže a prostaty a také neuroblastomu (65–67).

2 CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem předkládané disertační práce bylo prohloubení znalostí mechanismu působení vybraných inhibitorů HDAC (valproát, trichostatin A a entinostat) a cytostatik (etoposid, cisplatina a ellipticin) na buněčné nádorové linie neuroblastomů.

V rámci této disertační práce byly řešeny následující problematiky:

- Studium vlivu nedostatku kyslíku na neuroblastomy.
- Studium změny exprese transkripčních faktorů N-myc a HIF-1 α v neuroblastomových buňkách.
- Vliv valproátu na expresi molekuly CD133, znaku nádorových kmenových buněk.
- Vliv inhibitorů histondeacetylasy na protinádorové působení cytostatik.
- Sledování mechanismu vzniku rezistence neuroblastomů vůči ellipticinu.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Použité chemikálie

Amresco (Solon, Ohio): dimethylsulfoxid

Biorad (Herkules, CA, USA): hovězí sérový albumin (BSA)

GIBCO Life Technologies, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA): „Hanks' balanced salt solution" (HBSS), „Iscove's modified Dulbecco's mediu" (IMDM), „phosphate buffered saline" (PBS), fetální bovinní sérum (FBS), dodecylsulfát sodný (SDS)

Merck Millipore (Darmstadt, Německo): kyselina sírová

Penta (Praha, ČR): kyselina octová, roztok Giemsa-Romanowski, methanol

PLIVA-Lachema (Brno, ČR): cisplatina (CDDP), kyselina chlorovodíková

Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO, USA): KCl, NaCl, MgCl₂, Tris, dithiothreitol (DTT), kyselina trichloroctová (TCA), glycin, ellipticin (ELLI), valproát sodný (VPA), valpromid (VPM), trichostatin A (TSA), etoposid (ETO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromid (MTT), Triton X, 1,2-bis(dimethylamino)ethan (TEMED), formaldehyd, butyrát sodný (NaB), chloroquin (CQ), bafilomycin A (BAF), wortmannin (W), entinostat (MS-275), vorinostat (SAHA)

TEVA Pharmaceuticals (Praha, ČR): vincristin (VCR)

Lidské neuroblastomové linie UKF-NB-3 a UKF-NB-4 s amplifikací genu *N-myc* byly získány darem od prof. J. Činátla Jr. (J.W. Goethe University, Frankfurt, Německo). Neuroblastomová linie SK-N-AS byla z komerčních zdrojů [American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)].

3.2 Kultivace buněčných linií

Neuroblastomové buněčné linie byly pěstovány v „Iscove's modified Dulbecco's mediu" (IMDM) s 10% fetálním bovinním sérem (FBS) při 37 °C, 5 % CO₂ a 95 % vlhkosti vzduchu. Použité neuroblastomové linie rostou „adherentně" na povrchu kultivačních nádob. Pro jejich uvolnění byly buňky omyty „phosphate buffered saline" (PBS) a použit trypsin. Pasážování buněk probíhalo podle potřeby, většinou v třídených intervalech, vždy po kontrole hustoty buněk optickým inverzním mikroskopem Olympus

IX51 (Olympus, Tokyo, Japan). Všechny experimenty byly provedeny s buněčnými liniemi rostoucími v hustotě pokrytí kultivační plochy od 70 do 90 %.

Linie UKF-NB-4 rezistentní vůči ellipticinu (UKF-NB-4^{ELLI}) byla připravena kolegyní RNDr. Jitkou Poljakovou, Ph.D. kultivací buněk se zvyšující koncentrací ellipticinu (0,2 - 2,5 μ M) (68). Rezistence buněk vůči ellipticinu byla ověřena sledováním viability buněk pomocí metody založené na konverzi 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazolium bromidu (MTT).

3.3 Testování viability buněk pomocí MTT testu

MTT test používá principu založeného na metabolismu živých buněk 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 difenylnitrazolium bromidu na barevný produkt formazan. Pro zjištění hodnot IC_{50} jednotlivých látek je měřena absorbance vzorků při vlnové délce 570 nm. Experiment byl vždy připraven v 96jamkové destičce, kde do 1. sloupce mikrotitrační destičky bylo pipetováno 100 μ l média a do 2. až 12. sloupce bylo pipetováno 50 μ l média. Do 3. sloupce bylo přidáno 50 μ l média s danou koncentrací testované látky. Následně byla látka ředěna tzv. „dvojkovou řadou“ do všech dalších sloupců destičky. Dále bylo do sloupců 2 až 12 pipetováno 10 000 buněk v 50 μ l média. Mikrotitrační destička byla inkubována 72 hodin v inkubátoru. Kultivace buněk v hypoxických podmínkách (1 % O_2) byla prováděna v hypoxické komůrce C-Chamber BioSpherix (BioSpherix, NY, USA). Poslední 3 hodiny experimentu byla mikrotitrační destička inkubována s 50 μ l roztoku MTT (2 mg/ml PBS). Poté bylo přidáno 100 μ l 50% N,N-dimethylformamidu v 20% dodecylsulfátu sodném (SDS), pH=4,5. Následovala pětiminutová inkubace. Směs byla následně promíchána pipetou a výsledné zabarvení bylo měřeno spektrofotometrem VERSA max (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) při vlnové délce 570 nm. Optická hustota média byla odečtena jako pozadí a hodnota optické hustoty živých kontrolních buněk v druhém sloupci byla brána jako 100 %. Koncentrace látky způsobující padesátiprocentní úmrtnost buněk (IC_{50}) pro jednotlivé látky byla vypočtena programem SoftMax Pro, který je součástí spektrofotometru. V experimentech s kombinací účinku dvou látek byla příslušná látka odebrána a nahrazena jinou dle daného schématu uvedeného u jednotlivých experimentů.

3.4 Sledování viability buněk pomocí systému xCELLigence

Systém xCELLigence RTCA DP Instrument (ACEA Bioscience, San Diego, CA, USA) umístěný v inkubátoru při 37 °C a s 5 % CO₂ byl použit pro monitorování buněčné viability v reálném čase (69). Bylo připraveno 20 000 buněk linie UKF-NB-4 na každou jamku 16jamkové destičky se dnem pokrytým elektrodami. Zvýšené pokrytí dna kultivační jamky buňkami je „prezentováno“ změnou impedance a zaznamenáno formou změny „Cell Indexu“ dané situace v daném čase. Každý experiment (kontrolní kultivace buněk, inkubace buněk s 1 mM VPA, 4 μM cisplatinou a 1 mM VPA v kombinaci s 4 μM cisplatinou) byl proveden v dubletech. Hodnota „Cell Indexu“ (CI) byla monitorována každých 30 minut po dobu celkem 140 hodin a data byla vyhodnocena použitím softwaru RTCA, který je součástí přístroje.

3.5 Detekce apoptózy použitím dvojnásobného značení Annexinem V FITC a propidium iodidem

Pro detekci apoptózy byl použit kit „Annexin V fluorescein isothiokyanate (FITC) Apoptosis Detection Kit“ (Biovision, Milpitas, CA, USA) dle pokynů výrobce. Připravené vzorky buněk byly omyty PBS a „trypsinizovány“. Jednobuněčná suspenze byla po promytí v PBS centrifugována 300 g 2 minuty. Buňky byly resuspendovány ve 100 μl „Annexin binding“ pufru obsahujícím 5 μl Annexin V FITC a 5 μl propidium jodidu (PI). Suspenze byla inkubována 20 minut v temnu při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 400 μl „Annexin binding“ pufru a suspenze byla centrifugována při 300 g 2 minuty. Peleta byla resuspendována v „Annexin binding“ pufru a ihned analyzována cytometrem LSR II (BD, Franklin Lakes, CA, USA). Data byla vyhodnocena programem Flowing (<http://www.flowingsoftware.com/>), Flow Express5 (De Novo Software, Glendale, CA, USA) a FlowLogic (Inivai Technologies, Balcombe, Australie).

Pro detekci apoptózy indukované ellipticinem byl použit stejný postup, ovšem vzhledem vysoké fluorescenci samotného ellipticinu byly použity jiné fluorescenční značky, a to Annexin V Alexa Fluor 647 a 4',6-diamidin-2-fenylyndol (DAPI) – obě od společnosti Exbio (Vestec, ČR).

3.6 Stanovení aktivity caspasy-3

Připravené vzorky buněk byly omyty v PBS a „trypsinizovány“. Jednobuněčná suspenze byla po promytí PBS centrifugována 300 g 2 minuty. Buňky s aktivní caspasou-3 byly detekovány použitím kitu „CaspGLOW Fluorescein Active Caspase-3 Staining Kit“ (eBioscience, San Diego, CA, USA) dle instrukcí výrobce. Buněčná peleta byla resuspendována v 300 μ l IMDM a inkubována 30 minut s 1 μ l DEVD - fluoromethylketonem (DEVD-FMK) značeným FITC při 37 °C a s 5 % CO₂. Poté byly buňky centrifugovány 2 minuty při 300 g a peleta dvakrát promyta „wash“ pufrem (dle návodu). Takto připravené vzorky byly analyzovány průtokovým cytometrem LSR II (BD, Franklin Lakes, CA, USA) a data analyzována programem FlowLogic (Inivai Technologies, Balcombe, Australie).

3.7 Izolace histonů

Pro izolaci jaderných histonů byla použita metoda dle Shechtera (70). Mechanicky „sklizené“ vzorky buněk byly promyty PBS a resuspendovány v 1 ml hypotonického lyzačního pufru [složení: 10 mM Tris pH=8; 1 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 1 mM dithiotreitol (DTT)], který obsahoval proteasový inhibitor Complete (Roche, Bazilej, Švýcarsko). Suspenze byla inkubována 30 minut na otočném stojanu v lednici. Po centrifugaci při 4 °C a 10 000 g po dobu 10 minut byla peleta obsahující jadernou frakci resuspendována ve 400 μ l 0,2 M H₂SO₄. Směs byla inkubována na otočném stojanu v lednici po dobu 30 minut a následně centrifugována při 4 °C a 16 000 g po dobu 10 minut. Supernatant byl přenesen do nové zkumavky a precipitován postupným přikapáváním 132 μ l 100% kyseliny trichloroctové (TCA). Vzorky byly inkubovány na ledu 30 minut a poté centrifugovány při teplotě 4 °C a 16 000 g po dobu 10 minut. Histony zachycené na stěnách zkumavky byly dvakrát opatrně opláchnuty ledovým acetonem. Čisté histony byly sušeny vzduchem při laboratorní teplotě a následně rozpuštěny v 70 μ l destilované vody. Takto připravené vzorky byly uchovány při -80 °C. Druhá použitá metoda pro izolaci histonů je založena na „rozsuspendování“ buněk v 10 mM „HEPES“ pufru (pH=7.9) obsahujícího 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM dithiothreitol a 1,5 mM fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF). Poté byla přidána ke každému vzorku kyselina chlorovodíková až do finální koncentrace 0,2 M. Po 30minutové inkubaci vzorků na ledu byly vzorky centrifugovány při 4 °C a 11 000 g po dobu 10 minut. Supernatant byl dvakrát

dialyzován proti 0,1 M kyselině octové (1 hodinu) a dvakrát proti destilované vodě po dobu dvou hodin a přes noc. Takto připravené vzorky byly uchovány při -80 °C.

Koncentrace histonů byla stanovena metodou stanovení koncentrace proteinů (viz kapitola 3.8).

3.8 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla stanovena metodou dle Lowryho (71). Ke stanovení koncentrace proteinů byla použita sada „DC Protein Assay“ firmy BioRad (Hercules, CA, USA). Dle pokynů výrobce bylo vždy k 5 µl připravených standardů (hovězí sérový albumin) a 5 µl vzorků přidáno 25 µl roztoku A' připraveného smícháním 1000 µl roztoku A s 20 µl roztoku S. Ke všem vzorkům bylo následně přidáno 200 µl roztoku B. Po 15minutové inkubaci za laboratorní teploty a mírného míchání byla měřena absorbance na spektrofotometru VERSA max (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) při vlnové délce 750 nm. Zjištěná data byla vyhodnocena softwarem SoftMax Pro, který je součástí spektrofotometru.

3.9 Analýza exprese proteinů pomocí metody Western-blotting

Připravené vzorky buněk byly mechanicky „sklizeny“ a peleta promyta PBS a resuspendována v pufru „radio immuno precipitation assay“ (RIPA) [25 mM Tris pufr, pH=7,6 obsahující 150 mM NaCl, 1% detergent Igepal CA-630 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 1% deoxycholát sodný a 0,1% dodecylsulfát sodný (SDS)] a s roztokem Complete [proteasový inhibitor (Roche, Bazilej, Švýcarsko)]. Vzorky byly inkubovány 30 minut na ledu a následně centrifugovány při 4 °C a 20 000 g, 20 minut. V supernatantu, který byl použit pro další analýzu, byla stanovena koncentrace proteinů (viz kapitola 3.8). 15 µg proteinů bylo elektroforeticky separováno na komerčních 4-20% TGX gelech (Biorad, Herkules, CA, USA) při 100 mA. Separované proteiny byly přeneseny na nitrocelulóзовou membránu a membrána „blokována“ v 5% odtučněném mléce v PBS. Membrány byly poté inkubovány v mléce s příslušnou primární protilátkou [protilátka proti ATP6V0D1 (1:500, Abcam, Cambridge, UK); protilátka proti CD133 (1:100, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Německo); protilátka proti beta-aktinu (1:2000, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), protilátka proti acetyl-histonu H3 (1:4000 Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY, USA); protilátka proti acetyl-histonu H4

(1:1000, Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY, USA); protilátka proti histonu H3 (1:10 000; Millipore, San Diego, CA, USA). Membrány byly omyty a inkubovány se sekundární protilátkou konjugovanou s peroxidasou (1:2000; BioRad, Hercules, CA, USA). Chemiluminiscenční reakce proběhla pomocí kitu „Immun-Star HRP Substrate“ (BioRad, Hercules, CA, USA) a detekce za použití filmů X-ray MEDIX XBU (Foma, Hradec Kralové, ČR).

3.10 Stanovení koncentrace laktátu

Kultivační médium vzorků buněk bylo odebráno a centrifugací při 300 g, 2 minuty zbaveno nečistot a pevných částic. Vzorky byly analyzovány enzymovou kolorimetrickou metodou pomocí kitu „Lactate Gen.2“ (Roche, Bazilej, Švýcarsko) analyzátozem Integra 400 (Roche, Bazilej, Švýcarsko) v Ústavu lékařské chemie a biochemie 2.LF UK a FN Motol.

3.11 Měření aktivit histondeacetylasy a histonacetyltransferasy

Enzymová aktivita HDAC a HAT byla stanovena dle instrukcí výrobce použitých kitů „HAT Activity Colorimetric Assay kit“ a „HDAC Activity Colorimetric Assay kit“ (BioVision, Milpitas, CA, USA). Celkem 68 μ l směsi „HAT assay“ bylo přidáno k 50 μ g izolovaných proteinů (viz příprava vzorků pro metodu Western-blotting) ve 40 μ l destilované vody. Směs byla inkubována 1 h při 37 °C a následně analyzována spektrofotometricky na spektrofotometru VERSA max (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) při vlnové délce 440 nm. Aktivita HDAC byla stanovena obdobně. 50 μ g izolovaných proteinů bylo rozpuštěno v 85 μ l destilované vody. Dále bylo přidáno 15 μ l směsi „HDAC assay“ a směs byla inkubována 1 hodinu při 37 °C. Enzymová reakce byla zastavena přidáním 10 μ l „vývojky“ zabarvení. Směs byla inkubována při 37 °C 30 minut. Vzorky byly analyzovány při vlnové délce 400 nm spektrofotometrem VERSA max (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

3.12 Experimenty využívající fluorescenční mikroskopii

Buněčná linie UKF-NB-4 byla kultivována v 35 mm skleněných kultivačních miskách (In Vitro Scientific, Sunnyvale, CA, USA). Po kultivaci s testovanými látkami byl přidán 75 nM roztok látky „LysoTracker Red“ (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) a

buňky inkubovány při 37 °C po dobu 30 minut. Přisedlé buňky byly omyty „Hanks' balanced salt solution“ (HBSS) [Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO, USA)] a fluorescence buněk byla detekována laserovým skenovacím konfokálním mikroskopem Olympus FV 1000 (Olympus, Tokyo, Japan). Pro excitaci látky „LysoTracker Red“ byl použit laser (vlnová délka světla 559 nm), emitované světlo bylo detekováno v kanálu o šířce 570–670 nm. Pro excitaci ellipticinu byl použit laser (vlnová délka světla 473 nm) a emitované záření bylo detekováno v kanálu o šířce 485–545 nm. Všechny snímky byly „nahrány“ za použití 40x objektivu a 2x zvětšovacího faktoru a za pomoci programu Olympus FluoView FV1000 (součástí mikroskopu). Fluorescenční kanály byly barveny při softwarovém vyhodnocení s „red-green-blue“ RGB stupnicí. Experimenty využívající fluorescenční mikroskopie byly provedeny na pracovišti Mikrobiologického ústavu AV ČR, RNDr. Janem Svobodou, Ph.D.

3.13 Analýza buněčných neuroblastomových linií elektronovou mikroskopií

Linie byly kultivovány ve skleněných kultivačních miskách. Buňky byly mechanicky odebrány a omyty PBS. Následně byly vzorky „fixovány“ 2,5% glutaraldehydem v 0,1 M pufru kakodylátu sodného (pH=7,4) po dobu 90 minut. Po centrifugaci (16 000 g, 5 min) byla peleta „fixována“ 60 minut v 2% OsO₄ v 0,1 M pufru kakodylátu sodného (pH=7,4). Vzorky byly následně dehydratovány v gradientové sérii alkoholu a „fixovány“ v pryskyřici Durcupan [Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO, USA)]. Ultratenké řezy [Leica EM UC6 ultramikrotom (Leica Microsystems, Vienna, Austria)] byly kontrastně vizualizovány za použití uranyl acetátu a citrátu olovnatého na transmisním elektronovém mikroskopu JEM 1011 (Jeol, Tokyo, Japan). Analýza byla provedena MUDr. Jiřím Uhlíkem, Ph.D. v laboratořích Ústavu histologie a embryologie 2. LF UK a FN Motol.

3.14 Analýza distribuce fází buněčného cyklu

Distribuce fází buněčného cyklu neuroblastomových linií byla analyzována průtokovou cytometrií za použití kitu „DNA PREP reagent kit“ (Beckmann Coulter, Fullerton, CA, USA). Vzorky buněk byly zpracovány stejným způsobem jako při analýze apoptózy. Po promytí suspenze buněk PBS byly buňky „permeabilizovány“ 100 µl

lyzačního a permeabilizačního pufru a lehce promíchány. Následně bylo přidáno 1000 μ l barvicího roztoku „DNA Prep Stain“. Po 10minutové inkubaci při laboratorní teplotě v temnu byly vzorky analyzovány průtokovým cytometrem LSR II (BD, Franklin Lakes, CA, USA) a data analyzována programem FlowExpress5 (De Novo Software, Glendale, CA, USA).

3.15 Detekce proteinů CD133, N-myc a pH2AX metodou průtokové cytometrie

Buňky byly pro analýzu na průtokovém cytometru omyty PBS a „trypsinizovány“. Peleta buněk promytá PBS byla centrifugována 300 g, 2 minuty. Takto připravené buňky byly „fixovány“ v 2% formaldehydu v PBS po dobu 10 minut. Buňky byly promyty PBS a resuspendovány v ledovém 90% methanolu v PBS (permeabilizace buněk). Po 60minutové inkubaci při -20 °C byly buňky centrifugovány a opakovaně třikrát promyty „promývacím“ pufrům [0,5% hovězí sérový albumin (BSA) a 0,2% Triton X v PBS]. Buňky byly inkubovány v 50 μ l „promývacího“ pufru s 5 μ l protilátky proti pH2AX Alexa Fluor 647 [H2AX-Phosphorylated (Ser139), Biolegend, San Diego, CA, USA] či 5 μ l protilátky proti N-myc (N-myc, Abcam, Cambridge, UK) po dobu 60 minut při 4 °C. Buňky značené protilátkou proti N-myc byly promyty a dále inkubovány 30 minut v 0,5 ml „promývacího“ pufru s 0,5 μ l sekundární protilátkou DyLight 488 (Abcam, Cambridge, UK). Po promytí byly buňky analyzovány průtokovým cytometrem LSR II (BD, Franklin Lakes, CA, USA) a analyzovány softwarem FlowLogic (Inivai Technologies, Balcombe, Australie) a FlowJo v10 (FlowJo, Ashland, Oregon).

Buňky zpracované pro sledování exprese proteinu CD133 byly připraveny obdobně. S výjimkou přidání protilátky proti CD133 (CD133/2 PE, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), která byla přidána k buňkám před jejich „fixací“. Po „fixaci“ a „permeabilizaci“ buněk byla přidána protilátka proti štěpené caspase-3 (cleaved Caspase-3, Alexa Fluor 647, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Myší IgG2b-PE protilátka (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) byla použita jako „isotypová“ kontrola (používá se k odečtu „pozadí“ způsobeného nespecifickou vazbou protilátek na buňky).

3.16 Izolace DNA a stanovení tvorby aduktů ellipticinu s DNA metodou ³²P-postlabeling

Vzorky buněk byly „sklizeny“ a peleta buněk promyta PBS. Izolace DNA z neuroblastomových buněk byla provedena fenol-chloroformovou extrakcí, jak bylo popsáno v publikaci (72). Aduktů ellipticinu s DNA byly analyzovány pomocí metody „³²P-postlabeling“ prof. RNDr. Marií Stiborovou, DrSc. dle postupu popsaném v publikaci (73).

3.17 Testování klonogenicity neuroblastomových buněk

Buňky linie UKF-NB-3 byly preinkubovány 72 hodin s 1 mM VPA. Poté byly pasážovány a pouze 100 buněk v jedné jamce bylo kultivováno po dobu 12 až 18 dní. Po této době byly vytvořené kolonie kontrolních a preinkubovaných buněk „fixovány“ ve směsi kyseliny octové a methanolu (1:7) po dobu 5 minut. Poté byly buňky sušeny při laboratorní teplotě. Suché kolonie buněk v šestijamkových destičkách byly barveny 0,5% roztokem Giemsa-Romanowski v PBS přes noc. Kolonie větší 50 buněk byly analyzovány.

3.18 Kvantifikace exprese proteinu

Výsledky získané analýzou exprese proteinů metodou Western-blotting byly digitalizovány a vybrané vzorky byly vyhodnoceny za použití softwaru Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Byla použita metoda ke kvantifikaci digitálního obrazu.

3.19 Indukce apoptózy pomocí UV záření

Rostoucí buněčné linie byly ozářeny germicidní lampou Philips TUV 30w/g30t8 (Amsterdam, Nizozemsko) po dobu dvou minut a následně kultivovány 48 hodin s VPA postupem popsaným v kapitole 4.10.

3.20 Statistické vyhodnocení dat

Statisticky zpracovaná data jsou vyjádřena jako průměr hodnot se směrodatnou odchylkou. Studentův *t*-test byl použit pro statistické zpracování porovnání dvou situací. Hodnota $p < 0,05$ byla považována za signifikantní (*), hodnota $p < 0,01$ jako velice signifikantní (**) a hodnota $p < 0,001$ za výrazně signifikantní (***). Pokud není uvedeno

jinak, všechny experimenty byly nejméně třikrát opakovány. Pro grafické a statistické zpracování dat byl použit program Excel 2007 a GraphPad Prism6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Většina výsledků uvedených v předkládané disertační práci byla publikována v pracích ve vědeckých periodikách s impaktovým faktorem. Jednotlivé publikace jsou uvedeny jako přílohy disertační práce (č. 2-4). Příloha č. 1 je přehledovým článkem publikovaným v neimpaktovaném časopise a příloha č. 5 je rukopisem připravované publikace.

4.1 Vliv hypoxie na neuroblastomy

Jak již bylo podrobněji popsáno v úvodu disertační práce, pro solidní nádory je charakteristické hypoxické mikroprostředí. Nádorové buňky se dokážou dynamicky adaptovat na nedostatek kyslíku posttranslační modifikací histonových proteinů (74), a tím spojenou transkripční změnou některých genů. Navíc samotný selekční tlak mikroprostředí nádoru vede k indukci genetické mutace, která je pro přežití nádorové buňky výhodná.

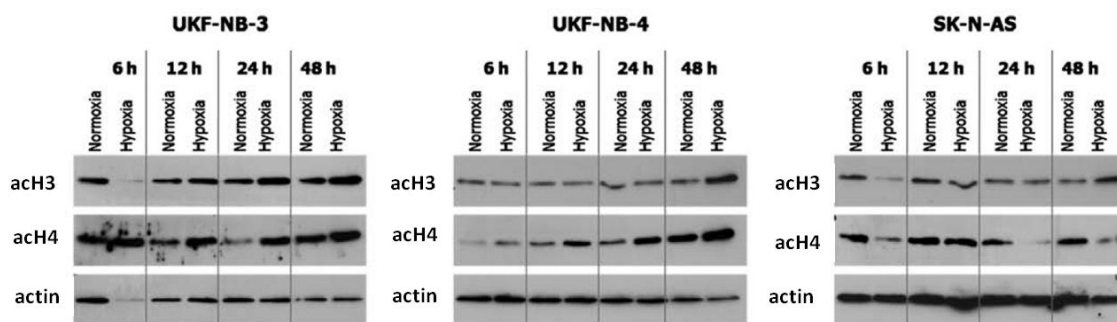
Tkáňové kultury neuroblastomů byly v disertační práci vybrány jako model, který je vhodný pro testování vlivu hypoxie na nádorové buňky. Výhody použití tkáňových kultur pro studium biochemie nádorových procesů jsou popsány v publikaci, která je uvedena jako příloha č. 1 disertační práce.

Vliv hypoxie na posttranslační modifikace histonů H3 a H4 v neuroblastomových liniích

Posttranslační modifikace histonových proteinů H3 a H4 byly sledovány za normoxických a hypoxických (1 % O₂) kultivačních podmínek v několika neuroblastomových liniích. Použity byly linie s amplifikací genu *N-myc* (linie UKF-NB-3 a UKF-NB-4) a linie se zmnožením genu *N-myc* (linie SK-N-AS) (obrázek č. 14). Acetylace uvedených histonů byla analyzována použitím metody Western-blotting. Experimenty byly provedeny společně s RNDr. Jitkou Poljakovou, Ph.D.

Kultivace testovaných linií 6, 12, 24 a 48 hodin v hypoxických podmínkách vedla ke zvýšení acetylace histonů H4 v liniích UKF-NB-3 a UKF-NB-4. Naopak snížení acetylace histonů H4 za hypoxických podmínek bylo pozorováno v linii SK-N-AS. Získané výsledky signalizují, že změny indukované hypoxií mohou být závislé na počtu kopií genu *N-myc*, který se v jednotlivých použitých liniích neuroblastomů liší.

Acetylace histonu H3 byla zvýšena za hypoxických kultivačních podmínek především v buňkách UKF-NB-3 a po 48 hodinové kultivaci v linii UKF-NB-4.



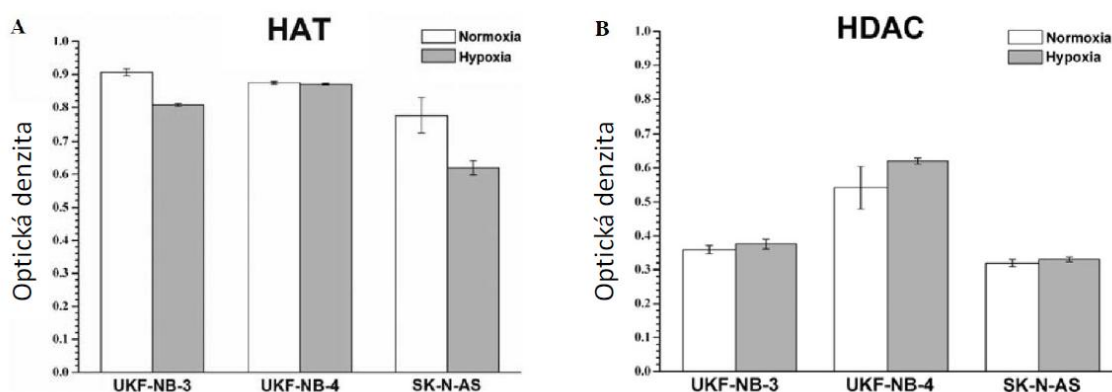
Obrázek č. 14. Vliv hypoxických kultivačních podmínek na acetylaci histonů H3 a H4 v neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-3, UKF-NB-4 a SK-N-AS. Aktin byl použit jako kontrola správné aplikace vzorku. Expres histonů byla analyzována pomocí metody Western-blotting. Acetylace histonu H4 se zvyšuje se zvyšující dobou kultivace v liniích UKF-NB-3 a UKF-NB-4. Acetylace histonu H3 se zvyšuje ve všech testovaných liniích po 48 h kultivaci.

Li a Costa ve své práci zjistili, že v buněčné nádorové linii A549 odvozené od plicního adenokarcinomu dochází ke snížení acetylace H4 po hypoxické kultivaci těchto buněk. Snížení acetylace bylo u těchto buněk spojeno se snížením exprese transkripčního faktoru C-myc (75).

Vliv hypoxie na aktivity enzymů histondeacetylasy (HDAC) a histonacetyltransferas (HAT) podílejících se na dynamických změnách posttranslačních modifikací histonů

V návaznosti na sledování změn acetylace histonů byly dále studovány i změny aktivit enzymů, které mohou acetylace histonů ovlivnit. Experimenty byly provedeny společně s Mgr. Žanetou Hejdukovou.

Aktivita HAT buněk UKF-NB-3 a SK-N-AS se po 24hodinové kultivaci za hypoxických podmínek lehce snížila pouze v těchto buňkách. Naproti tomu se aktivity HDAC v testovaných buňkách kultivovaných za normoxických a hypoxických podmínek signifikantně neodlišovaly (obrázek č. 15). Změny v acetylaci histonů v neuroblastomech za hypoxických podmínek tedy nejsou přímo spjaty s aktivitami HAT a HDAC.

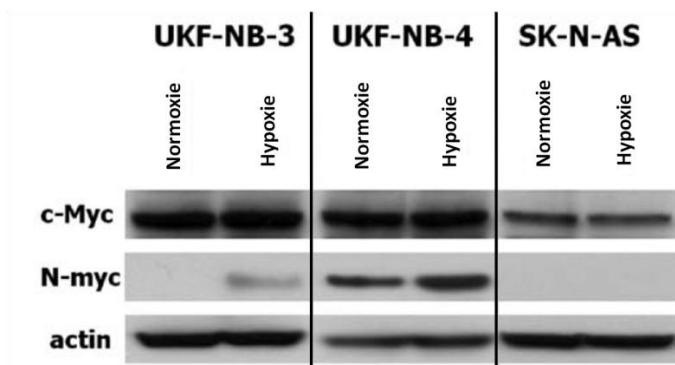


Obrázek č. 15. Vliv hypoxických kultivačních podmínek na aktivitu enzymů HAT (A) a HDAC (B) v neuroblastomových liniích UKF-NB-3, UKF-NB-4 a SK-N-AS po 24hodinové kultivaci. Hodnoty aktivity HAT se lehce snížily v hypoxických kultivačních podmínkách v liniích UKF-NB-3 a SK-N-AS. Hodnoty aktivit HDAC se příliš neliší v závislosti na kultivačních podmínkách.

Vliv hypoxie na expresi proteinů transkripčních faktorů N-myc a C-myc v neuroblastomových liniích

Hypoxie indukovala zvýšení exprese proteinu N-myc v obou liniích amplifikujících *N-myc*, v linii SK-N-AS, která *N-myc* neamplifikuje, nebyla exprese proteinu N-myc za normoxických ani hypoxických podmínek vůbec pozorována (obrázek č. 16). Hypoxií zvýšená exprese proteinu transkripčního faktoru N-myc v liniích UKF-NB-3 a UKF-NB-4 korelovala s pozorovaným zvýšením acetylace histonu H4 (obrázek č. 14).

Expresí proteinu transkripčního faktoru C-myc patřícího do stejné rodiny transkripčních faktorů jako N-myc byla detekována ve všech zkoumaných neuroblastomových liniích. Hypoxie jeho expresi neovlivnila (obrázek č. 16). Experimenty byly provedeny spolu s Mgr. Žanetou Hejdukovou.



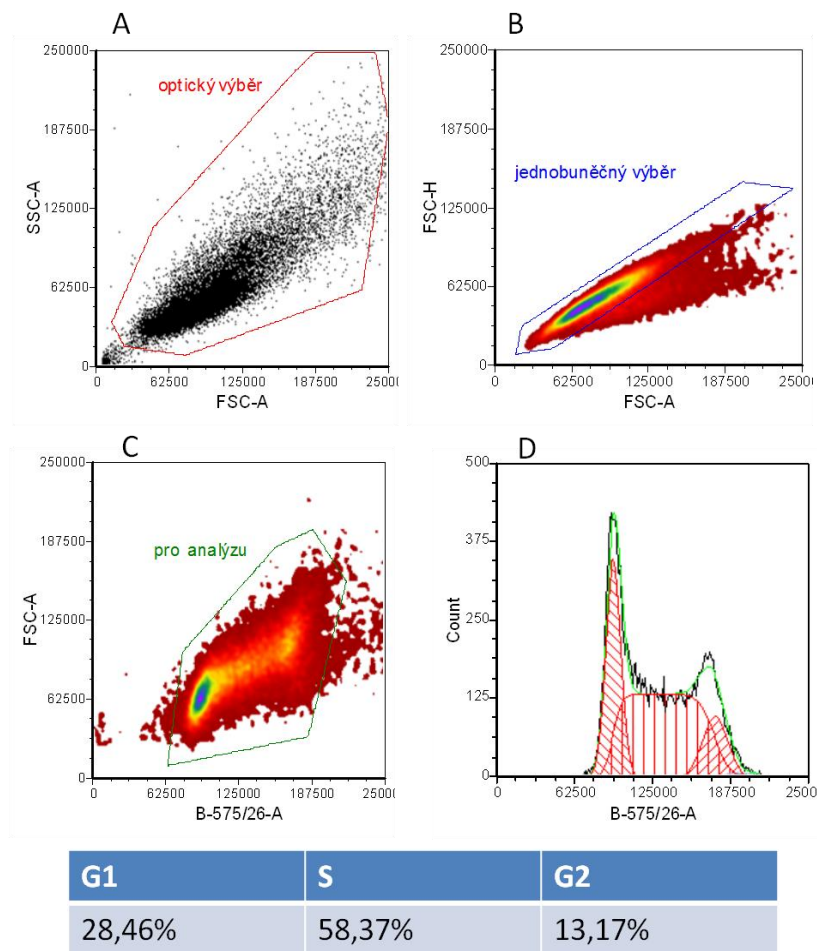
Obrázek č. 16. Vliv hypoxických kultivačních podmínek na expresi proteinů transkripčních faktorů N-myc a C-myc v liniích UKF-NB-3, UKF-NB-4 a SK-N-AS. Expresce proteinů byla analyzována metodou Western-blotting. Hypoxie indukovala zvýšení exprese proteinu N-myc v liniích UKF-NB-3 a UKF-NB-4. Aktin byl použit jako kontrola správné aplikace vzorku.

Získané výsledky prokazují, že hypoxické kultivační podmínky indukovaly zvýšenou expresi proteinu transkripčního faktoru N-myc v neuroblastomových liniích, kde je jeho gen amplifikován (UKF-NB-3 a UKF-NB-4). To je důležitý poznatek, neboť zvýšená exprese proteinu N-myc a také proteinu HIF-1 α se za hypoxických podmínek podílí v neuroblastomech na jejich progresi, a to zejména ovlivněním transkripce genů enzymů glykolýzy, například laktátdehydrogenasy (LDH-A) (76).

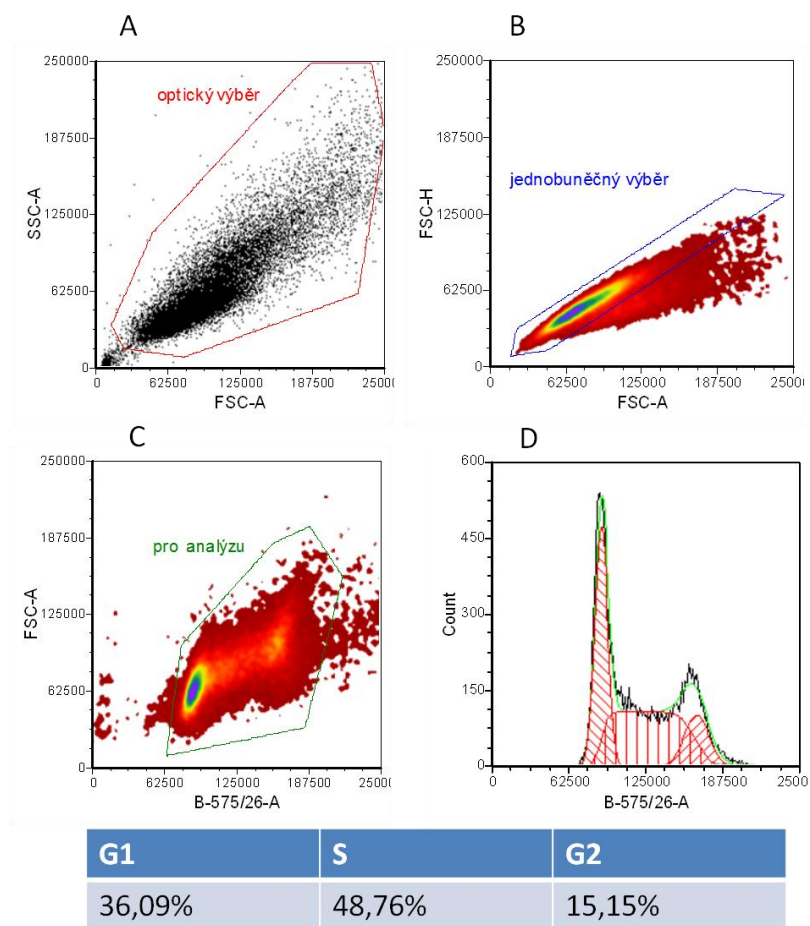
Hypoxie ovlivňuje distribuci fází buněčného cyklu neuroblastomové linie UKF-NB-4

Hypoxie také ovlivňuje buněčný cyklus studované neuroblastomové linie UKF-NB-4. Zjistili jsme totiž, že fáze buněčného cyklu neuroblastomové linie UKF-NB-4 byly při 24hodinové kultivaci buněk v hypoxickém prostředí (1 % O₂) oproti kontrolní kultivaci za přítomnosti 21 % O₂ změněny (obrázky č. 17 a 18). Obrázky č. 17 a 18 znázorňují výběrové (tzv. „gatovací“) strategie cytometrické analýzy (A, B, C) a finální analýzu značených buněk (D). Použitím optického „gatu“ byly vybrány nepoškozené buňky (A), z nich pro analýzu pak byly vybrány buňky vhodně oddělené od sebe (C a B). Výsledek experimentu je znázorněn formou histogramu, kdy je na ose x vynesena míra fluorescence jednotlivých buněk.

Hypoxická kultivace zvyšovala zastoupení buněk ve fázi G1 buněčného cyklu přibližně z 28 % na 36 %. Toto zvýšení bylo doprovázeno snížením fáze S buněčného cyklu hypoxických buněk (obrázky č. 17 a 18).



Obrázek č. 17. Analýza buněčného cyklu v kontrolních buňkách UKF-NB-4 kultivovaných 24 hodin za normoxických podmínek. (A) Výběr analyzovaných buněk, (B) jednobuněčný výběr-eliminace dubletů, (C) výběr pro finální analýzu, (D) histogram znázorňující distribuci fází buněčného cyklu; v tabulce jsou hodnoty procentuálního zastoupení analyzovaných buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu.



Obrázek č. 18. Analýza buněčného cyklu buněk UKF-NB-4 kultivovaných v hypoxických podmínkách po dobu 24 hodin. (A) Výběr analyzovaných buněk, (B) jednobuněčný výběr, (C) výběr pro finální analýzu na obrázku, (D) histogram znázorňující distribuci fází buněčného cyklu; v tabulce jsou hodnoty procentuálního zastoupení analyzovaných buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Oproti fázím buněčného cyklu normoxických buněk zde byl zaznamenán nárůst buněk ve fázi G1.

Výsledky uvedené v kapitole 4.1 ukazují na vztah hypoxických kultivačních podmínek neuroblastomových buněk a změn posttranslačních modifikací histonů H3 a H4 acetylací v těchto buňkách. Změna acetylace je v těchto buňkách spojena se zvýšenou expresí transkripčního faktoru N-myc a se změnou distribuce buněčného cyklu analyzované linie. Výsledky tedy naznačují, že hypoxií je ve studovaných neuroblastomových buňkách zvýšena jejich agresivita. Zvýšení exprese genu *Myc* je obecně spojováno s horší odpovědí nádorových buněk na léčbu (77).

Většina výsledků uvedených v kapitole 4.1 je součástí publikace, která tvoří přílohu disertační práce č. 3.

4.2 Vliv valproátu na expresi proteinů transkripčních faktorů N-myc a HIF-1 α

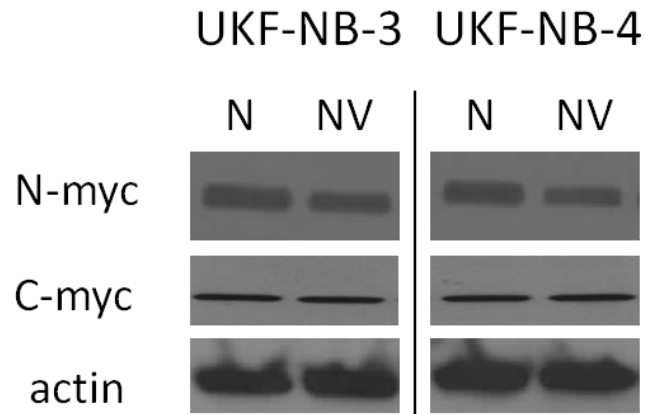
Jak již bylo uvedeno v úvodní části práce, valproát je látkou slibnou pro využití v chemoterapii řady nádorových onemocnění (jedná se o lék registrovaný jako antiepileptikum a jeho zavedení do klinické praxe by bylo proto daleko snazší než zavedení nové látky). Proto byl v dalších experimentech zkoumán jeho vliv na neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 a UKF-NB-3.

Experimenty navazují na výsledky experimentů uvedené v předešlé kapitole, kde změna exprese transkripčního faktoru N-myc korelovala se změnou acetylace histonů.

Vliv VPA na expresi transkripčního faktoru N-myc

Pro objasnění zastavení buněčného cyklu v jeho určitých fázích působením netoxické koncentrace VPA (1 mM), které byly popsány v publikaci, jež tvoří součást této disertační práce jako příloha č. 2, byly analyzovány změny exprese transkripčního faktoru N-myc vyvolané tímto inhibitorem HDAC. Změny v expresi transkripčního faktoru *N-myc* na genové i proteinové úrovni jsou totiž spojeny s výskytem různých nádorových onemocnění, především s vývojem neuroblastomů (78). Transkripční faktor N-Myc je zodpovědný za zrychlenou proliferaci buněk, jejich metabolickou adaptaci a indukci chemorezistence.

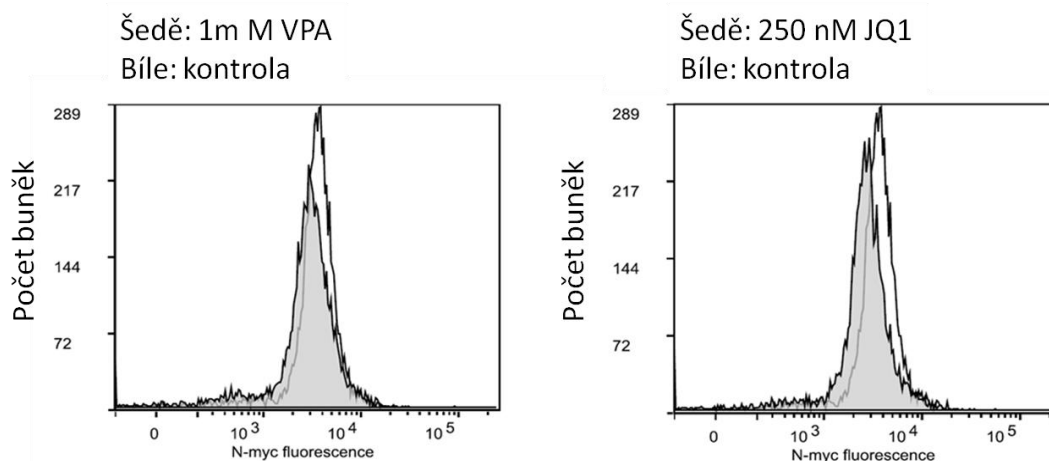
Kyselina valproová v koncentraci 1 mM indukuje po 24hodinové kultivaci neuroblastomových linií UKF-NB-3 a UKF-NB-4 snížení exprese proteinu N-myc (obrázek č. 19). Toto snížení nebylo kompenzováno zvýšením exprese proteinu transkripčního faktoru C-myc. Ten patří do stejné skupiny protoonkogenů jako N-myc. Překryv cílových genů transkripčního faktoru N-myc a C-myc může být až 40 % (79). Z toho důvodu je podstatné zjistit, zda změny exprese proteinu N-myc nejsou kompenzovány změnami exprese proteinu C-myc.



Obrázek č. 19. Expres proteinů transkripčních faktorů N-myc a C-myc v neuroblastomových liniích UKF-NB-3 a UKF-NB-4 po 24hodinové kultivaci za různých podmínek. N – normoxická kontrolní kultivace, NV – kultivace s 1 mM VPA v normoxii. Expres proteinů byla analyzována metodou Western-blotting. Valproát indukoval snížení exprese proteinu N-myc v obou sledovaných liniích. Expres proteinu C-Myc nebyla valproátem ovlivněna.

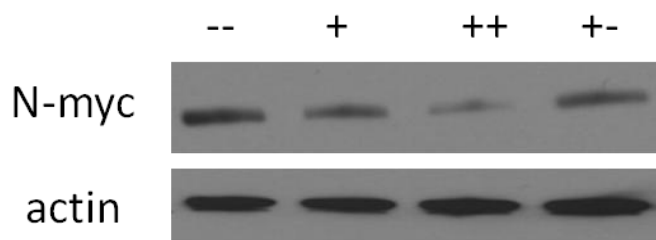
Snížená exprese proteinu N-myc byla detekována také při kultivaci neuroblastomové linie UKF-NB-4 s netoxickými koncentracemi jiných inhibitorů HDAC (0,5 μ M entinostat a 0,5 μ M vorinostat; data nejsou uvedena). Tento výsledek ukazuje na možný obecnější fenomén pozorované změny. Tomuto předpokladu odpovídají i výsledky získané za použití jiných nádorových buněk. Po kultivaci buněčných linií meduloblastomů DAOY a D283 s 1 mM VPA došlo ke snížení mRNA C-myc (80).

Snížení exprese proteinu N-myc valproátem detekované v buňkách UKF-NB-4 metodou Western-blotting (obrázek č. 19) bylo prokázáno i cytometricky, pomocí fluorescenčně značené protilátky proti tomuto transkripčnímu faktoru (obrázek č. 20). Jako pozitivní kontrola indukce snížení exprese proteinu N-myc byly použity buňky kultivované se specifickým inhibitorem JQ1. Jedná se o inhibitor proteinových bromodomén [název strukturního motivu proteinu je odvozen od genu *brahma*, kódující důležitý regulační protein v *Drosophila* (81)]. Tyto domény jsou zodpovědné za vazbu na acetylované části proteinů. V práci Puissanta se spolupracovníky (82) bylo totiž popsáno, že kultivace neuroblastomových buněk amplifikujících *N-myc* s inhibitorem JQ1 snižuje expresi proteinu N-myc a zastavuje buněčný cyklus buněk (82). V případě neuroblastomové linie UKF-NB-4 bylo zjištěno, že 24hodinová kultivace buněk s 250 nM JQ1 či 1 mM VPA snižuje expresi proteinu N-myc.



Obrázek č. 20. Fluorescence protilátky (osa x) navázané na protein transkripčního faktoru N-myc v buňkách neuroblastomové linie UKF-NB-4 po 24hodinové kultivaci s 1 mM VPA či 250 nM JQ1. Medián fluorescence kontrolních buněk je 3699, medián buněk kultivovaných s 1 mM VPA: 3050 a s 250 nM JQ1 je medián fluorescence 2761. S nižší hodnotou mediánu fluorescence buněk se snižuje exprese proteinu N-myc.

Změna exprese proteinu transkripčního faktoru N-myc vyvolaná valproátem je reversibilní (obrázek č. 21). Buňky UKF-NB-4 byly kultivovány 24 hodin s 1 mM VPA a po „odmytí“ VPA dalších 24 hodin v médiu bez valproátu [značeno (+-)]. Oproti 48hodinové kultivaci buněk s VPA (++) , kdy se výrazně snížila exprese proteinu N-myc, se po odstranění valproátu míra exprese N-myc opět zvýšila. A to téměř na úroveň kontrolních buněk kultivovaných bez VPA (--).



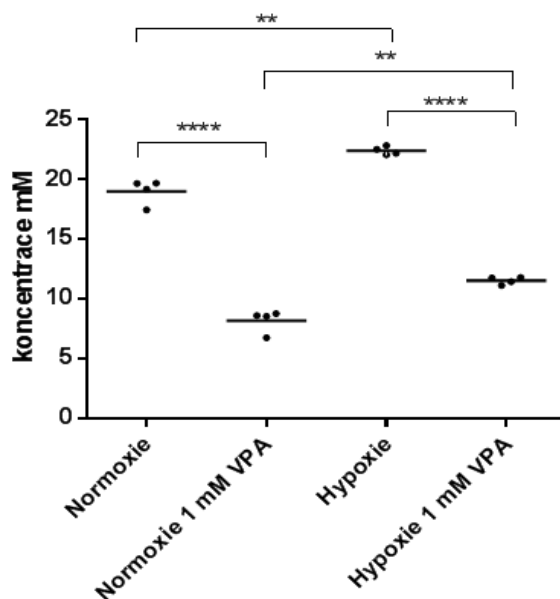
Obrázek č. 21. Změna exprese proteinu transkripčního faktoru N-myc v linii UKF-NB-4 po kultivaci s 1 mM VPA je reversibilní. Značení: (--) kontrolní kultivace buněk po dobu 48 hodin, (+) kultivace s 1 mM VPA po dobu 24 hodin či 48 hodin (++) , (+-) kultivace buněk s 1 mM VPA a jeho následné odmytí, kdy byly buňky kultivovány dalších 24 hodin v samotném médiu. Expresa proteinů byla analyzována metodou Western-blotting. Přítomnost VPA v kultivačním médiu buněk je důležitá pro udržení snížené exprese proteinu N-myc.

Pozorované snížení exprese proteinu N-myc způsobené kultivací buněk UKF-NB-4 s VPA může částečně vysvětlovat změny fází buněčného cyklu. Jak popsal Qing se spolupracovníky (76), specifické snížení exprese genu *N-myc* metodou shRNA vede ke snížení proliferace neuroblastomových buněk LAN5 amplifikujících *N-myc*. To je

v souladu i s naším pozorováním, kdy se v linii UKF-NB-4 kultivované s 1 mM VPA zvýšil zdvojovací čas buněk přibližně 1,4krát (viz výsledky uvedené v publikaci, která tvoří přílohu č. 2 disertační práce). Změny proliferace a exprese transkripčního faktoru *N-myc* vyvolané valproátem také korelují se zvýšením acetylace histonů H3 a H4 v těchto buňkách (viz výsledky v publikaci, která je uvedena jako příloha č. 4 disertační práce).

Změna koncentrace laktátu produkovaného buňkami UKF-NB-4 ovlivněných valproátem

Jak bylo popsáno Qingem se spolupracovníky (76), snížení transkripce genu *N-myc* buněčné linie LAN5 snižuje expresi laktátdehydrogenasy (LDH-A). Také Tavtigian a Papas (83,84) popisují přímou návaznost exprese transkripčního faktoru Myc na expresi proteinu enzymu laktátdehydrogenasy A (LDH-A). LDH-A je enzym zodpovědný za metabolickou adaptaci nádorových buněk k hypoxii a jedním z klíčových enzymů anaerobní glykolýzy. Výsledky našich experimentů ukazují, že VPA ovlivňuje aktivitu LDH-A. Buňky kultivované s 1 mM VPA produkovaly méně laktátu do kultivačního média v porovnání s kontrolními buňkami bez VPA (obrázek č. 22). Stejný trend jsme zaznamenali také za hypoxických kultivačních podmínek. Zvýšení koncentrace laktátu v médiu za hypoxických podmínek může být výsledkem zvýšeného množství aktivního transkripčního faktoru HIF-1 α v jádře a přepisu genů enzymů glykolýzy. Výše uvedené experimenty byly provedeny spolu s Ing. Blankou Jedličkovou.



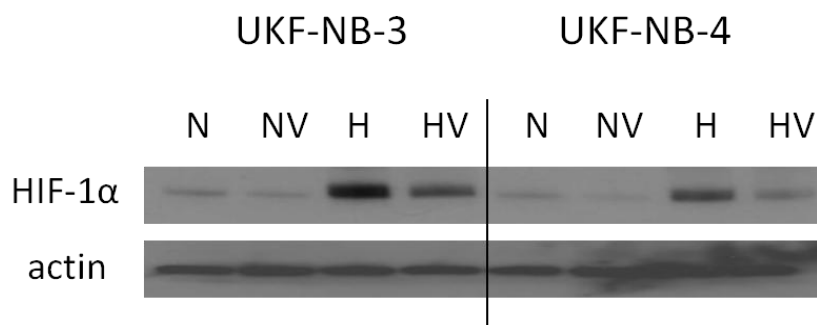
Obrázek č. 22. Koncentrace laktátu v kulturačním médiu neuroblastomové linie UKF-NB-4 po 96hodinové kultivaci za normoxických a hypoxických podmínek za přítomnosti 1 mM VPA. Valproát snižuje množství laktátu za hypoxických i normoxických podmínek. Nejvyšší koncentrace laktátu byla detekována v médiu hypoxických buněk. Data jsou výsledkem čtyř nezávislých opakování experimentu (n=4) a jsou vyhodnocena párovým t-testem. Signifikance $p < 0,01$ znázorněna **, signifikance $p < 0,0001$ znázorněna ****.

Expres proteinu transkripčního faktoru HIF-1 α v buňkách UKF-NB-4 a UKF-NB-3 kultivovaných za normoxických a hypoxických podmínek

V další části práce byla v neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-3 a UKF-NB-4 analyzována exprese proteinu transkripčního faktoru HIF-1 α za normoxických a hypoxických kulturačních podmínek. Jak již bylo uvedeno výše, HIF-1 α je transkripční faktor zodpovědný za adaptaci buněk na nedostatek kyslíku, který jako první detailně charakterizoval Semenza (85,86). Za hypoxie se snižuje ubiquitinace a degradace HIF-1 α , který je stabilizován a translokován do jádra, kde tvoří s HIF-1 β dimerní proteinový komplex (87). Kultivace neuroblastomových linií UKF-NB-3 a UKF-NB-4 v hypoxických podmínkách zvyšuje po 24 hodinách expresi transkripčního faktoru HIF-1 α (obrázek č. 23).

Vliv VPA na expresi proteinu transkripčního faktoru HIF-1 α v buňkách UKF-NB-4 a UKF-NB-3

Kultivace neuroblastomových buněk UKF-NB-3 a UKF-NB-4 s 1 mM valproátem za hypoxických podmínek indukovala snížení exprese proteinu transkripčního faktoru HIF-1 α (obrázek č. 23).



Obrázek č. 23. Expres proteinu transkripčního faktoru HIF-1 α v neuroblastomové linii UKF-NB-3 a UKF-NB-4 po 24hodinové kultivaci za různých podmínek. N – normoxická kultivace, NV – 1 mM VPA v normoxické kultivaci buněk, H – hypoxická kultivace buněk, HV – 1 mM VPA v hypoxické kultivaci buněk. Expres proteinů byla analyzována metodou Western-blotting. Kultivace buněk za hypoxických podmínek zvyšuje expresi HIF-1 α . Kultivace s 1 mM valproátem snižuje expresi HIF-1 α za normoxických a především za hypoxických podmínek. Aktin byl použit jako kontrola správného nanesení vzorku.

Kim se spolupracovníky (88) popisuje, že HDAC1 a HDAC3 přímo interagují s doménou proteinu HIF-1 α označovanou jako „oxygen-dependent degradation“ (ODD), a tím zvyšují jeho stabilitu za hypoxie. Je známo, že inhibice HDAC inhibitory těchto enzymů jako jsou trichostatin A, apicidin, VPA a NaB snižuje expresi proteinu HIF-1 α (88), což je v souladu s výsledky zjištěnými v této disertační práci, v experimentech s VPA (obrázek č. 23). Zvýšení exprese proteinu transkripčního faktoru HIF-1 α za hypoxických podmínek koreluje se zvýšenou hladinou laktátu v kultivačním médiu (obrázek č. 22). Tento jev je ve shodě s obecně uznávaným mechanismem stabilizace transkripčního faktoru HIF-1 α v hypoxii. Ten jako aktivovaný transkripční faktor přepisuje klíčové geny enzymů participujících na metabolické adaptaci na hypoxii (např. LDH-A, PDK, HK, GLUT) (57).

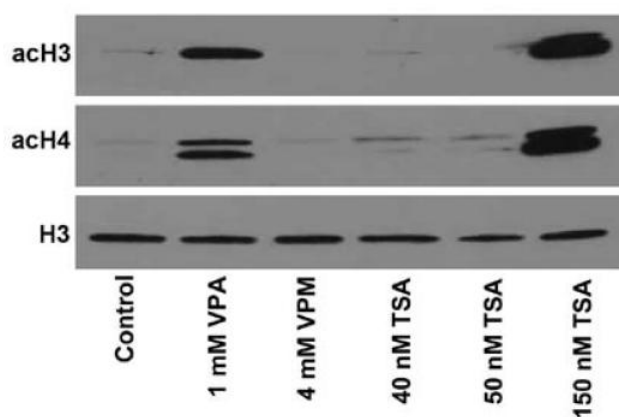
Výsledky uvedené v kapitole č. 4.3 signalizují, že VPA ovlivňuje acetylaci histonů, mění zastoupení fází buněčného cyklu a prodlužuje zdvojovací čas buněk (viz výsledky uvedené v publikaci, která je uvedena jako příloha č. 2 disertační práce). Navíc valproát snižuje expresi proteinu transkripčního faktoru N-myc za běžných kultivačních podmínek a

expresi proteinu HIF-1 α při kultivaci buněk za hypoxických podmínek. Buňky kultivované s 1 mM VPA také produkují méně laktátu do kultivačního média (obrázek č. 22).

4.3 Vliv VPA na acetylaci histonů H3 a H4

Jak již bylo v disertační práci uvedeno dříve, valproát je látka známá především pro své antikonvulzivní účinky. V současnosti je však intenzivně studováno i jeho protinádorové působení. Předkládaná disertační práce prohlubuje znalosti této problematiky. Zjistili jsme, že VPA zvyšuje acetylaci histonů H3 a H4. Vedle VPA byl sledován i vliv kultivace buněk UKF-NB-4 s dalšími látkami, jako jsou inhibitory HDAC TSA a analog valproátu, valpromid (VPM) (obrázek č. 24).

Metodou Western-blotting bylo detekováno zvýšení acetylace histonů H3 a H4 po kultivaci buněk s 1 mM VPA a toxickou koncentrací 150 nM TSA. Acetylace histonů H3 a H4 se však nezměnila po kultivaci buněk s netoxickou koncentrací 40 nM a 50 nM trichostatinu A a s netoxickou koncentrací 4 mM valpromidu [analogu VPA, který neinhibuje HDAC (89)].



Obrázek č. 24. Acetylace histonů H3 a H4 v buňkách UKF-NB-4 kultivovaných 8 hodin s 1 mM VPA, 4 mM VPM, 40 nM TSA, 50 nM TSA a 150 nM TSA. Histon H3 byl použit jako kontrola správného nanesení vzorku. Expres histonů byla analyzována metodou Western-blotting. Valproát a toxická 150 nM koncentrace TSA indukují zvýšení acetylace H3 a H4 u buněk. Histon H3 byl použit jako kontrola správného nanesení vzorku.

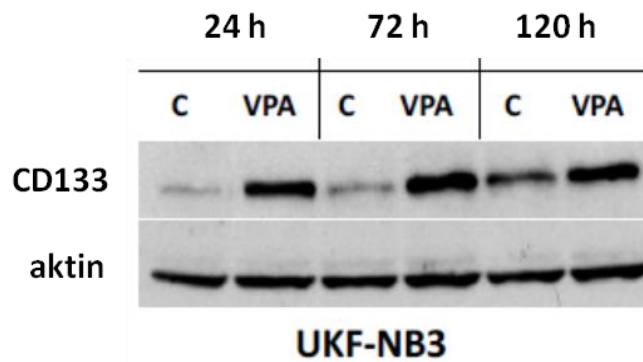
4.4 Vliv VPA na expresi proteinu molekuly CD133, specifického znaku kmenových nádorových buněk

Nádorové kmenové buňky jsou v nádorové biologii studovány v souvislosti s jejich chemorezistencí a zvýšenou schopností metastazovat. Nádorové kmenové buňky jsou v různých typech nádorů odlišně charakterizovány. Protein CD133 je často exprimován v nádorových kmenových buňkách některých solidních nádorů, např. kolorekta. Proto jsme v dalších experimentech studovali vliv VPA na expresi proteinu CD133 v neuroblastomech, a s tím spojenou chemorezistencí vůči vybraným cytostatikům. Experimenty sledující expresi molekuly CD133 byly provedeny společně s kolegou MUDr. Mohamedem Ashrafem Khalilem a RNDr. Pavlem Procházkou, Ph.D.

Vliv VPA na expresi proteinu CD133 v liniích UKF-NB-3 a UKF-NB-4

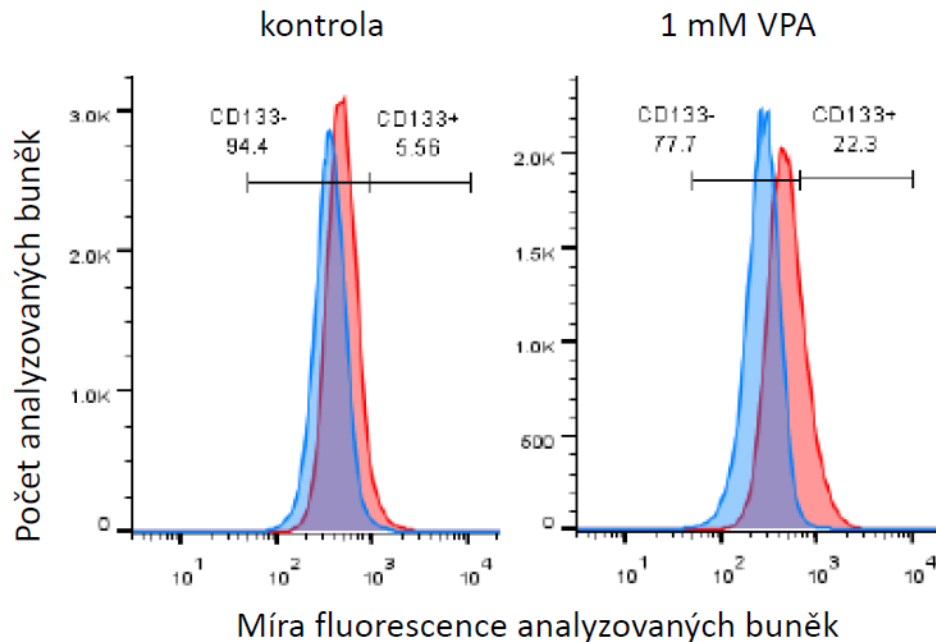
Buněčná linie UKF-NB-3 byla kultivována s netoxickou koncentrací 1 mM VPA 24, 72 a 120 hodin. Exprese proteinu CD133 se zvýšila kultivací buněk s VPA (obrázky č. 25 a 27). Zároveň se jeho exprese mírně zvyšuje v buňkách kultivovaných bez VPA, a to v závislosti na době kultivace, což je s největší pravděpodobností způsobeno zvýšenou hustotou buněk v kultivační nádobě (obrázek č. 25).

Protein CD133 nebyl detekován v linii UKF-NB-4, a to ani po kultivaci s 1 mM VPA. Zvýšení exprese CD133 v této linii indukovala až 144hodinová kultivace buněk s 8 μ M 5-aza-2'-deoxycytidinem (AZA) (výsledky nejsou uvedeny). AZA je demethylační činidlo, které indukuje snížení methylace v oblastech CpG genů (90). Analýza methylace bází promotorů P1 a P3 genu pro CD133 v linii UKF-NB-4 ukázala téměř 100% methylaci bází v této oblasti (výsledky nejsou uvedeny, budou začleněny do připravované publikace). Regulace exprese CD133 methylací promotoru jeho genu byla popsána také v gliomových buňkách (66).



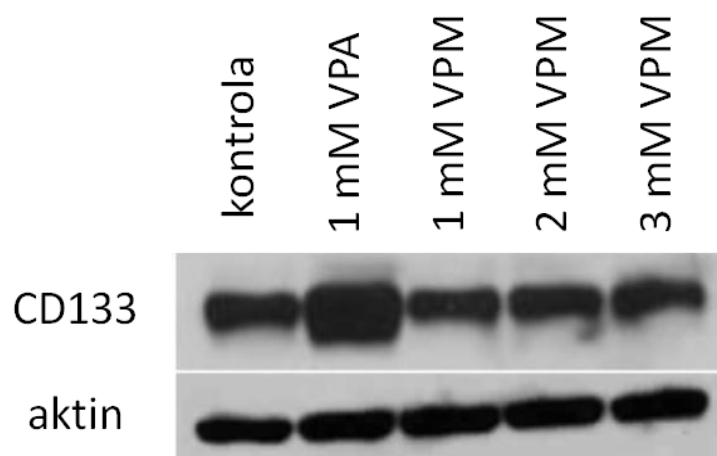
Obrázek č. 25. Změny exprese proteinu CD133 měřené pomocí metody Western-blotting v neuroblastomové linii UKF-NB-3 v závislosti na době kultivace s a bez 1 mM VPA. C – kontrolní kultivace buněk, VPA - kultivace s 1 mM valproátem. Valproát indukuje zvýšení exprese proteinu CD133 ve všech sledovaných intervalech kultivace. Aktin byl použit jako kontrola správného nanesení vzorku.

Změna exprese proteinu CD133 v neuroblastomových buňkách UKF-NB-3 jejich kultivací s 1 mM VPA zjištěná metodou Western-blotting byla prokázána i cytometricky (obrázek č. 26). Posun fluorescence značených buněk protilátkou proti CD133 kultivovaných s valproátem indikuje zvýšenou expresi proteinu CD133.



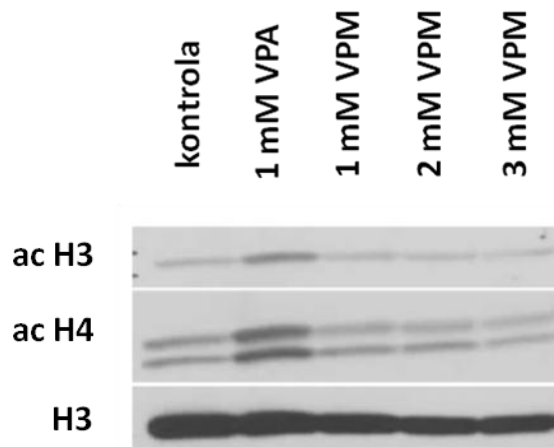
Obrázek č. 26. Expese CD133 v linii UKF-NB-3 kultivované 72 hodin s 1 mM VPA detekované průtokovou cytometrií. Buňky kultivované bez VPA vykazují bazální expresi proteinu CD133 (5,56 %), s VPA se zvyšuje exprese proteinu CD133 (22,30 %). Modře jsou vyznačeny buňky značené „isotypovou“ kontrolní protilátkou, červeně buňky značené protilátkou proti CD133.

Valpromid je strukturální analog valproátu, který také vykazuje antiepileptické účinky, není však inhibitorem HDAC (89). Tato sloučenina v netoxické koncentraci 1, 2 a 3 mM, expresi proteinu CD133 ve studované linii UKF-NB-3 nezvyšuje (obrázek č. 27).



Obrázek č. 27. Expresi proteinu CD133 (detekované pomocí Western-blottingu) v linii UKF-NB-3 její kultivací s 1 mM VPA a různými koncentracemi valpromidu (VPM) (1, 2 a 3 mM) po 72hodinové kultivaci. VPA zvyšuje expresi proteinu CD133, VPM ve třech různých koncentracích nikoliv.

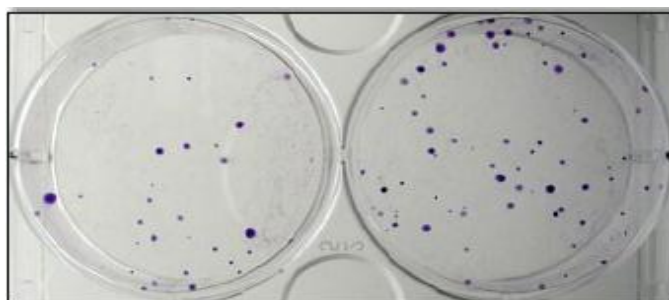
Zvýšená exprese proteinu CD133 v linii UKF-NB-3 korelovala se zvýšenou acetylací histonů H3 a H4 indukovanou kultivací s 1 mM VPA. Žádná z použitých koncentrací valpromidu (VPM) však acetylace histonů H3 a H4 neovlivnila (obrázek č. 28). Zvýšená acetylace histonů je často spojována s transkripční aktivací genů (91), v tomto případě je zvýšená acetylace histonů H3 a H4 spojena se zvýšenou expresí proteinu CD133.



Obrázek č. 28. Acetylace histonů H3 a H4 v buňkách UKF-NB-4 kultivovaných 72 hodin s 1 mM VPA a 1, 2 a 3 mM VPM detekovaná pomocí metody Western-blotting. Valproát zvyšuje acetylaci histonů H3 a H4. Histon H3 byl použit jako kontrola správného množství vzorku.

Vliv valproátu na klonogenicitu buněk linie UKF-NB-3

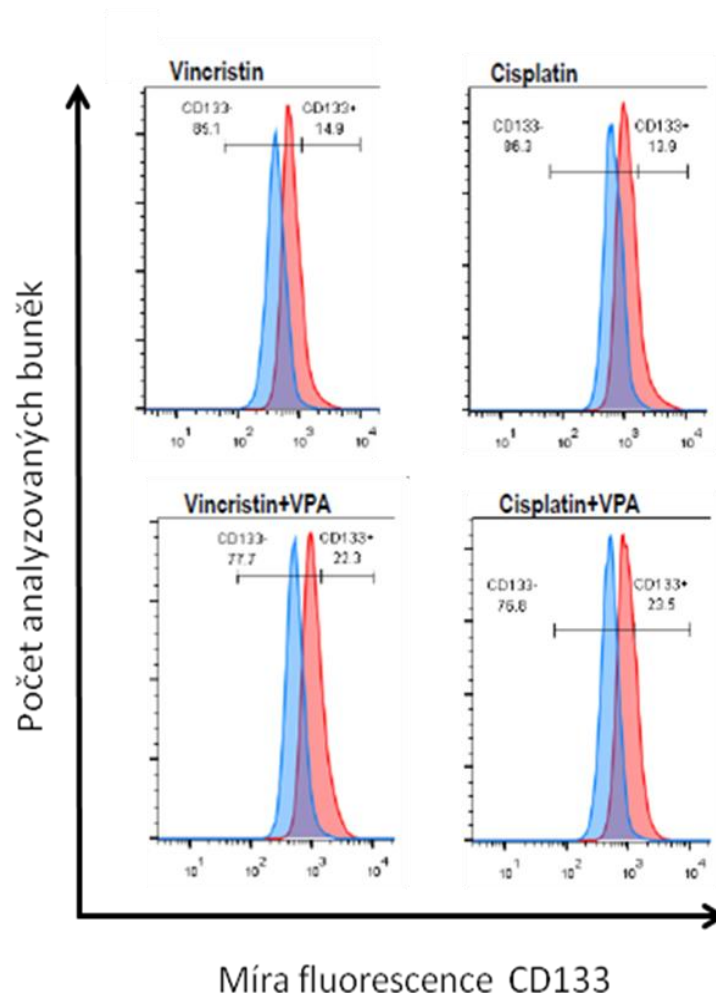
Jak ukazují výsledky uvedené v obrázcích č. 25-28, zvýšení acetylace histonů H3 a H4 kultivací buněk UKF-NB-3 s 1 mM VPA koreluje se zvýšenou expresí proteinu CD133. Zároveň bylo zjištěno, že preinkubace buněk s valproátem zvyšuje tvorbu klonů těchto buněk (obrázek č. 29). Bar se spolupracovníky ve své práci (92) popisuje obdobný trend tvorby klonů v buňkách exprimujících protein CD133 za hypoxických podmínek.



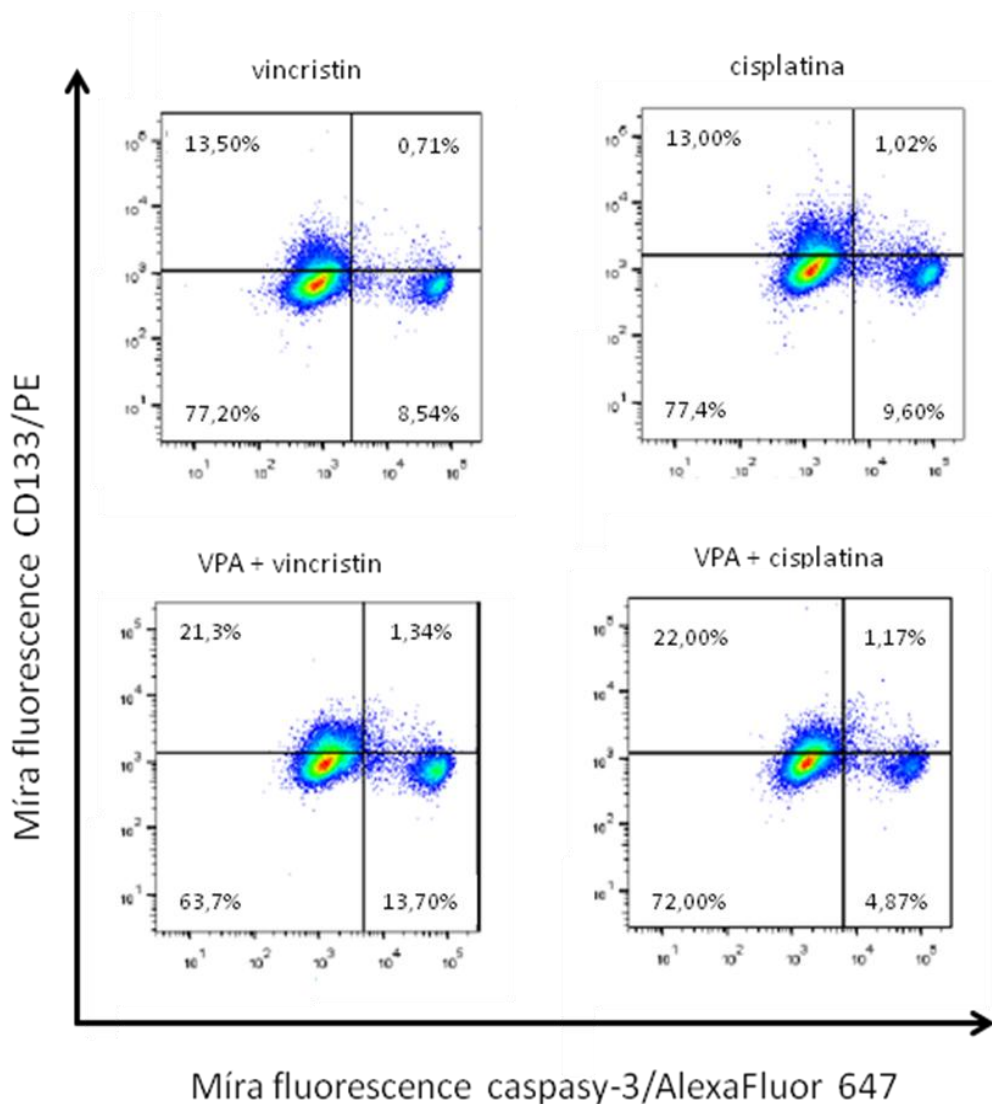
Obrázek č. 29. Klonogenicita linie UKF-NB-3. Vlevo kontrolní buňky, vpravo buňky preinkubované 1 mM VPA. Preinkubace buněk s VPA vede ke zvýšení počtu klonů buněk.

Zvýšení exprese proteinu CD133 zvyšuje chemorezistenci buněk linie UKF-NB-3 vůči cisplatině a vincristinu

V další části výzkumu realizovaného v průběhu vypracování disertační práce bylo zjištěno, že zvýšená exprese proteinu CD133 v linii UKF-NB-3 koreluje s nižší citlivostí těchto buněk vůči 1 μ M cisplatině a 0,2 nM vincristinu. Cisplatina a vincristin v kombinaci s 1 mM VPA zvyšují expresi proteinu CD133. Vincristin indukoval 14,9 % buněk exprimujících CD133, kombinace valproátu s vincristinem 22,3 % buněk exprimujících CD133. Cisplatina indukovala 13,9 % buněk exprimujících CD133, kombinace cisplatinu a valproátu pak 23,5 % buněk exprimujících CD133. Je zřejmé, že kultivace buněk UKF-NB-3 kombinací cytostatika (cisplatina nebo vincristin) s valproátem zvýšila expresi molekuly CD133 (obrázek č. 30). Buňky s vyšší expresí proteinu CD133 však nevykazovaly vyšší expresi aktivované caspasy-3, která je znakem programované buněčné smrti (obrázek č. 31). Ze získaných výsledků vyplývá, že zvýšené množství buněk exprimujících protein CD133 není spojeno se zvýšením štěpení caspasy-3, tedy se zvýšením apoptózy těchto buněk. Buňky exprimující CD133 jsou tedy více chemorezistentní vůči testovaným léčivům, což bylo popsáno také v jiných pracích (93,94).



Obrázek č. 30. Změna množství buněk UKF-NB-3 exprimujících CD133 jejich kultivací s 1 μ M cisplatinou a 0,2 nM vincristinem či jejich kombinací s 1 mM VPA (72h). Modře je zobrazena fluorescence buněk značených „isotypovou“ kontrolní protilátkou, červeně fluorescence buněk značených protilátkou proti CD133-PE.



Obrázek č. 31. Změna exprese CD133 kultivací buněk UKF-NB-3 s cisplatinou, vincristinem, VPA a jejich kombinací (72 h). Změny proteinu CD133 vynesené v bivariantním grafu s fluorescencí štěpené caspasy-3. Obě osy značí míru fluorescence komplexů s jednotlivými protilátkami. Nárůst procenta buněk po kombinované kultivaci buněk s VPA (u vincristinu z 13,5 % na 21,3 % a u cisplatinu z 13 % na 22 %) nekoreluje s nárůstem procenta buněk značené protilátkou štěpené caspasy-3.

4.5 Vliv etoposidu a VPA na neuroblastomy

Působení valproátu na neuroblastomové buňky bylo sledováno také v kombinaci s konvenčními cytostatiky. Testování valproátu s etoposidem bylo provedeno za použití neuroblastomové linie UKF-NB-4 a získané výsledky jsou součástí publikace uvedené jako příloha č. 2 disertační práce.

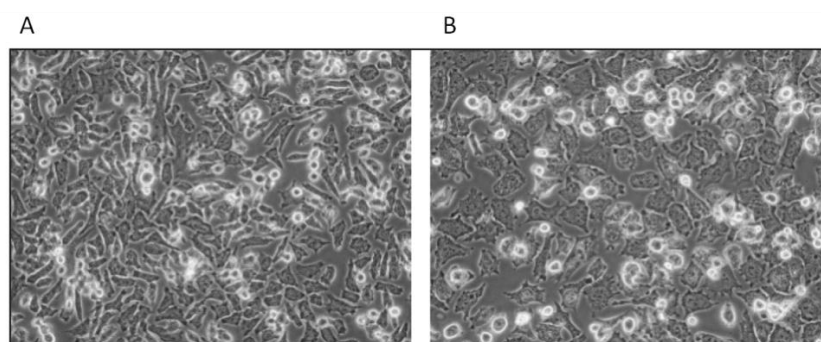
Cytotoxicita etoposidu vůči neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4

Cytotoxicita etoposidu na neuroblastomovou linii UKF-NB-4 byla analyzována metodou MTT, a to za normoxických i hypoxických kultivačních podmínek. Po 72hodinové kultivaci buněk byla stanovena hodnota IC_{50} tohoto cytostatika. Hypoxické kultivační podmínky redukovaly cytotoxicitu etoposidu zvýšením hodnoty IC_{50} , z hodnoty $2,33 \pm 0,56 \mu\text{M}$ na $3,23 \pm 0,33 \mu\text{M}$ (tabulka č. 1).

Tabulka č. 1. Hodnoty IC_{50} vůči etoposidu a VPA v linii UKF-NB-4 za normoxických a hypoxických podmínek.

	IC_{50} etoposidu (μM)		IC_{50} VPA (mM)	
	normoxie	hypoxie	normoxie	hypoxie
Exp. I	1,8	3	1,7	1,1
Exp. II	3,1	3,7	1,6	1,4
Exp. III	2,1	3	1,3	1,1
průměr	2,33	3,23	1,53	1,20
směrodatná odchylka	0,56	0,33	0,17	0,14

Pro zjištění mechanismu účinku etoposidu na neuroblastomovou linii UKF-NB-4 byla sledována indukce apoptózy v těchto buňkách působením $8 \mu\text{M}$ etoposidu v různých časových periodách kultivace (3, 6, 12, 24, 48 hodin). Apoptóza byla analyzována dvojitým značením buněk Annexinen V a PI. Nejvyšší procento apoptotických buněk bylo zaznamenáno 48 hodinovou kultivací buněk s etoposidem (data nejsou uvedena). Kultivace buněk s etoposidem mění i morfologii buněk (obrázek č. 32).



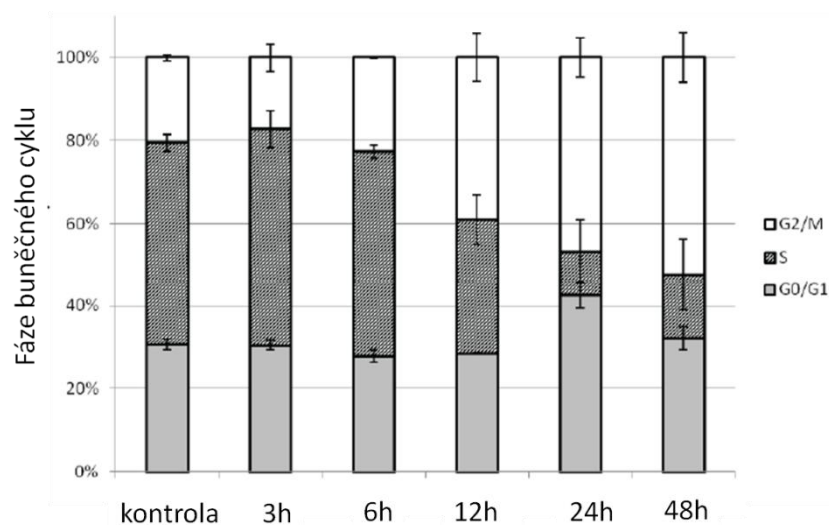
Obrázek č. 32. Neuroblastomová linie UKF-NB-4 (200x zvětšeno) kultivovaná bez etoposidu (A) a kultivovaná 48 hodin s $8 \mu\text{M}$ etoposidem (B). Etoposid indukoval dlaždicovitou morfologii a zvětšení plochy buněk.

Etoposid indukoval změny buněčného cyklu linie UKF-NB-4 v závislosti na době kultivace a použité koncentraci tohoto cytostatika (viz výsledky uvedené v publikaci, která tvoří přílohu č. 2 disertační práce).

Působení valproátu na neuroblastomovou buněčnou linii UKF-NB-4

Působení valproátu na neuroblastomovou linii UKF-NB-4 za normoxických a hypoxických podmínek bylo rovněž analyzováno metodou MTT. Po 72 hodinách byla stanovena hodnota IC_{50} vůči VPA. Hypoxické kultivační podmínky výrazně nezměnily toxicitu VPA vůči testované neuroblastomové linii UKF-NB-4 (tabulka č. 1).

Pro další sledování působení valproátu na neuroblastomovou linii UKF-NB-4 byla použita také metoda „Annexin V/PI“ sledující vývoj apoptózy. 1 mM VPA po kultivacích buněk 3, 6, 12, 24 a 48 hodin neovlivnil viabilitu buněk (data nejsou uvedena). Nicméně kultivace s 1 mM VPA ovlivňovala změny ve fázích buněčného cyklu (obrázek č. 33). Valproát indukoval po 24 a 48 hodinách zvýšení množství buněk ve fázích G0/G1 a G2/M buněčného cyklu, což koreluje s prodloužením zdvojeovacího času buněk po kultivaci s 1 mM VPA.

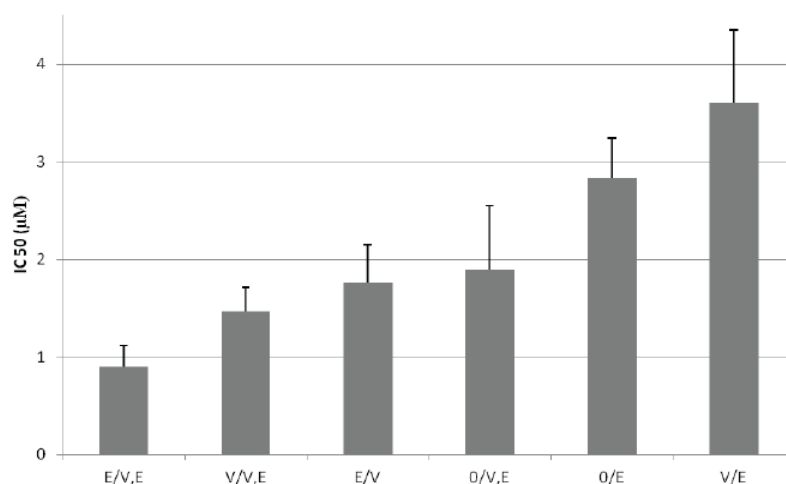


Obrázek č. 33. Vliv 1 mM VPA na fáze buněčného cyklu neuroblastomové linie UKF-NB-4 v závislosti na době kultivace buněk. Kultivace s valproátem zvyšuje počet buněk ve fázi G0/G1.

Vliv valproátu v kombinaci s etoposidem na neuroblastomovou linii UKF-NB-4

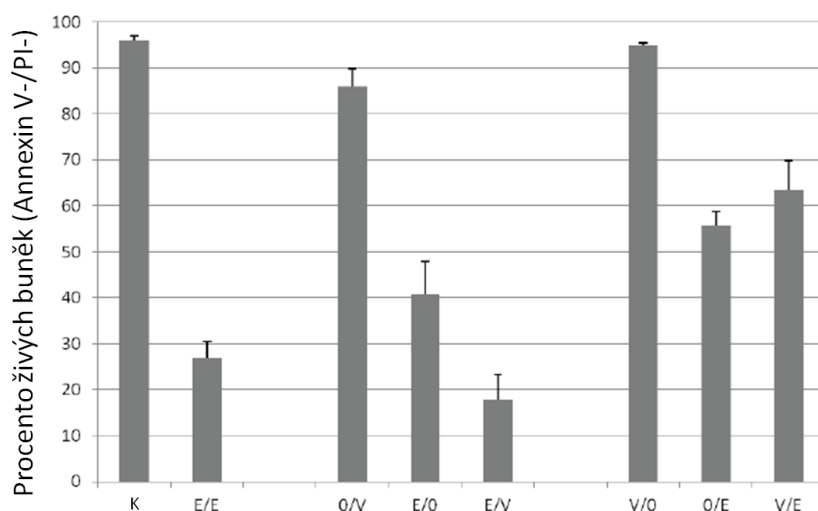
Jak již bylo uvedeno výše, inhibitory HDAC jsou v posledních letech studovány v kombinaci s konvenčními cytostatiky pro jejich nízkou nežádoucí toxicitu a zároveň možné posílení účinku cytostatik (95). Metodou MTT byl testován vliv různých koncentrací etoposidu a 1 mM valproátu při různé sekvenci jejich podání na

neuroblastomové linii UKF-NB-4. Celkem bylo testováno šest různých modulů kultivace buněk s etoposidem a VPA (E/E,V; V/V,E; E/V; 0/V,E; 0/E a V/E). 1) buňky preinkubované 24 hodin s VPA a následně kultivované s různými koncentracemi etoposidu po dobu 72 hodin jsou označeny jako V/E; 2) buňky preinkubované 24 hodin s různými koncentracemi etoposidu a následně kultivovány 72 hodin s 1 mM VPA jsou označeny jako E/V; 3) buňky preinkubované 24 hodin s různými koncentracemi etoposidu a následně kultivované 72 hodin s různými koncentracemi etoposidu v přítomnosti 1 mM VPA jsou označeny jako E/V,E; 4) buňky preinkubované 24 hodin s 1 mM VPA a následně kultivované 72 hodin s různými koncentracemi etoposidu v přítomnosti 1 mM VPA označeny jako V/V,E; 5) buňky preinkubované 24 hodin v samotném médiu a poté 72 hodin s různými koncentracemi etoposidu v přítomnosti 1 mM VPA jsou označeny jako 0/V,E; 6) buňky preinkubované 24 hodin v samotném médiu a následně kultivované 72 hodin s různými koncentracemi etoposidu jsou označeny jako 0/E. Výsledek znázorněn na obrázku č. 34 je souhrn výsledků všech kultivačních modulů vyjádřených v hodnotách IC_{50} . Ve většině případů se ukázalo, že valproát snižuje hodnotu IC_{50} oproti kontrolní inkubaci samotného etoposidu (0/E). Valproát tedy zvyšuje účinnost etoposidu na neuroblastomovou linii UKF-NB-4. Pouze v situaci, kdy byly buňky preinkubovány s valproátem a dále kultivovány s etoposidem (V/E), se hodnota IC_{50} oproti kontrole zvýšila. Tento jev lze částečně vysvětlit vlivem valproátu na buněčný cyklus buněk. Ty mohou být po 24hodinové preinkubaci méně citlivé vůči etoposidu, který je fázově specifickým cytostatikem s maximem účinku ve fázi G2.



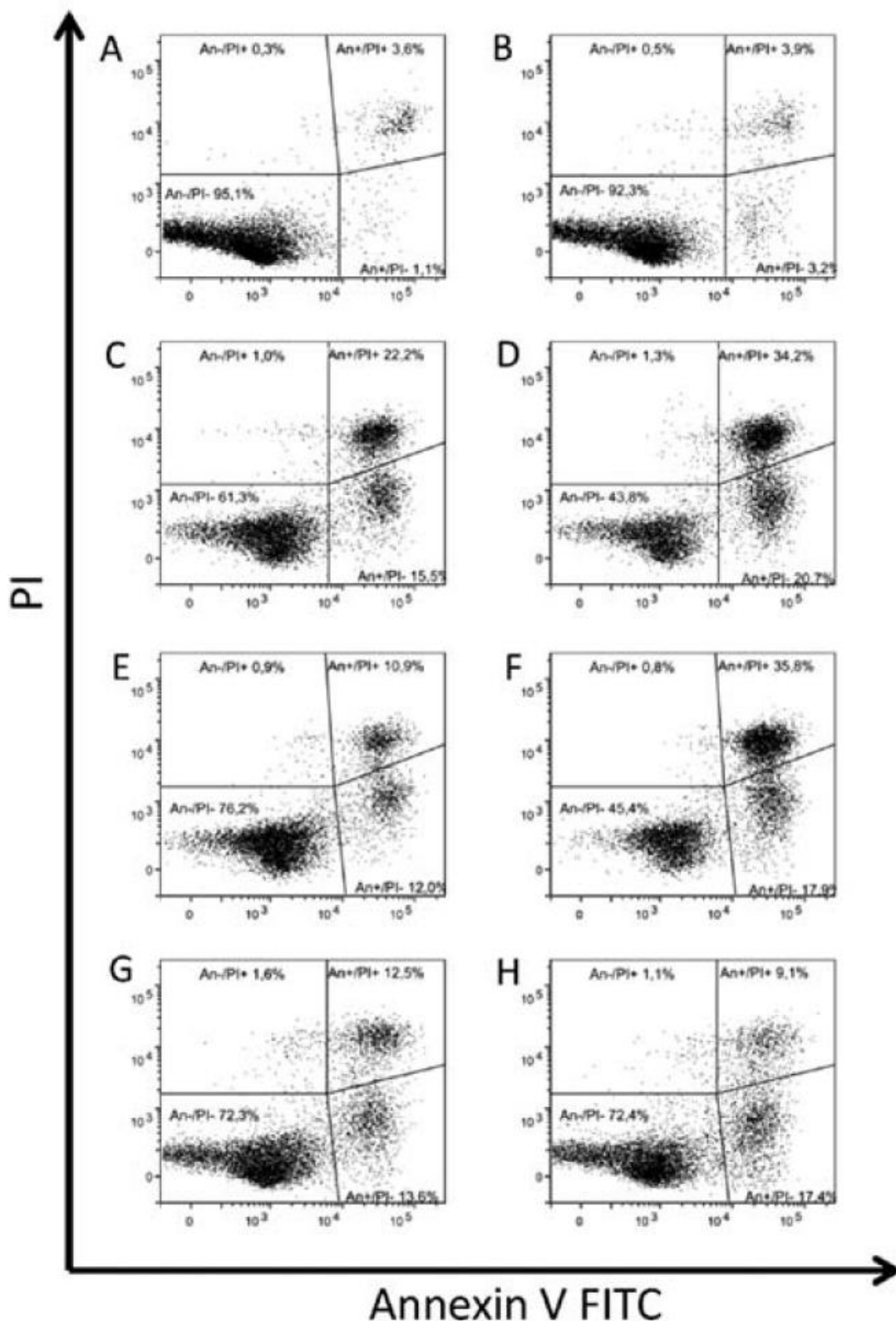
Obrázek č. 34. Cytotoxicita etoposidu v kombinaci s 1 mM VPA na neuroblastomovou linii UKF-NB-4. V grafu jsou porovnány hodnoty IC_{50} šesti situací kultivací značených E/E,V; V/V,E; E/V; 0/V,E; 0/E a V/E: (viz text).

Vybrané kultivační moduly byly dále použity pro poznání indukce apoptózy v testovaných buňkách. Ta byla stanovena metodou „Annexin V/PI“. V obrázku č. 35 jsou uvedeny výsledky vybraných kombinací kultivace buněk s etoposidem a valproátem (schéma kultivace je obdobné schématu uvedeném v tabulce č. 2). Výsledky signalizují, že valproát zvyšuje účinek etoposidu, pokud je k buňkám přidán po 24hodinové preinkubaci 8 μ M etoposidem (E/V). Opačná kultivační sekvence (V/E) zvýšení cytotoxicity etoposidu valproátem nevykazuje.



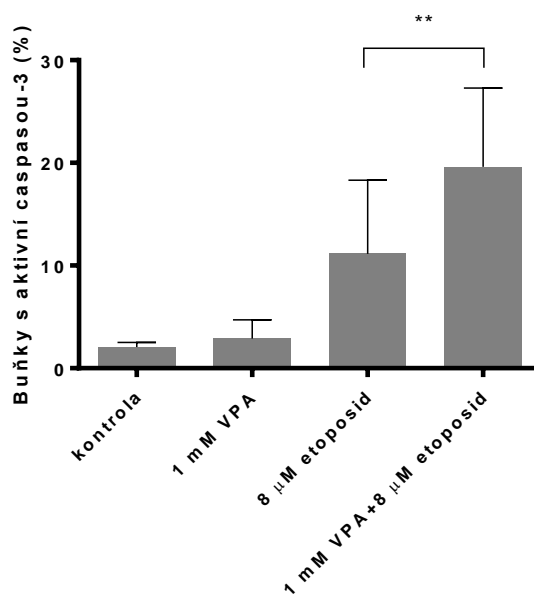
Obrázek č. 35. Viabilita buněk neuroblastomové linie UKF-NB-4 stanovena metodou „Annexin V/PI“. K – kontrolní kultivace buněk; (0) samotné médium; 8 μ M etoposid je značen (E) a 1 mM VPA (V). Buňky byly preinkubovány 24 hodin samotným médiem (0) či 8 μ M etoposidem (E) či 1 mM VPA (V) a poté s těmito látkami inkubovány 48 hodin (viz text). Nejvyšší účinnost, tedy snížení viability buněk (Annexin V-/PI- buněk), vykazuje kombinace E/V.

Typ působení 1 mM valproátu a 8 μ M etoposidu (aditivní nebo synergistický efekt) v linii UKF-NB-4 po 48hodinové kultivaci byl hodnocen sledováním apoptózy. Působení těchto látek současně bylo vyhodnoceno jako synergistické (obrázek č. 36, E a F). Kombinace kultivace buněk s 8 μ M etoposidem a 1 mM VPA zvýšila cytotoxický efekt samotného etoposidu a snížila populaci buněk Annexin V FITC⁺/PI⁻ (viabilních buněk). Zároveň bylo za uvedených podmínek paralelně testováno množství aktivní caspasy-3 v buňkách. Kombinovaná kultivace s etoposidem a valproátem zvyšuje počet buněk s aktivní caspasou-3 (obrázek č. 37). Získané výsledky prokazují, že indukce apoptózy v buňkách UKF-NB-4 etoposidem probíhá mechanismem zahrnujícím aktivaci enzymu caspasy-3.



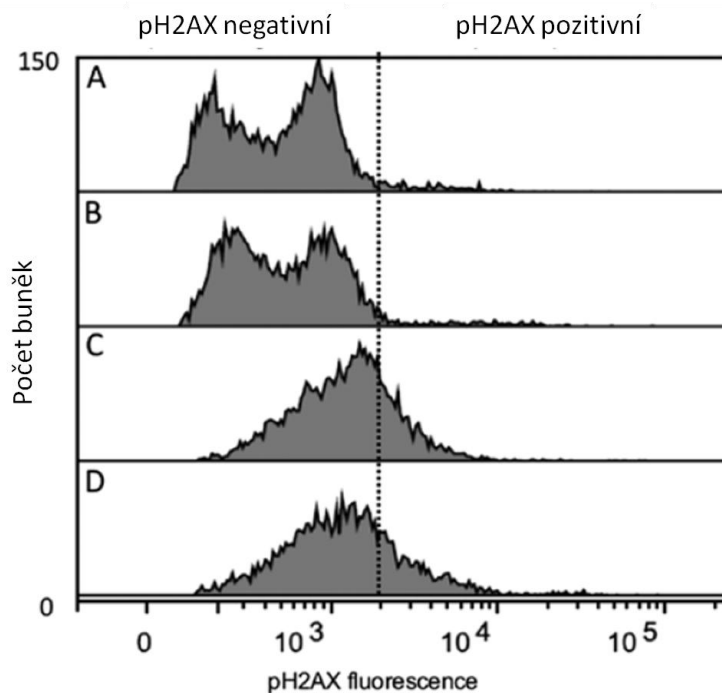
Obrázek č. 36. Indukce apoptózy v buňkách linie UKF-NB-4 vyvolané 48hodinovou kultivací s různými cytostatiky a VPA. Kontrolní kultivace buněk (A); kultivace s 1 mM VPA (B), s 20 μ M cisplatinou (C), s 8 μ M etoposidem (E), s 20 nM vincristinem (G). Kombinovaná kultivace buněk 1 mM VPA a cisplatinou (D), a etoposidu (F) a kombinace s vincristinem (H). Indukce apoptózy byla detekována metodou značením Annexinem V/FITC a PI. Annexin V negativní a PI negativní

buňky (levý dolní kvadrant) jsou považovány za živé (viabilní); Annexin V pozitivní a PI negativní (pravý dolní kvadrant) jsou považovány za časně apoptotické; Annexin V pozitivní a zároveň PI pozitivní buňky jsou považovány za pozdně apoptotické (pravý horní kvadrant). Buňky v levém horním kvadrantu jsou považovány za nekrotické či mechanicky poškozené (Annexin V negativní, PI pozitivní). 1 mM VPA neindukoval zásadní změny ve viabilitě buněk. Snížení viability buněk byla způsobena kultivací buněk s 20 μ M cisplatinou, 8 μ M etoposidem či 20 nM vincristinem. Kombinace 20 μ M cisplatinou či 8 μ M etoposidu s 1 mM VPA zvýšila jejich cytotoxický efekt a snížila populaci Annexin V FITC⁺/PI⁺ buněk. Tento jev nenastal, pokud byl 1 mM VPA kombinován s 20 nM vincristinem.



Obrázek č. 37. Vliv kultivace buněk linie UKF-NB-4 s 1 mM VPA, 8 μ M etoposidem či jejich kombinací po dobu 48 hodin na aktivaci caspasy-3. Kombinace 1 mM VPA a 8 μ M etoposidu produkuje nejvyšší procento buněk s aktivní caspasou-3. Samotný valproát aktivaci caspasy-3 v buňkách téměř neindukuje.

Kultivace buněk s 1 mM VPA v kombinaci s 4 μ M etoposidem nezvyšuje množství dvouřetězcových zlomů v buňkách linie UKF-NB-4 vyvolané 48hodinovou kultivací s etoposidem (obrázek č. 38). Dvouřetězcové zlomy byly určeny cytometricky, metodou značením fosforylovaného histonu H2AX (pH2AX) (96).



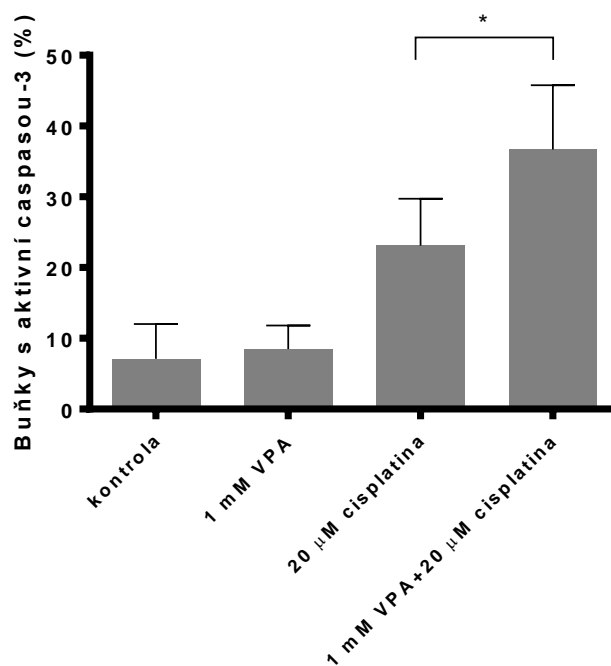
Obrázek č. 38. Analýza dvouřetězcových zlomů DNA pomocí značení fosforylovaného H2AX (pH2AX) v linii UKF-NB-4. Buňky byly kultivovány 48 hodin s médiem (A), s 1 mM VPA (B) s 4 μ M etoposidem (C) a v kombinaci 4 μ M etoposidu s 1 mM VPA (D). Množství buněk s fosforylovaným histonem H2AX při kultivaci buněk s etoposidem v kombinaci s valproátem se neliší od množství buněk kultivovaných se samotným etoposidem.

Z výsledků uvedených v kapitole 4.5 vyplývá, že citlivost linie UKF-NB-4 vůči etoposidu byla efektivně ovlivněna podáním netoxických koncentrací 1 mM VPA. Kultivace buněk za současné přítomnosti etoposidu a valproátu či preinkubace buněk s etoposidem s následnou kultivací s valproátem nejvíce potlačila růst buněk neuroblastomové linie UKF-NB-4. Různou sekvencí kultivace buněk s inhibitory HDAC a látkami poškozujícími DNA se zabývala také práce Luchenka se spolupracovníky (97). Tito autoři došli k závěru, že „prerelaxace“ DNA zvýšením acetylace histonu není nutná pro zvýšení účinku látek cílených na DNA. Nejvyšší účinnost kombinace látek byla zaznamenána při jejich společném působení.

4.6 Vliv cisplatinu a VPA na neuroblastomy

V další části práce bylo sledováno působení cisplatinu v kombinaci s valproátem na neuroblastomovou linii UKF-NB-4. Analýzy byly provedeny cytometricky, značením Annexinem V a PI. Netoxická koncentrace 1 mM VPA zvyšovala toxicitu 20 μ M

cisplatinou vůči testované buněčné linii. Procento viabilních buněk (Annexin V-/PI-) bylo sníženo z 61,3 % na 45,4 % (obrázek č. 36, C a D). Stejný trend byl nalezen i při sledování aktivace caspasy-3 v testovaných buňkách (obrázek č. 39). Kultivace buněk s 20 μM cisplatinou a 1 mM VPA zvyšovala aktivaci tohoto enzymu.

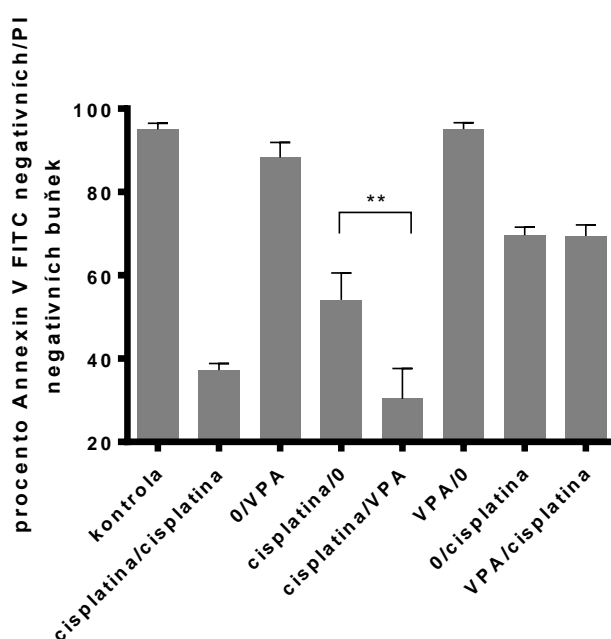


Obrázek č. 39. Buňky linie UKF-NB-4 s aktivní caspasou-3 po 48hodinové kultivaci těchto buněk s 1 mM VPA, 20 μM cisplatinou a jejich kombinací. Kombinace kultivace buněk s cisplatinou s valproátem zvyšuje procento buněk s aktivní caspasou-3 oproti kultivaci buněk se samotnou cisplatinou.

Na obrázku č. 40 jsou uvedeny výsledky z experimentů sledujících vybrané kombinace působení 20 μM cisplatinou a 1 mM valproátu vůči neuroblastomové linii UKF-NB-4. V tabulce č. 2 jsou popsány sekvence jednotlivých kultivačních situací (modulů). Výsledky signalizují, že valproát potencuje cytotoxický účinek cisplatinou, a to po 24hodinové preinkubaci buněk s 20 μM cisplatinou (cisplatina/VPA). Při opačné sekvenci kultivace (VPA/cisplatina), valproát cytotoxicitu cisplatinou nezvyšuje. To jsou výsledky analogické výsledkům zjištěných při testování vlivu VPA na cytotoxicitu etoposidu (kapitola 4.5).

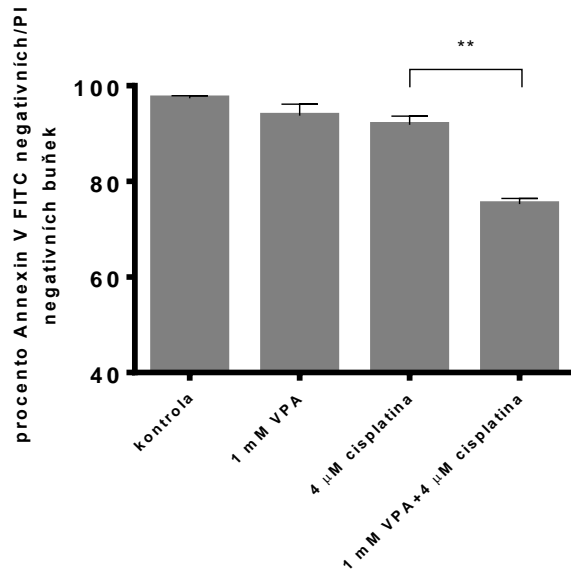
Tabulka č. 2. Schéma kultivací buněk linie UKF-NB-4 za různých kultivačních podmínek. Kombinována byla kultivace buněk s 20 μ M cisplatinou a 1 mM valproátem.

značení	0-24 h	24-72 h
kontrola	medium	nové medium
cisplatina/cisplatina	20 μ M cisplatina	20 μ M cisplatina
0/VPA	medium	1 mM valproát
cisplatina/0	20 μ M cisplatina	nové medium
cisplatina/VPA	20 μ M cisplatina	1 mM valproát
VPA/0	1 mM valproát	nové medium
0/cisplatina	medium	20 μ M cisplatina
VPA/cisplatina	1 mM valproát	20 μ M cisplatina



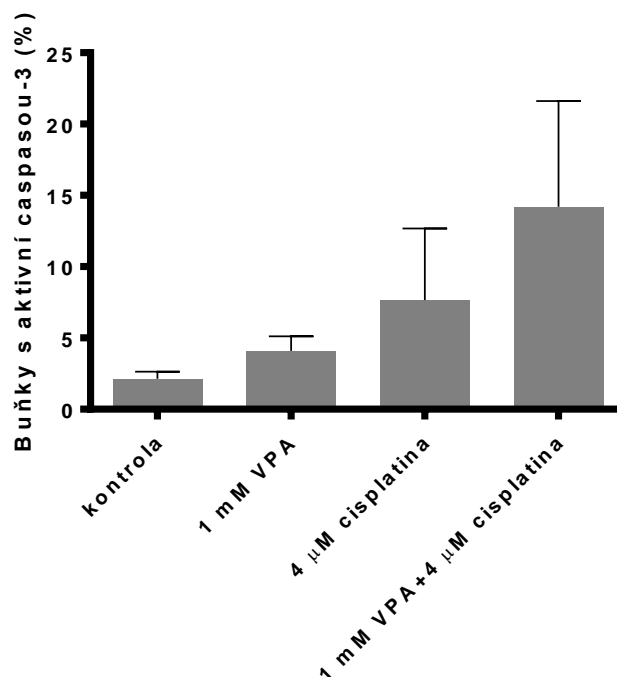
Obrázek č. 40. Indukce apoptózy sledovaná metodou „Annexin V/PI“ v neuroblastomové linii UKF-NB-4 v různých sekvencích kultivace s 20 μ M cisplatinou a 1 mM VPA. 24hodinová preinkubace buněk cisplatinou následovaná 24hodinovou kultivací buněk s VPA způsobuje nejvyšší toxicitu vůči testované buněčné linii.

Netoxická koncentrace VPA (1 mM) zvyšuje cytotoxicitu i téměř netoxické koncentrace 4 μ M cisplatinu [detekováno značením buněk Annexinem V a PI (obrázek č. 41)], a to po 48hodinové kultivaci buněk UKF-NB-4 s těmito látkami.



Obrázek č. 41. Viabilita buněk neuroblastomové linie UKF-NB-4 stanovena sledováním apoptózy metodou „Annexin V/PI“ po 48hodinové kultivaci s 1 mM VPA, 4 μ M cisplatinou a jejich kombinací. Kontrolní buňky byly kultivovány v médiu. Kombinace VPA a cisplatin snižuje podíl Annexin V negativních a PI negativních buněk (snižuje se viabilita buněk).

Podobný trend byl nalezen i při sledování aktivace caspasy-3 v testovaných buňkách. 48hodinová ko-kultivace buněk UKF-NB-4 s 1 mM VPA a 4 μ M cisplatinou zvyšuje podíl buněk s aktivovanou caspasou-3, oproti buňkám kultivovaným se samotnou cisplatinou (obrázek č. 42).

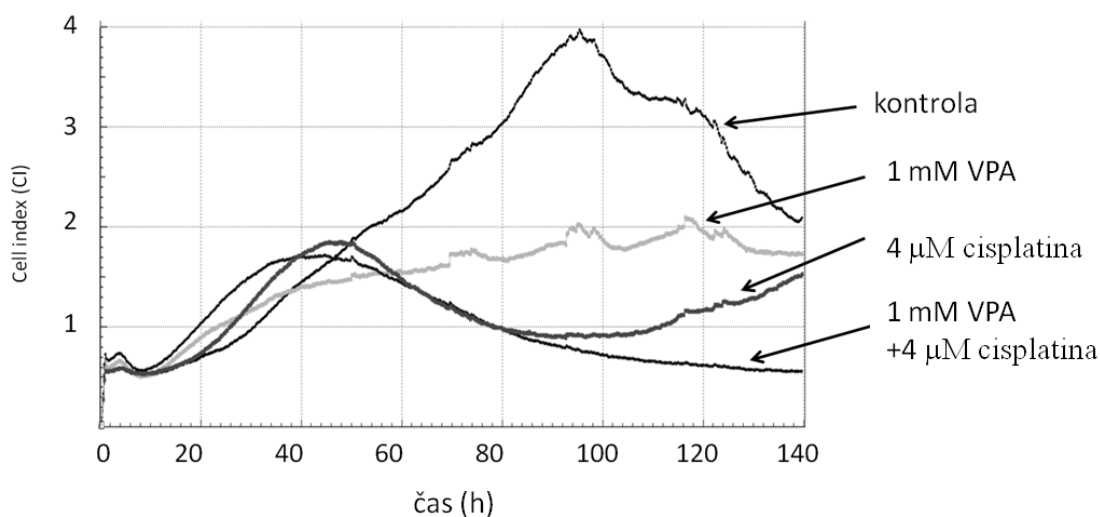


Obrázek č. 42. Buňky linie UKF-NB-4 s aktivní caspasou-3 po 48hodinové kultivaci těchto buněk s 1 mM VPA, 4 μM cisplatinou a jejich kombinací. Kombinace kultivace buněk s cisplatinou s valproátem zvyšuje procento buněk s aktivní caspasou-3 oproti kultivaci buněk se samotnou cisplatinou.

Kombinovaný účinek valproátu a cisplatiny byl rovněž studován další metodou, jejíž výhoda spočívá v nepřímé detekci buněčné smrti buněk bez jakéhokoli mechanicko/chemického zásahu do rostoucích buněk. Metoda xCELLigence detekuje „přisedlé“ buňky na základě změny impedance na povrchu kultivační jamky. To umožňuje detekovat „adherentně“ rostoucí buňky (69). Programovaná buněčná smrt je spojena se změnou jejich morfologie a ztrátou adheze, a tedy i se změnou signálu. Signál je metodou xCELLigence vyjadřován jako tzv. „Cell Index“ (CI) a jeho zvýšení odpovídá zvětšení množství buněk „adherentně“ rostoucích v kultivační jamce.

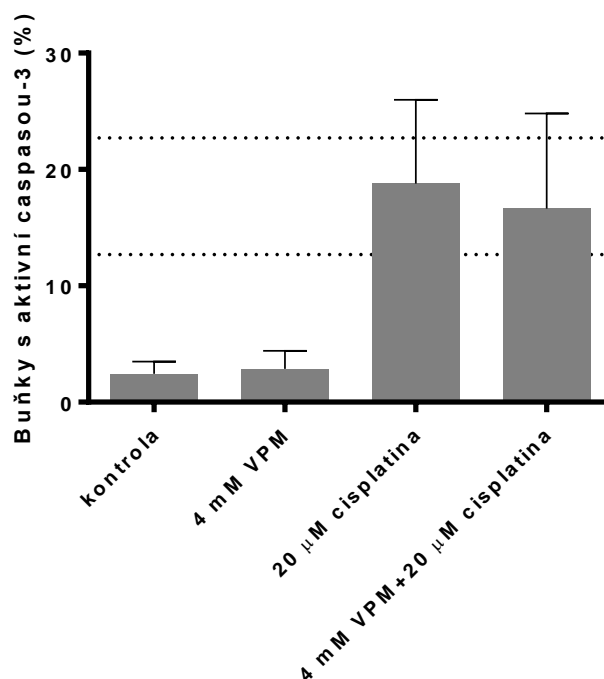
Na obrázku č. 43 jsou uvedeny hodnoty CI buněk kultivovaných pouze v médiu a kultivovaných s 1 mM VPA, s 4 μM cisplatinou a jejich kombinací. „Cell Index“ buněk UKF-NB-4 pěstovaných v čistém médiu roste s dobou kultivace. V čase kultivace okolo 90 hodin od začátku experimentu se hodnota CI rapidně snižuje díky nedostatku živin v kultivačním médiu. Hodnoty CI buněk kultivovaných s 1 mM VPA se s délkou kultivace mírně zvyšují. Oproti kontrole pomaleji, což je v souladu se zjištěnou změnou buněčného cyklu a prodloužení zdvojovacího času buněk po kultivaci s 1 mM VPA. Při kultivaci buněk s 4 μM cisplatinou se hodnota CI zvyšuje do doby přibližně 50 hodin od začátku

kultivace, poté hodnoty CI klesají, pravděpodobně díky indukci apoptózy (viz výsledky uvedené v obrázcích č. 41 a 42). Hodnota CI se snižuje, ovšem v době 100 hodin od začátku kultivace se začíná opět zvyšovat. To si vysvětlujeme růstem buněk rezistentních k použité dávce cisplatinu. Kultivace buněk s 1 mM valproátem v kombinaci s 4 μ M cisplatinou navodila obdobný průběh hodnot CI v závislosti na době kultivace jako při kultivaci se samotnou cisplatinou až na změnu, kdy hodnota CI po 100hodinách neroste. Zdá se tedy, že kombinace valproátu s cisplatinou likvidovala i většinu buněk rezistentních k cisplatině. Tato problematika si však žádá ještě další experimenty včetně experimentů s liniemi rezistentními k platinovým cytostatikům.



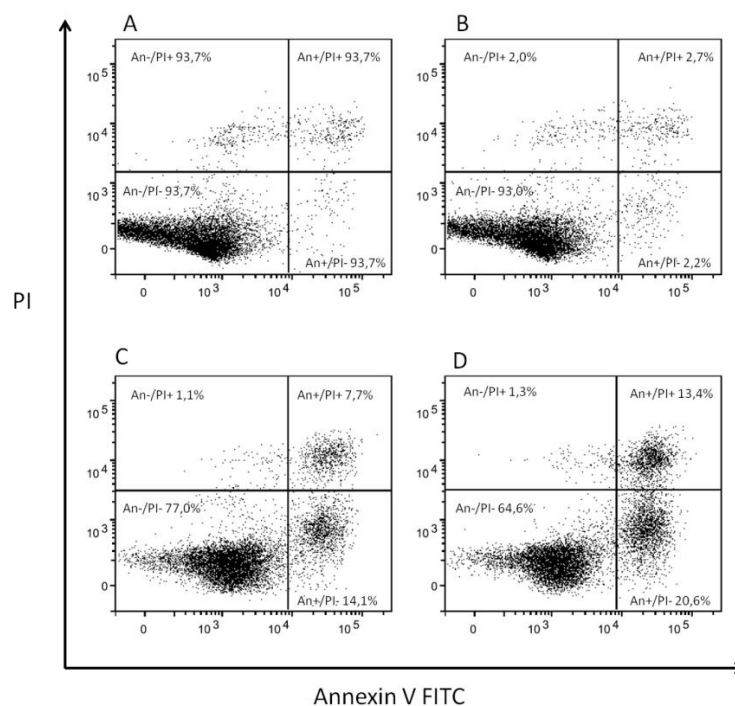
Obrázek č. 43. Změna hodnot „Cell Indexu“ (CI) buněk linie UKF-NB-4 kultivované v médiu (kontrola), s 1 mM VPA, 4 μ M cisplatinou či jejich kombinací v závislosti na době inkubace. S rostoucí dobou inkubace buněk se hodnoty CI mění, kombinace valproátu a cisplatinu snižuje hodnoty CI. Podobný průběh těchto hodnot vykazuje kultivace buněk s cisplatinou, zde byl ovšem po 100 hodinách pozorován nárůst hodnot CI.

V kombinaci s 20 μ M cisplatinou byl v neuroblastomové linii UKF-NB-4 testován také vliv analogu valproátu, valpromidu, sloučeniny která nevykazuje inhibiční aktivitu vůči HDAC. Jeho netoxická koncentrace nezvyšovala acetylaci histonů H3 a H4 (obrázek č. 24) v linii UKF-NB-4 a zároveň také neovlivnila toxicitu cisplatinu vůči této neuroblastomové linii (obrázek č. 44) měřené sledováním aktivace caspasy-3 v buňkách. Ukazuje se tedy, že účinek valproátu zvyšující cytotoxicitu cisplatinu je závislý na zvýšené acetylaci histonů.



Obrázek č. 44. Buňky linie UKF-NB-4 s aktivní caspasou-3 po 48hodinové kultivaci těchto buněk s 4 mM VPM, 20 μM cisplatinou a jejich kombinací. Kombinace kultivace buněk s cisplatinou a valpromidem nezvyšuje procento buněk s aktivní caspasou-3 oproti kultivaci buněk se samotnou cisplatinou.

Indukovat zvýšení acetylce histonů v linii UKF-NB-4 lze i jinými inhibitory HDAC, jedním z nich je inhibitor HDAC označovaný jako entinostat (MS-275). Kombinace kultivace buněk s netoxickou koncentrací entinostatu (250 nM) a 20 μM cisplatinu snižuje viabilitu buněk (Annexin V-/PI- populace buněk) oproti viabilitě buněk kultivovaných se samotnou cisplatinou (obrázek č. 45). O potenciaci účinku cytostatik jako je cisplatinu inhibitory HDAC lze tedy uvažovat jako o obecnějším mechanismu.



Obrázek č. 45. Viabilita buněk neuroblastomové linie UKF-NB-4 stanovena sledováním apoptózy metodou „Annexin V/PI“ po 48hodinové kultivaci s 250 nM entinostatem, 20 μ M cisplatinou a jejich kombinací. Kontrolní buňky byly kultivovány v médiu. Kombinace entinostatu a cisplatinu snižuje podíl Annexin V negativních a PI negativních buněk (snižuje se viabilita buněk).

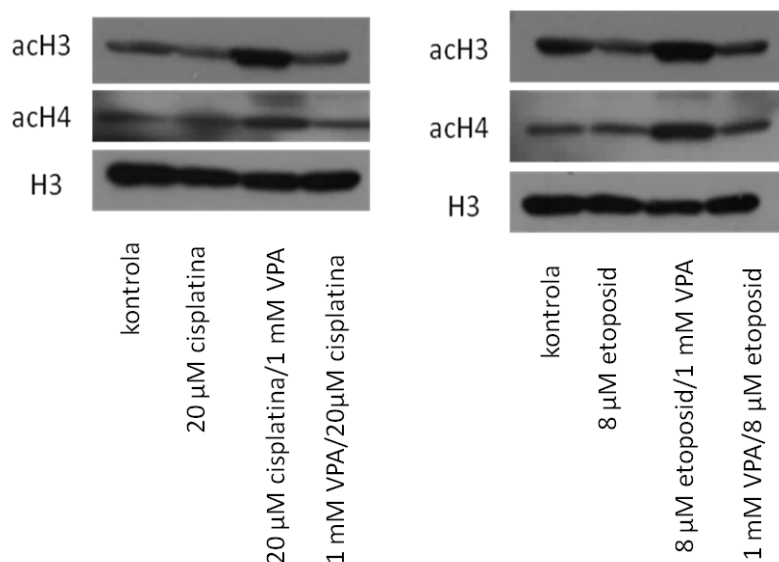
V experimentech testující vliv kombinace cisplatinu a etoposidu byl použit také jiný inhibitor HDAC, trichostatin A. Jak bylo popsáno výše, trichostatin A v netoxické koncentraci (40 nM) neovlivňuje v linii UKF-NB-4 acetylaci histonů H3 a H4. Při společném působení s cisplatinou či etoposidem nezvyšoval ani jejich cytostatický efekt. Tyto výsledky jsou podobné výsledkům z experimentů sledujících vliv kombinace valpromidu a cisplatinu. Z uvedených výsledků lze dedukovat i mechanismus potenciace cisplatinu a etoposidu. Pro potenciaci jejich účinku je nutná změna acetylace H3 a H4 v buňkách linie UKF-NB-4 (viz výsledky uvedené v publikaci, která je uvedena jako příloha č. 4 disertační práce).

4.7 Vliv cisplatinu a etoposidu v kombinaci s VPA na acetylaci histonů H3 a H4 v neuroblastomové linii UKF-NB-4

Testováním acetylace histonů H3 a H4 kultivací buněk UKF-NB-4 s 20 μ M cisplatinou, 8 μ M etoposidem a 1 mM VPA bylo zjištěno, že je míra acetylace histonů

klíčová pro pozorované změny viability buněk indukované těmito cytostatiky (obrázek č. 46).

Zjištěno bylo, že 8hodinová kultivace buněk s cisplatinou či etoposidem výrazně neovlivňuje změny acetylce histonu H4. Acetylce histonu H3 byla v obou vzorcích buněk kultivovaných s těmito cytostatiky lehce snižena. Kultivace buněk 8 hodin s 1 mM VPA a následně 24 hodin s 20 μ M cisplatinou či 8 μ M etoposidem nemění acetylaci testovaných histonů. Výrazný nárůst acetylce histonů H3 a H4 byl zaznamenán ve vzorcích buněk kultivovaných 24 hodin s 20 μ M cisplatinou či 8 μ M etoposidem a následně 8 hodin pouze s 1 mM valproátem. Tato sekvence podání látek je také nejúčinnější v množství apoptotických buněk (obrázek č. 35 a 40). Preinkubace buněk buněk cisplatinou či etoposidem a jejich následná kultivace s valproátem totiž také zvyšuje apoptózu buněk, což je spojeno se zvýšenou acetylací histonů těchto buněk (obrázek č. 46).



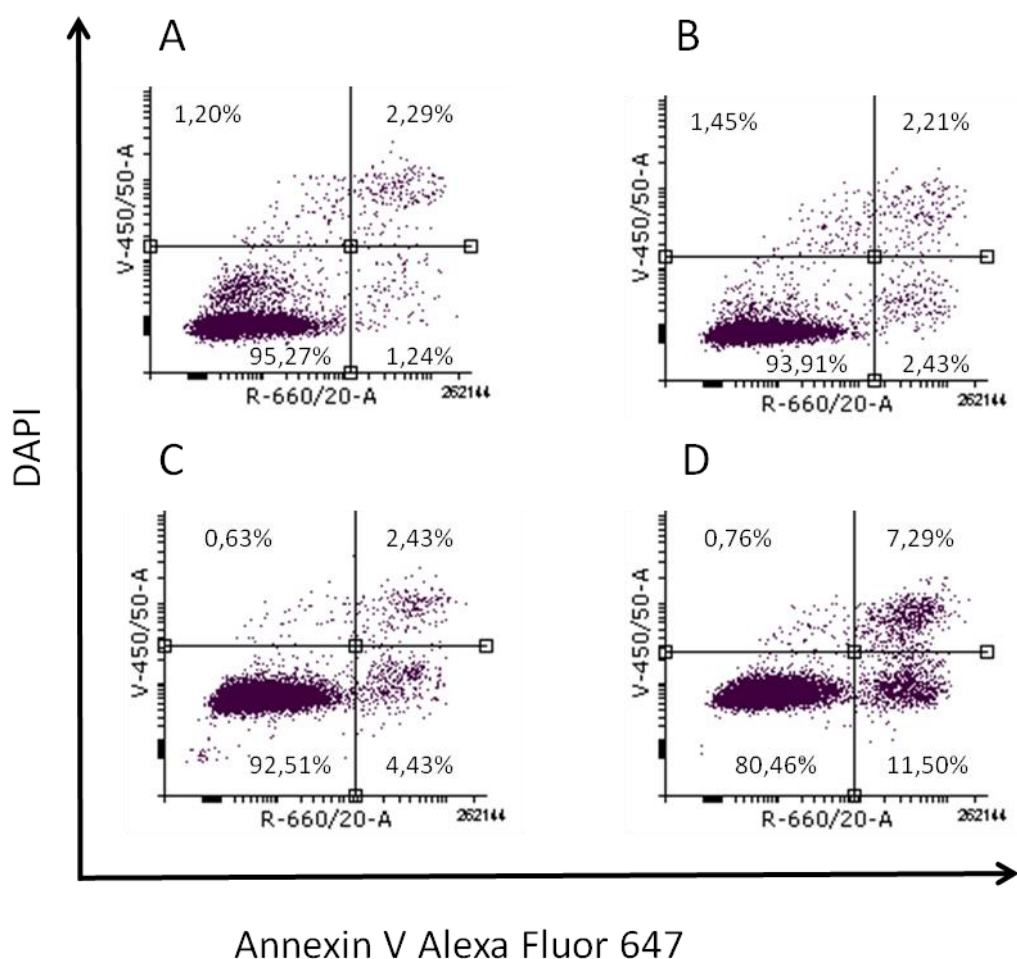
Obrázek č. 46. Acetylce histonů H3 a H4 v buňkách UKF-NB-4 kultivovaných 8 hodin s 1 mM VPA, s 20 μ M cisplatinou a 8 μ M etoposidem. Histon H3 byl použit jako kontrola správného nanesení vzorku. Expres histonů byla analyzována metodou Western-blotting. Buňky byly preinkubovány 24 hodin s cisplatinou či etoposidem a následně kultivovány 8 hodin s VPA, což vedlo ke zvýšení acetylce histonů H3 a H4. Opačná sekvence, tedy 8hodinová preinkubace buněk VPA a následná 24hodinová kultivace buněk s cisplatinou či etoposidem acetylce histonů nemění.

Většina výsledků uvedených v kapitolách 4.5, 4.6 a 4.7 je součástí publikací, které jsou přílohy disertační práce č. 2 a 4.

4.8 Vliv ellipticinu a VPA na neuroblastomy

Součástí experimentů studujících společné působení valproátu jako inhibitoru HDAC a různých cytostatik způsobujících změny DNA v buňkách bylo i testování vlivu ellipticinu na linii UKF-NB-4.

48hodinová ko-kultivace buněk UKF-NB-4 s 3 μM ellipticinem a 1 mM valproátem zvyšuje apoptotickou buněčnou smrt těchto buněk oproti jejich kultivaci s 3 μM ellipticinem. Samotná kultivace s 3 μM ellipticinem či 1 mM VPA apoptotickou smrt detekovanou značením Annexinem V (Alexa Fluor 647) a DAPI nevyvolává (obrázek č. 47). Pouze indukce časně apoptózy buněk jejich kultivací s ellipticinem je výrazněji zvýšena (viz kvadrant vpravo dole v obrázku č. 47 C).

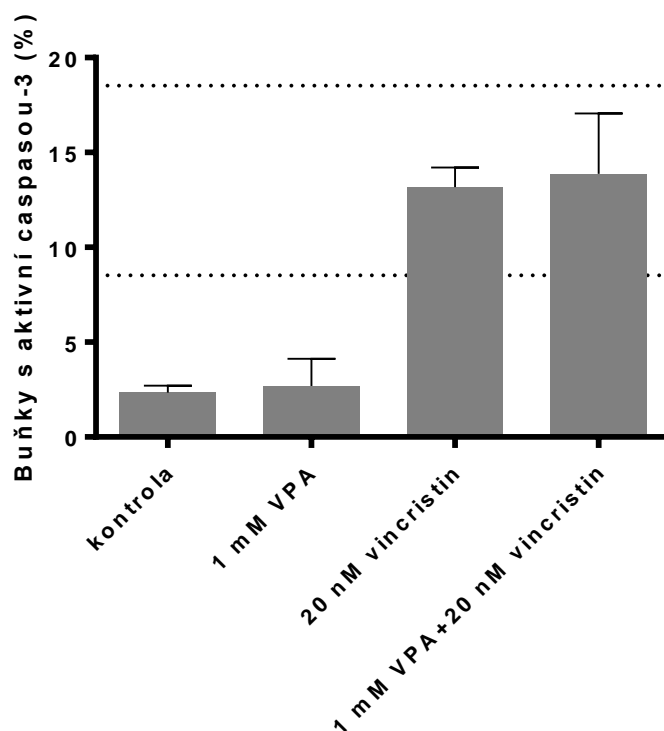


Obrázek č. 47. Viabilita buněk linie UKF-NB-4 detekovaná metodou „Annexin V/DAPI“ po 48hodinové kultivaci s 1 mM VPA (B), 3 μM ellipticinem (C) a jejich kombinací (D). Kombinace valproátu s ellipticinem indukuje největší množství časně (11,50 %) a pozdně apoptotických buněk (7,29 %). Kontrolní buňky byly kultivované v čistém médiu (A).

4.9 Vliv vincristinu a VPA na neuroblastomy

Výsledky uvedené v předešlých kapitolách (kapitola 4.5, 4.6, 4.7 a 4.8) ukazují, že VPA mění v linii UKF-NB-4 cytotoxicitu cisplatiny, etoposidu a ellipticinu, tedy látek cílených na buněčnou DNA. Dalším cílem disertační práce bylo proto analyzovat působení jiného konvenčního cytostatika, které působí odlišným mechanismem, konkrétně vincristinu. Mechanismus jeho účinku tkví v inhibici polymerace tubulinových dimerů, což znemožňuje tvorbu mitotického vřeténka.

Vystavení buněk UKF-NB-4 kombinaci 20 nM vincristinu a 1 mM valproátu nezvyšuje aktivaci caspasy-3 v těchto buňkách (obrázek č. 48). Nebyl také nalezen žádný rozdíl v zastoupení Annexin V-/PI- buněk po kultivaci s 20 nM vincristinem oproti kultivaci s 20 nM vincristinem kombinovaného s 1 mM VPA (obrázek č. 36; G, H).

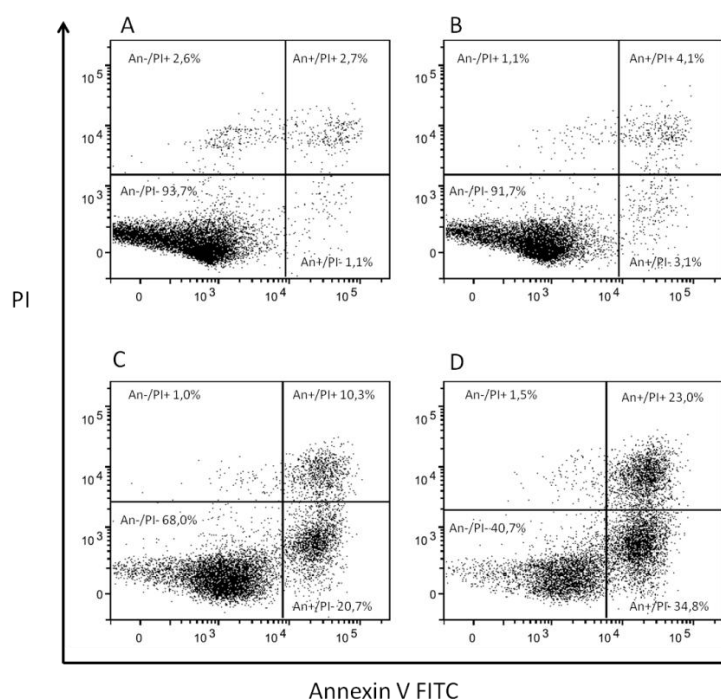


Obrázek č. 48. Buňky linie UKF-NB-4 s aktivní caspasou-3 po 48hodinové kultivaci těchto buněk s 1 mM VPA, 20 nM vincristinem a jejich kombinací. Kombinace valproátu a vincristinu neindukovala v linii UKF-NB-4 zvýšení aktivní caspasy-3 v jednotlivých buňkách v porovnání s kultivací se samotným 20 nM vincristinem.

4.10 Vliv UV záření a VPA na neuroblastomy

Z předchozích výsledků vyplývá, že VPA jako inhibitor HDAC zvyšuje toxicitu látek, které poškozují buněčnou DNA (cisplatina, etoposid, ellipticin). Poškození DNA lze také indukovat působením UV záření, o kterém je známo, že indukuje dvouřetězcové zlomy DNA, a tím iniciuje programovanou buněčnou smrt (98).

Valproát snížil množství viabilní populace buněk linie UKF-NB-4 (buněk Annexin-/PI-) v kombinaci s UV zářením (obrázek č. 49). Již samotné UV záření indukovalo apoptotickou buněčnou smrt linie UKF-NB-4. Okolo 30 % buněk bylo po ozáření UV zářením apoptotických (Annexin V+/PI- a Annexin V+/PI+).



Obrázek č. 49. Indukce apoptózy v buňkách linie UKF-NB-4 vyvolané 48hodinovou kultivací po ozáření těchto buněk UV zářením s 1 mM VPA. Buňky kultivované v samotném médiu (A), s 1 mM VPA (B), po UV ozáření (C) a buněk ozářených a následně kultivovaných s 1 mM VPA (D). Samotné UV záření indukovalo snížení viabilních Annexin V negativních/PI negativních buněk na 68 %, přidání VPA k ozářeným buňkám pak snížení na 40,7 %.

Získané výsledky jsou v souladu s výsledky publikovanými Harikrishnanem a spolupracovníky (99), který testoval potenciaci účinku UV záření v obdobném uspořádání experimentu v linii chronické myeloidní leukemie K562.

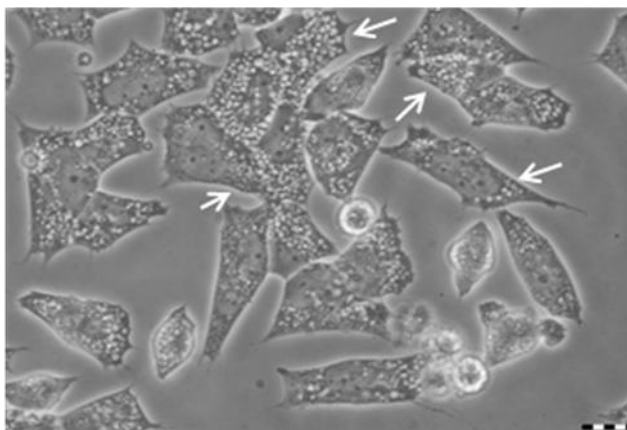
4.11 Ovlivnění chemorezistence neuroblastomových buněk vůči ellipticinu

Jak bylo zjištěno v dřívějších pracích laboratoří, ve kterých byla disertační práce vypracována, ellipticin je cytostatická látka, která je schopná indukovat programovanou buněčnou smrt v neuroblastomových buněčných liniích. Ellipticin působí na nádorové buňky především poškozením DNA (interkaluje do struktury DNA), inhibuje topoisomerasu II, váže se kovalentně na DNA po enzymové aktivaci cytochromem P450 a/nebo peroxidasou (100–102). Dlouhodobá kultivace neuroblastomových buněk s ellipticinem vede k vytvoření buněčné linie, která je vůči ellipticinu rezistentní (68). V další části disertační práce byl studován mechanismus této rezistence.

Experimenty studující rezistenci buněk vůči ellipticinu jsou výsledkem několika spolupracujících pracovišť. Práce byla provedena zejména společně s MVDr. Janem Hrabětou, Ph.D. a školitelkou prof. RNDr. Marií Stiborovou, DrSc. Výsledky jsou součástí připravované publikace (viz rukopis v přípravě uvedený jako příloha disertační práce č. 5).

Kompartmentace ellipticinu v buněčné linii UKF-NB-4

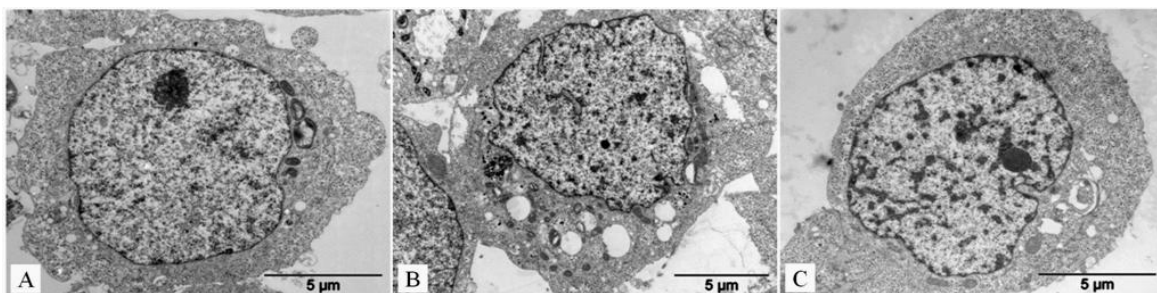
Při kultivaci buněk neuroblastomové linie UKF-NB-4 bylo zjištěno, že 5 μM ellipticin indukuje v těchto buňkách tvorbu vakuol, které jsou viditelné inverzním mikroskopem (obrázek č. 50).



Obrázek č. 50. Neuroblastomová linie UKF-NB-4 kultivovaná 24 hodin s 5 μM ellipticinem. Ellipticin indukuje cytoplasmatické vakuoly uvnitř buněk (viz bílé šipky).

Vakuoly (bílé okrouhlé objekty uvnitř cytoplasmy) byly v buňkách UKF-NB-4 detekovány za použití transmisního elektronového mikroskopu již po 60minutové kultivaci

s 5 μM ellipticinem (obrázek č. 51; B). Cílem bylo zjistit, zda se jedná o lysosomy, a jak je možné tvorbu vakuol v buňkách ovlivnit.

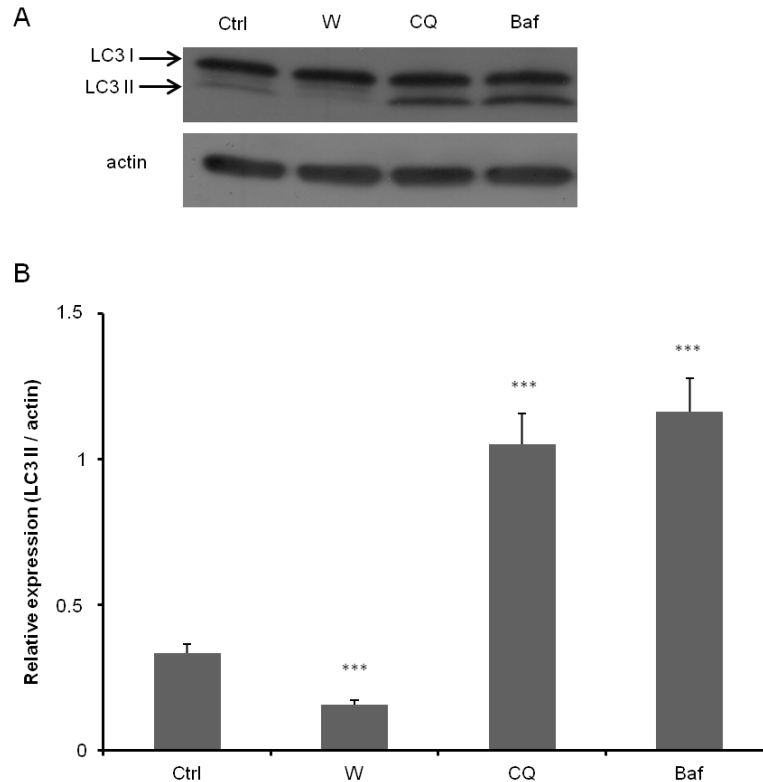


Obrázek č. 51. Obrázek z transmisního elektronového mikroskopu neuroblastomové linie UKF-NB-4 (A-C); A) kontrolní buňky, B) kultivace 1 h s 5 μM ellipticinem, C) kultivace 1 h s 100 nM bafilomycinem A a 5 μM ellipticinem. Na obrázku C) je patrné téměř úplné vymizení cytoplasmatických vakuol, které jsou zřetelné na obrázku B).

Inhibice procesu autofagie v neuroblastomové linii UKF-NB-4

V liniích UKF-NB-4 byly testovány tři látky, o nichž je známo, že ovlivňují tvorbu jednomembránových kompartmentů v buňce. Testován byl wortmannin (W), který negativně ovlivňuje inhibicí kinasy PI3K tvorbu autofagosomů, a tím inhibuje autofagii (103). Dále byl testován chloroquin (CQ), látka používaná v léčbě malárie, která také působí jako inhibitor autofagie. Chloroquin je lysosomotropní látka, zvyšující pH v lysosomech, a tím přerušující degradaci autofagosomů (104). Podobným mechanismem působí též třetí testovaná látka, bafilomycin A (Baf). Bafilomycin A inhibuje V-ATPasu, enzym zodpovědný za vývoj snížení pH v lysosomech. Tím inhibuje fúzi lysosomů a autofagosomů (105).

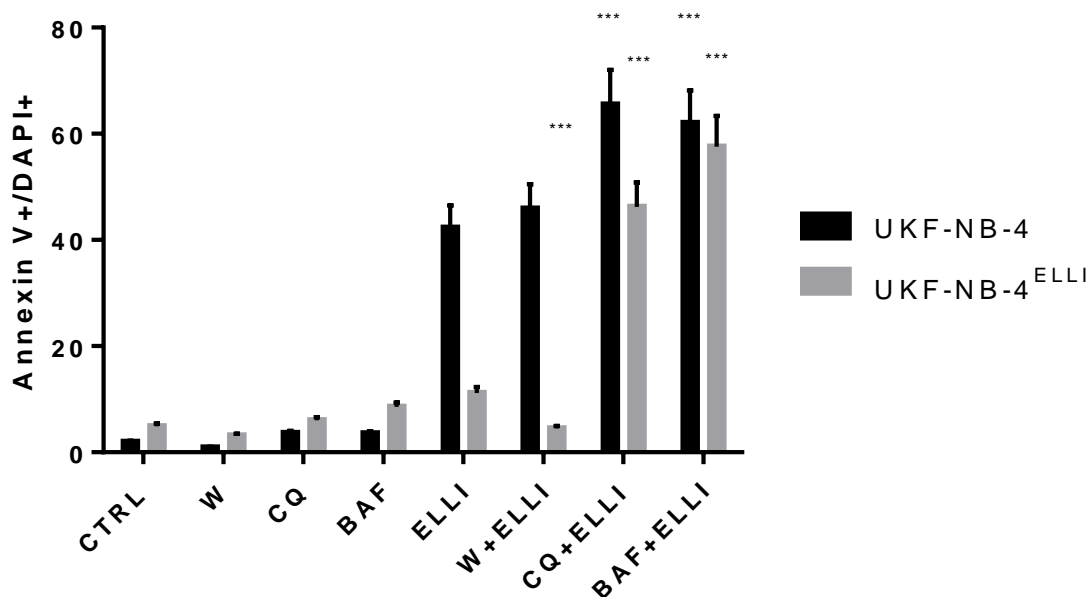
Míra autofagie byla sledována konverzí proteinu LC3 I na LC3 II. Jedná se o metodu standardní pro detekci autofagie (106,107). Na obrázku č. 52 jsou uvedeny změny exprese proteinů LC3 I a LC3 II po kultivaci buněk 4 hodiny v „Hanks’ balanced salt solution” (HBSS). Kultivace buněk v tomto mediu (médium chudé na živiny) mění expresi LC3 I a LC3 II a vede k vývoji procesu autofagie. V dalším experimentu byly buňky kultivovány v uvedeném mediu, které však obsahovalo 100 nM wortmannin nebo 25 μM chloroquin či 100 nM bafilomycin A (obrázek č. 52). Všechny tři použité inhibitory autofagie jsou účinné, mění expresi proteinu LC3 II. Wortmannin snižuje tuto expresi díky inhibici tvorby autofagosomů. Chloroquin a bafilomycin A naopak zvyšují expresi LC3 II díky inhibici degradace vytvořených autofagosomů.



Obrázek č. 52. Sledování změn autofagie v linii UKF-NB-4 po 4hodinové kultivaci v HBSS médiu expresí proteinu LC3 I a II. Buňky byly kultivovány 4 hodiny v médiu HBSS buď s přidáním 100 nM wortmanninu, 25 μ M chloroquinu či 100 nM bafilomycinu A. A) výsledná exprese proteinu LC3 I a II sledovaná metodou Western-blotting. Aktin byl použit jako kontrola správného nanesení vzorků. B) relativní exprese LC3 II vůči expresi aktinu vyjádřená graficky. Exprese proteinu LC3 II je snižena v buňkách kultivovaných s wortmaninem, zvýšená v buňkách kultivovaných s chloroquinem a bafilomycinem A.

Vliv wortmanninu, chloroquinu a bafilomycinu A na cytotoxicitu ellipticinu v neuroblastomových buněčných liniích

V této části disertační práce byl sledován i vliv kombinace výše testovaných inhibitorů s ellipticinem na viabilitu buněk UKF-NB-4 a buněk této linie rezistentní vůči ellipticinu (linie označovaná jako UKF-NB-4^{ELLI}). Buňky byly kultivovány s ellipticinem, bafilomycinem A, chloroquinem a wortmanninem. Látky samotné v linii UKF-NB-4 neindukovaly pozdní apoptózu (Annexin V+/DAPI+) až na kultivaci buněk s ellipticinem. Kombinace ellipticinu s chloroquinem či bafilomycinem A indukovala pozdní apoptózu (Annexin V+/DAPI+ buňky) v obou liniích UKF-NB-4 i UKF-NB-4^{ELLI}, a to ve vysoké míře (obrázek č. 53).



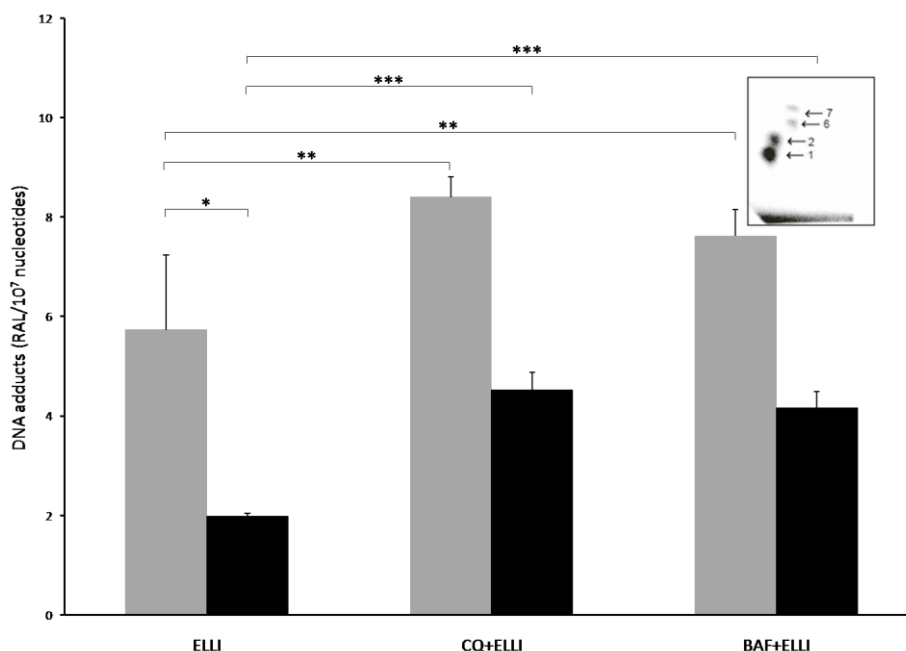
Obrázek č. 53. Indukce tvorby pozdně apoptotických buněk (detekované Annexinem V a DAPI) v neuroblastomových buňkách látkami ovlivňujícími jejich viabilitu. Buňky linie UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} byly kultivovány 24 hodin s 5 μ M ellipticinem (ELLI), 100 nM bafilomycinem A (BAF), 25 μ M chloroquinem (CQ), 100 nM wortmanninem či jejich kombinacemi. Chloroquin a bafilomycin A, ale ne wortmannin, potencoval indukci apoptózy vyvolanou ellipticinem.

Z výsledků uvedených na obrázku č. 53 vyplývá, že potenciace účinku ellipticinu chloroquinem a bafilomycinem A není pravděpodobně závislá na inhibici autofagie. Kombinace kultivace buněk s ellipticinem a wormanninem nezvyšuje účinnost ellipticinu. Linie UKF-NB-4^{ELLI}, rezistentní vůči ellipticinu (cca pouze 10 % pozdně apoptotických buněk oproti cca 40 % buněk linie UKF-NB-4), byla po kombinované kultivaci s ellipticinem a chloroquinem či bafilomycin A senzitivována vůči ellipticinu. Kultivace buněk s bafilomycinem A a chloroquinem pomohly překonat rezistenci těchto buněk vůči ellipticinu.

Tvorba kovalentních aduktů ellipticinu s DNA po kultivaci buněk linie UKF-NB-4 s ellipticinem v kombinaci s chloroquinem či bafilomycinem A

Expozice neuroblastomových buněk ellipticinem v kombinaci s chloroquinem či bafilomycinem A ovlivňuje v těchto buňkách (UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI}) i tvorbu kovalentních aduktů ellipticinu s DNA (obrázek č. 54). Kombinace kultivace buněk s ellipticinem a bafilomycinem A či chloroquinem (obě látky byly přidány 20 minut před

24hodinovou kultivací s ellipticinem, pro indukci zvýšení pH v lysosomech) zvyšuje tvorbu aduktů ellipticinu s DNA v obou testovaných liniích. Podrobné výsledky a kvantifikace jednotlivých aduktů ellipticinu s DNA jsou uvedeny v obrázku č. 54 a jsou součástí připravované publikace, která tvoří přílohu č. 5 disertační práce.

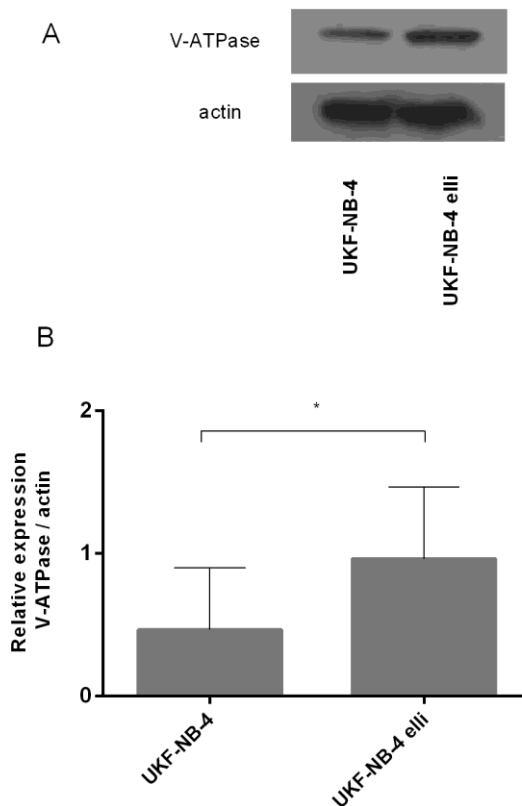


Obrázek č. 54. Množství aduktů (součet aduktů 1, 2, 6 a 7 – viz insert) s DNA po 24hodinové kultivaci buněk linie UKF-NB-4 (šedě) a UKF-NB-4^{ELLI} (černě) s 5 μ M ellipticinem (ELLI) a jeho kombinací se 100 nM bafilomycinem A (BAF) či 25 μ M chloroquinem (CQ). Kombinace kultivace buněk s ellipticinem a BAF či CQ zvyšuje tvorbu aduktů ellipticinu s DNA v obou testovaných liniích.

Ze získaných výsledků vyplývá, že linie UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} jsou rozdílně citlivé vůči cytostatiku ellipticinu. Ellipticin indukuje za stejné koncentrace tvorbu méně pozdně apoptotických buněk (obrázek č. 53) a zároveň tvoří v rezistentní linii UKF-NB-4^{ELLI} méně kovalentních aduktů s DNA (obrázek č. 54).

Expresse proteinu enzymu V-ATPasy v liniích UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI}

Analýzou exprese V-ATPasy, enzymu zodpovědného za acidifikaci lysosomů, bylo zjištěno, že neuroblastomová linie UKF-NB-4^{ELLI} oproti mateřské linii UKF-NB-4 exprimuje více tohoto proteinu (obrázek č. 55). Tímto mechanismem by tedy skutečně mohla být v linii UKF-NB-4^{ELLI} indukována rezistence vůči ellipticinu, jak bylo předpokládáno v práci Procházky a spolupracovníků (68). Expresse genu V-ATPasy byla v rezistentní linii pozměněna.



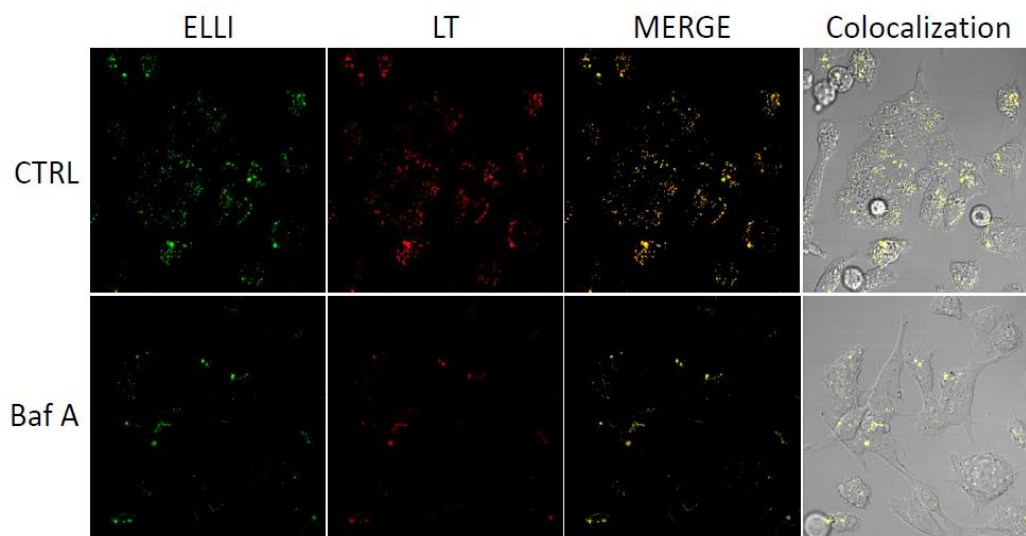
Obrázek č. 55. Expresa V-ATPasy v liniích UKF-NB-4 a rezistentní linii vůči ellipticinu UKF-NB-4^{ELLI}. A) exprese V-ATPasy analyzována pomocí metody Western-blotting je vyšší v rezistentní linii. Aktin byl použit jako kontrola správného nanesení vzorku. B) kvantifikace exprese V-ATPasy, relativně vůči expresi aktinu.

Analýza lokalizace ellipticinu v buňkách UKF-NB-4 pomocí konfokální mikroskopie

Shrneme-li výsledky z této části práce, lze konstatovat, že „vychytní“ ellipticinu do buněčných vakuol je způsobeno jeho přednostním transportem do acidifikovaných kompartmentů buněk, lysosomů. Pro sledování přítomnosti molekuly ellipticinu neuroblastomových buňkách byla použita konfokální mikroskopie. Buňky UKF-NB-4 byly „označeny“ fluorescenční barvou specifickou pro acidifikované buněčné kompartmenty, „LysoTracker Red“ (108). Ellipticin je fluorescenčně aktivní látka, na obrázku č. 56 viditelná zeleně. Výsledky uvedené na obrázku č. 56 ukazují tvorbu vakuol v buňkách UKF-NB-4 a jejich téměř úplné vymizení po přidání bafilomycinu A při kultivaci buněk 1 hodinu. 75 nM „LysoTracker Red“ byl přidán po kultivaci buněk po dobu 30 minut. Bafilomycin A také snížil kumulaci „markeru“ lysosomů „LysoTracker Red“

v lysosomech. Navíc bafilomycin A, který zvyšuje pH v lysosomech, také snižuje množství elliptycinu lokalizovaného v těchto kompartmentech.

Metodou fluorescenční mikroskopie se podařilo prokázat, že ellipticin je v buňkách linie UKF-NB-4 lokalizován v těchto kompartmentech. Narušení pH lysosomů bafilomycinem A snižuje akumulaci elliptycinu v lysosomech, a tím pravděpodobně zvyšuje jeho přítomnost v jádře. V jádře se váže aktivovaný ellipticin na DNA, a tím tak indukuje apoptózu buněk.



Obrázek č. 56. Lokalizace elliptycinu v buňkách linie UKF-NB-4 po 1 hodině sledovaná konfokálním mikroskopem. „LysoTracker Red“ (75 nM) značí lokalizaci lysosomů (LT), buňky kultivované s 5 μ M ellipticinem (ELLI) vykazují akumulaci elliptycinu (zelených teček). Kolo-localizace elliptycinu a „LysoTrackeru red“ je znázorněna jako překryv těchto dvou situací (oranžově, MERGE). Z obrázku je patrné, že ellipticin se v buňkách akumuluje ve vakuolách s nízkým pH, pravděpodobně lysosomech. Buňky linie UKF-NB-4 byly také kultivovány s 5 μ M ellipticinem či v kombinaci s 100 nM bafilomycinem A (Baf A). Bafilomycin snížil tvorbu „zelených“ vakuol, snížil tedy pronikání elliptycinu do lysosomů.

5 ZÁVĚR

Předkládaná disertační práce na téma „Mechanismus působení protinádorových léčiv v neuroblastomech“ prohlubuje znalosti problematiky nádorové léčby. Práce je členěná na několik oddílů s následujícími závěry:

- 1) Neuroblastomové linie UKF-NB-3 a UKF-NB-4 se adaptují na nedostatečné množství kyslíku zvýšenou expresí transkripčního faktoru HIF-1 α a změnou acetylace histonů H3 a H4. Hypoxie indukovala zvýšení exprese transkripčního faktoru N-myc v těchto liniích a zároveň indukovala změny buněčného cyklu.
- 2) Inhibice histondeacetylas valproátem zvyšuje acetylaci histonů H3 a H4 v neuroblastomové linii UKF-NB-4 a snižuje expresi proteinů transkripčních faktorů N-myc a HIF-1 α .
- 3) Valproát zvyšuje expresi proteinu CD133 v linii UKF-NB-3, což je spojeno se zvýšenou chemorezistencí těchto buněk vůči cisplatině a vincristinu.
- 4) Valproát zvyšuje acetylaci histonů H3 a H4 v linii UKF-NB-4, která je potřebná pro potenciaci účinku cytostatik cílených na buněčnou DNA (etoposid, cisplatina, ellipticin).
- 5) Ellipticin tvoří v neuroblastomových buňkách linie UKF-NB-4 cytoplasmatické vakuoly (lysosomy), do kterých je sekvestrován. Tím se snižuje jeho koncentrace v dalších buněčných kompartmentech včetně jádra a snižuje se i jeho cytotoxické působení. Narušení tvorby nově se tvořících lysosomů zvyšuje koncentrace ellipticinu v dalších buněčných kompartmentech, umožní jeho transport do buněčného jádra a zvyšuje tak jeho toxicitu.

Díky klinicky relevantním koncentracím testovaných látek s protinádorovou aktivitou (valproát, etoposid, cisplatina a ellipticin) je možné výsledky disertační práce použít jako základ pro klinické testování. Kombinace inhibitorů HDAC s cytostatiky cílenými na buněčnou DNA zvyšuje účinnost protinádorové léčby a v praxi by tak mohla přispět k eliminaci nádorových buněk u pacientů, kde standardní léčba chemoterapií není účinná.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. <http://www.uzis.cz/>; 1. 5. 2015.
2. Cheung N-K V and Dyer M A: Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 13: 397–411, 2013.
3. Vicha A and Eckschlager T: Molekulární biologie neuroblastomu. *Klin Onkol* 18: 159–165, 2005.
4. Papaioannou G and McHugh K: Neuroblastoma in childhood: Review and radiological findings. *Cancer Imaging* 5: 116–127, 2005.
5. Klener P: Protinádorová chemoterapie. Grada, Praha, 1996.
6. Siddik Z H: Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22: 7265–7279, 2003.
7. Florea A-M and Büsselberg D: Cisplatin as an anti-tumor drug: Cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers* 3: 1351–1371, 2011.
8. Maréchal A and Zou L: DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, 2013.
9. Nayak M S, Yang J M and Hait W N: Effect of a single nucleotide polymorphism in the murine double minute 2 promoter (SNP309) on the sensitivity to topoisomerase II-targeting drugs. *Cancer Res* 67: 5831–5839, 2007.
10. Stiborova M, Manhartova Z, Hodek P, *et al.*: Formation of DNA adducts by ellipticine and its micellar form in rats - a comparative study. *Sensors* 14: 22982–22997, 2014.
11. Wu Y, Sadatmousavi P, Wang R, *et al.*: Self-assembling peptide-based nanoparticles enhance anticancer effect of ellipticine in vitro and in vivo. *Int J Nanomedicine* 7: 3221–3233, 2012.
12. Stiborova M, Rupertova M, Schmeiser H H and Frei E: Molecular mechanisms of antineoplastic action of an anticancer drug ellipticine. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky* 150: 13–23, 2006.
13. Moudi M, Go R, Yien C Y S and Nazre M: Vinca alkaloids. *Int J Prev Med* 4: 1131–1135, 2013.
14. Pieters R, Hunger S P, Boos J, *et al.*: L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on Erwinia asparaginase. *Cancer* 117: 238–249, 2011.

15. Hrabeta J, Stiborova M, Adam V, *et al.*: Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky* 158: 161–169, 2014.
16. Halkidou K, Gaughan L, Cook S, *et al.*: Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate* 59: 177–189, 2004.
17. Kim H-J and Bae S-C: Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *Am J Transl Res* 3: 166–179, 2011.
18. West A C and Johnstone R W: New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. *J Clin Invest* 124: 30–39, 2014.
19. Mariadason J M, Corner G A and Augenlicht L H: Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids: Comparison with trichostatin A, sulindac, and curcumin and implications for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Res* 60: 4561–4572, 2000.
20. Ocker M and Schneider-Stock R: Histone deacetylase inhibitors: Signalling towards p21cip1/waf1. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 1367–1374, 2007.
21. Kong X, Lin Z, Liang D and Fath D: Histone deacetylase inhibitors induce VHL and ubiquitin-independent proteasomal degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Mol Cell Biol* 26: 2019–2028, 2006.
22. Stiborova M, Eckschlager T, Poljakova J, *et al.*: The synergistic effects of DNA-targeted chemotherapeutics and histone deacetylase inhibitors as therapeutic strategies for cancer treatment. *Curr Med Chem* 19: 4218–4238, 2012.
23. Adimoolam S, Sirisawad M, Chen J, *et al.*: HDAC inhibitor PCI-24781 decreases RAD51 expression and inhibits homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 19482–19487, 2007.
24. Zhang Y, Carr T, Dimtchev A, *et al.*: Attenuated DNA damage repair by trichostatin A through BRCA1 suppression. *Radiat Res* 168: 115–124, 2007.
25. BS B: On the propyl derivatives and decomposition products of ethylacetate. *Am Chem J* 3: 385–395, 1882.
26. Carraz G, Fau R, Chateau R and Bonnin J: Communication concerning 1st clinical tests of the anticonvulsive activity of N-Dipropylacetic acid (Sodium Salt). *Ann Med Psychol* 122: 577–585, 1964.
27. Owens M J and Nemeroff C B: Pharmacology of valproate. *Psychopharmacol Bull* 37 Suppl 2: 17–24, 2003.
28. Tsuji N, Kobayashi M, Nagashima K, *et al.*: A new antifungal antibiotic, trichostatin. *J Antibiot* 29: 1–6, 1976.

29. Yoshida M, Kijima M, Akita M and Beppu T: Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by Trichostatin A. *J Biol Chem* 265: 17174–17179, 1990.
30. Cairns R A, Harris I S and Mak T W: Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 11: 85–95, 2011.
31. Dang C V.: Links between metabolism and cancer. *Genes Dev* 26: 877–890, 2012.
32. Savage V M, Allen A P, Brown J H, *et al.*: Scaling of number, size, and metabolic rate of cells with body size in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 4718–4723, 2007.
33. Warburg O, Wind F and Negelein E: The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol* 8: 519–530, 1927.
34. Altenberg B and Greulich K O: Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics* 84: 1014–1020, 2004.
35. Jang M, Kim S S and Lee J: Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets. *Exp Mol Med* 45: e45, 2013.
36. Feron O: Pyruvate into lactate and back: From the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiother Oncol* 92: 329–333, 2009.
37. Hirschhaeuser F, Sattler UGA and Mueller-Klieser W: Lactate: A metabolic key player in cancer. *Cancer Res* 71: 6921–6925, 2011.
38. Singer K, Gottfried E, Kreutz M and Mackensen A: Suppression of T-cell responses by tumor metabolites. *Cancer Immunol Immunother* 60: 425–431, 2011.
39. Igney F H and Krammer P H: Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol* 71: 907–920, 2002.
40. Gottfried E, Kunz-Schughart L A, Ebner S, *et al.*: Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood* 107: 2013–2021, 2006.
41. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, *et al.*: Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* 109: 3812–3819, 2007.
42. Meyer N and Penn L Z: Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer* 8: 976–990, 2008.
43. Amler L C and Schwab M: Multiple amplicons of discrete sizes encompassing N-myc in neuroblastoma cells evolve through differential recombination from a large precursor DNA. *Oncogene* 7: 807–809, 1992.

44. Weiss W A, Aldape K, Mohapatra G, *et al.*: Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *EMBO J* 16: 2985–2995, 1997.
45. Burkhart C A, Cheng A J, Madafiglio J, *et al.*: Effects of MYCN antisense oligonucleotide administration on tumorigenesis in a murine model of neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst* 95: 1394–1403, 2003.
46. Knoepfler P S, Cheng P F and Eisenman R N: N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes Dev* 16: 2699–2712, 2002.
47. Haber M, Bordow S B, Gilbert J, *et al.*: Altered expression of the MYCN oncogene modulates MRP gene expression and response to cytotoxic drugs in neuroblastoma cells. *Oncogene* 18: 2777–2782, 1999.
48. Podar K and Anderson K C: A therapeutic role for targeting c-Myc/Hif-1-dependent signaling pathways. *Cell Cycle* 9: 1722–1728, 2010.
49. Faiola F, Liu X, Lo S, *et al.*: Dual regulation of c-Myc by p300 via acetylation-dependent control of Myc protein turnover and coactivation of Myc-induced transcription. *Mol Cell Biol* 25: 10220–10234, 2005.
50. Vervoorts J, Lüscher-Firzlauff J and Lüscher B: The ins and outs of MYC regulation by posttranslational mechanisms. *J Biol Chem* 281: 34725–34729, 2006.
51. Gerlinger M and Swanton C: How Darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine. *Br J Cancer* 103: 1139–1143, 2010.
52. Kreso A and Dick J E: Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell* 14: 275–291, 2014.
53. Nikolov S, Wolkenhauer O and Vera J: Tumors as chaotic attractors. *Mol Biosyst* 10: 172–179, 2014.
54. Sharma S V, Lee D Y, Li B, *et al.*: A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell* 141: 69–80, 2010.
55. Giudice F S, Pinto Jr. D S and Nor J E, Squarize CH and Castilho RM: Inhibition of histone deacetylase impacts cancer stem cells and induces epithelial-mesenchyme transition of head and neck cancer. *PLoS One* 8: e58672, 2013.
56. Wilson W R and Hay M P: Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 11: 393–410, 2011.
57. Semenza G L: Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3: 721–732, 2003.

58. Semenza G L: HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest* 123: 3664–3671, 2013.
59. Pollard P J, Brière J J, Alam N A, *et al.*: Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1 α in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Hum Mol Genet* 14: 2231–2239, 2005.
60. Sonveaux P, Végran F, Schroeder T, *et al.*: Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest* 118: 3930–3942, 2008.
61. Song X, Liu X, Chi W, *et al.*: Hypoxia-induced resistance to cisplatin and doxorubicin in non-small cell lung cancer is inhibited by silencing of HIF-1 α gene. *Cancer Chemother Pharmacol* 58: 776–784, 2006.
62. Dean M, Fojo T and Bates S: Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 5: 275–284, 2005.
63. Lou H and Dean M: Targeted therapy for cancer stem cells: the patched pathway and ABC transporters. *Oncogene* 26: 1357–1360, 2007.
64. Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, *et al.*: Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res* 14: 123–129, 2008.
65. Takenobu H, Shimozato O, Nakamura T, *et al.*: CD133 suppresses neuroblastoma cell differentiation via signal pathway modification. *Oncogene* 30: 97–105, 2011.
66. Tabu K, Sasai K, Kimura T, *et al.*: Promoter hypomethylation regulates CD133 expression in human gliomas. *Cell Res* 18: 1037–1046, 2008.
67. Khalil M A, Hrabeta J, Cipro S, *et al.*: Neuroblastoma stem cells - Mechanisms of chemoresistance and histone deacetylase inhibitors. *Neoplasma* 59: 737–746, 2012.
68. Prochazka P, Libra A, Zemanova Z, *et al.*: Mechanisms of ellipticine-mediated resistance in UKF-NB-4 neuroblastoma cells. *Cancer Sci* 103: 334–341, 2012.
69. Ke N, Wang X, Xu X and Abassi YA: The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods Mol Biol* 740: 33–43, 2011.
70. Shechter D, Dormann H L, Allis C D and Hake S B: Extraction, purification and analysis of histones. *Nat Protoc* 2: 1445–1457, 2007.
71. Lowry O H, Rosenbrough N J, Farr A L and Randall R J: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275, 1951.
72. Arlt V M, Schmeiser H H and Pfeifer G P: Sequence-specific detection of aristolochic acid-DNA adducts in the human p53 gene by terminal transferase-dependent PCR. *Carcinogenesis* 22: 133–140, 2001.

73. Stiborova M, Bieler C A, Wiessler M and Frei E: The anticancer agent ellipticine on activation by cytochrome P450 forms covalent DNA adducts. *Biochem Pharmacol* 62: 1675–1684, 2001.
74. Johnson A B, Denko N and Barton M C: Hypoxia induces a novel signature of chromatin modifications and global repression of transcription. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 640: 174–179, 2008.
75. Li Q and Costa M: c-Myc mediates a hypoxia-induced decrease in acetylated histone H4. *Biochimie* 91: 1307–1310, 2009.
76. Qing G, Skuli N, Mayes P A, *et al.*: Combinatorial regulation of neuroblastoma tumor progression by N-Myc and hypoxia inducible factor HIF-1. *Cancer Res* 70: 10351–10361, 2010.
77. Leonetti C, Biroccio A, Candiloro A, *et al.*: Increase of cisplatin sensitivity by c-myc antisense oligodeoxynucleotides in a human metastatic melanoma inherently resistant to cisplatin. *Clin Cancer Res* 5: 2588–2595, 1999.
78. Schwab M, Westermann F, Hero B and Berthold F: Neuroblastoma: Biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol* 4: 472–480, 2003.
79. Boon K, Caron H N, Van Asperen R, *et al.*: N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. *EMBO J* 20: 1383–1393, 2001.
80. Li X-N, Shu Q, Su J M-F, *et al.*: Valproic acid induces growth arrest, apoptosis, and senescence in medulloblastomas by increasing histone hyperacetylation and regulating expression of p21Cip1, CDK4, and CMYC. *Mol Cancer Ther* 4: 1912–1922, 2005.
81. Tamkun J W, Dearing R, Scott M P, *et al.*: Brahma: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* 68: 561–572, 1992.
82. Puissant A, Frumm S M, Alexe G, *et al.*: Targeting MYCN in neuroblastoma by BET bromodomain inhibition. *Cancer Discov* 3: 309–323, 2013.
83. Tavtigian S V, Zabludoff S D and Wold B J: Cloning of mid-G1 serum response genes and identification of a subset regulated by conditional myc expression. *Mol Biol Cell* 5: 375–388, 1994.
84. Papas K K, Sun L, Roos E S, *et al.*: Change in lactate production in Myc-transformed cells precedes apoptosis and can be inhibited by Bcl-2 overexpression. *FEBS Lett* 446: 338–342, 1999.
85. Semenza G L: Hypoxia-inducible factor 1: Master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 8: 588–594, 1998.

86. Wang G L and Semenza G L: Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 270: 1230–1237, 1995.
87. Salceda S and Caro J: Hypoxia-inducible factor 1a (HIF-1a) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 272: 22642–22647, 1997.
88. Kim S-H, Jeong J-W, Park J A, *et al.*: Regulation of the HIF-1alpha stability by histone deacetylases. *Oncol Rep* 17: 647–651, 2007.
89. Phiel C J, Zhang F, Huang E Y, *et al.*: Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem* 276: 36734–36741, 2001.
90. Fang J Y, Yang L, Zhu H Y, *et al.*: 5-aza-2'-deoxycytidine induces demethylation and up-regulates transcription of p16INK4A gene in human gastric cancer cell lines. *Chin Med J* 117: 99–103, 2004.
91. Verdone L, Caserta M and Di Mauro E: Role of histone acetylation in the control of gene expression. *Biochem Cell Biol* 83: 344–353, 2005.
92. Bar E E, Lin A, Mahairaki V, *et al.*: Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres. *Am J Pathol* 177: 1491–1502, 2010.
93. Liu G, Yuan X, Zeng Z, *et al.*: Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 5: 67, 2006.
94. Lan X, Wu Y Z, Wang Y, *et al.*: CD133 silencing inhibits stemness properties and enhances chemoradiosensitivity in CD133-positive liver cancer stem cells. *Int J Mol Med* 31: 315–324, 2013.
95. Shabason J E, Tofilon P J and Camphausen K: HDAC inhibitors in cancer care. *Oncology* 24: 180-185, 2010.
96. Kuo L J and Yang L-X: Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo* 22: 305–309, 2008.
97. Luchenko V L, Salcido C D, Zhang Y, *et al.*: Schedule-dependent synergy of histone deacetylase inhibitors with DNA damaging agents in small cell lung cancer. *Cell Cycle* 10, 3119-3128, 2011.
98. Oh K S, Bustin M, Mazur S J, *et al.*: UV-induced histone H2AX phosphorylation and DNA damage related proteins accumulate and persist in nucleotide excision repair-deficient XP-B cells. *DNA Repair* 10: 5–15, 2011.

99. Harikrishnan K N, Karagiannis T C, Chow M Z and El-Osta A: Effect of valproic acid on radiation-induced DNA damage in euchromatic and heterochromatic compartments. *Cell Cycle* 7: 468–476, 2008.
100. Stiborova M, Poljakova J, Martinkova E, *et al.*: Ellipticine cytotoxicity to cancer cell lines - a comparative study. *Interdiscip Toxicol* 4: 98–105, 2011.
101. Stiborova M, Rupertova M and Frei E: Cytochrome P450- and peroxidase-mediated oxidation of anticancer alkaloid ellipticine dictates its anti-tumor efficiency. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* 1814: 175–185, 2011.
102. Stiborova M and Frei E: Ellipticines as DNA-targeted chemotherapeutics. *Curr Med Chem* 21: 575-591, 2014.
103. Blommaert E F, Krause U, Schellens J P, *et al.*: The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 243: 240–246, 1997.
104. Harhaji-Trajkovic L, Arsikin K, Kravic-Stevovic T, *et al.*: Chloroquine-mediated lysosomal dysfunction enhances the anticancer effect of nutrient deprivation. *Pharm Res* 29: 2249–2263, 2012.
105. Yang Y, Hu L, Zheng H, *et al.*: Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta Pharmacol Sin* 34: 625–635, 2013.
106. Barth S, Glick D and Macleod KF: Autophagy: Assays and artifacts. *J Pathol* 221: 117–124, 2010.
107. Kabeya Y: LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 19: 5720–5728, 2000.
108. Hunziker W and Geuze H J: Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *Bioessays* 18: 379–389, 1996.

7 PŘÍLOHY

Příloha č. 1:

Cipro Š, **Groh T**: Tkáňové kultury. *Česko-Slovenská patologie* 2014; 50; 30-32.

Příloha č. 2:

Groh T, Hraběta J, Poljaková J, Eckschlager T, Stiborová M: Impact of histone deacetylase inhibitor valproic acid on the anticancer effect of etoposide on neuroblastoma cells. *Neuroendocrinology Letters* 2012; 33; 101-109. IF₂₀₁₂=0,932

Příloha č. 3:

Poljaková J, **Groh T**, Omana G Ž, Hraběta J, Bořek-Dohalská L, Kizek R, Doktorová H, Eckschlager T a Stiborová M: Hypoxia-mediated histone acetylation and expression of N-myc transcription factor dictate aggressiveness of neuroblastoma cells. *Oncology Reports* 2014; 31; 1928-1934. IF₂₀₁₃=2,191

Příloha č. 4:

Groh T, Hraběta J, Khalil M A, Doktorová H, Eckschlager T a Stiborová M: The synergistic effects of DNA-damaging drugs cisplatin and etoposide with a histone deacetylase inhibitor valproate in high-risk neuroblastoma cells. *International Journal of Oncology*, Rukopis přijatý do tisku v dubnu 2015. IF₂₀₁₃= 2,773

Příloha č. 5:

Hraběta J, **Groh T**, Khalil M A, Poljaková J, Adam V, Kizek R, Uhlík J, Doktorová H, Černá T, Frei E, Stiborová M a Eckschlager T: Vacuolar-ATPase-mediated intracellular sequestration of ellipticine contributes to drug resistance in neuroblastoma cells.

Článek v přípravě k odeslání do impaktovaného časopisu.