

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



**Význam V-ATPasy v rezistenci k cytostatikům a možnosti její
inhibice**

The role of V-ATPase in resistance to cytostatics and the possibility of its inhibition

Diplomová práce

Bc. Marie Belhajová

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Konzultant diplomové práce: prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.

Praha 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením mé školitelky prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a veškerou použitou literaturu jsem řádně citovala.

V Praze dne

Podpis.....

Poděkování:

Děkuji tímto své školitelce prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a konzultantovi panu prof. MUDr. Tomáši Eckschlagerovi, CSc. za ochotu, vstřícnost a trpělivost při vypracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat MVDr. Janu Hrabětovi, Ph.D. a Mgr. Tereze Černé za objasnění experimentálních přístupů, ochotu a čas, který mi věnovali. Můj dík také patří kolektivu pracovníků laboratoře Kliniky dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze – Motole za cenné rady a vytvoření příjemných pracovních podmínek. V neposlední řadě děkuji své rodině a blízkým za podporu a trpělivost.

Práce byla podporována Grantovou agenturou České republiky (grant 14-18344S).

Abstrakt

Onkologická onemocnění patří mezi nejzávažnější problémy moderní medicíny a jejich výskyt se neustále zvyšuje. Neuroblastom je maligní embryonální nádor dětského věku, vznikající z periferního nervového systému a je to nejčastější nádor u kojenců. I přes významný vývoj léčebných metod v posledních letech zůstává toto onemocnění obtížně léčitelné. K léčbě tohoto nádoru se využívá chirurgická léčba, radioterapie a chemoterapie s použitím cytostatik. Cytostatika, jako je doxorubicin, cisplatina či ellipticin, se stala velmi významná v léčbě zhoubných nádorů. Avšak jednou z největších komplikací chemoterapie je vznik lékové rezistence. Tato práce se zabývá studiem vakuolární H^+ -ATPasy (V-ATPasy), která hraje důležitou roli v tvorbě lékové rezistence. Jedná se o protonovou pumpu potřebnou pro acidifikaci vakuol.

Senzitivní neuroblastomová buněčná linie (UKF-NB-4) a linie rezistentní vůči doxorubicinu, ellipticinu a cisplatině (UKF-NB-4^{DOXO}, UKF-NB-4^{ELLI} a UKF-NB-4^{CDDP}) byly vystaveny působení těchto cytostatik. Ovlivnění exprese proteinu V-ATPasy bylo sledováno imunochemicky, metodou Western blot a exprese na genové úrovni pomocí kvantitativní reverzně transkripční polymerasové řetězové reakce (RT-PCR). Ellipticin indukuje zvýšení exprese V-ATPasy v neuroblastomových buňkách jak na proteinové, tak na genové úrovni, zatímco vlivem cisplatiny dochází ke snížení exprese tohoto enzymu. Působením doxorubicinu se zvyšuje exprese V-ATPasy pouze na proteinové úrovni. Zjištěno rovněž bylo, že specifický inhibitor V-ATPasy, bafilomycin A, potencuje vývoj apoptosy generovaný ellipticinem a cisplatinou. V buněčné linii UKF-NB-4 indukoval doxorubicin i ellipticin tvorbu lysosomů, do kterých se tato cytostatika akumulují, a tento proces výsledně vede ke snížení jejich cytotoxicity.

Prokázali jsme, že modulace exprese V-ATPasy je jedním z mechanismů umožňujících přežití buněk neuroblastomu po působení cytostatik. Může tedy být uvažována jako možný terapeutický cíl.

Klíčová slova: neuroblastom, léková rezistence, vakuolární ATPasa, bafilomycin A

Abstract

Cancers belong among the most serious problems of modern medicine and their occurrence is constantly increasing. Neuroblastoma is a malignant embryonal tumor in children, emerging from the peripheral nervous system and is the most frequent tumor in infants. Despite the significant development of therapeutic methods during recent years, this disease remains difficult to treat. It is treated surgically and also with chemotherapy using cytostatic drugs. The cytostatic drugs such as doxorubicin, ellipticine, cisplatin and vincristine have become very significant in treating cancer. However, they induced drug resistance in these neuroblastoma cells. This study investigates expression of the vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase), in neuroblastoma cells and its role in the development of drug resistance. V-ATPase is a proton pump required for the acidification of vacuoles, as a sensor of cytosolic pH.

A sensitive neuroblastoma cell line (UKF-NB-4) and cells resistant to doxorubicin, ellipticine and cisplatin (UKF-NB-4^{DOX}, UKF-NB-4^{ELLI}, UKF-NB-4^{CDDP}) were exposed to these agents and the expression of the V-ATPase was studied by Western blot analysis and real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Ellipticine induces an increase in expression of the V-ATPase in neuroblastoma cells both on the transcriptional and the translational levels, while cisplatin causes a decrease in expression of this enzyme. Treatment with doxorubicin increases expression of the V-ATPase only at the translational level. Furthermore, it was found that a specific inhibitor of V-ATPase, bafilomycin A, potentiates the development of apoptosis generated by ellipticine and cisplatin. Doxorubicin and ellipticine induced formation of lysosomes, where these cytostatics accumulates (are sequestered). This sequestration leads to a reduction of cytotoxicity of these agents.

In this study, we have shown that V-ATPase is one of the survival mechanisms of neuroblastoma cells in the presence of cytostatics, and seems to be a promising selective therapeutic target to be considered for future trials.

Keywords: neuroblastoma, drug rezistence, vacuolar ATPase, bafilomycin A

Obsah

Seznam použitých zkratk:	7
1. Úvod	10
1.1. Nádorová onemocnění dětí	11
1.1.1 Neuroblastom	11
1.2 Léčba nádorových onemocnění pomocí chemoterapie	13
1.2.1 Doxorubicin	14
1.2.2 Ellipticin	15
1.2.3 Cisplatina	16
1.3 Mnohočetná léková rezistence	17
1.4 V-ATPasa	21
1.4.1 Struktura V-ATPasy	22
1.4.2 Funkce V-ATPasy	24
1.4.3 Regulace V-ATPasy	28
1.4.4 Bafilomycin A, specifický inhibitor V-ATPasy	29
2. Cíl práce	29
3. Materiál a metody	31
3.1 Materiál a chemikálie	31
3.2 Metody	33
3.2.1. Rozmrazení buněk	33
3.2.2. Kultivace neuroblastomových buněčných linií	33
3.2.3 Stanovení koncentrace doxorubicinu, ellipticinu a cisplatiny, způsobující padesátiprocentní úmrtnost buněk (IC_{50}) u senzitivní neuroblastomové linie UKF-NB-4	34
3.2.4 Příprava vzorků buněčných extraktů pro analýzu pomocí metody Western blot a kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR)	35
3.2.5 Izolace proteinů z testovaných neuroblastomových buněčných linií	36
3.2.6 Stanovení koncentrace proteinů testovaných neuroblastomových buněčných linií metodou dle Lowryho [74]	37
3.2.7 Separace proteinu buněčných lyzátů pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)	37
3.2.8. Analýza proteinů testovaných neuroblastomových buněčných linií pomocí metody Western blot	38

3.2.9 Izolace RNA z analyzovaných buněk neuroblastomových linií	38
3.2.10 Reverzní transkripce RNA testovaných neuroblastomových buněčných linií	39
3.2.11 Kvantitativní polymerasová řetězová reakce v reálném čase (RT-PCR) genů domén V-ATPasy ATP6V1C1 a ATP6V1G1	39
3.2.12 Detekce vývoje apoptosy v lidských neuroblastomových liniích po působení ellipticinu a cisplatiny	40
3.2.13 Lokalizace doxorubicinu a ellipticinu v buňkách neuroblastomové linie pomocí konfokální mikroskopie	42
4. Výsledky	43
4.1 Určení hodnot koncentrace doxorubicinu, ellipticinu a cisplatiny způsobující zánik 50 % buněk (IC ₅₀) v senzitivní neuroblastomové linii UKF-NB-4	43
4.2 Sledování vlivu testovaných léčiv na expresi membránové domény ATP6V0D1 enzymu V-ATPasy v neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4 a linií rezistentních vůči těmto léčivům (UKF-NB-4 ^{DOXO} , UKF-NB-4 ^{ELLI} a UKF-NB-4 ^{CDDP}) pomocí metody Western blot	46
4.3 Stanovení exprese genů <i>ATP6V1C1</i> a <i>ATP6V1G1</i> enzymu V-ATPasy v neuroblastomových liniích pomocí kvantitativní polymerasové řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR)	51
4.4 Analýza cytotoxicity cisplatiny a ellipticinu na neuroblastomové buněčné linie a sledování vlivu bafilomycinu A na tuto cytotoxicitu pomocí průtokového cytometru ...	53
4.5 Analýza lokalizace doxorubicinu a ellipticinu v buňkách UKF-NB-4 pomocí konfokální mikroskopie	57
5. Diskuse.....	60
6. Závěr	63
Seznam literatury:	64

Seznam použitých zkratk:

ALK	„anaplastic lymphoma“ kinasa
AMPK	proteinkinasa aktivovaná 5'-adenosinmonofosfátem
APS	amonium peroxodisulfát
ATB	antibiotikum
ATP	adenosintrifosfát
BAX	proapoptotický protein „Bcl-2 associated-X“
BCL2	antiapoptotický protein „B-cell lymphoma-2“
BCLX	antiapoptotický protein „B-cell lymphoma-extra large“
BNIP3	proapoptotický protein
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CD 63	lysosomální membránovým proteinem tetraspanin
CDDP	cisplatina
Cdk2	cyklin-dependentní kinasa 2
cDNA	„complementary DNA“
CLC 7	„chloride channel protein 7“
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOXO	doxorubicin
DSL	ligandy „Delta-Sarrate-Lag-2“
EGF	epidermální růstový faktor
ELLI	ellipticin
FAS	receptor, též znám jako apoptotický antigen 1 (APO-1)
FBS	telecí sérum
HIV	„Human Immunodeficiency Virus“
Hoechst 33342	2'-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperaziny)-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihydrochlorid hydrát, bisBenzimid
HRP	křenová peroxidasa
IC₅₀	koncentrace látky způsobující padesátiprocentní úmrtnost buněk
IMDM	kultivační medium „Iscove's Modified Dulbeccos Medium“
INSS	„International Neuroblastoma Staging System“
LAMP	„lysosome-associated membrane proteins“

LDL	„low density lipoproteins“
LIMP2	„lysosomal integral membrane protein 2“
LKB1	„liver kinasa B1“
LRP6	„low-density lipoprotein receptor-related protein 6“
MAPK	„Mitogen-activated protein kinases“
MDR	„multidrug resistance“
mTOR	„mammalian target of rapamycin“
mTORC1/C2	„mTOR Complex 1/ Complex 2“
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromid
MYCN	onkogen, z angl. „myelocytomatosis viral related, neuroblastoma derived gen“
NB	neuroblastom
NICD	„Notch intracellular domain“
NPC1	„Niemann–Pick C1 protein“
OMA	opsoklonus myoklonus ataxie
p53	tumor-supresorový gen
p73	tumor-supresorový gen
p.a.	pro analýzu
PBS	sodno-fosfátový pufr s obsahem NaCl („phosphate-buffered saline“)
PEG	polyethylenglykol
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace H ⁺ iontů
PHOX2B	„Paired-like homeobox 2b“
PI3K	fosfatidylinositol-3 kinasa
PKA	proteinkinasa A
Rag	„recombination activating gene“
Ras	protoonkoproteiny
RAVE	regulátor ATPas vakuolárních a endosomálních membrán
Rbcn-3	Rabconnectin
Rheb	„Ras homolog enriched in brain“
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku „reactive oxygen species“

rpm	počet otáček za minutu
RT-PCR	kvantitativní reverzně transkripční polymerasová řetězová reakce („real time reverse transcription polymerase chain reaction“)
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného
TEMED	1,2-bis (dimethylamino) ethan
Tris	1,1,1-tris (hydroxymethyl) aminomethan
TWEEN 20	polyoxyethylensorbitanmonolaurát
V-ATPasa	vakuolární ATPasa
VIP	vazoaktivní intestinální polypeptid

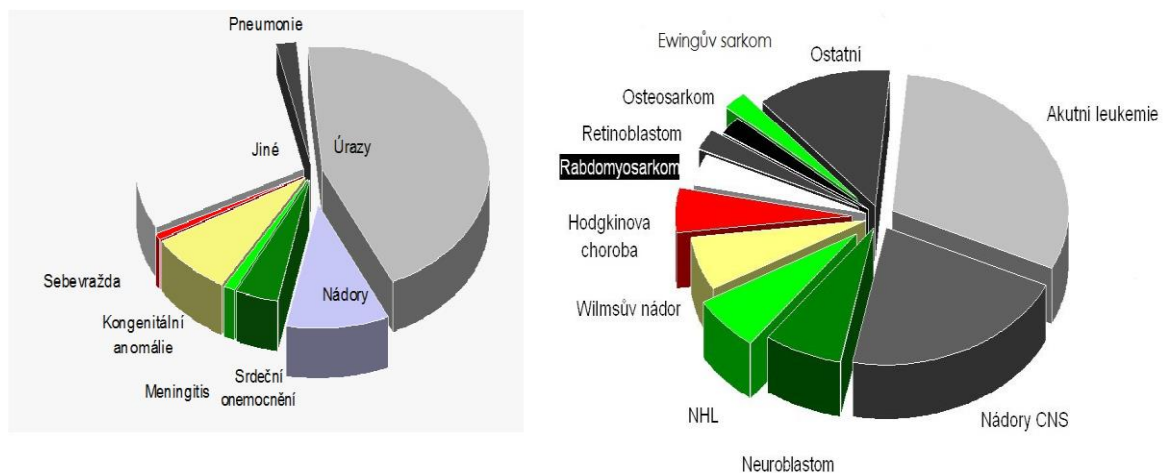
1. Úvod

Zhoubná nádorová onemocnění představují v současné době závažný celospolečenský problém. [1] Incidence nádorových onemocnění narůstala v průběhu druhé poloviny 20. století mimořádnou rychlostí. V České republice je tímto onemocněním postižen každý třetí a příčinou každého čtvrtého úmrtí je zhoubný nádor. [2] Důvodem tohoto vývoje je především stárnoucí populace, kdy vazba mezi věkem a nádorovým onemocněním je výsledkem delšího časového působení kancerogenních faktorů a také vlastních změn souvisejících se stárnutím usnadňujících vývoj nádoru. Nádorová onemocnění se řadí do civilizačních chorob. Dalším významným faktorem, vysvětlujícím nárůst těchto onemocnění, je změna životního stylu. Nádory se stále častěji vyskytují u mladších osob, což je dááno do souvislosti se změnou životního stylu (odlišnou skladbou potravy, která obsahuje převahu cukrů a tuků, ale také ovlivnění stresem a kontaminací složek životního prostředí látkami s kancerogenním účinkem). [1, 3] Kancerogeneze, tedy vznik nádorového onemocnění, je složitý, vícestupňový proces, kdy je narušena rovnováha mezi proliferací, diferenciací, migrací a programovanou smrtí buňky (apoptosou). [4]

Až do 20. let 20. století zůstávala chirurgická léčba jedinou protinádorovou léčebnou metodou. S objevem rentgenových paprsků pak nastoupila radioterapie. Jednou z dalších léčebných metod se od poloviny minulého století stala chemoterapie, která byla do té doby pouze metodou doplňkovou. Léčebné metody byly následně rozšířeny o tzv. biomodulační léčbu. Nejčastěji se uplatňují kombinace různých metod protinádorové léčby. [4] Léčba nádorových onemocnění je komplikovaná, protože je potřeba zničit buňky tělu vlastní a nikoli cizorodé. Nádorové buňky se sice více či méně liší od buněk normálních, ale odlišnosti jsou buď příliš malé, takže jsou imunitním systémem většinou ignorovány nebo nádorové buňky využívají mechanismy, které jim umožňují paralyzovat některé součásti imunitního systému. [1]

1.1. Nádorová onemocnění dětí

Přestože nádorová onemocnění dětí a mladistvých představují pouze 1-1,5 % ze všech zhoubných onemocnění diagnostikovaných každoročně v České republice, jsou nejčastější příčinou úmrtí mezi chorobami a jsou hned po úrazech druhou nejčastější příčinou úmrtí (obr. 1). V populaci dětí a dospělých se zhoubné nádory zásadně liší. U dětí se jedná o rychle rostoucí nádory s vysokou růstovou frakcí, které záhy metastazují, což velmi časně ohrožuje pacienta na životě. Ovšem právě díky těmto vlastnostem jsou dětské nádory zpravidla více chemosenzitivní a radiosenzitivní než nádory, které se vyskytují v dospělosti [5].



Obr. 1: Příčiny úmrtí v dětském věku (vlevo) a typy nádorů v dětském věku (vpravo).
Převzato a upraveno z [6]

1.1.1 Neuroblastom

Neuroblastom (NB) je embryonální nádor autonomního nervového systému vznikající z buněk neurální lišty. Jedná se o nejčastější nádor diagnostikovaný u dětí do jednoho roku. Neuroblastom je velmi komplexní a heterogenní onemocnění, kdy mnoho faktorů určuje, zda dojde ke spontánní regresi, metastazování či bude odolný vůči terapii. Takovéto faktory jsou například věk při stanovení diagnózy, rozsah onemocnění, molekulární, buněčné a genetické rysy nádoru. Neuroblastom je onemocnění

buněk sympatoadrenálního systému, a proto může být diagnostikován kdekoli v těle, kde je přítomen sympatický nervový systém. Primární tumor je buď adrenální, tedy v dřeni nadledvin, nebo vychází z paraspinálních ganglií, a pak jsou typickými lokalizacemi břicho nebo pánev, vzácněji pak hrudník nebo krk. [7, 8] Běžný výskyt metastáz neuroblastomu je v kostech, kostní dřeni, játrech a kůži. Vzácně metastazuje do mozku a do plic. Klinické příznaky neuroblastomu jsou různé v závislosti na lokalizaci nádoru a stádiu onemocnění. U neuroblastomu se mohou vyskytnout paraneoplastické projevy, a to: „opsoklonus myoklonus ataxie“ (OMA) a vodnatý průjem v důsledku sekrece vazoaktivního intestinálního polypeptidu (VIP). Opsoklonus se vyznačuje nekonjugovanými očními pohyby všemi směry a myoklonus myoklonickými záškuby svalů končetin a trupu. Nejčastějšími příznaky jsou bolest v místě nádoru, únava, nechutenství, slabost, změny chování, anemie a další. [5, 9]

Přestože etiologie tohoto onemocnění zatím není zcela objasněna, byla u většiny případů familiárního neuroblastomu zjištěna mutace tyrosinkinasové domény pro onkogen „anaplastic lymphoma kinase“ (*ALK*), která může být dědičným znakem neuroblastomů společně s mutací genu *PHOX2B*. Negativním prognostickým znakem je amplifikace onkogenu *MYCN*, lokalizovaném na chromozomu 2 (2p24). Gen *MYCN* kóduje transkripční faktor, který může při zvýšené expresi vést k deregulaci buněčného cyklu a nekontrolované proliferaci. Tento onkogen je amplifikován v buňkách neuroblastomů s klinicky nejagresivnějším chováním, a proto je stanovení počtu kopií *MYCN* používáno jako prognostický faktor. K dalším prognosticky významným změnám patří delece 1p, delece 11q a zmnožení 17q. [10-12] U neuroblastomu jsou do moči pacienta sekretovány ve zvýšeném množství metabolity katecholaminů (kyselina homovanilová a vanilmandlová). Vysoká hladina těchto metabolitů v moči je ukazatelem nádorového onemocnění a využívá se již řadu let k potvrzení diagnózy a k monitorování efektu léčby. [13]

Pro terapii neuroblastomu je důležité určení stadia a prognostická klasifikace choroby. Proto bylo vypracováno několik systémů určení stadia onemocnění, nejvíce se v současnosti používá systém klasifikace pacientů s neuroblastomem INSS („*International Neuroblastoma Staging System*“), který rozděluje pacienty dle prognózy do šesti skupin (tabulka 1, str. 13). [14] U pacientů nízkého rizika je příznivá prognóza a ve většině případů lze pacienty trvale vyléčit. Oproti tomu u pacientů vysokého rizika je navzdory agresivní chemoterapii zahrnující transplantaci kostní dřeně velmi malé procento

přeživších. Vzhledem k vysoké variabilitě neuroblastomu vyžaduje léčba široké spektrum metod zahrnujících chirurgii, chemoterapii, radioterapii a bioterapii. [13]

Tabulka 1: Terapeutické skupiny onemocnění podle klinických a biologických vlastností neuroblastomu dle INSS. Převzato a upraveno z [15]

Stádium	Popis
1	Nádor lokalizovaný v místě svého původu; makroskopicky je kompletně odstraněn; ipsilaterální a kontralaterální lymfatické uzliny jsou histologicky negativní
2A	Lokalizovaný nádor nekompletně makroskopicky odstraněn; ipsilaterální a kontralaterální lymfatické uzliny jsou histologicky negativní
2B	Unilaterální nádor kompletně či nekompletně makroskopicky odstraněn, ipsilaterální lymfatické uzliny jsou histologicky pozitivní, kontralaterální negativní
3	Nádor infiltrující přes střední čáru s nebo bez zasažení lymfatických uzlin; unilaterální nádor se zasažením kontralaterálních lymfatických uzlin; středočárový nádor se zasažením bilaterálních lymfatických uzlin
4	Diseminace nádoru do vzdálených lymfatických uzlin, kostí, kostní dřevě, jater a dalších orgánů (s výjimkou definovanou stádiem 4S)
4S	Lokalizovaný primární nádor s diseminací omezenou na kůži, kostní dřevě a játra. U dětí do 1 roku.

1.2 Léčba nádorových onemocnění pomocí chemoterapie

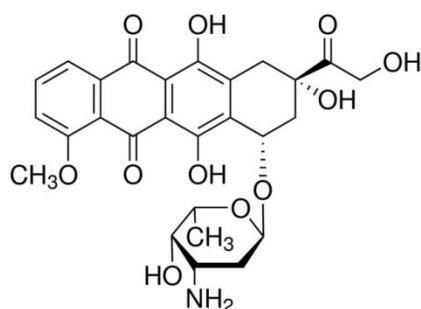
V závislosti na typu a stádiu nádorových onemocnění se v dnešní době využívá mnoho druhů léčby. Společně s chirurgickou léčbou a radioterapií, jež působí lokálně, je základem léčby také chemoterapie. Tato léčebná metoda využívá chemické látky (cytostatika), aby zabránila dělení, invazivitě, metastazování nádorových buněk a tím smrti pacienta. Většina cytostatik je širokospektrá a využívá se k léčbě více druhů nádorů. [16] Chemoterapie je považována za terapii systémovou, což znamená, že může ovlivnit nádorové buňky v celém těle. Cytostatika postihují tkáň s vysokou proliferační rychlostí, avšak jejich účinek není specifický v důsledku neschopnosti odlišit rychle se dělící nádorové buňky od zdravé tkáně, která tak může být zasažena. Většinou se jedná o tkáň s vysokou frekvencí buněčného dělení (kostní dřevě, sliznice trávicího ústrojí a vlasové folikuly). Tyto nežádoucí účinky značně limitují dávkování. Cytostatika mají různé mechanismy účinku, podle kterých je lze rozdělit do několika skupin: látky poškozující DNA (cisplatina, doxorubicin, ellipticin), látky ovlivňující syntézu DNA (metotrexát), látky působící interakcí s mikrotubuly (vinkristin), látky ovlivňující regulační pochody organismu (hormony) a látky působící dalšími mechanismy. U některých nádorových onemocnění je léčba úspěšná a je tedy možné úplné vyléčení (např. leukemie v dětském

věku). Nicméně četná nádorová onemocnění se nedají vyléčit žádným léčebným postupem, a pak se volí paliativní léčba s cílem život prodloužit a zlepšit jeho kvalitu. [17, 18]

Cílem chemoterapie je tedy zpomalit nebo zastavit růst nádorových buněk. S léčbou jsou spojeny problémy jako nespecifita, vedlejší účinky a také riziko vzniku rezistence.

1.2.1 Doxorubicin

Doxorubicin (DOXO) je klinicky důležité cytostatikum, které se využívá při léčbě hematologických malignit, lymfomů a řady solidních nádorů - například neuroblastom, Wilmsův nádor a další. [19] Tato látka izolována z bakterie *Streptomyces peucetius varcaesitue* je hydroxyderivátem daunorubicinu (14-hydroxydaunorubicin, obr. 2). [20-22]



Obr. 2: Struktura doxorubicinu, převzato a upraveno z [25]

Jedná se o antracyklinové antibiotikum (ATB) s planární molekulou, tvořenou antrachinonovým jádrem a aminocukrem daunosaminem, připojeným glykosidickou vazbou. Je používán ve formě hydrochloridu. Doxorubicin je charakteristický svým červeným zbarvením, jež je dáno právě tímto konjugovaným systémem a je tedy chromoforem pro viditelnou oblast. Zároveň se díky své struktuře vyznačuje fluorescenčními vlastnostmi, což umožňuje jeho detekci pomocí fluorescenčních metod včetně fluorescenční mikroskopie. Lze tak získat informaci o jeho biodistribuci v buňkách a živých organismech. [20-22] Antrachinonová část molekuly je vysoce lipofilní, zatímco

cukerná část je hydrofilní. Molekula doxorubicinu je jak amfifilní, tak amfoterní, což má za následek vazbu doxorubicinu na buněčné membrány a proteiny.

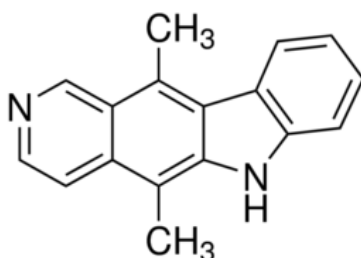
Jeho použití je limitováno kardiotoxicitou a při překročení kumulativní dávky 450 mg/m² stoupá riziko vzniku kardiomyopatie, která často vyústí v selhání srdce. Dochází k tvorbě volných radikálů a reaktivních forem kyslíku (ROS), které se podílejí na tomto nejzávažnějším vedlejším účinku. Ve snaze snížit toxicitu je doxorubicin vázán na různé nosiče, a to enkapsulací do liposomů, pegylací a nebo pegylací liposomů. Cytostatikum tak snadněji proniká do tkáně nádoru, kde je poté uvolňováno. Vazba na polyethylenglykol (PEG), tedy pegylace, výrazně mění farmakokinetiku daného léčiva. Brání degradaci látky v cirkulaci, zvyšuje poločas vylučování, lze jej zacílit na konkrétní místo v organismu a snížit tak množství, které se dostane do srdce, a tím tedy významně omezit toxicitu při zachování efektivity. [23]

Hlavním mechanismem účinku doxorubicinu je interkalace, tedy vazba do míst DNA bohatých na páry cytosinu a guaninu (CG). Díky své planární struktuře je schopen se navázat mezi tyto páry CG, což zablokuje replikaci a transkripci. Interkalací do DNA působí i blokádu funkcí topoizomerasy II, která se váže na oba řetězce DNA a po působení doxorubicinu zůstává kovalentně navázána a vznikají zlomy v DNA. Tento jev je doprovázen zástavou ve fázi buněčného cyklu G2 a apoptosou. V neposlední řadě se vytváří reaktivní formy kyslíku, tedy již zmíněné volné radikály. [20, 24]

1.2.2 Ellipticin

Dalším studovaným cytostatikem je ellipticin a jeho deriváty (obr. 3, str. 16). Jedná se o přirozeně se vyskytující alkaloid izolovaný z rostlin čeledi *Apocynaceae* (toješťovitě). Tato látka má nejen protinádorové účinky, ale také anti-HIV aktivitu a je silným mutagenem. Ellipticin je účinný proti několika typům nádorových onemocnění, není hematotoxický a má omezené vedlejší účinky, což jej činí vhodným pro klinické použití. [26] Obdobně jako doxorubicin se ellipticin interkaluje do DNA a působí inhibici topoizomerasy II. Studie, při které byla použita metoda ³²P-postlabelingu, prokázala, že v DNA řady nádorových buněčných linií včetně neuroblastomových tvoří metabolity ellipticinu kovalentní adukty. Naproti tomu v DNA vystavené působení doxorubicinu žádné kovalentní adukty nebyly detekovány. Tato kovalentní vazba je zprostředkována cytochromy P450 a peroxidasami. Dále ellipticin zabraňuje proliferaci buněk tím, že reguluje

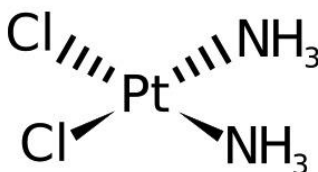
expresi cyklinu B1 a fosforylaci cyklin-dependentní kinasy 2 (Cdk2). V neposlední řadě inhibuje fosforylaci proteinu p53 společně s 9-hydroxyellipticinem, což vede k indukci apoptozy. [27- 29]



Obr. 3: Struktura ellipticinu, převzato a upraveno z [30]

1.2.3 Cisplatina

Jedním z často užívaných cytostatik je cisplatina (CDDP). Tento cis-diammindichloroplatinatý komplex (obr. 4) se využívá při léčbě široké škály malignit, jako je například neuroblastom, zhoubné nádory vaječníků, karcinomy hlavy a krku, sarkomy měkkých tkání a řada dalších. [31] Mechanismus účinku cisplatiny a dalších platinových derivátů je podobný alkylačním činidlům, čímž se řadí do skupiny látek poškozujících DNA. Slabě navázané chlory jsou snadno substituovány nukleofily oproti amonným skupinám, která jsou na centrální atom platiny vázány silnou koordinační vazbou. Oba chloridové ionty jsou tak nahrazeny vodou a tato hydratovaná, kladně nabitá forma komplexu může reagovat s nukleofilními místy v DNA, RNA a proteinech. Vytváří můstky mezi dvěma molekulami DNA (po vazbě na dva guaniny v komplementárních řetězcích) nebo i ve vláknu téže molekuly DNA (po vazbě na dva sousední guaniny nebo na guanin a adenin). Také jsou aktivovány některé signální dráhy, včetně těch, které zahrnují regulaci pomocí proteinů p53, p73 a MAPK, což výsledně aktivuje apoptosu. [18, 31]



Obr. 4: Struktura cisplatiny převzato a upraveno z [32]

Hlavními nežádoucími účinky cisplatiny jsou nefrotoxicita, ototoxicita a centrálně

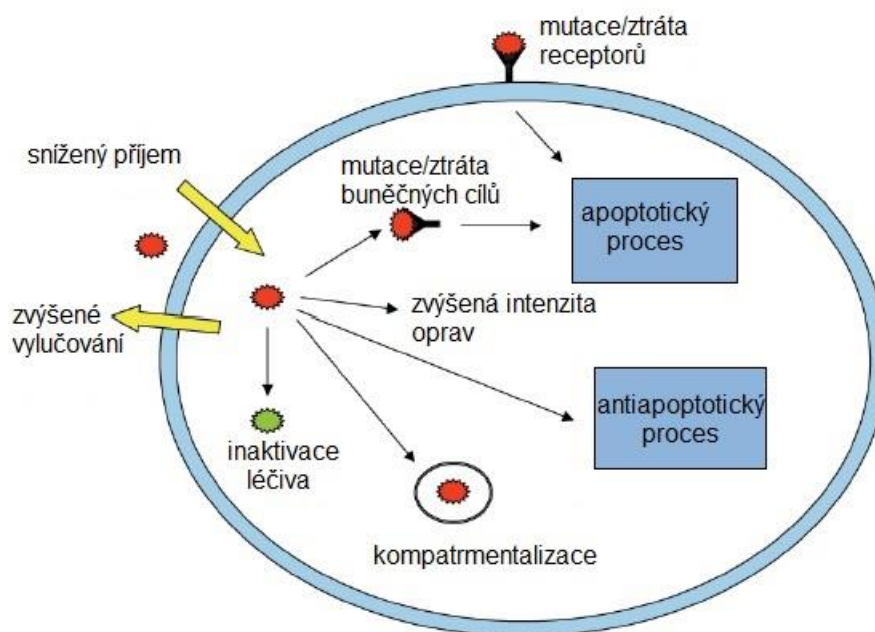
vyvolané zvracení, dále je velkým problémem také rezistence k léčivu při opakovaném podávání při recidivě choroby [18]

1.3 Mnohočetná léková rezistence

Nejčastější příčinou selhání protinádorové léčby je schopnost nádorových buněk odolávat účinkům cytostatických látek. Již při první léčbě mohou být maligní buněčné populace rezistentní vůči chemoterapii a jedná se o tzv. primární rezistenci. Častěji se však setkáváme s rezistencí sekundární (získanou), která vzniká až v průběhu cytostatické léčby. Z původně citlivé nádorové populace se stává rezistentní, což má za následek snížení účinnosti léčby. Kromě rezistence k jednotlivým cytostatikům se setkáváme i s mnohočetnou lékovou rezistencí (MDR), tedy rezistencí k protinádorovým léčivům lišícím se jak strukturně, tak mechanismem účinku. O zkřížené rezistenci mluvíme, když rezistence k jednomu cytostatiku vyvolá rezistenci k ostatním cytostatikům stejné skupiny např. vinca alkaloidům nebo antracyklinům [33]

V řadě studií byly zjištěny různé mechanismy, kterými rezistence nádorových buněk vzniká (obr. 5, str. 18). Dané mechanismy jsou vázány na tyto základní pochody: Změna farmakokinetiky, zahrnující snížený příjem léčiva buňkou, zvýšené vylučování (převážně ABC transportéry- transmembránové proteiny aktivně přenášející různé látky přes buněčné membrány za spotřeby ATP) nebo změnu katabolizmu. Změna cytokinetiky, neboť narůstání nádorové populace je doprovázeno přechodem větší části buněk do klidové fáze buněčného cyklu G_0 a v tomto stavu je citlivost k řadě cytostatik omezená. Rovněž s přibývajícím nádorovou masou vznikají sekundární mutace buněk, což vede ke vzniku buněčných klonů s odlišnou citlivostí k léčbě. Léčba tak ničí jen citlivou frakci buněk a rezistentní populace je selektována. Strukturální a funkční změny buňky. Jedná se o mechanismus rezistence zahrnující snížení exprese nebo aktivity enzymů, které jsou nutné pro konverzi cytostatika v účinnou látku, nebo naopak zvýšení exprese enzymů, jež se podílejí na biodegradaci. Kompartimentalizace léčiva, porušení intracelulární distribuce cytostatika (např. hromaděním v lysosomu) či ovlivnění transportu cytostatika buněčnou membránou. Další příčinou vzniku rezistence může být zvýšená intenzita oprav poškozené DNA. Za rezistenci může být odpovědná i porucha mechanismů apoptosy způsobená

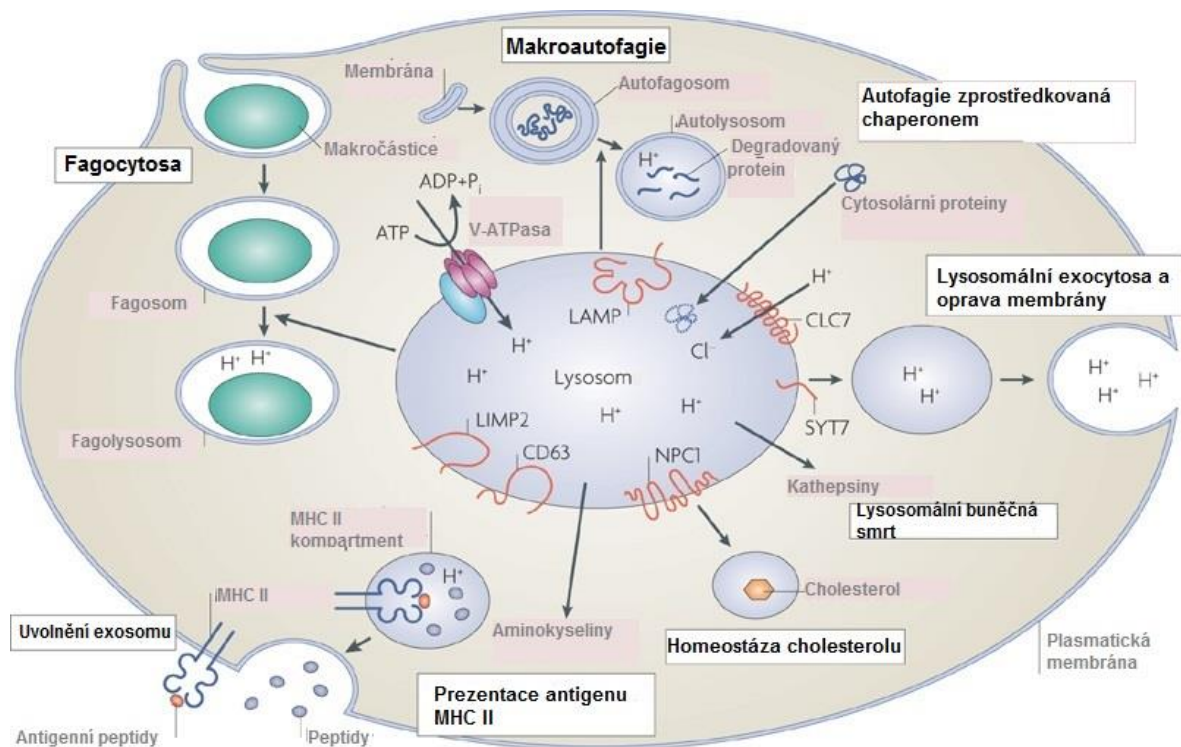
zvýšenou expresí apoptotických molekul (BCL2, BCLX aj.) nebo inaktivací proapoptotických efektorů (např. p53, BAX, FAS). [33-35]



Obr. 5: Schématické znázornění možných mechanismů rezistence k cytostatikům. Přejato a upraveno z [36]

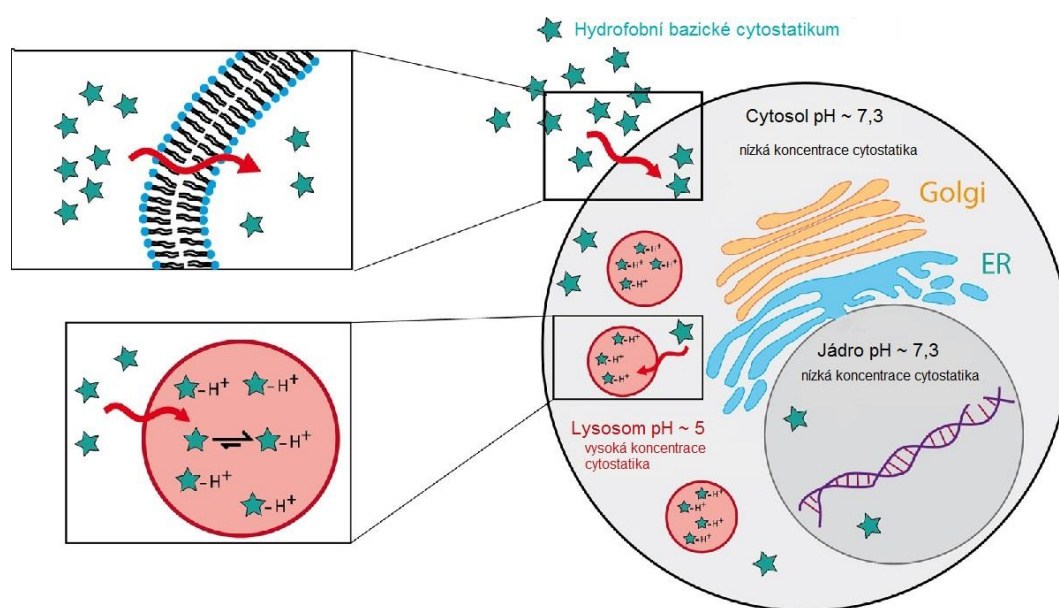
Výsledky řady studií dále ukazují, že lysosomy hrají důležitou roli při MDR. [37-39] Lysosomy jsou intracelulární orgány s vysokým obsahem hydrolytických enzymů, jež jsou ohraničeny jednoduchou membránou. Hydrolytické enzymy potřebují pro svoji funkci kyselé prostředí, které zajišťují protonové pumpy vakuolární ATPasy (V-ATPasy) umístěné v membráně lysosomů. Přenášejí aktivně protony do lysosomů, a proto je jejich vnitřní obsah s hodnotou pH mezi 4,5 až 5 výrazně kyselější, než cytoplazma. Právě kyselé pH poskytuje ochranu proti nekontrolovatelnému štěpení obsahu cytoplazmy. [40] Lysosomy fungují jako „zažívací“ systém buňky a dochází v nich k degradaci mnoha typů extracelulárních i intracelulárních organických látek. Po mnoho let byly považovány za tzv. odpadový kompartment, dnes jsou již uznávány jako orgány, které u eukaryot hrají důležitou roli v mnoha biologických procesech. Mají význam v prezentaci antigenů, programované buněčné smrti, exocytose, opravě plasmatické membrány, autofagii a udržování homeostázy některých metabolitů jako například cholesterolu a aminokyselin (obr. 6, str. 19). [41- 43] S lysosomy je spojena celá řada nemocí (Gaucherova nemoc, Tayův-Sachsův syndrom, Pompeho nemoc a další), kdy se v důsledku nedostatečné enzymové aktivity hromadí nevyužité makromolekuly

v lysosomech. Dále bylo zjištěno, že lysosomy hrají důležitou roli v různých nádorových onemocněních. Přeměna zdravé buňky v nádorovou vede i ke změnám v lysosomech včetně zvýšené exprese lysosomálních proteinů, které řídí progresi nádoru a tvorbu metastáz. Dále dochází ke snížení regulace exprese lysosomálních proteinů, jenž brání apoptose zprostředkované lysosomem a zvýšené sekreci lysosomálních enzymů, které se podílí i na invazi nádoru a angiogenezi. Mechanismem zvaným lysosomální sekvestrace se mohou podílet na chemorezistenci.[44, 45]



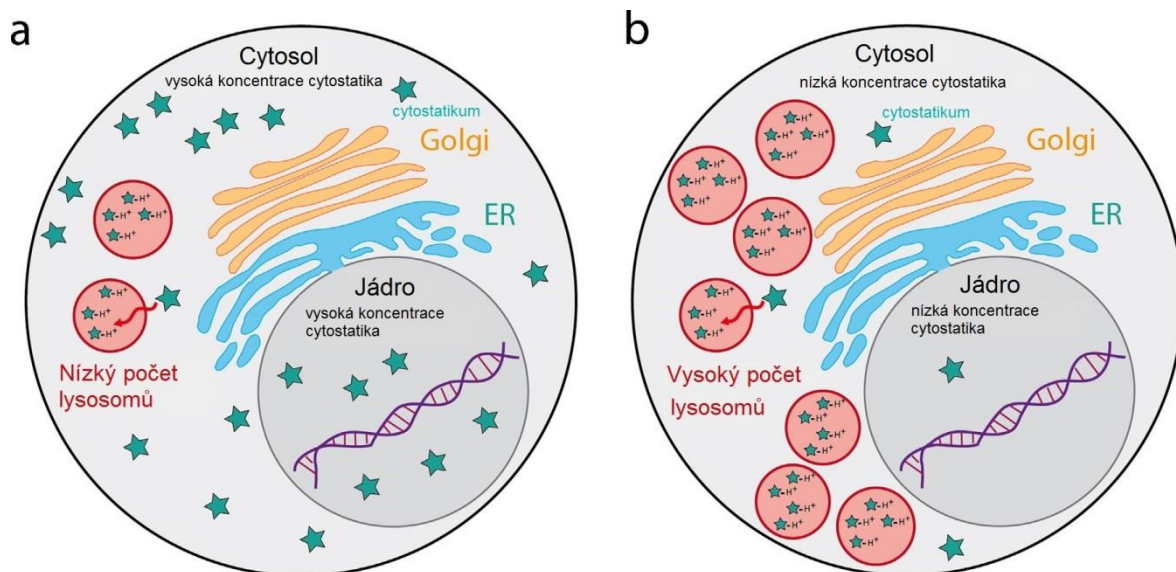
Obr. 6: Souhrn dějů, kterých se účastní lysosomy. „Major histocompatibility complex“ (MHC) II jsou povrchové glykoproteiny II. třídy prezentující antigeny. „Lysosome-associated membrane proteins“ (LAMP) jsou integrální membránové proteiny lysosomů a LIMP2 je lysosomální integrální membránový protein 2, jež slouží k regulaci lysosomálního/endosomálního transportu. Dalším lysosomálním membránovým proteinem je tetraspanin (CD63). Lysosomální exocytosa a oprava plasmatické membrány jsou závislé na synaptotagminu 7 (SYT7). Homeostáza cholesterolu je řízena pomocí Niemann–Pick C1 proteinu (NPC1). Transport H^+/Cl^- zajišťuje „chloride channel protein 7“ (CLC7). Přejato a upraveno z [46]

Lysosomální sekvestrace je proces, kdy jsou slabé báze hydrofobní povahy akumulovány v lysosomech. Díky své povaze prochází tyto látky volně jak přes plasmatickou, tak lysosomální membránu. V kyselém prostředí lysosomů jsou tyto látky protonovány. Tyto jejich formy nemohou projít lipidovou membránou lysosomů a jsou zde akumulovány. Vzhledem k tomu, že cílovým místem protinádorových léčiv jsou jen zřídka lysosomy nebo lysosomální proteiny, nemohou se tato cytostatika dostat k místu potenciálního účinku. Snížená koncentrace cytostatika v místě účinku, kterým je nejčastěji jádro má za následek snížení jeho cytotoxického efekt (obr. 7). Mezi taková cytostatika patří již zmiňovaný doxorubicin, daunorubicin a ellipticin. [37, 45]



Obr. 7: Lysosomální sekvestrace. Přejato a upraveno z [45]

U neuroblastomových buněčných linií bylo zjištěno, že ellipticin indukuje tvorbu vakuol, ve kterých se koncentruje. Konfokální mikroskopií po barvení pro lysosomy specifickým barvivem LysoTrackerem byly tyto vakuoly identifikovány jako lysosomy. Následkem je snížení koncentrace ellipticinu v místě účinku, tedy v jádře, což bylo potvrzeno snížením množství kovalentních DNA aduktů s ellipticinem u rezistentní linie. Buňky s větším počtem lysosomů jsou k danému léčivu méně citlivé než buňky s menším počtem lysosomů (obr. 8, str. 21). [37]



Obr. 8: Lysosomální sekvestrace. Cytostatikum je sekvestrováno do lysosomů (a). Zvýšený počet lysosomů (b) činí buňky odolné vůči cytosatikům. Přejato a upraveno z [45]

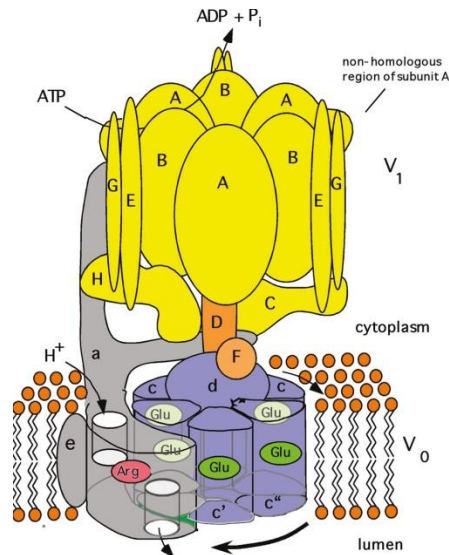
V linii rezistentní vůči ellipticinu byla rovněž zvýšena exprese V-ATPasy, která zajišťuje kyselé lysosomální prostředí. Alkalizace za použití specifického inhibitoru V-ATPasy bafilomycinu A nebo chlorochinu, který inhibuje lysosomální enzymy, způsobila vývoj apoptosy indukované ellipticinem v rezistentní linii, což naznačuje, že V-ATPasy a s nimi spojená sekvestrace v lysosomech hrají důležitou roli ve vývoji rezistence buněk vůči ellipticinu. [37]

1.4 V-ATPasa

Eukaryotická vakuolární adenosintrifosfatáza (V-ATPasa) je membránový proteinový komplex složený ze 14 podjednotek. [47] Jedná se o protonovou pumpu, která za spotřeby ATP „pumpuje protony“ z cytoplasmy do vakuoly, a tím zajišťuje acidifikaci některých intracelulárních kompartmentů jako například Golgiho aparátu, endosomů a lysosomů. Podílí se na kontrole pH cytoplasmy a vytváří protonový gradient, který hraje důležitou roli v již zmiňované lékové rezistenci. [48] Zvýšená aktivita a exprese této transmembránové H⁺-ATPasy je konstantním rysem u mnoha typů nádorů, a proto je její inhibice slibným terapeutickým cílem. [49]

1.4.1 Struktura V-ATPasy

V-ATPasa je enzym, který je tvořen 2 doménami a 14 podjednotkami (obr. 9). Cytoplazmatická doména V₁ se skládá z podjednotek A-H a je odpovědná za hydrolyzu ATP. Rotace centrální části řízená hydrolyzou (tvořené podjednotkami D, F a d) translokuje protony přes integrální V₀ doménu, jež se skládá z podjednotek a, d, e, c a c'. U enzymu kvasinek se navíc vyskytuje i podjednotka c'. [50, 51]

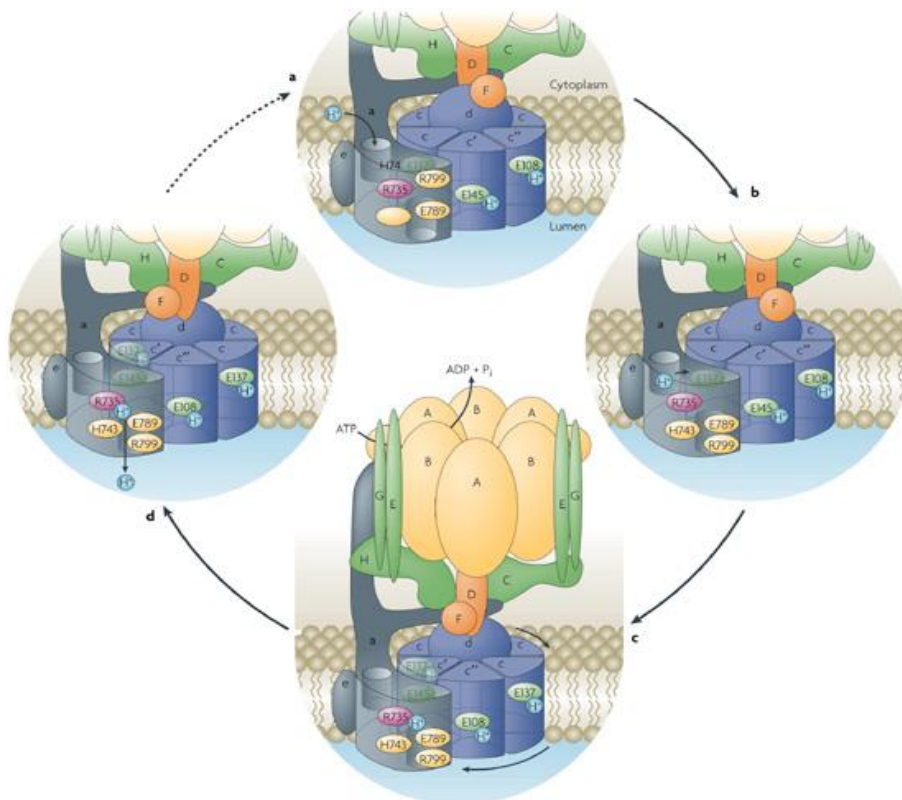


Obr. 9: Struktura V-ATPasy. Obrázek ukazuje uspořádání jednotlivých podjednotek V-ATPasy, včetně zbytků kyseliny glutamové (Glu) a arginylového zbytku (Arg). Přejato a upraveno z [52]

Doména V-ATPasy V₁ obsahuje subdoménu A₃B₃, což je hexamer vzniklý alterací podjednotek A a B, kde se hydrolyzuje ATP. Dále se skládá z podjednotek E a G, které tvoří tzv. „stator“, regulačních podjednotek C a H a podjednotek D a F, které tvoří centrální osu rotoru. Doména V₀ obsahuje proteolipidový kruh tvořený podjednotkami c, c' a c'', přilehlý k podjednotkám a a e, podjednotka d zprostředkovává spojení mezi proteolipidovým kruhem a centrální částí enzymu. Domény V₀ a V₁ jsou spojeny periferiální a centrální částí enzymu. Bylo zjištěno, že specifické inhibitory V-ATPasy včetně bafilomycinu A, archazolidu a dalších, se váží na proteolipidový kruh a brání tak její funkci. Hydrolyza ATP uvede do pohybu centrální rotační část, což vede k rotaci proteolipidového kruhu a je umožněn transport protonů (H⁺) přes membránu pomocí „hemikanálů“ umístěných v podjednotce a. Na cytoplazmatické straně se protony dostávají

do kanálu podjednotky a a protonují zbytky kyseliny glutamové proteolipidového kruhu. Poté se hydrolyzuje ATP na subdoméně A_3B_3 , rotuje centrální část a proteolipidový kruh. V důsledku interakce postranních zbytků kyseliny glutamové a zbytků argininu se uvolňují protony z podjednotek proteolipidového kruhu a translokují přes membránu pomocí kanálu podjednotky a (obr. 10, str. 24). [50, 53-55]

Reverzibilní disociace domén V0 a V1 je důležitým mechanismem regulace aktivity V-ATPasy. Při disociaci domén je ATPasová aktivita domény V1 inhibována. Bylo zjištěno, že podjednotka H je esenciální v tomto ději, neboť interaguje s podjednotkou F, brání tak rotaci a inhibuje hydrolyzu ATP. [56] Podjednotka a se skládá z C-terminální domény, která je zanořena do membrány a hydrofilní N-terminální domény lokalizované na cytoplasmatické straně membrány. C-terminální doména je tvořena osmi transmembránovými helixy, jež pravděpodobně tvoří „hemikanál“ důležitý pro transport protonů. U kvasinek se tato podjednotka exprimuje ve dvou izoformách (Vph1p a Stv1p), u savců ve čtyřech izoformách (V0a1-V0a4). [57, 58] Izoformy V0a1 a V0a2 jsou primárně intracelulární. V0a1 je exprimována zpravidla v synaptických váčcích, zatímco V0a2 je exprimována v endosomálních kompartmentech. V0a3 je exprimována v plasmatické membráně osteoklastů (kostních buněk) a izoforma V0a4 se exprimuje v buňkách ledvin, kde udržuje renální acidobazickou rovnováhu. Zvýšená exprese jednotlivých izoform V-ATPasy byla popsána u nádorových onemocnění, v závislosti na druhu tohoto onemocnění. [59]



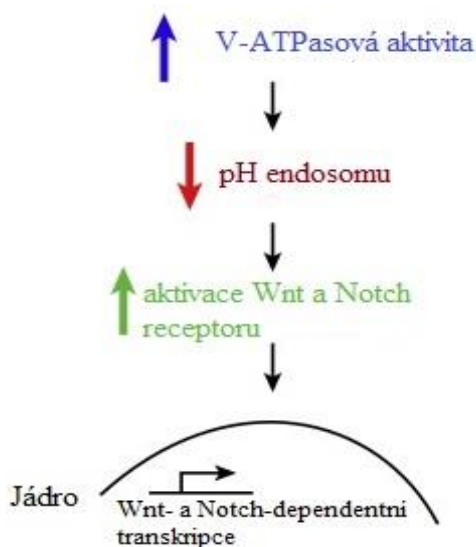
Obr. 10: Mechanismus transportu protonů V-ATPasou. (a) vstup protonů do „hemikanálu“ podjednotky a; (b) protonace zbytků kyseliny glutamové (E137, E145 a E108); (c) hydrolýza ATP, rotace proteolipidového kruhu a interakce zbytků kyseliny glutamové (E137, E145 a E108) a arginylového zbytku (R735); (d) translokace protonů. Přejato a upraveno z [50]

1.4.2 Funkce V-ATPasy

V-ATPasa, jakožto ATP-dependentní protonová pumpa, acidifikuje celou řadu vakuol a vykonává v buňce různé biologické funkce. V lysosomech vytváří kyselé prostředí, které je nezbytné pro správnou funkci proteas při degradaci proteinů. Hraje rovněž důležitou roli při endocytose, intracelulárním transportu a acidifikaci pozdních endosomů. [60,61] Endosomy obsahují různé ligand-receptorové komplexy, k jejichž disociaci dochází vlivem kyselého prostředí, zprostředkovaného V-ATPasou. Dochází tak k recyklaci receptorů pro ligandy jako jsou například lipoprotein o nízké hustotě (LDL), inzulin a transferin. Ty jsou následně transportovány do lysosomů. [62] V-ATPasy hrají důležitou roli v aktivaci intracelulárních signalizačních drah důležitých při vývoji (Notch a Wnt, obr. 11, str. 25). Bylo zjištěno, že Wnt-buněčný povrchový receptor LRP6 (Low-

density lipoprotein receptor-related protein 6) nemůže být aktivován, pokud je inhibována V-ATPasa a dochází k blokadě Wnt-indukované transkripce během vývoje. [58]

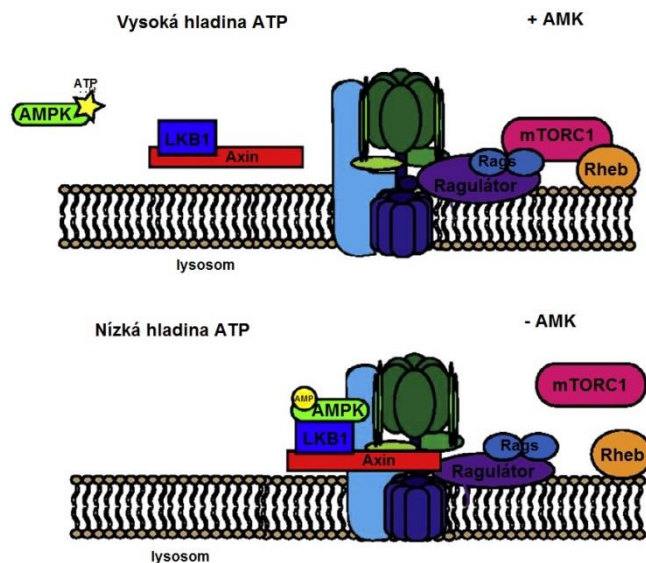
Signalizační dráha Notch mezi buňkami je rozhodující při vývoji a obnově tkání, neboť reguluje rovnováhu mezi buněčnou proliferací a apoptosou. Buňka vysílající signál exprimuje ligandy “Delta-Serrate-Lag-2” (DSL) rodiny a vazba těchto ligandů na receptor Notch sousední buňky je důležitá pro aktivaci této dráhy. Vazba ligandu vede k produkci formy Notch, jež je substrátem pro intramembránovou proteasu γ -sekretasu, ta následně odštěpí transkripčně aktivní intracelulární doménu Notch (NICD), která je translokována do jádra. V-ATPasa hraje důležitou roli pravděpodobně modulací γ -sekretasové aktivity nebo degradací receptoru Notch. Studie prokázaly, že u octomilek specifický inhibitor V-ATPasy bafilomycin A porušuje aktivaci γ -sekretasou a snižuje NICD. Působení této látky rovněž vyvolává v závislosti na koncentraci defekty vývoje embryí Dánie pruhovaného. Stejný jev byl rovněž pozorován v buněčných liniích odvozených od lidských nenádorových a nádorových epiteliálních buněk mléčné žlázy. [58, 63]



Obr. 11: Schéma vlivu V-ATPasy na signalizační dráhu Wnt a Notch. Přejato a upraveno z [58]

Savčí cíl rapamycinu (mTOR) je serin-threoninová kinasa lokalizovaná v cytoplasmě, která reguluje buněčný růst a metabolismus. Za fyziologických podmínek se podílí na neonatální autofagii a přežití, na vývoji obezity a stárnutí. Abnormální funkce mTOR se účastní patogeneze mnoha onemocnění, včetně rakoviny, diabetu, neurodegenerativních

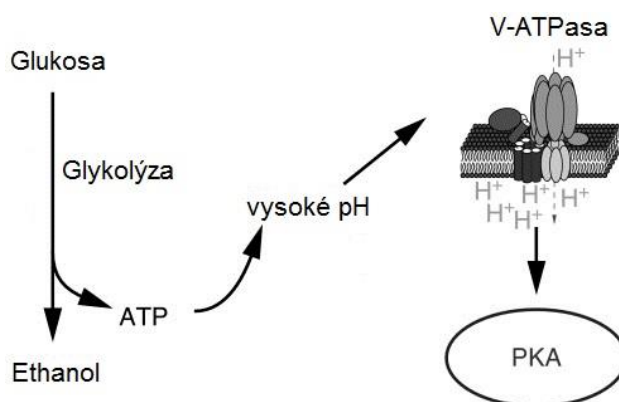
onemocnění a poruch ledvin. mTOR patří do superrodiny kinas příbuzných fosfatidylinositol-3 kinase (PI3K) a tvoří jádro dvou funkčně odlišných komplexů: mTORC1 a mTORC2. mTOR komplex 1 (mTORC1) reaguje na hladinu růstových faktorů, aminokyselin, kyslíku, energii a stres. V-ATPasa byla identifikována jako důležitá součást regulačního superkomplexu mTORC1 a signální dráhy. Pro aktivaci mTORC1 jsou nezbytné aminokyseliny, které stimulují jeho vazbu na povrch lysosomů, kde se nachází jeho aktivátor „Ras homolog enriched in brain“ (Rheb). Tato vazba je zprostředkována Rag (recombinatio activating gene) GTPasami navázanými na lysosom pomocí proteinového komplexu tzv. Regulátoru (obr. 12). Právě Regulátor je asociován s V-ATPasou v závislosti na aminokyselinách. V-ATPasa hraje přímou roli jako senzor aminokyselin a při její inhibici dochází k blokaci přenosu signálu. Regulátor a V-ATPasa jsou také stěžejní pro aktivaci proteinkinasy aktivované 5'-adenosinmonofosfátem (AMPK), jež hraje důležitou roli v buněčné kontrole metabolismu při odpovědi na energetický stres. [64]



Obr. 12: Schéma vlivu V-ATPasy na aktivaci savčího cíle rapamycinu (mTORC1) a proteinkinasy aktivované 5'-adenosinmonofosfátem AMPK. LKB1 (liver kinasa B1). Přejato a upraveno z [58]

Jednou z hlavních signalizačních drah pro glukosu u kvasinek je dráha cAMP/proteinkinasy A (PKA) a glukosa také stimuluje aktivitu této kinasy v některých

savčích buňkách, zejména v β bunčkách pankreatu. Glukosa změnou pH cytosolu aktivuje PKA. V-ATPasa funguje také jako intracelulární senzor glukosy, tedy pH a moduluje aktivitu PKA. (obr. 13) [65]



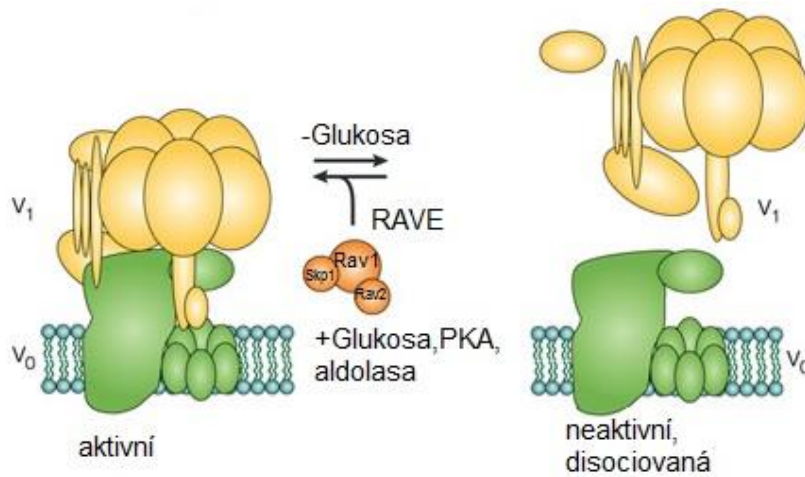
Obr. 13: Glykolýza mění pH a V-ATPasa jako senzor pH následně moduluje aktivitu proteinkinasy A (PAK). Přejato a upraveno z [65]

V-ATPasy hrají také důležitou roli při nádorových onemocněních, kdy byla pozorována zvýšená exprese jejich podjednotek v různých nádorových liniích. Navíc byla zjištěna zvýšená exprese V-ATPasy v plasmatické membráně invazivních nádorových buněk prsu, prostaty, ledvin, pankreatu, také u melanomu a Ewingova sarkomu. Nízké pH, které je typické pro nádory, je potřebné pro aktivaci některých proteolytických enzymů, včetně matrix metaloproteinů. Ty se podílí na degradaci a remodelaci extracelulární matrix, což vede k invazi a metastazování nádoru. Inhibicí V-ATPasy se zvyšuje citlivost nádorových buněk k cytostatikům a snižuje se růst některých nádorů. Při krátkém působení inhibitorů dochází k odpovědi na buněčný stres a autofagii, zatímco delší působení indukuje apoptosu. V důsledku intracelulární acidózy způsobené inhibicí V-ATPasy v nádorových buňkách prsu je stabilizován pro-apoptotický protein BNIP3, což následně vede k buněčné smrti. Ztráta V-ATPasové aktivity snižuje invazi a migraci u různých nádorů a metastazování u melanomu a nádoru prsu. V neposlední řadě hraje roli při již zmíněné chemorezistenci. Celkově lze říci, že rozmanité funkce V-ATPasy v mechanismu přežití a metastazování nádorových buněk, z ní činí potenciální cíl při vývoji protinádorových léčiv. [60, 58]

1.4.3 Regulace V-ATPasy

Důležitým mechanismem regulace aktivity V-ATPasy je reverzibilní disociace tohoto komplexu na jednotlivé V1 a V0 domény, které jsou tak inhibovány. Tento proces byl nejprve popsán u kvasinek a lišaje, jehož housenky se živí tabákem (*Manduca sexta*). Později bylo zjištěno, že modulace disociace podjednotek V-ATPasy je také regulačním mechanismem v savčích buňkách. Disociace probíhá jako odpověď na různé podněty, které se u kvasinek a savců liší. [66]

V kvasinkách disociují domény V1 a V0 při nedostatku glukosy. K jejich opětovnému spojení je třeba několika faktorů. Po přidání glukosy k „hladovějícím“ kvasinkám se aktivuje dráha Ras/cAMP/PKA a opětovně se spojí celý komplex. Interakce s glykolytickými enzymy, aldolasou nebo fosfofruktokinásou, také pozitivně moduluje aktivitu V-ATPasy. Interakce aldolasy jak s doménou V0, tak i V1 je nezbytná pro spojení obou domén. Fosfofruktokinasa interaguje s podjednotkou a domény V0, je však třeba účasti dalšího faktoru, a to regulátoru ATPas vakuolárních a endosomálních membrán (RAVE). RAVE je heterotrimerní komplex tvořený proteiny, které jsou součástí ubiquitin lygasy (Skp1, Rav1 a Rav2). Tento komplex interaguje s doménou V1 V-ATPasy. Rav1 homolog u octomilky a myši, zvaný Rabconnectin (Rbcn-3) je důležitý pro acidifikaci organel, proto má konzervovanou roli v regulaci V-ATPasové aktivity. Disociaci domén V-ATPasy je také kontrolována extracelulárním pH. Neutrální extracelulární pH zvyšuje aktivitu V-ATPasy až o 57% oproti vakuolám izolovaným z buněk kultivovaných v kyselém prostředí (pH 5). [66-68] Cytosolické pH se rovněž podílí na regulaci V-ATPasy, neboť zvýšené pH vede ke zvýšení asociace domén a zvýšení aktivity kinasy PKA, což bylo zmíněno v kapitole 1.4.2. [69] Schéma regulace V-ATPasy je uvedeno na obr. 14 na straně 29.



Obr. 14: Regulace V-ATPasy v kvasinkách. Přejato a upraveno z [68]

V případě savců je mechanismus regulace podobný, avšak jsou zahrnuty jiné faktory. Například v buňkách renálního epitelu glukosa aktivuje V-ATPasu a spojení domén V1 a V0 je zprostředkováno fosfatidylinositol-3 kinasou (PI3K). Epidermální růstový faktor (EGF) aktivuje mTORC1 a ten se rovněž účastní pozitivní modulace aktivity V-ATPasy. [70,71]

1.4.4 Bafilomycin A, specifický inhibitor V-ATPasy

Mezi mnoha mechanismy, kterými se dá regulovat prostředí nádoru, má významné místo inhibice V-ATPasy pomocí inhibitorů protonových pump. Jak již bylo zmíněno, V-ATPasy hrají důležitou roli v metastazování a invazi nádorů. Nejstudovanějšími a nejpoužívanějšími inhibitory jsou bafilomycin A a konkanamycin. Jedná se o makrolidová antibiotika s 16- až 18-člennými laktonovými kruhy. Pravděpodobně dochází k vazbě na proteolipidový kruh domény V0, tvořený podjednotkami c, c' a c'', přesný mechanismus však není zcela znám. [60]

2. Cíl práce

Předkládaná diplomová práce si kladla za cíl sledovat podíl enzymu vakuolární ATPasy (V-ATPasy) na vzniku rezistence lidských neuroblastomových buněčných linií vůči cytostatikům. Dále byly zkoumány možnosti inhibice tohoto enzymu. K dosažení výsledků bylo postupováno podle následujících kroků:

- Kultivace neuroblastomových buněčných linií a od nich odvozených linií rezistentních k vybraným cytostatikům
- Stanovení koncentrace doxorubicinu, ellipticinu a cisplatiny způsobující padesátiprocentní úmrtnost buněk (IC_{50}) senzitivní neuroblastomové linie UKF-NB-4 metodou MTT testu
- Stanovení exprese enzymu vakuolární ATPasy (V-ATPasy) metodou Western blot a kvantitativní RT-PCR
- Detekce buněčné smrti vyvolané studovanými cytostatiky a ovlivnění její indukce inhibitorem V-ATPasy bafilomycinem A
- Sledování lokalizace ellipticinu a doxorubicinu v neuroblastomových buňkách UKF-NB-4 pomocí konfokální mikroskopii

3. Materiál a metody

3.1 Materiál a chemikálie

Agfa (Belgie): lékařský x-ray film

Abcam (USA): primární protilátka proti ATP6V0D1

Applied Biosystems (USA): „Universal PCR Master Mix“

Bio-Rad (USA): sekundární protilátka (kozí proti myši v konjugátu s HRP), souprava pro stanovení koncentrace proteinů (DC Protein Assay Reagent A, Reagent S, Reagent B), sušené mléko (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk), nitroceluloseová membrána 0,45 µm, „Immun-Star HRP Chemiluminiscence Kit“, trypanová modř

Carl Roth (Německo): merkaptoethanol

Exbio (ČR): Anexin V Dyomics 674, Anexin V Binding Buffer

Fluka (Německo): Ponceau S, amonium peroxodisulfát (APS), 1,2-bis (dimethylamino) ethan (Temed), Igepal CA 630, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromid (MTT),

Generi Biotech (ČR): kit pro reverzní transkripci „gb Reverse Transcription Kit“,

Primery a sondy: Assay qPCR hPOLR2A FAM, Assay qPCR hATP6V0C1 FAM, Assay qPCR hATP6V0D1 FAM, Assay qPCR hATP6V0G1 FAM

Gibco (USA): sodný fosfátový pufr s obsahem NaCl (PBS), telecí sérum (fetal bovine serum FBS), „Iscove’s modified Dulbecco’s“ médium (IMDM) s glutaminem,

Invitrogen (USA): dodecylsulfát sodný (SDS)

Penta (ČR): methylalkohol, bromfenolová modř

Quiagen (Německo): „RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (50)“ pro izolaci RNA

Roche (Německo): proteasový inhibitor „Complete protease inhibitor“

Sigma-Aldrich (USA): ellipticin, N,N-dimethylformamid, Tris báze, glycerol, akrylamid/bis-akrylamid, bisBenzimid (Hoechst 33342), deoxycholát sodný, polyoxyethylensorbitanmonolaurát (TWEEN 20), bafilomycin A, 4',6-diamidino-2-fenylindol dihydrochlorid (DAPI)

Teva (Izrael): doxorubicin, cisplatina

Všechny chemikálie byly čistoty p.a. (pro analýzu) nebo čistoty vyšší.

Neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4, UKF-NB-4^{DOXO} a UKF-NB-4^{CDDP} byly darem prof. Jindřicha Činátla, DrSc. z Goetheho Univerzity ve Frankfurtu nad Mohanem. Linie UKF-NB-4^{ELLI} byla připravena dlouhodobou kultivací linie UKF-NB-4 se stoupajícími dávkami ellipticinu v laboratoři Kliniky dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze s Fakultní nemocnice Motole. [72]

3.2 Metody

3.2.1. Rozmrazení buněk

Suspenze testovaných lidských neuroblastomových linií, jak UKF-NB-4, tak i linií rezistentních k ellipticinu UKF-NB-4^{ELLI}, cisplatině UKF-NB-4^{CDDP} a doxorubicinu UKF-NB-4^{DOXO} byly uchovávány v tekutém dusíku. Pro rozmrazení byly zkumavky se vzorky buněk umístěny do vodní lázně (37°C) a poté přeneseny do 15 ml zkumavek s 5 ml kompletního média IMDM doplněného 10% telecím sérem (FBS). Následně byly buňky centrifugovány při 1350 rpm po dobu 2 minut při pokojové teplotě v centrifuze Hettich Universal 320 (Německo). Po odstranění supernatantu byla peleta buněk resuspendována v 10 ml kompletního kultivačního média a buněčná suspenze byla přenesena do kultivační lahvičky o kultivační ploše 25 cm². Buňky byly umístěny do inkubátoru Jouan IGO 150 (USA).

3.2.2. Kultivace neuroblastomových buněčných linií

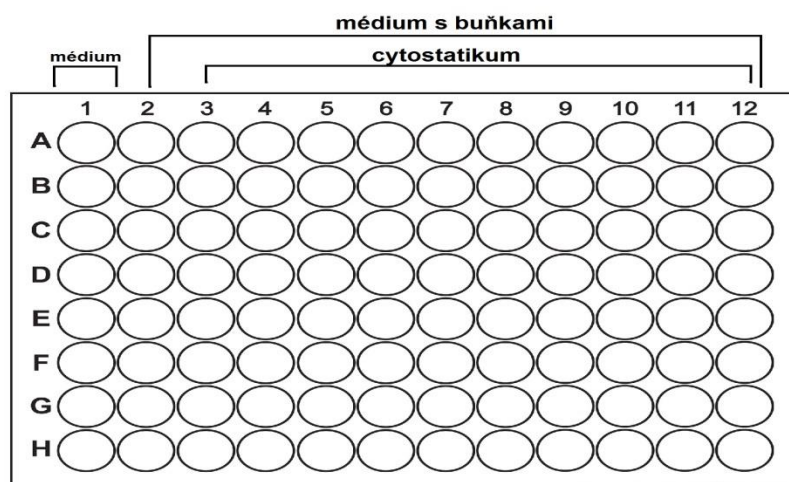
Neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 a UKF-NB-4 rezistentní k doxorubicinu (UKF-NB-4^{DOXO}), UKF-NB-4 rezistentní k ellipticinu (UKF-NB-4^{ELLI}) a UKF-NB-4 rezistentní k cisplatině (UKF-NB-4^{CDDP}) byly kultivovány v IMDM médiu, obohaceném 10% telecím sérem (FBS). Kultivace probíhala v inkubátoru Jouan IGO 150 (USA) při 37 °C s 5% CO₂ a 95% vlhkostí vzduchu. Rezistentní buněčné linie byly kultivovány s příslušnými cytostatiky o koncentracích uvedených v tabulce 2 na straně 34. Dvě pasáže buněk před provedením experimentů, byly tyto linie kultivovány bez přídavku cytostatik, aby nedošlo k ovlivnění buněk. Buněčné linie byly pasážovány v pravidelných intervalech 2x týdně. Buňky byly promyty PBS a poté byly z povrchu kultivačních lahviček uvolňovány 0,05% roztokem trypsinu v PBS a resuspendovány v dostatečném množství média. Buněčné linie byly kultivovány v lahvičkách o kultivační ploše 25 cm² a 75 cm².

Tabulka 2: Koncentrace cytostatik přidávaných k rezistentním neuroblastomovým liniím při pasážování

Buněčná linie	Přidávané cytostatikum	Koncentrace cytostatika
UKF-NB-4 ^{DOXO}	doxorubicin	92 nM
UKF-NB-4 ^{CDDP}	cisplatina	3 μ M
UKF-NB-4 ^{ELLI}	ellipticin	2,5 μ M

3.2.3 Stanovení koncentrace doxorubicinu, ellipticinu a cisplatin, způsobující padesátiprocentní úmrtnost buněk (IC₅₀) u senzitivní neuroblastomové linie UKF-NB-4

Do prvního sloupce 96 jamkové mikrotitrační destičky bylo pipetováno 100 μ l kompletního IMDM média. Do druhého až dvanáctého sloupce bylo pipetováno vždy 50 μ l IMDM média. Do posledního 12. sloupce bylo pipetováno 50 μ l testovaného cytostatika a osmi kanálovou pipetou tzv. „dvojkovou řadou“ pipetovány do předchozích sloupců destičky až k 3. sloupci. Počáteční koncentrace ellipticinu byla 10 μ M, doxorubicinu 5 μ M a cisplatin 25 μ M. Dále bylo do sloupců dvě až dvanáct pipetováno 10 000 buněk v 50 μ l média, mikrotitrační destička byla umístěna do inkubátoru Jouan IGO 150 (USA), kde byla inkubována po dobu 72 hodin při 37 °C. Schéma mikrotitrační destičky je uvedeno na obrázku 15 na straně 35. Následně bylo do všech sloupců destičky pipetováno 50 μ l 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromidu (MTT, 2 mg/ml v PBS) a destička byla umístěna do inkubátoru na 2 hodiny. Poté bylo přidáno 100 μ l 50 % N,N-dimethylformamidu v 20 % SDS, pH 4,5-5. Obsah jamek byl důkladně promíchán pipetou a spektrofotometrem Molecular Devices VERSA max (USA) byla měřena absorbance při vlnové délce 570 nm. Optická denzita média byla odečtena jako pozadí a hodnota optické denzity živých kontrolních buněk v druhém sloupci byla brána jako 100 %. Koncentrace cytostatika způsobující padesátiprocentní úmrtnost buněk (IC₅₀) pro jednotlivé látky byla vypočtena programem SoftMax Pro.



Obr. 15: Mikrotitrační destička pro MTT test. Přejato a upraveno z [73]

3.2.4 Příprava vzorků buněčných extraktů pro analýzu pomocí metody Western blot a kvantitativní reverzně transkripční polymerázové řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR)

Buněčné linie byly přeneseny na Petriho misky o kultivační ploše 60,1 cm² tak, aby v každé misce byly 4 miliony buněk. Buňky byly počítány na počítadle buněk BIO-RAD TC 20 (USA). Misky byly umístěny do inkubátoru Jouan IGO 150 (USA) po dobu 24 h. Poté bylo do média přidáno příslušné cytostatikum pro analýzu metodou Western blot v koncentraci uvedené v tabulce 3 na straně 36. Koncentrace cytostatik použitých pro analýzu pomocí RT-PCR jsou uvedeny v tabulce 4 na straně 36. U každé linie byla ponechána jedna miska bez přídavku cytostatika, která sloužila jako kontrola. Kultivace daných linií v prostředí cytostatik probíhala po dobu 24 hodin při 37 °C. Následně byly buňky tzv. kultivační škrabkou uvolněny ze dna Petriho misky, takto vzniklá suspenze byla přenesena do centrifugační zkumavky a centrifugována po dobu 2 min při 1350 rpm při laboratorní teplotě v centrifuze Hettich Universal 320 (Německo). Supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována v 1 ml PBS s následnou centrifugací za stejných podmínek. Většina supernatantu byla odstraněna, peleta byla resuspendována v 700 µl PBS a přenesena do mikrozkušavky a opět proběhla centrifugace při stejných podmínkách. Veškerý supernatant byl odstraněn a pro další práci byla použita peleta buněk, která byla skladována při -20 °C.

Tabulka 3: Přehled vzorků buněčné linie UKF-NB-4 senzitivní a linií rezistentních k cisplatině UKF-NB-4^{CDDP}, doxorubicinu UKF-NB-4^{DOXO} nebo ellipticinu UKF-NB-4^{ELLI} připravených pro analýzu metodou Western blot. Buňky byly s jednotlivými cytostatiky kultivovány po dobu 24 hodin, linie bez přídatku cytostatika byly použity jako kontrolní.

UKF-NB-4 ^{ELLI}	UKF-NB-4 ^{DOX}	UKF-NB-4 ^{CDDP}	UKF-NB-4		
ellipticin	doxorubicin	cisplatina	ellipticin	doxorubicin	cisplatina
0 μM	0 μM	0 μM	0 μM	0 μM	0 μM
2 μM	92 nM	3 μM	2 μM	92 nM	3 μM
5 μM	460 nM	17 μM	5 μM	460 nM	17 μM

Tabulka 4: Přehled vzorků buněčné linie UKF-NB-4 senzitivní a linií rezistentních k cisplatině UKF-NB-4^{CDDP}, doxorubicinu UKF-NB-4^{DOXO} nebo ellipticinu UKF-NB-4^{ELLI} připravených pro analýzu metodou kvantitativní polymerasové řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR). Buňky byly s jednotlivými cytostatiky kultivovány po dobu 24, linie bez přídatku cytostatika byly použity jako kontrolní.

UKF-NB-4 ^{ELLI}	UKF-NB-4 ^{DOX}	UKF-NB-4 ^{CDDP}	UKF-NB-4		
ellipticin	doxorubicin	cisplatina	ellipticin	doxorubicin	cisplatina
0 μM	0 μM	0 μM	0 μM	0 μM	0 μM
5 μM	460 nM	17 μM			

3.2.5 Izolace proteinů z testovaných neuroblastomových buněčných linií

Pelety neuroblastomových buněčných linií připravených dle kapitoly 3.2.4 (tabulka 4) byly resuspendovány v 1-3x objemu pelety v roztoku pufru RIPA (1% Igepal CA 63; 0,5% deoxycholát sodný; 0,1% SDS; v PBS), ke kterému byl přidán „Complete protease inhibitor cocktail“ v poměru 1:24. Takto připravené buňky byly inkubovány po dobu 60 min na ledu. Poté byly vzorky centrifugovány při 4°C po dobu 20 min při 15 000 rpm na centrifuze Hettich Universal 320R (Německo). Supernatant byl přenesen do nové mikrozkušavky a zmrazen na -80°C pro další použití.

3.2.6 Stanovení koncentrace proteinů testovaných neuroblastomových buněčných linií metodou dle Lowryho

Koncentrace proteinů analyzovaných vzorů byla stanovena metodou dle Lowryho. [74] Nejprve byly vzorky proteinů připravených dle kapitoly 3.2.5 8x ředěny destilovanou vodou. Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 5 μ l příslušného vzorku, standardu sérového hovězího albuminu (BSA) o koncentraci 0; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2 a 2,8 mg/ml. „Slepým“ vzorkem o koncentraci BSA 0 mg/ml byla destilovaná voda a pufr RIPA. Do každé jamky se standardem či vzorkem bylo přidáno 25 μ l roztoku A' (1000 μ l roztoku A a 20 μ l roztoku S), a poté bylo přidáno 250 μ l roztoku B. Mikrotitrační destička byla umístěna na laboratorní třepačku Labnet Gyro Twiester (USA) a inkubována po dobu 15 min při opatrném míchání při laboratorní teplotě. Následně byla měřena optická denzita na spektrofotometru Molecular Devices VERSA max (USA) při vlnové délce 750 nm. Zjištěná data byla vyhodnocena softwarem SoftMax Pro.

3.2.7 Separace proteinu buněčných lyzátů pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)

Proteiny z celobuněčných lyzátů byly elektroforeticky rozděleny pomocí SDS-PAGE postupem dle Laemmliho. [75] Pro diskontinuální uspořádání byl použit 16 % separační gel o objemu 10 ml (3,75 ml 1,5 M Tris pH 8,8; 3,94 ml 40 % akrylamid/bis-akrylamid (29:1); 100 μ l 10% SDS; 10 μ l TEMED; 100 μ l 10% APS a doplnit destilovanou vodou do 10 ml) a „zaostřovací“ 6% gel o objemu 5 ml (1,25 ml 1M Tris pH 6,8; 750 μ l 40% akrylamid/bis-akrylamid (29:1); 50 μ l 10% SDS; 10 μ l TEMED; 50 μ l 10% APS a doplnit destilovanou vodou do 5 ml). K jednotlivým vzorkům (25 μ g proteinu na jamku) byl přidán v poměru 1:5 vzorkový pufr (375 mM Tris-HCl pH 6,8; 9% SDS; 50% glycerol; 9% merkaptoethanol; 0,03% bromfenolová modř). Vzorky byly dále 5 minut inkubovány ve vyhřevném bloku Techne Dri-block (UK) při teplotě 95°C a poté nanášeny do jamek gelu. Rozdělení proteinů probíhalo v elektroforetické aparatuře BIO-RAD (USA), elektromigrace probíhala ve vertikálním uspořádání 80 minut při konstantním proudu 40 mA. Elektroforeticky rozdělené proteiny byly přeneseny na nitrocelulosovou membránu metodou Western blot.

3.2.8. Analýza proteinů testovaných neuroblastomových buněčných linií pomocí metody Western blot

Pro přenos proteinů na nitroceluloseovou membránu byla použita aparatura firmy BIO-RAD (USA). Do této aparatury byly postupně navrstveny „fiber“, filtrační papír, elektroforetický gel, nitroceluloseová membrána, opět filtrační papír a „fiber“. Membrány spolu s „fibery“ a filtračními papíry byly ponořeny do přenosového pufru (3,05 g Tris a 14,5 g glycinu v 10% methanolu). Přenos proteinů probíhal 80 minut při konstantním proudu 350 mA. Pro kontrolu správného přenosu byly membrány obarveny roztokem Ponceau a následně roztokem PBS odbarveny. Membrány byly poté 1 hodinu blokovány v roztoku 5% mléka v pufru C (1 ml 20% TWEEN 20 do 400 ml PBS) za mírného míchání na laboratorní třepáče Labnet Gyro Twiester za laboratorní teploty. Následovala inkubace s myší specifickou primární protilátkou proti ATP6V0D1 (1:500) přes noc při 4°C za stálého míchání pomocí Labnet LabRoller II (USA). Ve vakuové aparatuře Millipore SNAP i.d. (Německo) byly membrány promyty pufrům C. Poté byla na membrány navrstvena sekundární protilátka, kozí proti myši s HRP konjugátem, 1:2000 ředěná v 0,1% mléce v pufru C a membrány byly inkubovány 10 minut při laboratorní teplotě. Následně byly membrány opět promyty roztokem pufru C a inkubovány 3 minuty s reagensy soupravy Immun-Star HRP Chemiluminescence Kit (Bio-Rad, USA) smíchanými v poměru 1:1. Membrány byly umístěny do kazety firmy FOMA CAWO (ČR) a vyvolány na filmy Agfa v přístroji FOMA Optimax (ČR) dle údajů výrobce.

3.2.9 Izolace RNA z analyzovaných buněk neuroblastomových linií

Izolace RNA byla prováděna za použití kitu RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (50). Vzorky buněčných linií byly připraveny postupem popsáním v kapitole 3.2.4. (tabulka 4, str. 25). Buněčné pelety byly resuspendovány v 1 ml QIAzol Lysis Reagent a přibližně 30 minut inkubovány při laboratorní teplotě do úplného rozpuštění pelety. Následně bylo přidáno 200 μ l chloroformu, vzorky byly 15 sekund míchány invertováním, 3 minuty inkubovány při laboratorní teplotě a poté centrifugovány při 4°C po dobu 15 minut při 11 400 rpm v centrifuze Eppendorf Centrifuge 5415R (Německo). Vrchní vodná fáze obsahující RNA byla přenesena do nové mikrozkuhavky, přidán 70% ethanol v poměru 1:1 a vzorky byly důkladně míchány na vortexu VELP Scientifica Rw³ (Itálie). Poté byly vzorky přeneseny do „RNeasy mini spin colum“ ve 2 ml „collection tube“, centrifugovány

po dobu 15 sekund při 9 400 rpm a filtrát byl odstraněn. Následoval krok štěpení DNAsou, kdy bylo přidáno 350 μ l RW1 pufru s následnou centrifugací za stejných podmínek a filtrát byl odstraněn. Smísením 10 μ l DNasy I a 70 μ l RDD pufru byl připraven „DNAsa mix I“. Tento „mix“ byl navrstven na membránu kolonky, která byla inkubována po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 350 μ l RW1 pufru s následnou centrifugací 15 sekund při 9 400 rpm a filtrát byl odstraněn. Ke kolonce bylo přidáno 500 μ l RPE pufru s následnou centrifugací za stejných podmínek. Po odstranění filtrátu byl tento krok opakován s centrifugací po dobu 2 minut při 9 400 rpm. Pro úplné vysušení membrány byla kolonka vložena do nové mikrozkušavky a centrifugována 1 minutu při 13 400 rpm (maximum). Dále byla opět kolonka vložena do nové mikrozkušavky a bylo přidáno 30 μ l „RNasy free“ vody. Vzorky byly centrifugovány po dobu 1 minuty při 9 400 rpm. Veškerá práce byla prováděna v laminárním boxu Telstar AV-100 (Španělsko). Koncentrace a čistota izolované RNA byla měřena na spektrofotometru Nanodrop ND-1000 (USA).

3.2.10 Reverzní transkripce RNA testovaných neuroblastomových buněčných linií

Pro přepis RNA do komplementární DNA (cDNA) byla použita komerční sada pro reverzní transkripci na cDNA s inhibítorem RNAsy Generi Biotech Reverse Transcription Kit. Vzorky RNA izolované dle kap. 3.2.8. na straně 27 byly ředěny vodou (RNase free) tak, aby koncentrace RNA na reakci činila 500 μ g. Ke každému vzorku (1,5 μ l) bylo přidáno 15 μ l „Master Mixu“ a 13,5 μ l vody zbavené RNAsy. Reverzní transkripce byla připravována v boxu Bioair instruments Aura PCR (Itálie).

Pro přepis RNA do cDNA byly vzorky umístěny do termocykleru SensoQuest Labcycler (Německo) a byl zvolen následující program: 42°C po dobu 60 minut a poté 4°C ∞ .

3.2.11 Kvantitativní polymerasová řetězová reakce v reálném čase (RT-PCR) genů domén V-ATPasy *ATP6VIC1* a *ATP6VIG1*

Kvantitativní polymerasová řetězová reakce v reálném čase (RT-PCR) je jednou z modifikací klasické PCR reakce. Tato metoda se používá pro kvantitativní analýzu templátu, tedy určitého úseku cDNA v reálném čase. Amplifikace je detekována pomocí

fluorescenčních sond, které se váží specificky nebo nespecificky na amplifikovanou DNA. Mezi specifické sondy patří např. TaqMan systém, který byl využit v této práci, nespecifické sondy jsou např. Syber Green.

Pro RT-PCR byly použity primery hATP6V1C1, hATP6V1G1 a pro kontrolní gen hPOLR2A s FAM (6-Carboxyfluorescein) značenými fluorescenčními specifickými sondami, které byly navrženy a připraveny v Generi Biotech (ČR). Reakce RT-PCR byla provedena se vzorky cDNA připravenými dle kap. 3.2.9. Každá 20 μ l reakce sestávala z: 10 μ l „Universal Master Mixu“, 2 μ l primeru s FAM fluorescenční značkou, 6 μ l „RNase free“ vody a 2 μ l vzorku cDNA. Každý vzorek byl vyšetřen v triplicátu. Vzorky byly vloženy do Applied Biosystems 7 300 Real Time PCR System (USA), kde byly pomocí programu 7 300 System Software následující podmínky:

95°C po dobu 10 minut

40 cyklů o následujících parametrech:

95°C po dobu 15 sekund

60°C po dobu 60 sekund

Pro vyhodnocení výsledků byla použita relativní kvantifikace. Ta popisuje relativní změnu exprese genu vůči vnitřnímu standardu. Jako vnitřní standard se využívá tzv. house-keeping gen (POLR2A), jehož hladina exprese je za podmínek experimentu konstantní. Pro výpočet exprese cílového genu ve vztahu k odpovídajícímu house-keeping genu použita srovnávací $\Delta\Delta C_t$ metoda. Základním předpokladem při srovnávací $\Delta\Delta C_t$ metodě je, že amplifikace cílového i house-keeping genu probíhá se stejnou účinností. K výpočtu celkového množství cílového genu se poté používá vztah:

$R=2^{-\Delta\Delta C_t}$ kde: $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{vzorku}} - \Delta C_{t_{kontrola}}$ [76]

3.2.12 Detekce apoptosy v lidských neuroblastomových liniích po působení ellipticinu a cisplatin

Průtoková cytometrie je metoda používaná pro analýzu buněk v suspenzi. Buňky jsou značeny monoklonální protilátkou s navázaným flourofochromem specificky se vážající na antigen na povrchu nebo uvnitř stanovovaných buněk nebo jinou fluorescenční značkou. Suspenze je poté vháněna tryskou do průtokového cytometru a prochází jí laserový paprsek, který se od částic suspenze odrazí do strany, což značí míru granularity

buněk, a rozptýlí se v závislosti na velikosti buněk. Jsou-li na buňce navázány molekuly flourochromu, excitují se laserovým paprskem a dojde k vyzáření excitovaného světla. Tyto parametry jsou zaznamenány detektory a takto získaná primární data jsou vyhodnocena softwarem. [77]

Buněčné linie UKF-NB-4, UKF-NB-4^{ELLI} a UKF-NB-4^{CDDP} byly přeneseny na Petriho misky o kultivační ploše 22,1 cm² tak, aby na každé misce bylo 800 000 buněk a byly inkubovány po dobu 24 h v inkubátoru Jouan IGO 150 (USA). Následně byly linie inkubovány s cytostatiky po dobu 24 h (tabulka 5). Poté bylo medium přeneseno do zkumavek a buňky byly promyty 1 ml PBS a následně uvolněny 1 ml roztoku trypsinu. Suspenze byla centrifugována při 1 350 rpm po dobu 2 min a supernant byl odstraněn. Peleta byla resuspendována v 1 ml PBS, centrifugována za stejných podmínek a supernatant byl opět odstraněn. Peleta byla poté resuspendována v 1 ml „Binding Bufferu“ (10x ředěný destilovanou vodou). Z takto připravené suspenze bylo odebráno 10 µl, smíseno s trypanovou modří v poměru 1:1 a buňky byly spočítány na počítadle buněk BIO-RAD TC 20 (USA). Následně bylo odebráno takové množství suspenze do centrifugační zkumavky, aby počet buněk činil 500 000, suspenze byla centrifugována za stejných podmínek a supernatant byl odstraněn. Poté bylo přidáno 5 µl Anexinu V-DY647, 1 µl 4',6-diamidino-2-fenylindol dihydrochloridu (DAPI) a 95 µl „Binding Bufferu“, vše bylo jemně promícháno, buňky byly inkubovány po dobu 15 min ve tmě za laboratorní teploty a centrifugovány za stejných podmínek. Peleta byla resuspendována v 250 µl „Binding Bufferu“. Takto připravené vzorky byly analyzovány průtokovým cytometrem BD Bioscience LSR II (USA) a konečná analýza byla provedena programem FlowJo.

Tabulka 5: Přehled vzorků senzitivní buněčné linie UKF-NB-4 připravených pro detekci apoptosy

UKF-NB-4	UKF-NB-4
bez přídavku	bez přídavku
5 µM ellipticin	17 µM cisplatina
100 nM bafilomycin A1	100 nM bafilomycin A1
kombinace obou	kombinace obou

3.2.13 Lokalizace doxorubicinu a ellipticinu v buňkách neuroblastomové linie pomocí konfokální mikroskopie

Vzhledem k fluorescenčním vlastnostem doxorubicinu a ellipticinu lze sledovat jejich lokalizaci v buňce pomocí konfokálního mikroskopu. Neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 byly kultivovány, jak je popsáno v kapitole 3.2.2 a poté byly přeneseny na misky (35 mm Dish with 10 mm Bottom well) tak, aby počet buněk na 1 misku činil 400 000 a byly inkubovány po dobu 24 hodin v inkubátoru Jouan IGO 150 (USA) při 37 °C. Poté byly inkubovány po dobu 30 minut s 5 μM doxorubicinem, 10 μM ellipticinem a kombinací cytostatika s 100 nM bafilomycinem A při 37 °C. Následně byly linie inkubovány po dobu 30 minut s 50 nM LysoTracker Red a 1 μg/ml 2'-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihyd rochlorid hydrátu (Hoechst 33342). Buňky byly pozorovány mikroskopem Leica DMi8 (Německo) za použití programu Leica Application Suite X.

4. Výsledky

Předkládaná diplomová práce je zaměřena na bližší poznání jednoho z mechanismů rezistence vůči chemoterapeutikům, kde hraje důležitou roli protonová pumpa, enzym V-ATPasa, lokalizovaná v membránách některých intracelulárních kompartmentů včetně lysosomů. Léková rezistence vyvolaná tímto mechanismem, ale i mechanismy dalšími, je totiž jednou z největších komplikací protinádorové chemoterapie.

Lidská neuroblastomová buněčná linie UKF-NB-4 a linie rezistentní k doxorubicinu UKF-NB-4^{DOXO}, ellipticinu UKF-NB-4^{ELLI} a cisplatině UKF-NB-4^{CDDP} byly vystaveny působení příslušného cytostatika po dobu 24 hodin a následně byla imunochemicky analyzována exprese části proteinové molekuly V-ATPasy, ATP6V0D1 (metodou Western blot). Exprese *ATP6VIC1* a *ATP6VIG1* pak byla analyzována na úrovni exprese mRNA, pomocí kvantitativní reverzně transkripční polymerázové řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR). Buňky byly dále testovány z hlediska vývoje apoptosy po vystavení působení cytostatika v kombinaci se specifickým inhibitorem V-ATPasy bafilomycinem A. Díky fluorescenčním vlastnostem doxorubicinu a ellipticinu byla pomocí konfokálního mikroskopu sledována jejich lokalizace v buněčných kompartmentech a vliv bafilomycinu A na distribuci daných cytostatik.

4.1 Určení hodnot koncentrace doxorubicinu, ellipticinu a cisplatiny způsobující zánik 50 % buněk (IC₅₀) v senzitivní neuroblastomové linii UKF-NB-4

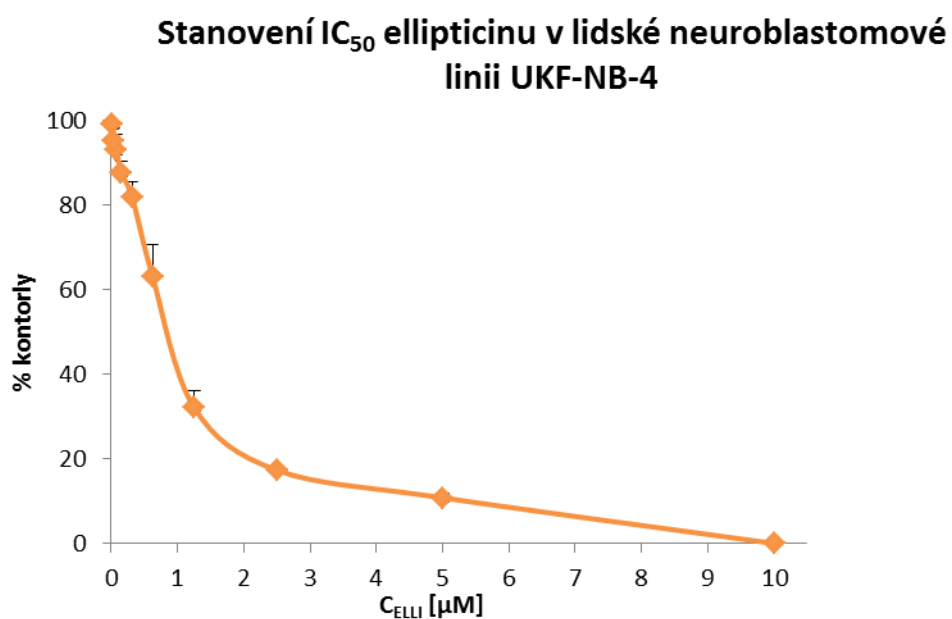
Cytotoxicita doxorubicinu, ellipticinu a cisplatiny vůči neuroblastomovým buněčným liniím UKF-NB-4 byla měřena MTT testem. Tato metoda je založena na redukci žlutého rozpustného 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromidu (MTT) na modré krystalky formazanu. Uvedená reakce probíhá na mitochondriální membráně živých buněk. Spektrofotometrický průkaz formazanu (hodnota absorbance roztoku při vlnové délce 570 nm) odpovídá množství živých buněk.

Neuroblastomová buněčná linie byla kultivována po dobu 72 hodin se vzrůstající koncentrací jednotlivých cytostatik podle kapitoly 3.2.3. Absorbance jednotlivých vzorků byla měřena při vlnové délce 570 nm za použití spektrofotometru Molecular Devices VERSA max (USA). Takto byly stanoveny hodnoty IC₅₀ (koncentrace látky, která sníží

počet buněk oproti kontrole na polovinu) jednotlivých cytostatik a jsou uvedeny v tabulce 6. Výsledky experimentů jsou znázorněny na obr. 16, 17 a 18.

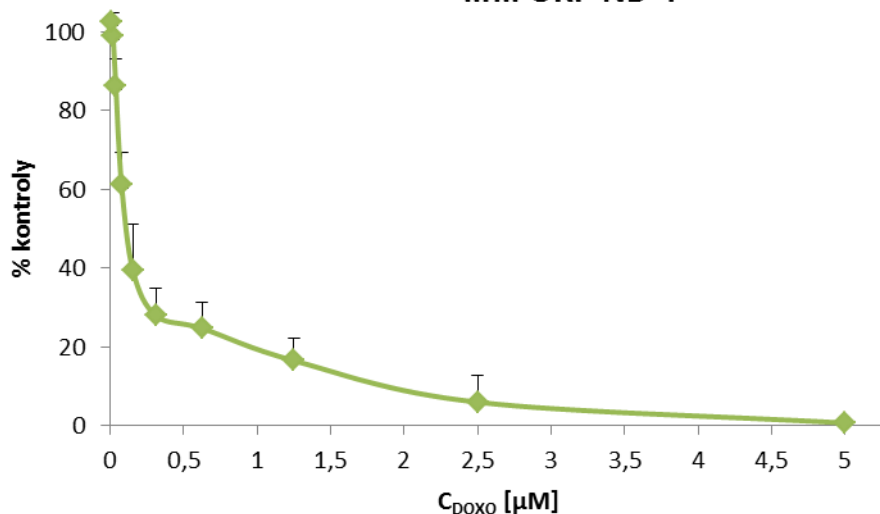
Tabulka 6: Hodnoty IC_{50} pro jednotlivá cytostatika pro buňky UKF-NB-4.

Cytostatikum	IC_{50} [μM]
doxorubicin	$0,098 \pm 0,007$
ellipticin	$0,784 \pm 0,044$
cisplatina	$4,044 \pm 0,133$



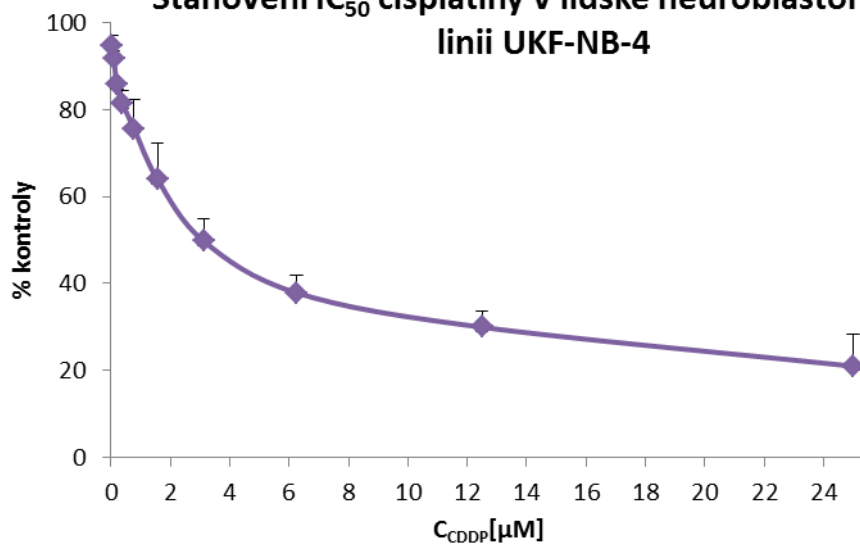
Obr. 16: Cytotoxicita ellipticinu vůči lidským neuroblastomovým liniím UKF-NB-4. Testované buňky byly kultivovány 72 hodin s ellipticinem o počáteční koncentraci 10 μM . Jako kontrola byly použity buňky bez přídavku cytostatika.

Stanovení IC_{50} doxorubicinu v lidské neuroblastomové linii UKF-NB-4



Obr. 17: Cytotoxicita doxorubicinu vůči lidským neuroblastomovým liniím UKF-NB-4. Testované buňky byly kultivovány 72 hodin s doxorubicinem o počáteční koncentraci 5 μM . Jako kontrola byly použity buňky bez přídavku cytostatika.

Stanovení IC_{50} cisplatinu v lidské neuroblastomové linii UKF-NB-4



Obr. 18: Cytotoxicita cisplatinu vůči lidským neuroblastomovým liniím UKF-NB-4. Testované buňky byly kultivovány 72 hodin s cisplatinou o počáteční koncentraci 25 μM . Jako kontrola byly použity buňky bez přídavku cytostatika.

4.2 Sledování vlivu testovaných léčiv na expresi membránové domény ATP6V0D1 enzymu V-ATPasy v neuroblastomové buněčné linii UKF-NB-4 a linií rezistentních vůči těmto léčivům (UKF-NB-4^{DOXO}, UKF-NB-4^{ELLI} a UKF-NB-4^{CDDP}) pomocí metody Western blot

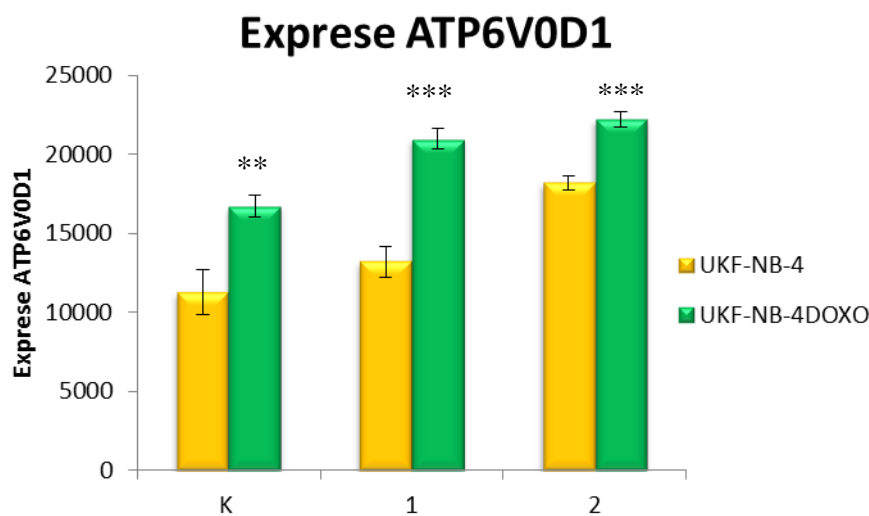
V další části diplomové práce byla sledována exprese V-ATPasy, respektive její membránové domény ATP6V0D1, na proteinové úrovni, a to imunochemicky, pomocí metody Western blot. Testován byl rovněž vliv doxorubicinu, ellipticinu a cisplatinu na tuto expresi.

Lidská senzitivní linie UKF-NB-4 a linie rezistentní vůči doxorubicinu UKF-NB-4^{DOXO}, ellipticinu UKF-NB-4^{ELLI} a cisplatině UKF-NB-4^{CDDP} byly připraveny podle kapitoly 3.2.4., 3.2.5 a 3.2.6 a exprese proteinu ATP6V0D1 byla analyzována pomocí metody Western blot.

Výsledek experimentu sledující expresi ATP6V0D1 v buňkách UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{DOXO} je uveden na obr. 19 na straně 47. Výsledky byly poté kvantifikovány pomocí programu ImageJ a jsou znázorněny na obr. 20 na straně 47. Z výsledků uvedených na obr. 19 a 20 je patrné, že v rezistentní linii, v porovnání s linií senzitivní, je působením doxorubicinu zvýšena exprese membránové domény ATP6V0D1 enzymu V-ATPasy. Doxorubicin indukuje změnu v expresi tohoto proteinu. S rostoucí koncentrací doxorubicinu dochází ke zvýšení exprese ATP6V0D1 v obou liniích.

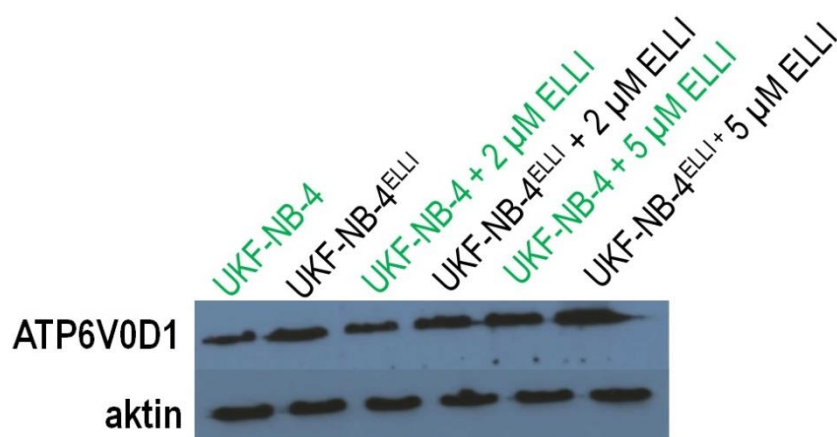


Obr. 19: Vliv doxorubicinu na expresi proteinu ATP6V0D1 membránové domény enzymu V-ATPasy v neuroblastomové linii UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{DOXO}. Zleva buňky UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{DOXO}, které nebyly inkubované s doxorubicinem, buňky UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{DOXO} kultivované 24 hodin s 92 nM doxorubicinem a buňky UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{DOXO} kultivované 24 hodin s 460 nM doxorubicinem. Jako kontrola správného nanesení množství proteinů vzorků byl použit aktin. Reprezentativní snímek jednoho ze tří nezávislých experimentů.

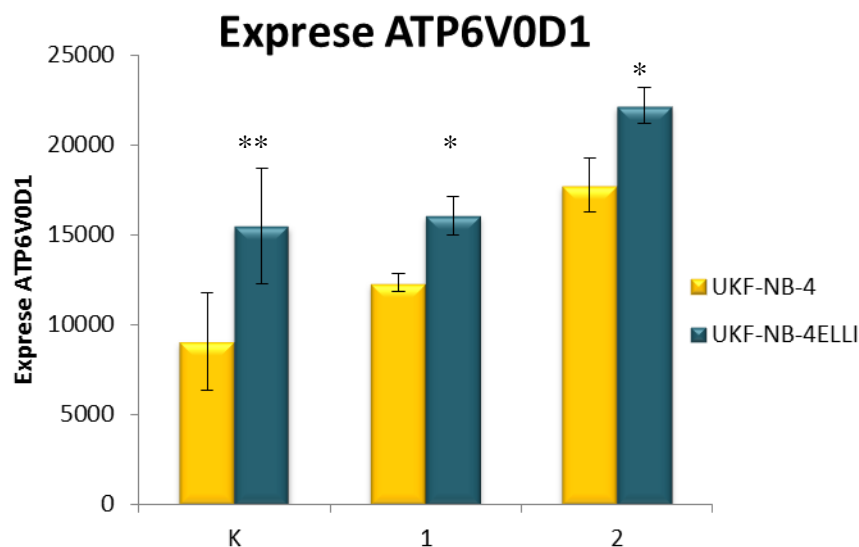


Obr. 20 Vliv doxorubicinu na expresi proteinu ATP6V0D1 membránové domény enzymu V-ATPasy v neuroblastomové linii UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{DOXO}. **K-** kontrolní linie inkubované bez doxorubicinu, **1-** linie inkubované 24 hodin s 92 nM doxorubicinem, **2-** linie inkubované 24 hodin s 460 nM doxorubicinem. Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření a data jsou vyhodnocena párovým t-testem. Signifikance $p < 0,01$ znázorněna **, signifikance $p < 0,001$ znázorněna ***

V další fázi práce jsme sledovali vliv ellipticinu na expresi studované domény V ATPasy (protein ATP6V0D1). Výsledky experimentů sledujících expresi tohoto proteinu (ATP6V0D1) v buňkách UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} jsou uvedeny na obr. 21 a 22. Stejně jako v případě doxorubicinu, lze i v případě působení ellipticinu pozorovat zvýšenou expresi ATP6V0D1, a to zejména v linii rezistentní vůči ellipticinu. Po kvantifikaci výsledků pomocí programu ImageJ (obr. 22, str. 49) je patrné, že se zvyšuje exprese tohoto proteinu po působení ellipticinu jak v linii rezistentní, tak v linii senzitivní.



Obr. 21: Vliv ellipticinu na expresi proteinu ATP6V0D1 membránové domény enzymu V-ATPasy v neuroblastomové linii UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI}. Zleva buňky UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI}, které nebyly inkubované s ellipticinem, buňky UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} kultivované 24 hodin s 2 μM ellipticinem a buňky UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI} kultivované 24 hodin s 5 μM ellipticinem. Jako kontrola správného nanesení množství proteinů vzorků byl použit aktin. Reprezentativní snímek jednoho ze tří nezávislých experimentů.

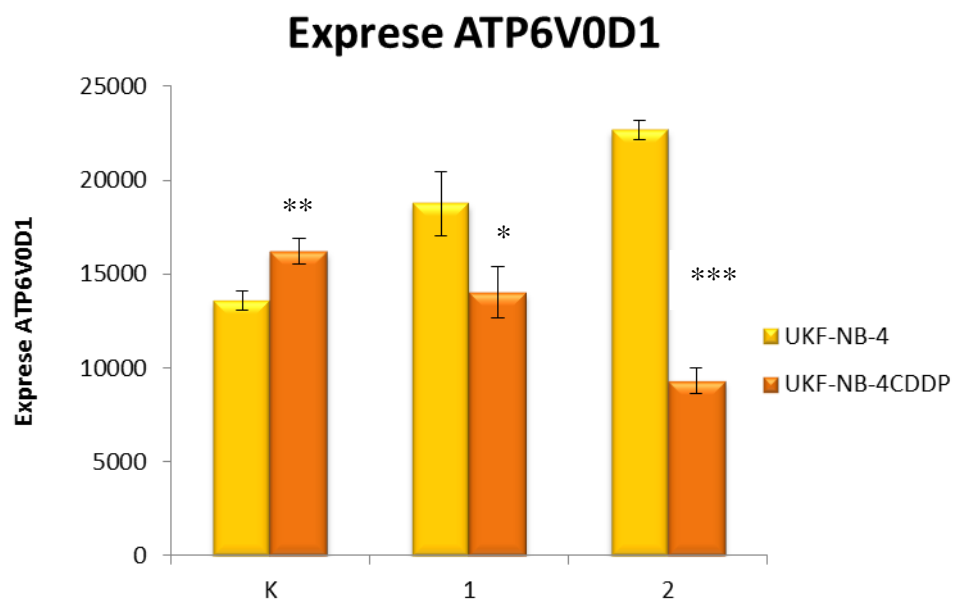


Obr. 22: Vliv ellipticinu na expresi proteinu ATP6V0D1 membránové domény enzymu V-ATPasy v neuroblastomové linii UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI}. **K**- kontrolní linie inkubované bez ellipticinu, **1**- linie inkubované 24 hodin s 2 μM ellipticinem, **2**- linie inkubované 24 hodin s 5 μM ellipticinem. Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření a data jsou vyhodnocena párovým t-testem. Signifikance $p < 0,05$ znázorněna *, signifikance $p < 0,01$ znázorněna **

Analogicky jako v experimentech s doxorubicinem a ellipticinem jsme sledovali i vliv dalšího studovaného cytostatika cisplatiny. Western blot ilustrující expresi proteinu ATP6V0D1 v buňkách UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{CDDP} je uveden na obr. 23 na straně 50. Jak je z obrázku patrné, v případě rezistentní linie dochází ke značnému poklesu exprese tohoto proteinu. Pro kvantifikaci exprese tohoto proteinu byly výsledky opět analyzovány pomocí programu ImageJ a jsou uvedeny na obr. 24 na straně 50. Je z nich patrné, že exprese ATP6V0D1 je viditelně zvýšená pouze v případě rezistentní linie, která nebyla kultivována v přítomnosti cytostatika. V liniích kultivovaných v přítomnosti cisplatiny se exprese snižuje oproti expresi v senzitivní linii. Tento výsledek naznačuje, že cisplatina má negativní vliv na expresi daného proteinu v rezistentních liniích.



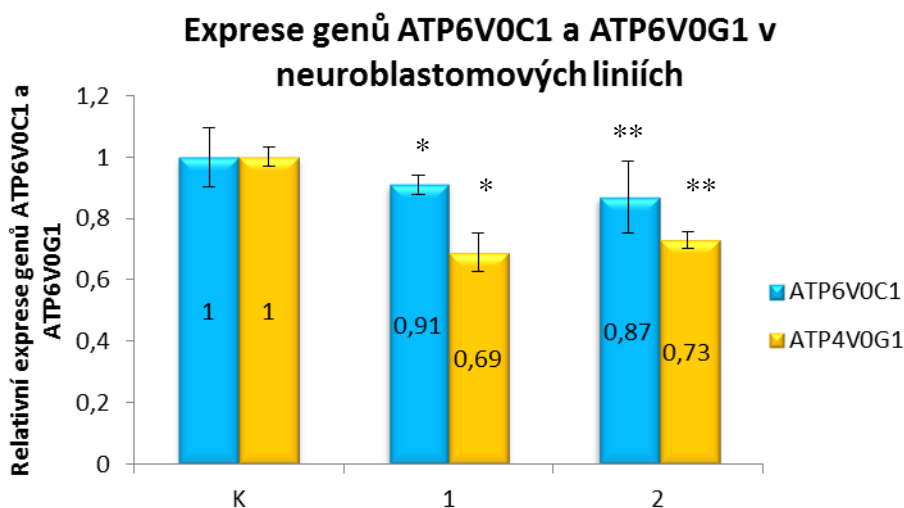
Obr. 23: Vliv cisplatinu na expresi proteinu ATP6V0D1 membránové domény enzymu V-ATPasy v neuroblastomové linii UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{CDDP}. Zleva buňky UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{CDDP}, které nebyly inkubované s cisplatinou buňky UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{CDDP} kultivované 24 hodin s 3 μM cisplatinou a buňky UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{CDDP} kultivované 24 hodin s 17 μM cisplatinou. Jako kontrola správného nanesení množství proteinů vzorků byl použit aktin. Reprezentativní snímek jednoho ze tří nezávislých experimentů.



Obr. 24: Vliv cisplatinu na expresi ATP6V0D1 membránové domény enzymu V-ATPasy v neuroblastomové linii UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{CDDP}. **K**- kontrolní linie inkubované bez cisplatinu, **1**- linie inkubované 24 hodin s 3 μM cisplatinou, **2**- linie inkubované 24 hodin s 17 μM cisplatinou. Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření a data jsou vyhodnocena párovým t-testem. Signifikance $p < 0,05$ znázorněna *, signifikance $p < 0,01$ znázorněna **, signifikance $p < 0,001$ znázorněna ***

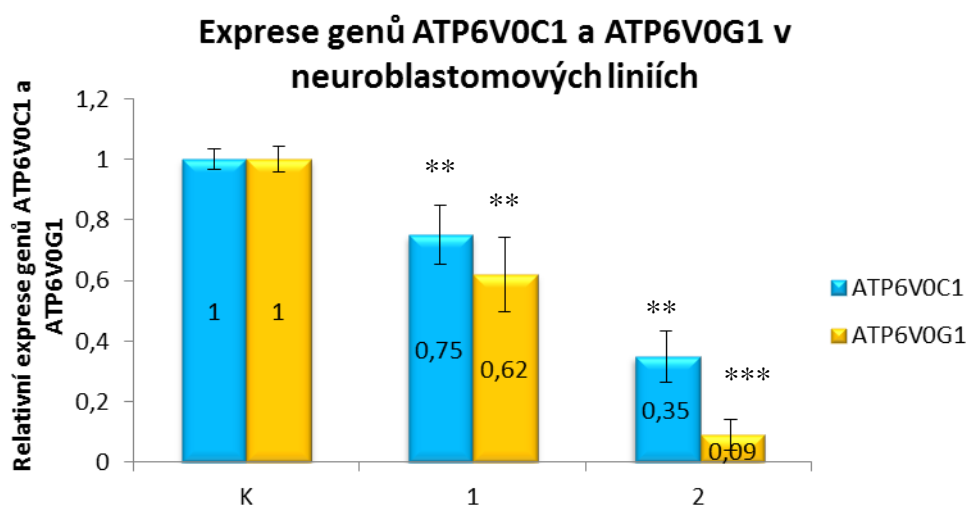
4.3 Stanovení exprese genů *ATP6VIC1* a *ATP6VIG1* enzymu V-ATPasy v neuroblastomových liniích pomocí kvantitativní polymerasové řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR)

Neuroblastomová buněčná linie UKF-NB-4 a linie rezistentní vůči ellipticinu UKF-NB-4^{ELLI}, doxorubicinu UKF-NB-4^{DOXO} a cisplatině UKF-NB-4^{CDDP} byly inkubovány s cytostatiky postupem uvedeným v kapitole 3.2.4 a následně byla z analyzovaných buněk izolovaná RNA (kapitola 3.2.9). Čistota a koncentrace izolované RNA byly stanoveny spektrofotometricky (měřeno na přístroji NanoDrop ND 1000, USA). Čistotu RNA udává poměr absorbancí A_{260}/A_{280} . Hodnota poměru těchto absorbancí se pohybovala v požadovaném rozmezí 1,8 – 2. Izolovaná RNA byla poté přepsána reverzní transkripcí do komplementární DNA (cDNA) s následnou polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase. Exprese těchto genů je vztažena ke kontrolní linii UKF-NB-4. Z výsledků uvedených na obr. 25 vyplývá, že exprese obou genů, *ATP6VIC1* a *ATP6VIG1*, V-ATPasy v buňkách UKF-NB-4^{DOXO} je snížena. Po inkubaci těchto buněk s doxorubicinem byl pozorován stejný výsledek, přestože metodou Western blot byla detekována zvýšená exprese proteinu ATP6V0D1.



Obr. 25: Vliv doxorubicinu na expresi genů *ATP6VIC1* a *ATP6VIG1* v neuroblastomových buněčných liniích. **K-** UKF-NB-4, **1-** UKF-NB-4^{DOXO}, **2-** UKF-NB-4^{DOXO} s 460 nM doxorubicinem. Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření a data jsou vyhodnocena párovým t-testem. Signifikance $p < 0,05$ znázorněna *, signifikance $p < 0,01$ znázorněna **

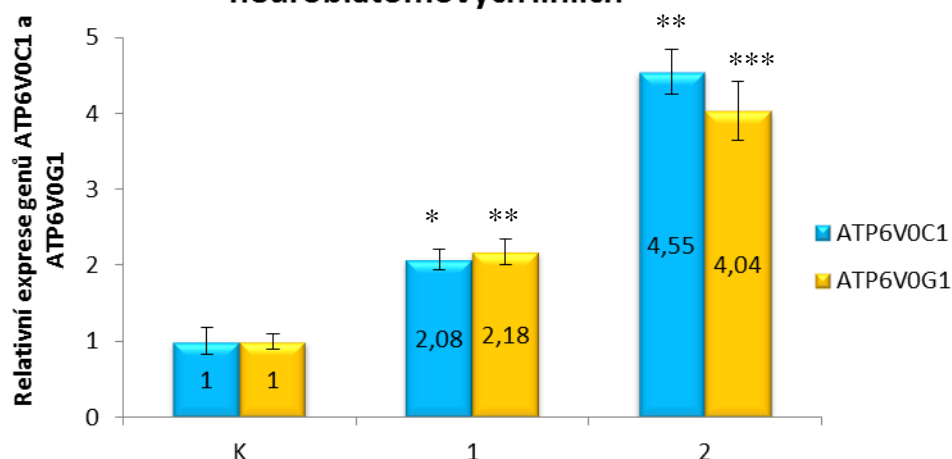
V případě exprese genů *ATP6VIC1* a *ATP6VIG1* v linii UKF-NB-4^{CDDP}, jak je patrné z obr. 26, se mírně zvýšila tato exprese ve vzorcích buněk kultivovaných bez přídavku cisplatin, avšak v buňkách vystavených působení tohoto cytostatika je exprese výrazně snížena. Tyto výsledky odpovídají expresi proteinu membránové domény V-ATPasy, jež byla v buňkách UKF-NB-4^{CDDP} značně snížena po kultivaci s cisplatinou.



Obr. 26: Vliv cisplatin na expresi genů *ATP6VIC1* a *ATP6VIG1* v neuroblastomových buněčných liniích. **K-** UKF-NB-4, **1-** UKF-NB-4^{CDDP}, **2-** UKF-NB-4^{CDDP} s 17 μ M cisplatinou. Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření a data jsou vyhodnocena párovým t-testem. Signifikance $p < 0,01$ znázorněna **, signifikance $p < 0,001$ znázorněna ***

Naopak v liniích UKF-NB-4^{ELLI} vyvolal ellipticin zvýšenou expresi genů *ATP6VIC1* a *ATP6VIG1*, avšak tato exprese byla zvýšena již při kultivaci bez tohoto cytostatika (obr. 27, str. 53). Získané výsledky odpovídají expresi proteinu ATP6V0D1 zjištěnými metodou Westen blot. Expresa obou genů *ATP6VIC1* a *ATP6VIG1* vykazovaly vždy shodný trend.

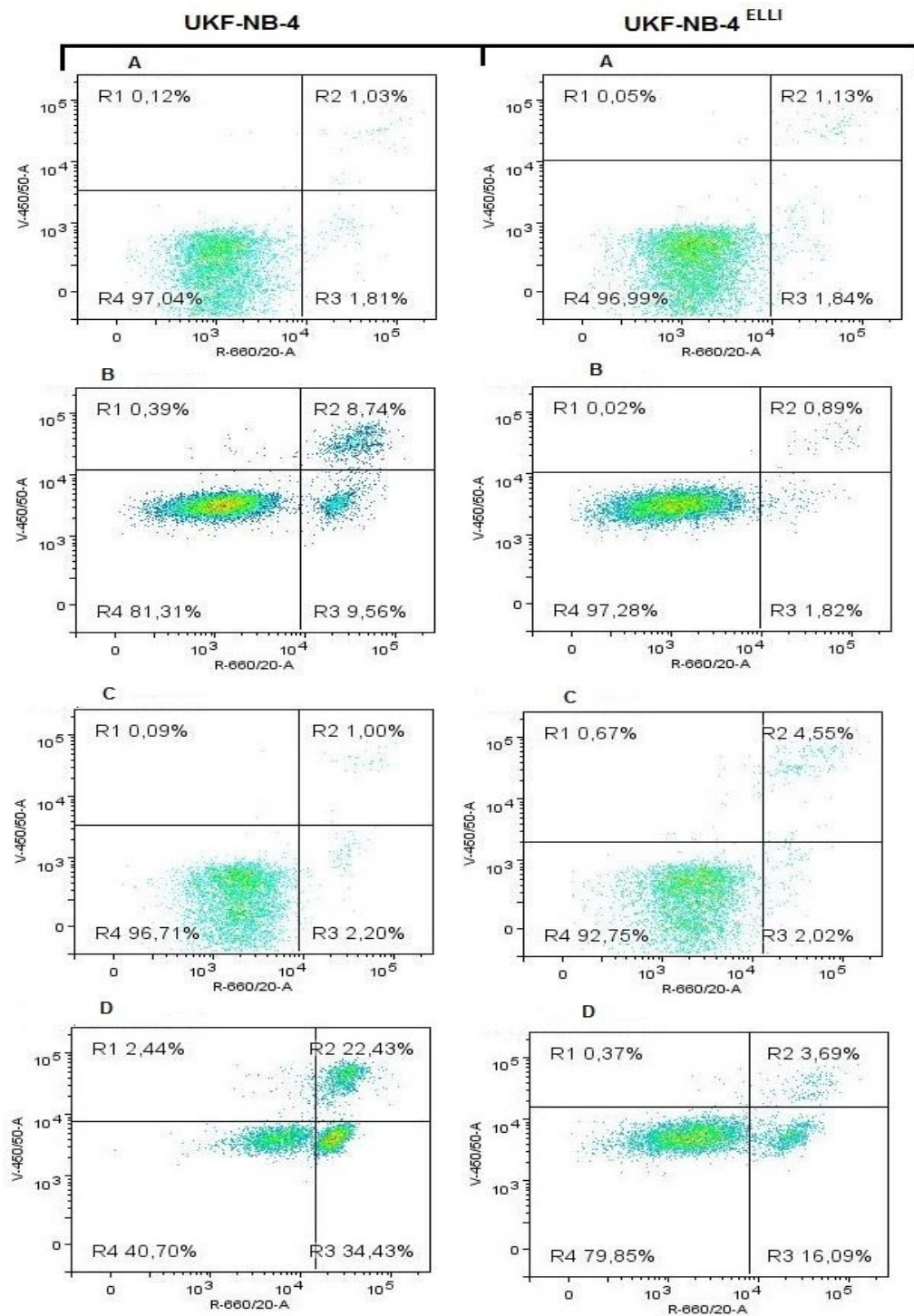
Exprese genů ATP6V0C1 a ATP6V0G1 v neuroblastomových liniích



Obr. 27: Vliv ellipticinu na expresi genů *ATP6VIC1* a *ATP6VIG1* v neuroblastomových buněčných liniích. **K**- UKF-NB-4, **1**- UKF-NB-4^{ELLI}, **2**- UKF-NB-4^{ELLI} s 5 μ M ellipticinem. Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření a data jsou vyhodnocena párovým t-testem. Signifikance $p < 0,05$ znázorněna *, signifikance $p < 0,01$ znázorněna **, signifikance $p < 0,001$ znázorněna ***

4.4 Analýza cytotoxicity cisplatinu a ellipticinu na neuroblastomové buněčné linie a sledování vlivu bafilomycinu A na tuto cytotoxicitu pomocí průtokového cytometru

Při sledování cytotoxicity cisplatinu a ellipticinu, a vlivu bafilomycinu A po 24 hodinové inkubaci neuroblastomových buněčných linií s těmito látkami, byla analýzou pomocí průtokového cytometru detekována indukce apoptosy (postupem popsaným v kapitole 3.2.12). Použitý barevný marker Annexin V se váže na fosfatidylserin, který je při apoptose translokován na vnější stranu cytoplasmatické membrány. Další použitý barevný marker (DAPI) prochází cytoplasmatickou membránou u pozdně apoptotických a nekrotických buněk. Výsledky experimentu jsou shrnuty na obrázcích 28 (str. 54) a 29 (str. 56). V levém horním kvadrantu (R1) jsou buňky nekrotické, které jsou pouze DAPI-positivní, v pravém horním kvadrantu (R2) se pak nachází buňky pozdně apoptotické, tedy buňky Annexin V-positivní i DAPI-positivní. Pravý dolní kvadrant (R3) představuje buňky časně apoptotické, pouze Annexin V-positivní a v levém dolním kvadrantu (R4) se nachází buňky živé. Množství buněk v jednotlivých kvadrantech je vyjádřeno v procentech.

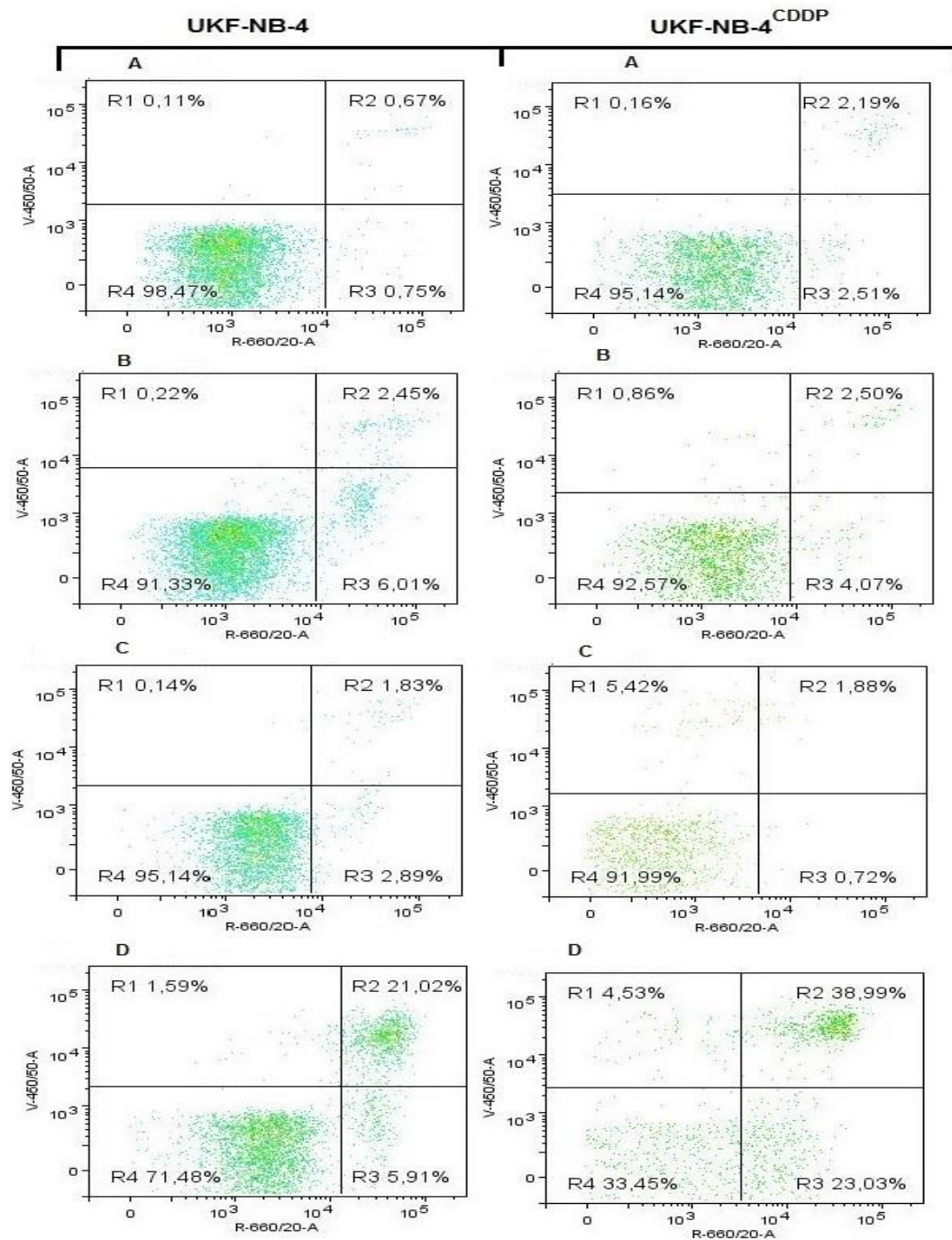


Obr. 28: Vývoj apoptosy v neuroblastomové linii UKF-NB-4 a linii rezistentní vůči ellipticinu UKF-NB-4^{ELLI}, znázorněný pomocí „dot-plotového“ zobrazení. Kontrolní „neošetřené“ linie (A); linie inkubované s 5 μ M ellipticinem (B); linie inkubované s bafilomycinem A (C); linie inkubované v kombinaci obou látek (D). Reprezentativní data jednoho ze tří nezávislých experimentů.

Výsledky experimentu sledující indukci apoptosy ellipticinem a vliv bafilomycinu A na tento proces jsou uvedeny na obr. 28 na straně 54. Z výsledků uvedených na tomto obrázku je patrné, že 5 μM ellipticin indukuje apoptosu v senzitivní linii, zatímco u rezistentní linie se viabilita buněk nezměnila. Vliv 100 nM bafilomycinu A také nebyl pro vývoj apoptosy významný, ovšem při kombinaci bafilomycinu A a ellipticinu se viabilita buněk obou testovaných linií výrazně snížila. V senzitivní linii byla více než polovina buněk apoptotických, některé pozdně apoptotické, jiné časně apoptotické. V rezistentní linii bylo 80 % buněk živých. Jako kontrola byly pro obě linie použity buňky „neošetřené“, které obsahují malé množství Anexin V-pozitivních a Anexin V/DAPI-pozitivních populací.

Výsledky ukazující vliv cisplatinu na vývoj apoptosy v neuroblastomových liniích UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{CDDP} jsou uvedeny na obr. 28 na straně 56. Po 24 hodinové inkubaci obou linií pouze s 17 μM cisplatinou nebo 100 nM bafilomycinem A je pouze malé procento buněk ve stavu apoptosy, ať už se jedná o populaci pozdně či časně apoptotickou. Po vystavení linií působení kombinaci těchto látek však dochází k výrazné indukci apoptosy v obou liniích, ale v linii rezistentní vůči cisplatině je procento živých buněk značně nižší (33 %) než v linii senzitivní (71 %). Jako kontrola byly pro obě linie použity buňky „neošetřené“, ve kterých je zastoupeno minimální procento apoptotické populace.

Z výsledků uvedených experimentů (obr. 26 a 27) vyplývá, že bafilomycin A potencuje cytotoxický účinek obou cytostatik, jak ellipticinu, tak cisplatinu.

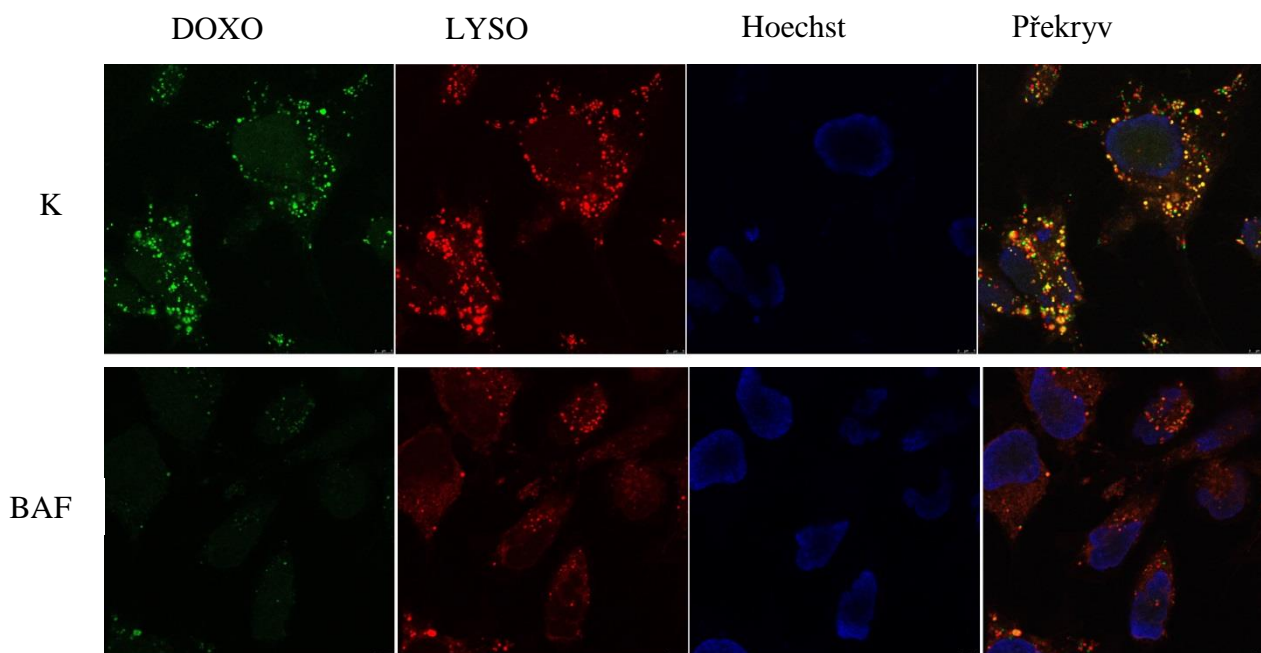


Obř. 29: Vývoj apoaptosy v neuroblastomové linii UKF-NB-4 a linii rezistentní vůči cisplatině UKF-NB-4^{CDDP}, znázorněný pomocí „dot-plotového“ zobrazení. Kontrolní „neošetřené“ linie (A); linie kultivované s 17 μM cisplatinou (B); linie kultivované s 100 nM bafilomycinem A (C); linie kultivované v kombinaci obou látek (D). Reprerentativní data jednoho ze tří nezávislých experimentů.

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

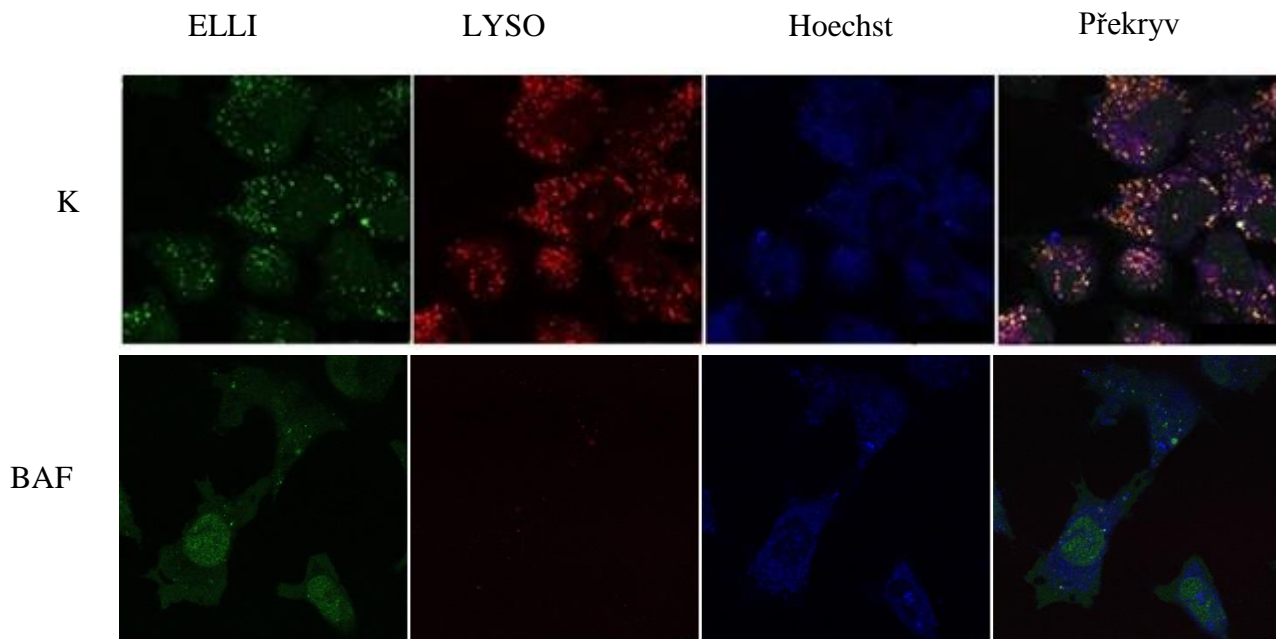
Vzhledem k fluorescenčním vlastnostem doxorubicinu a ellipticinu lze sledovat jejich lokalizaci v buňce pomocí konfokálního mikroskopu. Doxorubicin a ellipticin se řadí do skupiny látek interkalujících do DNA a působí na nádorové buňky vícečetnými mechanismy. Jak již bylo uvedeno výše, tato cytostatika indukují v buňkách neuroblastomů rezistenci, která je spojena se zvýšenou expresí V-ATPasy.

Výsledky sledování lokalizace doxorubicinu analyzované pomocí konfokální mikroskopie, jsou uvedeny na obr. 30 na straně 58. Po kultivaci buněk neuroblastomové linie UKF-NB-4 s 5 μM doxorubicinem postupem popsáním v kapitole 3.2.13 bylo zjištěno, že indukuje v těchto buňkách tvorbu vakuol, do kterých je sekvestrován, což je zřejmé z fluorescence doxorubicinu (obr. 30, panel DOXO). Použitím specifického markeru lysosomů 50 nM „LysoTrackeru Red“ byly označeny lysosomy a jádra byla barvena pomocí 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ barvy Hoechst 33342. Překryvem těchto situací byla zjištěna lokalizace doxorubicinu. Ten se převážně nachází v lysosomech (vyznačeny žlutě) a ve velmi malé míře vstupuje též do jádra. Po vystavení linie působení specifického inhibitoru V-ATPasy bafilomycinu A se počet lysosomů sníží, což je patrné z obr. 30 (panel BAF) a větší koncentrace doxorubicinu je tak lokalizováno v jádrech buněk. Zde pak může působit na DNA svými mechanismy účinku.



Obr. 30: Lokalizace doxorubicinu v buňkách linie UKF-NB-4 sledovaná v konfokálním mikroskopu. 50 nM lysosomální marker LysoTracker Red (**LYSO**), buňky kultivované s 5 μ M doxorubicinem (**DOXO**), jádra jsou značena 1 μ g/ml barvy Hoechst 33342 (**Hoechst**). Kolokalizace doxorubicinu a LysoTrackeru je znázorněna žlutě jako překryv těchto dvou situací (**Překryv**). Buňky byly připraveny kultivovány pouze s doxorubicinem (**K**) nebo v kombinaci s bafilomycinem A (**BAF**). Reprezentativní snímek jednoho ze tří nezávislých experimentů.

Výsledky experimentů analyzujících lokalizaci ellipticinu v buňkách UKF-NB-4, sledované pomocí konfokální mikroskopie, jsou uvedeny na obr. 31 na straně 59. Buňky neuroblastomové linie UKF-NB-4 byly kultivovány s 10 μ M ellipticinem postupem popsaným v kapitole 3.2.13. Z obrázku je patrné, že stejně jako v případě doxorubicinu, i ellipticin indukuje v těchto buňkách tvorbu vakuol. Také v tomto experimentu byl použit specifický marker lysosomů 50 nM „LysoTrackeru Red“, kdy byly označeny lysosomy, a jádra byla barvena 1 μ g/ml barvou Hoechst 33342. Překryvem je znázorněna lokalizace ellipticinu (panel ELLI). I zde je léčivo (ellipticin) lokalizováno v lysosomech (vyznačeny žlutě) a ve velmi malé míře vstupuje též do jádra. Po vystavení linie působení specifického inhibitoru V-ATPasy bafilomycinu A dochází téměř k vymizení lysosomů (obr. 31, panel BAF) a ellipticin je tak více koncentrován v jádrech buněk, kde může působit na DNA svými mechanismy účinku.



Obr. 31: Lokalizace ellipticinu v buňkách linie UKF-NB-4 sledovaná v konfokálním mikroskopu. Lysosomální marker 50 nM LysoTracker Red (**LYSO**), buňky kultivované s 10 μ M ellipticinem (**ELLI**), jádra jsou značena 1 μ g/ml barvy Hoechst 33342 (**Hoechst**). Kolokalizace ellipticinu a LysoTrackeru je znázorněna žlutě jako překryv těchto dvou situací (**Překryv**). Buňky byly kultivovány pouze s ellipticinem (**K**) nebo v kombinaci s bafilomycinem A (**BAF**). Reprezentativní snímek jednoho ze tří nezávislých experimentů.

5. Diskuse

Zhoubné novotvary patří k nejčastějším příčinám úmrtí ve všech civilizovaných zemích. Incidence nádorových onemocnění neustále stoupá. I přes pokroky v onkologické diagnostice a velký rozvoj terapeutických metod během posledních let, jsou tato onemocnění stále obtížně léčitelná. Chemoterapeutická léčba je komplikována vznikem rezistence k podávaným cytostatikům. Pro usnadnění léčby a zlepšení prognózy je tedy důležité odhalit klíčová místa (mechanismy) vzniku rezistence.

V této diplomové práci bylo sledováno ovlivnění buněčné exprese vakuolární ATPasy (V-ATPasy, respektive její membránové domény ATP6V0D1) třemi studovanými léčivými (doxorubicin, ellipticin, cisplatin). A to konkrétně v buňkách lidské neuroblastomové linie UKF-NB-4 a od ní odvozených linií rezistentních vůči doxorubicinu UKF-NB-4^{DOXO}, ellipticinu UKF-NB-4^{ELLI} a cisplatině UKF-NB-4^{CDDP}, vystavených působení uvedených cytostatik. Konkrétně 92 nM a 460 nM doxorubicinu, 2 μM a 5 μM ellipticinu a 3 μM a 17 μM cisplatině. Vakuolární H⁺-ATPasa (V-ATPasa) je multipodjednotkový enzym lokalizovaný v membráně mnoha organel, který funguje jako protonová pumpa. Důležitou roli však hraje v nádorových onemocněních, kdy byla zjištěna její upregulace, zejména v progresi nádoru a v lékové rezistenci, jež byla předmětem studia v této diplomové práci. Enzym zajišťuje acidifikaci lysosomů. Kyselé prostředí je podmínkou akumulace bazických cytostatik v lysosomech. To může způsobit chemorezistenci, protože tato cytostatika se nedostanou k místu svého účinku, kterým je nejčastěji jádro. U buněk linie odvozené od akutní myeloidní leukemii s experimentálně navozenou rezistencí k doxorubicinu bylo popsáno vychytávání tohoto léku v lysosomech. [78]

Metodou Western blot bylo zjištěno, že v liniích UKF-NB-4^{DOXO} a UKF-NB-4^{ELLI} je zvýšená exprese ATP6V0D1 v porovnání s linií senzitivní (obr. 19 a 21). Po vystavení linií příslušným cytostatikům dochází ke zvýšení exprese tohoto proteinu v závislosti na koncentraci daného cytostatika jak v linií senzitivní, tak v liniích rezistentních. S rostoucí koncentrací jak ellipticinu, tak doxorubicinu se exprese ATP6V0D1 zvyšuje (obr. 20 a 22). Tyto výsledky naznačují, že ellipticin i doxorubicin indukují v buňkách neuroblastomů rezistenci, která je spojena se zvýšenou expresí proteinu V-ATPasy. V linii UKF-NB-4^{CDDP} byla exprese proteinu ATP6V0D1 oproti v linií senzitivní rovněž zvýšena. Výsledky jsou však zajímavé z toho hlediska, že po vystavení linií působení cisplatin

došlo v závislosti na koncentraci ke snížení exprese tohoto proteinu v buňkách UKF-NB-4^{CDDP}, zatímco v buňkách UKF-NB-4 se exprese s rostoucí koncentrací zvyšovala. V-ATPasy mají zásadní význam v regulaci pH buněk, v nádorovém mikroprostředí zvyšují aciditu extracelulárního prostoru. Jak je uvedeno v několika studiích, nízké pH potencuje cytotoxický účinek cisplatinu, což může být vysvětlením pro snížení exprese proteinu ATP6V0D1 v rezistentní linii UKF-NB-4^{CDDP} po působení tohoto cytostatika. [79-81]

V dalším experimentu byla sledována exprese V-ATPasy na genové úrovni, a to pomocí RT-PCR. Jmenovitě exprese genu kodujícího podjednotku C (*ATP6VIC1*) a genu kodujícího podjednotku G (*ATP6VIG1*). Lidská neuroblastomová buněčná linie UKF-NB-4 a od ní odvozené linie rezistentní vůči doxorubicinu UKF-NB-4^{DOXO}, ellipticinu UKF-NB-4^{ELLI} a cisplatině UKF-NB-4^{CDDP} byly vystaveny působení těchto cytostatik v dávkách: 460 nM doxorubicin, 5 μM ellipticin a 17 μM cisplatin. V buňkách UKF-NB-4^{ELLI} inkubovaných bez ellipticinu a s 5 μM ellipticinem byla exprese obou genů (*ATP6VIC1* a *ATP6VIG1*) oproti linii UKF-NB-4 výrazně zvýšena (obr. 27). V linii UKF-NB-4^{CDDP} však byla zaznamenána snížená exprese genů *ATP6VIC1* a *ATP6VIG1* oproti senzitivní linii UKF-NB-4 a po vystavení rezistentní linie působení 17 μM cisplatinu došlo k markantnímu snížení jejich exprese (obr. 26). Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky exprese proteinu ATP6V0D1. V linii UKF-NB-4^{DOXO} byla tato exprese nižší a po kultivaci s doxorubicinem se již výrazněji neměnila (obr. 25).

V další části diplomové práce byla dále sledována cytotoxicita vybraných cytostatik na neuroblastomové buněčné linie a vliv bafilomycinu A (makrolidové antibiotikum specificky inhibující V-ATPasu vazbou na její doménu V0) na tuto cytotoxicitu. A to pomocí měření v průtokovém cytometru. Sledována byla cisplatin a jeden zástupce interkalátorů. Jmenovitě, ellipticinu. Sledovali jsme vliv 5 μM ellipticinu na indukci apoptosy v liniích UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{ELLI}. Ellipticin efektivně indukuje apoptosu v buňkách UKF-NB-4 po jejich vystavení působení tohoto cytostatika, zatímco v buňkách UKF-NB-4^{ELLI} se jejich viabilita téměř nezměnila (obr. 26 B). Buňky byly rovněž vystaveny působení 100 nM bafilomycinu A, specifického inhibitoru V-ATPasy, který apoptosu neindukuje (obr. 28 C). Vlivem působení kombinace obou těchto látek však došlo k výrazné indukci apoptosy, a to v obou liniích (obr. 28 D). Získané výsledky potvrzují náš předpoklad, že ellipticin indukuje rezistenci v neuroblastomových buněčných liniích zprostředkovanou V-ATPasou lokalizovanou v lysosomech a po působení inhibitoru

V-ATPasy bafilomycinu A dochází k potenciaci cytotoxického účinku tohoto cytostatika. Rezistence tedy mizí. Dále byl v liniích UKF-NB-4 a UKF-NB-4^{CDDP} sledován vliv 17 μM cisplatinu na indukci apoptosy. Vliv tohoto cytostatika však nebyl nijak významný ani u jedné linie (obr. 29 B). Po vystavení působení 100 nM bafilomycinu A, specifického inhibitoru V-ATPasy, indukce apoptosy rovněž není vyvolána (obr. 29 C), avšak kombinace cytostatika a inhibitoru indukuje apoptosu v obou liniích výrazně (obr. 29 D). Z výsledků daných experimentů vyplývá, že bafilomycin A potencuje cytotoxický účinek obou cytostatik, jak elliptycinu, tak cisplatinu a ruší tak rezistenci neuroblastomových buněk, kde jak již bylo zmíněno, hraje V-ATPasa důležitou úlohu.

Doxorubicin a ellipticin se vyznačují svými flouorescenčními vlastnostmi. To umožňuje určení jejich lokalizace v buňce a zjištění vlivu specifického inhibitoru V-ATPasy bafilomycinu A na jejich distribuci. V neuroblastomové linii UKF-NB-4 vystavené působení 5 μM doxorubicinu byla pozorována přítomnost tohoto cytostatika ve vakuolách, kde se akumuloval (obr. 30). Použitím specifického lysosomálního markeru byly tyto vakuoly indentifikovány jako lysosomy. K „chycení“ doxorubicinu do lysosomů dochází pravděpodobně v důsledku jeho protonace, kdy léčivo nemůže projít membránou lysosomů a dále do jádra, kde jinak působí svými cytotoxickými účinky. Proto byl v paralelním experimentu použit bafilomycin A, specifický inhibitor V-ATPasy. Působením uvedeného inhibitoru došlo k výraznému snížení počtu těchto vakuol (lysosomů).

Stejným experimentem byla analyzována i lokalizace elliptycinu. Působení 10 μM elliptycinu indukovalo v neuroblastomové linii UKF-NB-4 tvorbu vakuol, ve kterých se akumuloval (obr. 31). Rovněž v tomto experimentu byl použit bafilomycin A, specifický inhibitor V-ATPasy, v důsledku jehož působení došlo téměř k vymizení těchto vakuol a zvýšení cytotoxicity elliptycinu. Z výsledků vyplývá, že sekvestrace protonovatelných léčiv v subcelulárních kompartmentech (lysosomech) může ovlivňovat jejich účinnost, a podílet se tím na chemorezistenci.

6. Závěr

Předkládaná diplomová práce se zabývala významem V-ATPasy pro vznik rezistence lidské neuroblastomové linie UKF-NB-4 a od ní odvozené linie rezistentní k doxorubicinu UKF-NB-4^{DOXO}, ellipticinu UKF-NB-4^{ELLI} a cisplatině UKF-NB-4^{CDDP}, vůči příslušným cytostatikům. V práci byly získány následující poznatky.

- V rezistentních neuroblastomových liniích UKF-NB-4^{ELLI} a UKF-NB-4^{DOXO}, vystavených působení příslušných cytostatik po dobu 24 hodin byla pomocí metody Western blot detekována zvýšená exprese V-ATPasy (respektive její membránové domény ATP6V0D1). V buňkách UKF-NB-4^{CDDP} dochází působením cisplatinou ke snížení exprese tohoto proteinu (ATP6V0D1).
- V rezistentní linii UKF-NB-4^{ELLI} vystavené působení ellipticinu byla metodou RT-PCR detekována zvýšená exprese genů domén V-ATPasy *ATP6VIC1* a *ATP6VIG1*. V liniích UKF-NB-4^{CDDP} a UKF-NB-4^{DOXO} došlo po kultivaci s příslušnými cytostatiky (cisplatinou, doxorubicinem) ke snížení exprese těchto genů (*ATP6VIC1* a *ATP6VIG1*).
- Testovaná léčiva (ellipticin a cisplatinou) indukují vznik apoptosy v neuroblastomových buněčných liniích. Specifický inhibitor V-ATPasy, bafilomycin A, potencuje vývoj apoptosy generovaný ellipticinem a cisplatinou.
- Doxorubicin i ellipticin indukují tvorbu lysosomů v buňkách UKF-NB-4, kde se akumulují. Působením specifického inhibitoru V-ATPasy, bafilomycinu A, dochází ke snížení počtu lysosomů, či jejich vymizení a cytostatika jsou pak lokalizována převážně v jádrech buněk.

Výsledky práce plně potvrzují úlohu V-ATPasy v indukci rezistence neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4 vyvolané doxorubicinem, ellipticinem a cisplatinou. Tvorba lysosomů a zvýšená exprese V-ATPasy, vyvolaná testovanými cytostatiky, vedou k jejich sekvestraci do tvořených lysosomů. Dochází tak ke snížení jejich aktuálních koncentrací v buňkách, a tím i ke snížení jejich cytotoxicity.

Seznam literatury:

- [1] Stiborová, M.: *Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace*, (2004), ke stažení z <http://archiv.otevrena-veda.cz> [cit. 5.3.2016]
- [2] Koutecký J.: *Klinická onkologie I.*, Riopress, Praha (2004)
- [3] Marek, J. a kolektiv autorů: *Farmakoterapie vnitřních nemocí, 4. Zcela přepracované a doplněné vydání*, Grada Publishing, Praha (2010)
- [4] Klener, P.jr., Klener, P.: *Principy systémové protinádorové léčby*, Grada Publishing, Praha (2013)
- [5] Adam, Z., Vorlíček, J., Vaniček, J. a kolektiv autorů: *Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob*, Grada Publishing, Praha (2004)
- [7] Maris, J. M.: *N. Engl. J. Med* **362**, 2202- 2211 (2010)
- [8] Cheung, N. K., Dyer, M. A.: *Nat. Rev. Cancer* **13**, 397–411 (2013)
- [9] Tomlinson, D., Kline, N.E.: *Pediatric oncology nourishing, Advanced clinical handbook*, Springer, New York (2010)
- [10] Mossé, Y.P., Laudenslager, M., Longo, L., Cole, K.A., Wood, A., Attiyeh, E.F., Laquaglia, M.J., Sennett, R., Lynch, J.E., Perri, P., Laureys, G., Speleman, F., Kim, C., Hou, C., Hakonarson, H., Torkamani, A., Schork, N.J., Brodeur, G.M., Tonini, G.P., Rappaport, E., Devoto, M., Maris, J.M.: *Nature* **445**, 930-935 (2008)
- [11] Mossé, Y.P., Laudenslager, M., Khazi, D., Carlisle, A.J., Winter, C.L., Rappaport, E., Maris, J.M.: *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 727-730 (2004)
- [12] Huang, M., Weiss, W.A.: *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **3**, (2013)
- [13] Cheung, V.N.K, Cohn, S.L.: *Neuroblastoma*, Springer (2005)
- [14] Krška, Z., Hoskovec, D., Petruželka, L. a kolektiv autorů: *Chirurgická onkologie*, Grada Publishing, Praha (2014)
- [15] <http://dx.doi.org/10.1594/ranzcr2013/R-0032> [cit. 23.4.2016]

- [16] <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/chemotherapy#1> [cit. 10.3.2016]
- [17] http://www.chemotherapy.com/new_to_chemo/what_is_chemo/ [cit. 10.3.2016]
- [18] Lüllman, H., Mohr, K., Wehling, M.: *Farmakologie a toxikologie, Překlad 15., zcela přepracovaného vydání*, Grada Publishing, Praha (2004)
- [19] Angsutararux , P., Luanpitpong , S., Issaragrisil, S.: *Oxid. Med. Cell. Longev.* doi: 10.1155/2015/795602 (2015)
- [20] Rabbani, A., Finn, R.J., Ausió, J.: *Bioessays* **27**, 50-56,(2005)
- [21] Arcamone, F.: *Doxorubicin, Anticancer Antibiotics*, Academic Press, New York 1981
- [22] Blažková, I., Dostálová, S., Šmerková, K., Ryvolová, M., Adam, V., Eckschlager, T., Stiborová, M., Kizek, R.: *Chemagazín* **12**, 8–10 (2012)
- [23] Mohan, P., Rapoport, N.: *Mol. Pharm.* **7**, 1959–1973 (2010)
- [24] Cummings, J., Smyth, J.F.: *Ann. Oncol.* **4**, 533–534 (1993)
- [25] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d1515?lang=en®ion=CZ>
[cit. 12.3.2016]
- [26] Stiborová, M., Poljaková, J., Martínková, E., Bořek-Dohalská, L., Eckschlager, T., Kizek, R., Frei, E.: *Interdiscip. Toxicol.* **4**, 98-105 (2011)
- [27] Stiborová, M., Poljaková, J., Eckschlager, T., Kizek, R., Frei, E.: *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* **156**, 115-121 (2012)
- [28] Stiborová, M., Sejbal, J., Bořek-Dohalská, L., Aimová, D., Poljaková, J., Forsterová, K., Rupertová, M., Wiesner J., Hudecek, J., Wiessler, M., Frei, E.: *Cancer Res.* **64**, 8374-8380 (2004)
- [29] http://www.linkos.cz/files/abstrakta/BOD2008_018.pdf [cit. 12.3.2016]
- [30] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/e3380?lang=en®ion=CZ> [cit. 12.3.2016]
- [31] Siddik, Z.H.: *Oncogene* **22**, 7265–7279 (2003)

- [32] <http://www.scbt.com/datasheet-200896-cisplatin.html> [cit. 12.3.2016]
- [33] Nosková, V., Hajdúch, M., Mihál, V., Cwierka, K.: *Klinická onkologie* **2**, 4-9 (2000)
- [34] Assaraf, Y.G.: *Drug Resist. Updat.* **9**, 227-246 (2006)
- [35] Klener P., Klener Jr. P.: *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*, GRADA Publishing, Praha (2010)
- [36] <http://www.discoverymedicine.com/Michael-M-Gottesman/2009/07/26/defeating-drug-resistance-in-cancer/> [cit. 28.3.2015]
- [37] Hrabeta, J., Groh, T., Khalil, M.A., Poljaková, J., Adam, V., Kizek, R., Uhlík, J., Doktorová, H., Černá, T., Frei, E., Stiborová, M., Eckschlager, T.: *Int. J. Oncol.* **47**, 971-980 (2015)
- [38] Colombo, F., Trombetta, E., Cetrangolo, P., Maggioni, M., Razini, P., De Santis, F., Torrente, Y., Prati, D., Torresani, E., Porretti, L.: *PLoS One* **9**, e114787 (2014)
- [39] Yamagishi, T., Sahni, S., Sharp, M.D., Arvind, A., Jansson, P.J., Richardson, D.R.: *J. Biol. Chem.* **288**, 31761–31771 (2013)
- [40] Staftig, P.: *Lysosomes*, Springer, New York (2005)
- [41] Kirkegaard, T., Jäättelä, M.: *Biochim. Biophys. Acta* **1793**, 746-754 (2009)
- [42] Aits, S., Jäättelä, M.: *J. Cell Sci.* **126**, 1905-1912 (2013)
- [43] Appelqvist, H., Wäster, P., Kagedal, K., Öllinger, K.: *J. Mol. Cell. Biol.* **5**, 214-226 (2013)
- [44] Cooper, G.M.: *The Cell, A Molecular Approach, 2nd Edition*, ASM Press, Washington, DC (2000)
- [45] Zhitomirsky, B., Assaraf, Y.G.: *Drug Resist. Updat.* **24**, 23-33 (2016)
- [46] Saftig, P., Klumperman, J.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 623-635 (2009)
- [47] Marshansky, V., Rubinstein, J.L., Grüber, G.: *Biochim. Biophys. Acta* **1837**, 857-79 (2014)

- [48] Hernandez, A., Serrano-Bueno, G., Perez-Castineira, J.R., Serrano, A.: *Curr. Pharm. Des.* **18**, 1383-1394 (2012)
- [49] Avnet, S., Di Pompo, G., Lemma, S., Salerno, M., Perut, F., Bonuccelli, G., Granchi, D., Zini, N., Baldini, N.: *Biochim. Biophys. Acta* **1832**, 1105-1116 (2013)
- [50] Forgac, M.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 917-929 (2007)
- [51] Beyenbach, K.W., Wieczorek, H.: *J. Exp. Biol.* **209**, 577-589 (2006)
- [52] Toei, M., Saum, R., Forgac, M.: *Biochemistry* **49**, 4715-4723 (2010)
- [53] Lu, X., Qin, W.: *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* **16**, 252-259 (2012)
- [54] Zhao, J., Benlekbir, S., Rubinstein, J.L.: *Nature* **521**, 241-245 (2015)
- [55] Jefferies, K.C., Forgac, M.: *J. Biol. Chem.* **283**, 4512-4519 (2008)
- [56] Osteresch, Ch., Bender, T., Grond, S., Zezschwitz, P., Kunze, B., Jansen, R., Huss, M., Wieczore, H.: *J. Biol. Chem.* **287**, 31866–31876 (2012)
- [57] Wang, Y., Toei, M., Forgac, M.: *J. Biol. Chem.* **283**, 20696-20702 (2008)
- [58] Cotter, K., Stransky ,L., McGuire, C., Forgac, M.: *Trends Biochem. Sci.* **40**, 611-622 (2015)
- [59] Kulshrestha, A., Katara, G.K., Ibrahim, S., Pamarthy, S., Jaiswal, M.K., Gilman Sachs, A., Beaman, K.D.: *Oncotarget* **6**, 3797-3810 (2015)
- [60] Holliday, S.L.: *New Journal of Science* **vol. 2014**, Article ID 675430 (2014)
- [61] Pérez-Sayáns, M., García, A.G.: *V-ATPase Inhibitors in Cancer Treatment and Their Implication in Multidrug Resistance in Oral Squamous Cell Carcinoma, v knize Current Cancer Treatment-Novel Beyond Conventional Approaches*, (Özdemir, Ö.) InTech, Rijeka (2011)
- [62] Forgac, M.: *FEBS Lett.* **440**, 258-263. (1998)
- [63] Kobia, F., Duchi, S., Deflorian, G., Vaccari, T.: *Mol. Oncol.* **8**, 207-220 (2014)

- [64] Zoncu, R., Bar-Peled, L., Efeyan, A., Wang, S., Sancak, Y., Sabatini, DM.: *Science* **334**, 678-683 (2011)
- [65] Dechant, R., Binda, M., Sik Lee, S., Pelet, S., Winderickx, J., Peter, M.: *EMBO J.* **29**, 2515–2526 (2010)
- [66] Kane, P.M.: *Curr. Protein Pept. Sci.* **13**, 117–123 (2012)
- [67] Seo, J.H., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Deshaies, R.J.: *Nat. Cell Biol.* **3**, 384–391 (2001)
- [68] Nishi, T., Forgac, M.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 94-103 (2002)
- [69] Diakov, T.T., Kane, P.M.: *J. Biol. Chem.* **285**, 23771–23778 (2010)
- [70] Sautin, Y. Y., Lu, M., Gaugler, A., Zhang, L. and Gluck, S. L.: *Mol. Cell. Biol.* **25**, 575-589 (2005)
- [71] Xu, Y., Parmar, A., Roux, E., Balbis, A., Dumas, V., Chevalier, S., Posner, B.I.: *J. Biol. Chem.* **287**, 26409-26422 (2012)
- [72] Procházka, P., Libra, A., Zemanová, Z., Hřebačková, J., Poljaková, J., Hraběta, J., Bunčec, M., Stiborová, M., Eckschlager, T.: *Cancer Sci.* **103**, 334-341 (2012)
- [73] <http://www.cellsignet.com/media/templ.html> [cit. 20.4.2016]
- [74] Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Faar, A.L, Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951)
- [75] Laemmli, U.K: *Nature* **227**, 680–685 (1970)
- [76] <https://is.muni.cz/el/1431/podzim2014/C9320/um/RT-qPCR.pdf> [cit. 3.5.2016]
- [77] Bartůňková, J., Paulík, M. a kolektiv autorů: *Vyšetřovací metody v imunologii, 2., přepracované a doplněné vydání*, Grada publishing, Praha 2011
- [78] Hurwitz, S.J., Terashima, M., Mizunuma, N., Slapak, C.A.: *Blood* **89**, 3745-3754

[79] Belhajová, M., Hraběta, J., Eckschlager, T., Černá, T., Stiborová, M.: *V-ATPase in resistance to cytostatics and its inhibition*, V4 International Conference, Analytical Cytometry VIII, Program and Book of Abstracts, Olomouc 3.6.-6.6.2015, s. 124-125 (2015), ISBN 978-80-906086-2-7

[80] Laurencot, C.M., Kenned, K.A.: *Oncol. Res.* **7**, 371-379 (1995)

[81] Nilsson, C., Roberg, K., Grafström, R.C., Ollinger, K.: *Head Neck* **32**, 1185-1194 (2010)

