

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy
Katedra genetiky a mikrobiologie



Diplomová práce

**EXPRESE GENŮ BCL-2 A BAX VE VZTAHU
K CHEMOREZISTENCI NÁDOROVÝCH BUNĚK**

Lucie Houšková

Vedoucí diplomové práce: doc. MUDr. Tomáš Eckschlager, Csc.

Praha 2004

Prohlašuji, že jsem svou práci vypracovala samostatně pouze za použití uvedené literatury.

Dne 5. 5. 2004 v PRAZE

Lucie Homolová!

Chtěla bych poděkovat svému školiteli doc. MUDr. Tomášovi Eckschlagerovi, Csc. za odborné vedení mé diplomové práce, za jeho trpělivost, cenné rady a připomínky. Dále bych ráda poděkovala vedoucí laborantce pí. Janě Jašinské i všem ostatním pracovníkům laboratoře za pomoc při řešení technických problémů. V neposlední řadě chci poděkovat rodičům a svému manželovi, bez nichž by tato práce nevznikla.

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	8
1. ÚVOD.....	10
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	11
2.1. Obecná charakteristika mnohočetné lékové rezistence (MDR).....	11
2.2. Stručný přehled mechanismů MDR.....	13
2.2.1. Rezistence způsobená sníženou koncentrací cytostatik v buňce.....	13
2.2.2. Rezistence způsobená inaktivací cytostatik v metabolismu xenobiotik	15
2.2.3. Rezistence způsobená změnami v molekulárním cíli cytostatik.....	15
2.2.4. Rezistence způsobená změnami v regulaci buněčného cyklu.....	17
2.2.5. Rezistence způsobená zvýšenou schopností reparace DNA	18
2.2.6. Rezistence způsobená změnami v procesech vedoucích k apoptóze	20
2.3. Programovaná buněčná smrt (apoptóza)	21
2.3.1. Indukce apoptózy	21
2.3.2. Efektorová fáze apoptózy.....	22
2.3.3. Degradční fáze apoptózy	23
2.4.1. Struktura proteinů rodiny Bcl-2	24
2.4.2. Lokalizace proteinů rodiny Bcl-2.....	25
2.4.3. Homodimerizace a heterodimerizace.....	25
2.4.4. Regulace aktivity proteinů rodiny Bcl-2.....	26
2.5. Diagnostika metodou Q RT PCR	28
2.5.1. Historický vývoj Q RT PCR metodiky	28
2.5.3. Kvantifikace PCR v reálném čase.....	29
3. MATERIÁL A METODIKA	31
3.1. Materiál.....	31
3.1.1. Vzorčky a buněčné linie.....	31
3.1.2. Kultivace a zpracování.....	31
3.2.1. Izolace celkové RNA	32
3.2.2. Průkaz přítomnosti RNA metodou gelové elektroforézy.....	33
3.2.3. Převod RNA na cDNA metodou reverzní transkripce.....	35
3.2.4. Stanovení poměru Bax/Bcl-2 metodou kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (Q-RT PCR).....	36
4. VÝSLEDKY.....	39
4.1. Optimalizace reakce.....	39
4.2. Expres Bcl-2 a Bax u nádorových linií	41
4.3. Expres Bcl-2 a Bax u zdravých dárců a u pacientů.....	43
4.3.1. Buňky zdravých jedinců bez nádorového onemocnění.....	43

4.3.2. Buňky pacientů s nádorovým onemocněním	44
5. DISKUSE	47
5.1. Metodické aspekty studia exprese apoptotických genů.....	47
5.2. Exprese Bcl-2 a Bax u nádorových a nenádorových buněk.....	48
6. ZÁVĚR	52
7. LITERATURA	53
PŘÍLOHA Č. 1: UKÁZKY VÝSTUPŮ Z Q RT PCR ANALÝZY.....	63

Publikace výsledků formou přednášek:

Eckschlager T., Sumerauer D., Vicha A., Mejstříková L., Cinek O. (2002): Detekce minimální zbytkové choroby u neuroblastomu reverzní transkripční PCR v reálném čase kvantifikující mRNA GD2 syntázy. VI. Celostátní konference DNA diagnostiky, buněčné a genové terapie, 11.-12.12. 2002, Praha

Eckschlager T., Sumerauer D., Vicha A., Mejstříková L., Cinek O., Koutecký J. (2003): Metodika detekce minimální nádorové choroby u neuroblastomu-nový algoritmus. XXVII. Brněnské onkologické dny, 29.-31.5. 2003, Edukační sborník, Brno.

Eckschlager T., Čermáková M., Mejstříková L., Činátl J., Činátl J. jr. (2003) : Problematika mnohočetné lékové rezistence. XXVII. Brněnské onkologické dny, 29.-31.5. 2003, Edukační sborník, Brno.

Houšková L., Cinek O., Eckschlager T. (2003): Provází overexprese Bcl-2 mnohočetnou lékovou rezistenci? VII. Celostátní konference DNA diagnostiky, buněčné a genové terapie, 11.-12.12. 2003, Praha.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABC	angl. <i>ATP binding cassette</i> , ATP vazebná kazeta
AIF	angl. <i>apoptosis inducing factor</i>
Apaf-1	angl. <i>apoptosis activating factor</i>
APE-1	angl. <i>apurinic/aprimidinic endonuclease 1</i>
ATP	adenosintrifosfát
At-MDR	atypická mnohočetná léková rezistence
ALL	akutní lymfoidní leukémie
ALL-NR	akutní lymfoidní leukémie nereagující na léčbu (<i>non response</i>)
AML	akutní myeloidní leukemie
Bax	angl. <i>Bcl-2- associated X protein</i>
Bcl-2	angl. <i>B- cell lymphoma</i>
β-GUS	β-glukuronidasa
BH	angl. <i>Bcl-2 homology</i>
bp	pár bazí (base pair)
CAD	angl. <i>caspase- activated deoxyribonuclease</i> ,
CD	angl. <i>cluster of differentiation</i> , diferenciační antigen
Cdc	cyklin-dependentní kinasy
cDNA	<i>copy</i> deoxyribonukleová kyselina
CLL	chronická lymfoblastická leukémie
CML	chronická myeloidní leukémie
cMOAT	angl. <i>canalicular multispecific anion transporter</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	disodná sůl kyseliny ethylendiaminotetraoctové, dihydrát
GAPDH	glyceraldehydfosfátdehydrogenasa
GDS	glutathion detoxikační systém
GSH	glutathion
GST	glutathion-S-transferasový systém
HePC	hexadecylphosphocholin
kDa	kilodalton
LRP	angl. <i>lung resistance related protein</i>
MDR	mnohočetná léková rezistence (<i>multidrug resistance</i>)
MGMT	<i>O</i> ⁶ -methylguanine-DNA methyltransferasa
MM	mnohočetný myelom
MRP	angl. <i>multidrug related protein</i>
MVP	angl. <i>major vault proteins</i>
NBDs	angl. <i>nucleotide binding domains</i> , nukleotid vazebné domény
NBL	neuroblastom
NHL	non-Hodgkinův lymfom
NK	nukleové kyseliny
PARP	poly (ADP-ribosa) polymeráza
PBS	fosfátový pufr (<i>phosphate buffer saline</i>)
PCR	angl. <i>polymerase chain reaction</i> , polymerázová řetězová reakce
Pgp	P glykoprotein
PRb	retinoblastoma protein
PTP	angl. <i>permeability transition pore</i>
Rb	retinoblastom
RNA	ribonukleová kyselina
Rpm	<i>rotations per minutes</i> , otáčky za minutu

RT PCR	angl. <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> , reverzní transkripce s polymerázovou řetězovou reakcí
TAP	angl. <i>transporter of antigenic peptides</i> , přenašeče antigenních peptidů
TBE	pufr Tris-borát-EDTA
TI	terapeutický index
TMDs	angl. <i>transmembrane domains</i> , transmembránové domény
UNG	uracil-N-glykosyláza

1. ÚVOD

Nádorová onemocnění se stala v druhé polovině 20. století hned po traumatech druhou nejčastější příčinou úmrtí dětí a mladistvých v průmyslově vyspělých zemích. Postupem času se zjistilo, že se chování nádorů u dětí značně liší od nádorů dospělých a zároveň se zvýšila úspěšnost jejich léčby.

Dětská onkologie vznikla jako samostatný obor před více než 50 lety a dnes se studiem této problematiky zabývají stovky pracovišť po celém světě. Proti šedesátým létům, kdy se podařilo vyléčit 3% dětí se zhoubnými nádory, dosáhli lékaři dnes více než 70% úspěšnosti v léčbě (KOUTECKÝ *et al.* 1997).

Současné léčebné postupy zanechávají při vyléčení pacienta trvalé následky. Nové možnosti se otevírají na poli molekulární biologie, která umožňuje detailnější charakterizaci nádoru podle různých biologických markerů. Pomocí klinických a biologických údajů lze pacienty rozlišit podle rizikovosti a vybírat dále terapii podle těchto kritérií. Může se zamezit zbytečnému „přeléčování“ pacientů s nízkým rizikem a naopak u vysokorizikových pacientů je možné použít intenzivnější léčbu např. imunoterapii či genovou léčbu. Kromě toho je nezbytné zaměřit se na i na vznik lékové rezistence tj. sledovat tyto markery (bohužel zatím ne všechny mechanismy jsou prozkoumané a jasné) a testovat cytostatika *in vitro* (KRÁL *et al.* 2000).

Cílem mé diplomové práce bylo zapojit se do výzkumu lékové rezistence v laboratořích molekulární biologie a průtokové cytometrie kliniky dětské onkologie při 2. lékařské fakultě a Fakultní nemocnici v Motole. Zaměřila jsem se na zavedení nové metodiky polymerázové řetězové reakce v reálném čase s využitím přístroje ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System a po optimalizaci metodiky jsem měřila expresi genů Bax a Bcl-2, které jsou jednou z příčin lékové rezistence u dětských nádorů.

Cíle mé diplomové práce:

1. zavést a optimalizovat metodu PCR v reálném čase
2. prověřit citlivost a zhodnotit výhody této metody pro použití v praxi
3. změřit a porovnat expresi genů Bax a Bcl-2 u různých nádorových linií senzitivních a rezistentních k cytostatikům
4. změřit expresi Bax a Bcl-2 u nenádorových vzorků a vzorků pacientů s nádorovým onemocněním a výsledky porovnat s literaturou

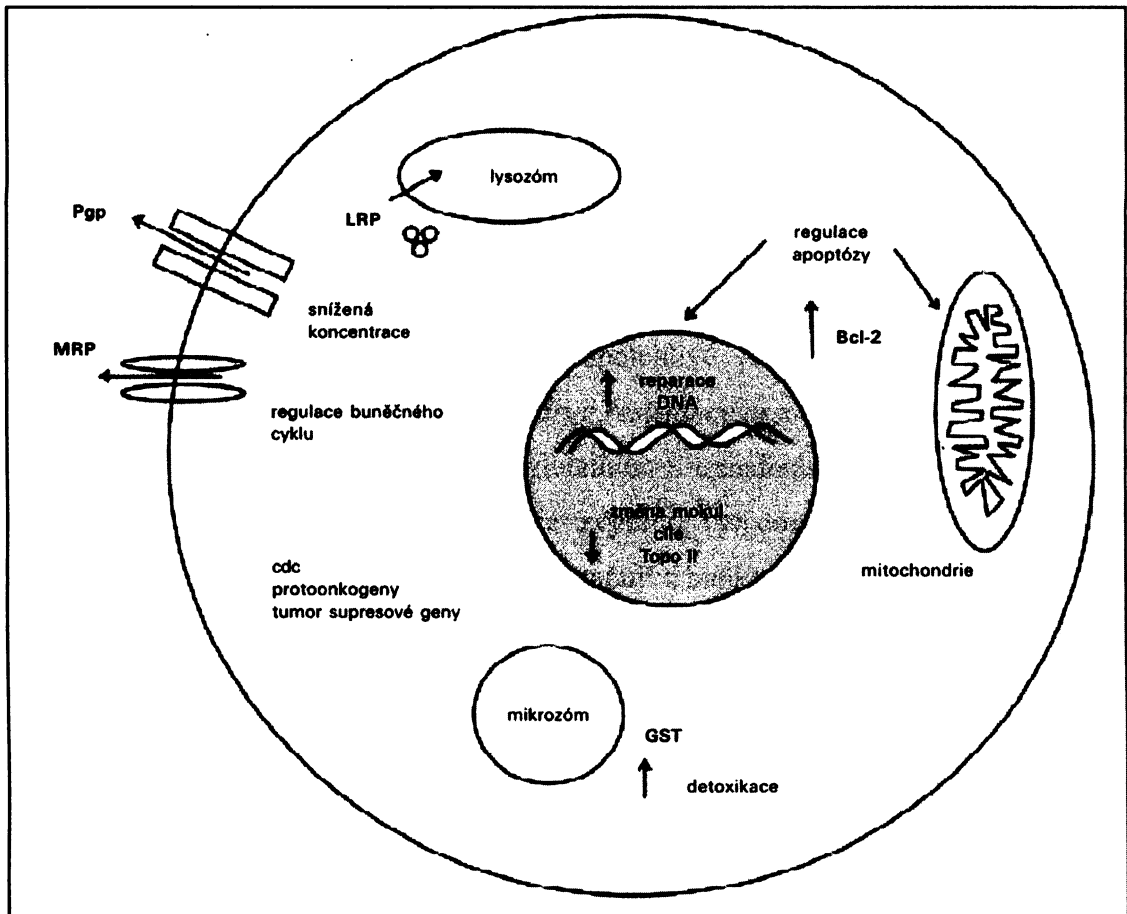
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Obecná charakteristika mnohočetné lékové rezistence (MDR)

Chemoterapie je základním nástrojem protinádorové léčby (spolu s operativní léčbou a radioterapií) a jako jediná se může uplatnit i u generalizovaných a systémových nádorů. Cílem chemoterapie je vyvolat takové poškození buňky, aby v konečném důsledku došlo k apoptóze tj. programované buněčné smrti. Apoptóza je přirozený geneticky kontrolovaný mechanismus, kterým se organismus zbavuje poškozených buněk a předchází tak vzniku mutant a potenciálně maligních buněk. Nádorový proces se rozvíjí v buňkách, které jsou schopny poškození překonat, vymknout se kontrole, neomezeně proliferovat a žít na úkor ostatních.

Příčinou selhání protinádorové léčby je nejčastěji rezistence nádorových buněk vůči účinkům cytotoxických látek. Nádorové buňky mohou vykazovat rezistenci již při první léčbě-**rezistence přirozená** (primární). Druhým typem je **rezistence získaná** (sekundární), která vzniká v průběhu cytostatické léčby, kdy se původně citlivé buňky stávají rezistentními a účinnost léčby se snižuje. Zde je zpravidla nutné změnit chemoterapeutický režim. Pokud při ztrátě citlivosti vůči jednomu přípravku vzniká současně rezistence na jiná, často strukturně příbuzná cytostatika, jde o rezistenci **zkříženou** (*cross resistance*). Rezistenci ke skupině cytostatik lišících se jak strukturně, tak mechanismem účinku nazýváme **mnohočetná léková rezistence** a označujeme ji jako MDR (z anglického *multidrug resistance*) (ZUBERCOVÁ *et al.* 1998, KODYKOVÁ *et al.* 2000) (viz. obr. 1, str.12)

MDR byla poprvé popsána v roce 1970 na buněčné linii izolované z plic čínské křečka a na buněčné linii myší leukémie P3884 (BIEDLER *et al.* 1970). V průběhu dalších let byly popsány mechanismy, kterými nádorové buňky odolávají chemoterapii, dále byla popsána cytostatika, která vyvolají vznik MDR, ale i taková, která nejenže MDR nevyvolají, ale jsou účinná i u nádorových buněk s MDR fenotypem (NOSKOVÁ *et al.* 2000).



Obr. 1. Schématické znázornění mechanismů, které se podílejí na vzniku mnohočetné lékové rezistence tj. *lung resistance protein* LRP, P-glykoprotein, *multidrug resistance protein* MRP, tumor supresory, protoonkogeny, glutathion-detoxikační systém, zvýšená aktivita reparačních enzymů, proteiny rodiny Bcl-2.

2.2. Stručný přehled mechanismů MDR

Mnohočetnou lékovou rezistenci můžeme rozdělit do 2 skupin. Typická (klasická) MDR zahrnuje působení membránového glykoproteinu P (Pgp), který je produktem *mdr1* genu. Do atypické MDR (at-MDR) zahrnujeme všechny ostatní mechanismy, na kterých se Pgp nepodílí. Pro účely klinické praxe nejsou dosud k překonání at-MDR k dispozici žádné spolehlivé preparáty. Hlavními proteiny účastnicími se at-MDR jsou: MRP (*multidrug resistance associated protein*), LRP (*lung resistance related protein*) a p-isoforma glutathion-S-transferázy (GST-p).

Nejčastěji se při MDR uplatňuje zvýšené vylučování cytostatik s využitím transmembránových přenašečů, které je odstraňují z buňky. V další části této práce jsou mechanismy MDR rozdělené podle účinků nádorových buněk na inhibici působení cytostatik, kam patří kromě transportních pump také změny v cytokinetice, snížení koncentrace cílového enzymu, změny exprese a aktivity proteinů glutathionového detoxikačního systému a proteinů účastnících se kontrolních mechanismů apoptózy (STAVROVSKAYA 2000).

2.2.1. Rezistence způsobená sníženou koncentrací cytostatik v buňce

Dostatečná akumulace cytostatik uvnitř nádorové buňky je nezbytná pro efektivní chemoterapii. Ta může být narušena zvýšením metabolismu buňky, nedostatečnou permeabilitou membrány pro vstup cytostatika i jeho nízkou dávkou.

V nádorové buňce existují faktory, které snižují intracelulární koncentraci cytostatik. U lidí bylo popsáno 46 ABC (z angl. *ATP binding cassette*) přenašečů lokalizovaných v cytoplazmě, jádru buňky či přímo v buněčných membránách, které hrají důležitou roli nejen v mnohočetné lékové rezistenci, ale i u cystické fibrózy, u některých neurologických poruch aj. Všechny ABC přenašeče nesou minimálně dvě nukleotid vazebné domény (NBDs-*nucleotide binding domains*, nebo také ABC) a dvě transmembránové domény (TMDs-*transmembrane domains*), které určují substrátovou specifitu. Zdrojem energie pro přenos pomocí ABC proteinů je hydrolýza ATP (CHANG 2003).

Nejstudovanějším ABC přenašečem je **P-glykoprotein** (Pgp) (JULIANO a LING 1976). Transmembránový P-glykoprotein (170 kDa) je kódován genem *mdr-1* lokalizovaným na chromozómu 7 v oblasti 7q21.1 (HIROSE 2002). Tento protein funguje jako ATP-dependentní pumpa, která udržuje intracelulární koncentraci

cytostatika pod cytotoxickou úrovní (BRADLEY *et al.* 1988). P-glykoprotein se vyskytuje ve velké koncentraci v normálních buňkách jater, ledvin, tračnicku, nadledvin a slinivky, kde funguje jako ochrana proti působení cytotoxických chemikálií obsažených ve stravě. Nízké hladiny Pgp byly nalezeny v kůži, svalech, nervovém systému a v kostní dřeni (ALEXANDROVA 1998). Co se týče patologického výskytu, nadměrná exprese Pgp byla nalezena častěji v nádorech léčených cytostatiky. Výjimkou je zvýšená exprese u nádorů odvozených od tkání s přirozeným výskytem Pgp. Řada dalších nepříbuzných nádorů pocházejících z tkání, které normálně neexprimují Pgp, vykazovala expresi tohoto proteinu (neuroblastom, CML, nádory plic, prsu, prostaty aj.) (NOSKOVÁ *et al.* 2000). Studie na modelu dětských nádorů prokázala silnou vazbu mezi expresí Pgp, neodpovídavostí na chemoterapii a kratší délkou přežívání (ARCECI 1993).

Druhým významným přenašečem z rodiny ABC proteinů je protein MRP1 (*multidrug resistance protein*, 190 kDa), který je fyziologicky exprimován na basolaterálních membránách hepatocytů. Gen pro MRP je lokalizován na 16. chromozómu (16p13.1). MRP byl v buňkách nalezen v 6 formách (MRP 1-6), ale pouze MRP1-3 mají význam při navození lékové rezistence. Důležitým rozdílem mezi MRP1 a Pgp je schopnost MRP1 transportovat léčiva z **cytoplazmy** (Pgp pouze z vnitřní vrstvy plazmatické membrány) a navíc v kotransportu s glutathionem. Bylo prokázáno, že kooperace MRP a glutathion-S-transferázy (GST) je nezbytná pro významnou ochranu buňky proti cytotoxicitě a dokonalou ochranu nukleových kyselin (MORROW *et al.* 1998, PAUMI *et al.* 2001)

Třetím proteinem významně přispívajícím k MDR je LRP (*lung resistance protein*, 110 kDa), který patří do rodiny tzv. *major vaults proteins* (MVP). *Vaults* jsou dutá oválná ribonukleoproteinová tělíska s komplexní, vysoce konzervativní strukturou, jejichž funkce nebyla ani po 20 letech výzkumu zcela vysvětlena, nicméně se předpokládá jejich účast na lékové rezistenci (van ZON *et al.* 2003, MOSSINK *et al.* 2003). Nacházejí se v jádře a v cytoplazmatických vezikulech, kde se zřejmě podílí na přenosu látek dovnitř a vně buňky. Gen pro LRP je lokalizován na 16. chromozómu v oblasti 16p11.2. Exprese LRP se běžně vyskytuje ve tkáních s bohatou sekrecí a ve tkáních vystavených toxickým látkám tj. buňky bronchů, zažívacího traktu, keratinocytů aj. Nadměrná exprese LRP se vyskytuje u akutní myeloidní leukémie a ovariálního karcinomu, přičemž jeho výskyt souvisí s chemorezistencí (NOSKOVÁ *et al.* 2000). Různé studie ukazují, že exprese LRP je u řady nádorů silným nezávislým

prognostickým faktorem špatné odpovědi na chemoterapii a jejího výsledku (IZQUIERDO *et al.* 1998)

2.2.2. Rezistence způsobená inaktivací cytostatik v metabolismu xenobiotik

Dalším způsobem vzniku rezistence může být inaktivace a detoxikace cytostatik. K tomu jsou běžně v buňkách přítomny enzymy, které veškeré látky tělu cizí tj. xenobiotika v první fázi hydroxylojí (připojení OH skupiny). Katalytickou funkci zde zastupují enzymy zvané monooxygenázy neboli systém cytochromu P450. Ve druhé fázi jsou hydroxylované sloučeniny buď modifikovány metylací (připojení CH₃ skupiny) nebo přeměněny na různé polární metabolity konjugací s kyselinou glukuronovou, sulfátem, acetátem nebo s glutathionem. Cílem obou fází je zvýšit rozpustnost těchto látek ve vodě (polárnost) a usnadnit tak jejich vyloučení z organismu. To je nezbytné zejména u silně hydrofobních xenobiotik, která by se bez tohoto systému mohla neomezeně akumulovat v tkáních.

V souvislosti s rezistencí nádorových buněk k cytostatikům je nejdůležitější glutathion-S-transferázový systém katalyzující konjugaci xenobiotik s glutathionem (MURRAY *et al.* 1998).

Glutathion-S-transferázový systém (GST) tvoří rodina cytosolických izoenzymů (fyzikálně odlišné formy se stejnou katalytickou aktivitou) se schopností vázat velké množství lipofilních molekul a zároveň katalyzovat konjugační reakci se silným nukleofilním činidlem, kterým je glutathion. Lidské GST izoenzymy se dělí do čtyř skupin: α , μ , π a θ . Konjugát glutathionu s toxickou látkou je z buněk odstraněn specifickými membránovými pumpami, například MRP (viz. 2.2.1.) (MORROW *et al.* 1998, PAUMI *et al.* 2001).

Aktivita glutathion detoxikačního systému (GDS) je závislá na řadě enzymů, které se podílejí na regeneraci glutathionu, formaci konjugátů glutathion-toxická látka a dalších úpravách těchto konjugátů (BOHÁČOVÁ *et al.* 2000). MDR fenotyp se proto může vyskytovat i u buněk s nezměněnou intracelulární koncentrací GST (MENG *et al.* 2001).

2.2.3. Rezistence způsobená změnami v molekulárním cíli cytostatik

Specifickým mechanismem vzniku rezistence nádorových buněk jsou kvalitativní a kvantitativní změny v ve funkci topoizomeráz tj. enzymů, které katalyzují

změny v topologii DNA a tím v tzv. čísle vinutí (celkový počet závitů či překřížení jednoho řetězce druhým). Na vzniku této rezistence se podílí i mutace v kódující oblasti genů pro topoizomerázy (MAO *et al.* 1999).

Existují dva typy enzymů pro určování topologie DNA: *Topoizomerázy I.* způsobují jednořetězcové zlomy v DNA a přemísťují neporušený řetězec přes zlom protilehlého řetězce, čímž mohou relaxovat kladnou i zápornou nadšroubovici. Ke své enzymatické aktivitě nevyžadují ATP a jejich funkce je spojena také s helikázovou aktivitou, která je nezbytná při iniciaci replikace a transkripce.

Topoizomerázy II. vytvářejí dvouřetězcové zlomy ve vláknech DNA a přemísťují neporušenou DNA přes zlomy obou řetězců protilehlé dvoušroubovice. Uplatňují se zejména při rychlé proliferaci buněk (ROTHENBERG 1997). Jde o homodimerní proteiny vyskytující se ve dvou izoformách α a β , které jsou kódovány odlišnými geny a ke své aktivitě vyžadují ATP.

Topoizomerázy mohou relaxovat pozitivní i negativní nadotáčky nebo je naopak vytvářet. Jsou asociovány s jadernou matrix a hrají důležitou roli jak při replikaci, transkripci a rekombinaci DNA, dekatenaci dceřinných molekul, oddělování chromatid a segregaci chromosomů v mitose, tak i při tvorbě chromatinové struktury (POLJAK a KAS 1995, KODYKOVÁ a KREJSEK 2000). Nezbytnost těchto enzymů je zřejmá a proto jakákoliv změna v jejich koncentraci, aktivitě či mechanismu účinku vede k zásahům do důležitých buněčných pochodů. Proti topoizomerázám jsou zaměřena různá cytostatika, která například stabilizují štěpný komplex a tím inhibují opětovné spojení rozštěpené DNA. Dochází tak k interferenci těchto látek s buněčnými pochody jako je replikace a transkripce a se indukuje apoptóza (SHIOTANI a ASHIDA 2004). Mezi inhibitory topoizomerázy I. patří kamptotecin (WALL M. *et al.* 1966) a jeho analogy topotekan a irinotekan. V přítomnosti kamptotecinu štěpí topoizomeráza I. na guanin bohaté úseky, zejména telomery, čímž přispívá k apoptóze (KANG *et al.* 2004). Aktivitu topoizomerázy II. ovlivňují látky patřící mezi tzv. „katalytické inhibitory“, které působí cytotoxicky inhibicí enzymu tak, že inhibují ATPázové aktivity topoizomerázy II. např. merbarone. K inhibitorům topoizomeráz II. vzniká mnohočetná léková rezistence, u topoizomeráz I. nevzniká, ale rezistence se může vyvinout zvýšením aktivity reparačních enzymů, které zlomy způsobené topoizomerázou I. opraví (KLENER 1998). Tvorba štěpného komplexu a následná odpověď na DNA léze je závislá na souhře mezi enzymem, DNA a cytostatikem. Inhibitory topoizomerázy II. a jejich cytotoxický efekt jsou závislé na aktivitě a kvantitě tohoto enzymu. V souvislosti se získanou rezistencí k inhibitorům topoizomerázy se nejčastěji uvádí

snížená koncentrace těchto enzymů. Navíc se na vzniku chemorezistence podílí i epigenetické faktory jako např. amplifikace genu pro topoizomerázu II., snížená i zvýšená exprese topoizomerázy II. (CARDOSO *et al.* 2004), zvýšená degradace proteinu aj. (KODYKOVÁ *et al.* 2000, PESSINA *et al.* 2001).

2.2.4. Rezistence způsobená změnami v regulaci buněčného cyklu

Eukaryotické buňky prochází buněčným cyklem, během kterého se chromozómy buňky zduplikují a segregují do dvou dceřiných buněk. Jeho regulace je kritickým bodem pro normální vývoj mnohobuněčného organismu. Ztráta kontroly buněčného cyklu vede ke vzniku nádorového bujení. Buněčný cyklus je regulován mnoha proteiny, které musí precizně zajistit souslednost dějů a správné střídání jednotlivých fází. Kontrolní body v průběhu cyklu slouží jako rozhraní mezi jednotlivými fázemi, ve kterých jsou zrevidovány již proběhnuvší události, aby buňka mohla postoupit do další fáze. V případě, že se objeví nějaké odchylky, buňka vydá signál k zamezení vstupu do následující fáze.

Hlavní úlohu zde hraje malé množství heterodimerních proteinkináz, které nesou regulační podjednotku (cykliny) a katalytickou podjednotku (cyklin-dependentní kinázy). Podílejí se na regulaci tak, že fosforylují proteiny buněčného cyklu, čímž je aktivují nebo inhibují. V nádorových buňkách jsou často k poškozeny geny účastníci se regulace buněčného cyklu (např. tumor supresorové geny). To zvýší aktivitu cyklin-dependentních proteinkináz (cdc) a vyvolá nekontrolovanou proliferaci (KODYKOVÁ a KREJSEK 2000).

Příkladem může být tetramerní protein p53, který se aktivuje poškozením DNA. Gen pro protein p53 je lokalizován na chromosomu 17 (p13.1) a je jedním z klíčových tumorsupresorových genů, protože jeho mutace se vyskytuje u více než 50% lidských zhoubných nádorů. Inaktivace či ztráta p53 vede ke genomové nestabilitě, snížení indukce apoptózy (KESHELAVA *et al.* 2001, SIMIN *et al.* 2004, TAKATOSHI *et al.* 2004) a v jejich důsledku k akumulaci mnohočetných mutací vedoucích přes transformaci až k nádorovému bujení.

Tento protein je důležitý kontrolní bod při přechodu buněk z G₁ fáze do S fáze. Intaktní p53 působí jako transkripční faktor cdc-inhibitoru p21 (produkt genu *waf1*), který se váže na komplex cdc-cyklin, inaktivuje ho a zajistí tak setrvání buňky v G₁ fázi. Při poškození DNA protein p53 zabrání vstupu buněk do S fáze, dokud není opravena a hladiny proteinů p53 a p21 se nesníží. V mnoha buňkách snižuje protein p53 práh

nutný k indukci apoptózy tím, že aktivuje proteiny, které se na tomto procesu podílí (LOWE *et al.* 1993).

Dalším nádorovým supresorem je Rb protein (pRb, produkt genu *rb*). Gen pro Rb protein je lokalizován na chromozómu 17 (13q14). Aberantní forma pRb se vyskytuje u mnoha lidských malignit. Protein Rb hraje klíčovou roli v buněčném cyklu. Jakmile buňka přechází z G₀ nebo G₁ fáze a vstupuje do S fáze, funguje pRb jako negativní regulátor (SIMIN *et al.* 2004). Tento protein se vyskytuje v jádře ve dvou formách tj. hyperfosforylovaný (inaktivní) a hypofosforylovaný (aktivní). Hypofosforylovaný Rb váže proteiny E2F, což jsou transkripční faktory, které se touto vazbou mění z aktivátorů na represory promotorů genů, jejichž produkty jsou nutné pro vstup do S-fáze (ROSYPAL 1999). Protein Rb navíc interreaguje s deacetylázovým systémem histonů. Deacetylaci se DNA stává nepřístupná pro transkripční faktory, protože histony jsou pevně navázány kladně nabitými lysiny k jejím záporně nabitým skupinám (BREHM *et al.* 1998). Pokud je ale protein Rb nadměrně fosforylován například ze strany deregulovaných cdc, zvýší se uvolňování vázaných transkripčních faktorů E2F, které spustí expresi dalších genů (i protoonkogenů jako c-fos a c-jun), což vede k přechodu z G₁ do S fáze a tím k nadměrné proliferaci.

Změny cytotkinetiky způsobené hromaděním nádorových buněk v G₀ fázi mohou také souviset s rezistencí buněk k cytostatikům, protože v tomto stádiu jsou buňky k řadě cytostatik necitlivé. Vzhledem k tomu, že většina cytostatik působí pouze v některých fázích (tzv. fázově specifická), každá změna v zastoupení fází se projeví změnami citlivosti k cytostatikům (KODYKOVÁ a KREJSEK 2000).

2.2.5. Rezistence způsobená zvýšenou schopností reparace DNA

Propojení mezi poškozením DNA a její opravou, vedoucí ke kancerogenezi, se potvrdilo zjištěním, že všechny známé kancerogeny jsou zároveň mutageny tj. způsobující změny v sekvencích DNA. Kromě chemických látek jde také o UV a ionizující záření.

Poškození DNA mohou mít ale také přirozenější příčinu. Jde o polymerázy, které běžně zařazují při replikaci na 10 000 párů bazí jednu nesprávnou. Proto i tento enzym musí nést opravnou tzv. *proofreading* aktivitu, která zajistí opravu bez které replikace nemůže pokračovat. Stejně tak je nutné zajistit zastavení replikace a opravit DNA poškozenou radiací a kancerogeny. K tomu mají živočišné buňky již dříve zmíněný systém kontroly zahrnující proteiny jako p53, který zajistí zastavení buněčného

cyklu v G₁ fázi a zabrání tak akumulaci mutací. Buňky, které neprodukují funkční p53, vykazují vyšší výskyt mutací vedoucí až ke vzniku nádorů.

Spojení kancerogeneze s poškozeným reparačním mechanismem lze jasně vysledovat u lidí s dědičnými genetickými defekty, u nichž se vyskytuje zvýšená pravděpodobnost vzniku nádorového bujení. Jedno z takových poškození nese xeroderma pigmentosum, onemocnění, při kterém je nefunkční opravný mechanismus pro DNA poškozenou UV zářením, protože je mutován gen pro excizní reparaci. Pokud je kůže jedinců s touto deficiencí vystavena UV záření, vyvíjí se u nich velmi často kožní karcinomy a melanomy. (LODISH *et al.* 2001).

V jiných případech maligní buňky vykazují naopak zvýšenou aktivitu reparace (MAJSTEREK *et al.* 2004). Pak je vhodné zaměřit cytostatika na poškození funkce enzymů účastnících se oprav DNA, což může být jedním z efektivních přístupů k překonání tohoto typu rezistence.

Důležitou roli v opravných procesech hrají DNA nukleázy, které štěpí fosfodiesterovou vazbu mezi deoxyribózou a fosfátovým zbytkem, čímž produkují 5' koncový fosfát a 3' koncový hydroxyl. Exonukleázy štěpí nukleotidy na 5' nebo 3' konci, endonukleázy štěpí specifická vnitřní místa na DNA (MARTI a FLECK 2004).

Z hlediska výsledku reparačního procesu se dělí opravné mechanismy na 3 skupiny:

1) „*mismatch repair*“ - tento způsob opravy nastupuje ihned po syntéze DNA, přičemž využívá rodičovské vlákno jako templát k nahrazení nesprávného nukleotidu v nově syntetizovaném vlákně. Této opravy se účastní např. DNA polymeráza lambda (GARCIA-DIAZ *et al.* 2004).

2) excizní reparace (*base excision repair, nucleotide excision repair*) - je opravný mechanismus, při kterém dojde k vyštípnutí poškozené oblasti systémem specifických nukleáz a poté k jejímu dosyntetizování. Významnou roli zde hraje endonukleáza APE-1 (*apurinic/aprimidinic endonuclease 1*), která odštěpí chybnou bázi, vytvoří tak 5'-konec a umožní dosyntetizování mezery pomocí DNA polymerázy beta. Dalším důležitým opravným enzymem je O(6)-methylguanin-DNA methyltransferáza (MGMT), která je zodpovědná za odstraňování alkylovaných bází produkovaných některými karcinogeny, zejména O⁶-methylguaninu, přenosem alkyly na své aminokyselinové zbytky (ISHIKAWA *et al.* 2004).

3) oprava zlomů v dvouřetězcové DNA - tyto zlomy vzniknou v případě, že buňka toleruje poškození matricového řetězce při replikaci vytvořením mezery

v dceřinném vlákne. K opravě takového zlomu je nutný Ku protein, který svou helikázovou aktivitou rozvolní konec DNA a umožní tak párování této molekuly s jinou DNA, která nese mikrohomologní oblast. Nespárované nukleotidy jsou odstraněny a volné konce obou DNA propojeny ligací. Toto je příklad, jak může opravný mechanismus díky ztrátě několika nukleotidů vytvořit mutaci (LODISH *et al.* 2000).

2.2.6. Rezistence způsobená změnami v procesech vedoucích k apoptóze

Poslední dosud zjištěný MDR fenotyp vykazují buňky se změnami v expresi proteinů souvisejících s apoptózou (viz. dále 1.2). Programovaná buněčná smrt-apoptóza je fyziologický proces, který hraje hlavní roli v regulaci homeostáze tkání, v ontogenetických procesech při morfogenezi, účastní se regulace imunitní odpovědi a uplatňuje se u rezistence na protinádorovou terapii u některých nádorových onemocnění. Může být indukována jak fyziologicky, tak exogenními podněty a zahrnuje složitě regulovanou síť vztahů, na které se podílí řada enzymů, proteinů a dalších molekul. Externí signál může být do buňky přenesen vazbou ligandu na specifický povrchový receptor, který je tvořen tzv. „ *death domain*“ (smrtící doména). Jejím prostřednictvím signál vstupuje do nitrobuněčného prostoru a spouští složitou kaskádu, která v konečném důsledku vede k buněčné smrti. Na regulaci apoptózy se podílí řada genů kódujících proapoptotické a antiapoptotické proteiny jako například Bcl-2, Bcl-X_L, Bax, Bad a další. Nedávné studie ukázaly, že defekty v apoptotické dráze jsou důležité nejen při vzniku nádorů, ale také v odpovědi na jejich léčbu. Některá cytostatika totiž účinkují tak, že navozují apoptózu, proto nadměrná exprese např. Bcl-x_L nebo Bcl-2 může navodit rezistenci vůči protinádorové terapii. Znalost genů zahrnutých do regulace apoptózy, jejich alterace a v důsledku toho zvýšená či naopak snížená exprese apoptotických proteinů, které se objevují v mnoha typech nádorových onemocnění, začíná být důležitou prognostickou informací pro rozhodnutí o způsobu léčby. Cílem této práce bylo studium zvýšené exprese proteinů Bcl-2 a Bax a její vliv na vznik mnohočetné lékové rezistence u nádorů dětského věku. Existuje představa, že některé formy chemorezistence např. u leukémií začínají tak, že nádorové buňky úspěšně obcházejí apoptózu a Bcl-2 může hrát roli v tomto defektu (KODYKOVÁ *et al.* 2000, DURRIEU *et al.* 1999). Tato práce je zaměřena na hledání a průkaz obdobného mechanismu i u solidních nádorů dětského věku jako je neuroblastom, Ewingův sarkom, non-Hodgkinův lymfom aj.

2.3. Programovaná buněčná smrt (apoptóza)

Programovaná buněčná smrt představuje centrální mechanismus, který se podílí na eliminaci nadbytečných nebo potenciálně nebezpečných buněk. Buněčné interakce regulují smrt buňky dvěma zcela odlišnými cestami. Většina buněk v mnohobuněčném organismu je závislá na signálech, které jim umožní zůstat naživu. Jejich nepřítomnost aktivuje „sebevražedný“ program. V jiném kontextu, zahrnujícím imunitní systém, mohou specifické signály indukovat také „vražedný“ program pro zabití buňky. Nicméně ať už buňka spáchá sebevraždu pro nedostatek signálů pro přežití nebo je zabita prostřednictvím signálů od jiných buněk, buněčná smrt je zprostředkována společnou molekulární cestou.

Odstranění buněk cestou programované buněčné smrti je provázeno řadou dobře definovaných morfologických změn, obecně označovaných jako **apoptóza** (KERR *et al.* 1972). Jde o vysoce organizovaný proces (GERSHESON a ROTELLO 1992), který je geneticky řízený a vyžaduje přísun energie (převážně ve formě ATP) (EVAN *et al.* 1995). V průběhu apoptózy dochází kromě specifické exprese ke změnám na úrovni membrán, mitochondrií a DNA. Umírající buňka se deformuje, dochází ke kondenzaci, fragmentaci a poté k uvolnění malých, membránově vázaných apoptotických tělísek, která jsou fagocytována jinými buňkami. Důležité je, že nedochází k uvolnění intracelulárních komponent do extracelulárního prostoru a tím k vyvolání zánětlivých procesů jako je tomu u nekrózy (STELLER *et al.* 1995).

2.3.1. Indukce apoptózy

Proces apoptózy můžeme rozdělit na tři fáze: iniciační, efektorovou a degradační. (KROEMER *et al.* 1995). Iniciační fáze zahrnuje přijetí a zpracování apoptotického signálu, buď interního nebo externího.

Interní signál zajistí komplex proteinu Apaf-1 (*apoptosis activating factor*) a kaspázy 9, který se váže na protein Bcl-2 (viz. dále) na povrchu buňky. Trimer Bcl-2/Apaf-1/kaspáza 9 byl prozatím nazván **apoptozóm** (TSUJIMOTO 1998).

K externí aktivaci apoptózy dochází pomocí integrálních membránových proteinů **Fas** a **TNF receptoru**, jejichž receptorové domény jsou vystaveny na povrchu buňky. Vazbou komplementárních proteinů (**FasL** resp. **TNF**) se přenesení signál do cytoplazmy, kde se aktivuje kaspáza 8 (DUBSKÁ a SHEARD 2003). Tato dráha se vyznačuje zkrácenou efektorovou fází, protože se na ní nepodílí proteiny rodiny Bcl-2

a kaspázy se bezprostředně aktivují cestou intracelulární doména-kaspáza. Mezi další induktory apoptózy patří různé vnější faktory (ionizující záření, toxické látky) v podprahových hodnotách, které při překročení prahové hodnoty mají za následek nefyziologickou smrt buňky (nekróza). Jedním z hlavních signálů v důsledku poškození DNA je aktivace proteinu p53, který je považován za „strážce“ genomu (LANE 1992, THOMPSON 1995).

2.3.2. Efektorová fáze apoptózy

Efektorová fáze je souhrnem interakcí, které dále určují osud buňky po přijetí apoptotického signálu. Tuto fázi si lze představit jako aktivační kaskádu řady proteinů působících na různé cílové struktury.

Vyvrcholením efektorové fáze je aktivace tzv. apoptotických exekutorů – kaspáz (*caspase = cystein aspartase*) (MIGNOTTE a VAYSSIERE 1998). Kaspázy tvoří rodinu cytoplasmatických cysteinových proteáz, které jsou syntetizovány jako proenzymy a aktivují se hydrolýzou. Štěpí proteiny za zbytkem kyseliny asparagové. Vzájemnou aktivací kaspáz vzniká kaskáda proteolytické aktivity degradující strukturní proteiny v cytoplasmě a chromozomální DNA, která vyvolá smrt buňky. Významnou roli v průběhu apoptózy hrají proteiny rodiny Bcl-2, které se podílejí na rozhodování o tom, zda buňka podstoupí apoptózu či nikoliv (KROEMER *et al.* 1995). Na úrovni těchto proteinů se integrují externí a interní signály.

Důležitým momentem v apoptotické dráze je otevření specifických kanálů mezi vnější a vnitřní mitochondriální membránou, čímž se poruší transmembránový potenciál. Tyto kanály se nazývají PTP (*permeability transition pore*). PTP jsou multiproteinové komplexy, které jsou propustné pro molekuly do velikosti 1,5 kDa (BERNARDI *et al.* 1994, ZORATTI a SZABO 1995), nicméně jejich molekulární podstata není zatím zcela jasná (KROEMER *et al.* 1998, ZAMZAMI *et al.* 1998).

Otevření PT pórů je prvním krokem k aktivaci kaspáz. Dochází k uvolnění cytochromu c z mitochondrií, který v přítomnosti ATP aktivuje protein Apaf-1. Tento komplex se váže na prokaspázu 9, čímž indukuje její štěpení a tím i aktivaci kaspázy 9 (LI *et al.* 1997). Kaspáza 9 štěpí cílové substráty (PARP, DNA-dependentní proteinkinázy, U1-nukleoprotein, nukleární laminy, aktin, keratin) a zároveň aktivuje další kaspázy (KROEMER 1997).

Proteiny rodiny Bcl-2 se výrazně podílejí na tomto procesu. Bcl-2 a Bcl-x_L brání otevření PT pórů a uvolnění cytochromu c z mezimembránového prostoru

do cytoplazmy (LIU *et al.* 1996, KLUCK *et al.* 1997). Naproti tomu Bax protein zvyšuje propustnost PT pórů a působí jako induktor uvolnění cytochromu c (GREEN a REED 1998).

Bcl-2 a Bcl-x_L mohou vázat protein Apaf-1, čímž znemožní tvorbu apoptozómu a následně aktivaci kaspáz (CHENG *et al.* 1996, THORNBERRY a LAZEBNIK 1998). Na druhé straně proteiny z podrodiny Bax a z podrodiny BH3 umožňují aktivní působení Apaf-1 proteinu. V důsledku heterodimerizace (viz dále kapitola 2.4.3.) mezi antiapoptotickými a proapoptotickými proteiny je protein Apaf-1 uvolněn z vazby, která ho blokuje a je schopen plnit svoji funkci (ZHOU *et al.* 1997).

2.3.3. Degradční fáze apoptózy

K vlastní realizaci apoptózy dochází v její degradční fázi, tedy v okamžiku aktivace kaspáz. Mezi jejich cíle patří mimo jiné: proteiny metabolismu nukleových kyselin, komponenty cytoskeletu a nukleoskeletu (aktin, lamin). Degradční fáze apoptózy končí morfologicky specifickou destrukcí buňky. Výsledkem tohoto procesu je vznik membránově ohraničených vezikulů (tzv. apoptotických tělísek), které obsahují fragmenty jaderného materiálu, zbytky cytoplazmy a organely. Apoptotická tělíška jsou obvykle odstraněna fagocytózou, kterou provádějí sousední (živé) buňky.

Plazmatická membrána zůstává v průběhu celé apoptózy intaktní (WYLLIE *et al.* 1980), buňka se však postupně kondenzuje. Mitochondrie se výrazně morfologicky nemění, ztrácejí však svoji funkci.

Charakteristickým znakem apoptózy je fragmentace DNA. Dochází k ní záhy po aktivaci kaspázové kaskády, kdy je aktivována kromě DNáz zvaných CAD (*caspase-activated deoxyribonuclease*) také Ca²⁺/Mg²⁺ dependentní endonukleáza, které společně štěpí DNA mezi nukleozómy na fragmenty o velikosti 200 bp (OBERHAMMER *et al.* 1993).

2.4. Proteiny rodiny Bcl-2

Bcl-2 protein (TSUJIMOTO *et al.* 1984) byl původně identifikován jako onkoprotein se zvýšenou expresí u lidského folikulárního lymfomu odvozeného od lymfocytů B řady (odtud název Bcl-2- B-cell lymphoma) (BAKHSHI *et al.* 1985, CLEARY a SKLAR 1985, TSUJIMOTO *et al.* 1985, TSUJIMOTO a CROCE 1986). Bcl-2 protein je produktem bcl-2 protoonkogenu (230 kbp), který byl objeven

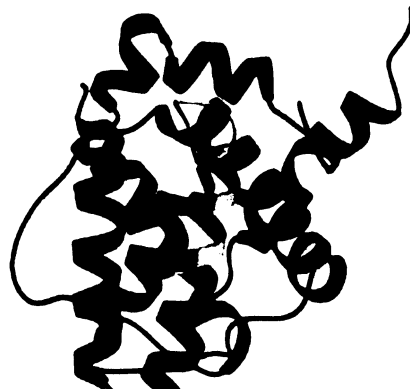
v souvislosti s translokací t(14;18). Ta se hojně vyskytuje u folikulárních non-Hodgkinových lymfomů a méně často i u chronické lymfoproliferativní choroby, mnohočetného myelomu a difúzního velkobuněčného lymfomu (GAIDANO 1997, GORDON 2000). Jeho hlavní funkce spočívá v inhibici apoptózy a prodlužování života buňky jejím přechodem na rozhraní Go/G₁ fází buněčného cyklu (MARTIN *et al.* 2003).

Protein Bcl-2 a jemu strukturně podobné proteiny patří mezi klíčové regulátory apoptózy. Hrají nezastupitelnou roli v efektorové fázi, kde rozhodují o tom, jakým způsobem buňka odpoví na apoptotické signály (KROEMER 1997).

Proteiny rodiny Bcl-2 působí buď antiapoptoticky (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Bfl-1, Bcl-1, Mcl-1, A1) nebo proapoptoticky (Bax, Bak, Bok, Bad, Bid, Blk, Hrk) (YANG a KORSMEYER 1996).

2.4.1. Struktura proteinů rodiny Bcl-2

Všechny proteiny Bcl-2 nesou v rámci své struktury alespoň jeden konzervativní motiv označovaný jako BH doména (*Bcl-2 homology domain*). Rozlišujeme čtyři typy BH domén, BH1 až BH4. Proteiny rodiny Bcl-2 je možné rozdělit do tří podrodin v závislosti na strukturní homologii a funkci jednotlivých proteinů. Bcl-2 podrodina (1) zahrnuje proteiny Bcl-2, Bcl-x_L a



Bcl-w, které vykazují antiapoptotickou aktivitu a nesou všechny čtyři BH domény. Většina proteinů této podrodiny nese na svém C-konci rovněž transmembránovou (TM) doménu (TSUJIMOTO a CROCE 1986, FANG *et al.* 1994, CORY 1995).

Členové podrodiny Bax (2) vykazují proapoptotickou aktivitu. Patří sem proteiny Bax, Bak a Bok, které ve své struktuře mají zastoupeny domény BH1, BH2, BH3 transmembránovou doménu. Proteiny BH3 podrodiny (3), kam patří proteiny Bik, Bid aj., vykazují proapoptotickou aktivitu a nesou pouze BH3 doménu (CHITTENDEN *et al.* 1995).

Klíčový pohled do molekulární podstaty mechanismů regulujících buněčnou smrt poskytly genetické studie hlísty *Caenorhabditis elegans*. Zjistilo se, že tento hlíst produkuje membránový protein Ced-9, který vykazuje strukturní homologii s proteinem Bcl-2 a plní stejnou protiapoptotickou funkci (STELLER 1995, HALE *et a.* 1996).

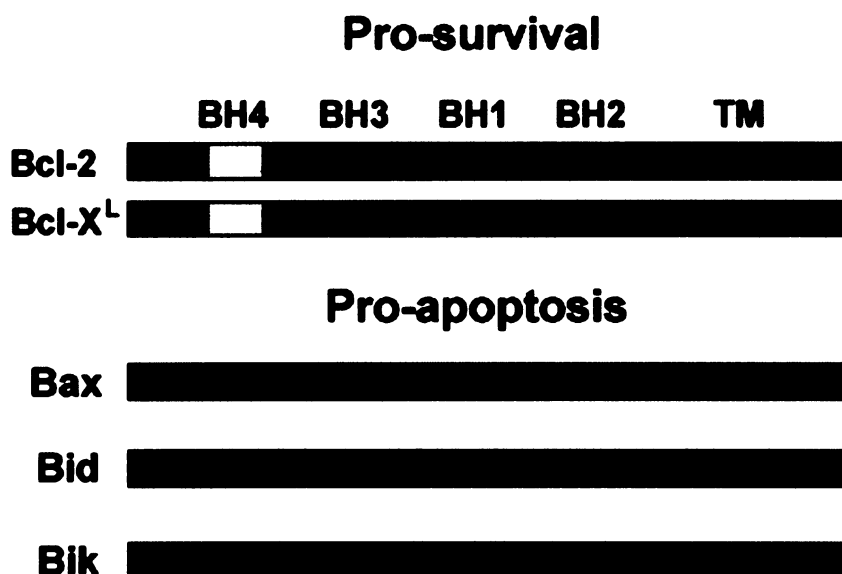
2.4.2. Lokalizace proteinů rodiny Bcl-2

Protein Bcl-2 je integrální membránový protein o molekulové hmotnosti 26 kDa, který se vyskytuje přirozeně na vnitřní (HOCKENBERY *et al.* 1990) a vnější membráně mitochondrií (YANG a KORSMEYER 1996), endoplasmatickém retikulu a na jaderné membráně. Stejnou lokalizaci vykazuje i protein Bcl-x_L. Pro membránovou lokalizaci je nezbytná přítomnost transmembránové domény, nicméně absence této domény nemá u Bcl-2 vliv na jeho funkci (NGUYEN 1994).

Protein Bax se před přijetím apoptotického signálu buňkou nachází v cytosolu. Po indukci apoptózy se přesouvá do mitochondriální membrány (HSU *et al.* 1997, ZHANG *et al.* 1998).

2.4.3. Homodimerizace a heterodimerizace

Významným rysem proteinů rodiny Bcl-2 je jejich schopnost vytvářet homodimery a heterodimery prostřednictvím svých BH domén (OLTVAI *et al.* 1993). K vazbě dochází prostřednictvím BH3 domény proapoptotického proteinu, která se váže do hydrofobní kapsy tvořené doménami BH1, BH2 a BH3 antiapoptotického proteinu např. Bcl-2 (SATTLETER *et al.* 1997), čímž je zrušena antiapoptotická funkce daného proteinu (CONRADT a HORVITZ 1998). BH4 doména je nezbytná pro antiapoptotickou aktivitu, BH3 doména naopak pro proapoptotickou funkci. V případě heterodimerizace pak poměr mezi antiapoptotickými a proapoptotickými proteiny do určité míry rozhoduje, jakým způsobem buňka odpoví na apoptotický signál (OLTVAI *et al.* 1993). Nicméně se předpokládá, že některé proteiny se mohou podílet na regulaci apoptózy nezávisle na ostatních (KNUDSON a KORSMEYER 1997). Jde o možnou tvorbu iontových kanálů v lipidické membráně obdobně jako je tomu u některých bakteriálních toxinů (diphtheria, koliciny) (ANTONSSON *et al.* 1997, MINN *et al.* 1997, SCHENDEL *et al.* 1997, SCHLESINGER *et al.* 1997), tato možnost ale ještě nebyla potvrzena v *in vivo* systému.



Obr.2. Proteiny rodiny Bcl-2 sdílejí některé z transmembránových domén. Podle jejich uspořádání se dělí do tří podrodin: podrodina antiapoptotických proteinů Bcl-2 (např. Bcl-2, Bcl-x_L aj.) a dvě podrodiny proapoptotických proteinů Bax a podrodina BH3 (např. Bax, Bid, Bik aj.).

2.4.4. Regulace aktivity proteinů rodiny Bcl-2

Aktivita proteinů rodiny Bcl-2 může být regulována (1) změnou exprese genů kódujících příslušné proteiny, (2) posttranslační modifikací samotných proteinů, (3) prostřednictvím jiných proteinů.

Je známo, že zvýšená exprese antiapoptotických proteinů (Bcl-x_L, Bcl-2) může způsobit rezistenci nádorových buněk k indukci apoptózy, na druhé straně proapoptotické proteiny této rodiny (Bax, Bad, Bak, Bcl-x_S) mohou zvýšit citlivost buněk na apoptotické podněty (REED 1997).

Protein p53 se také podílí na regulaci exprese proteinů rodiny Bcl-2. Tento jaderný protein působí jako transkripční faktor a je aktivován při poškození DNA. Aktivovaný p53 zvyšuje expresi Bax a zároveň snižuje expresi Bcl-2 (HALDAR *et al.* 1994, SELVAKUMARAN *et al.* 1994).

Proteiny Bcl-2 rodiny mohou být ovlivňovány také posttranslačními modifikacemi. Jednou z možných modifikací je fosforylace serinových a threoninových zbytků těchto proteinů. Fosforylace na Ser70 u proteinu Bcl-2 je nezbytná pro jeho protiapoptotickou funkci (ITO *et al.* 1997). Hyperfosforylace Bcl-2 indukovaná cytostatiky narušujícími cytoskelet inhibuje jeho antiapoptotickou aktivitu. Jednou

z příčin může být ztráta schopnosti vázat protein Bax a neutralizovat tak jeho funkci (SRIVASTAVA *et al.* 1998). Naopak v důsledku úplné defosforylace Bcl-2 dochází k vazbě ubiquitinu na tento protein, což vede k jeho degradaci v proteazómu (DIMMELER *et al.* 1999). Fosforylace proteinů z podrodiny BH3 je inaktivuje, protože brání jejich heterodimerizaci (ZHA *et al.* 1996).

Jinou možností modifikace je štěpení proteinů rodiny Bcl-2 různými proteázami. Antiapoptotická aktivita Bcl-2 a Bcl-x_L může být regulována kaspázami (CHENG *et al.* 1997, CLEM *et al.* 1998), které štěpí v oblasti smyček a štěpené produkty se stávají proapoptotickými.

Také proteiny bez Bcl-2 homologie mohou výrazně přispět k regulaci aktivity apoptotických proteinů. Jedním z nich je protein Bag-1, který je schopen vytvářet s Bcl-2 heterodimery a zvyšovat tak jeho aktivitu. (TAKAYAMA *et al.* 1995, BARDELLI 1996).

2.5. Diagnostika metodou Q RT PCR

2.5.1. Historický vývoj Q RT PCR metodiky

Řetězová polymerázová reakce-PCR (SAIKI 1985) slouží k cílené amplifikaci krátkého řetězce DNA. Její podstatou je třífázová syntéza DNA podle templátu, zajištěná termostabilní DNA polymerázou. Reakce probíhá podél vlákna DNA od místa, kde hybridizuje primer. Sekvence obou primerů zajišťuje specificitu reakce. Jednotlivé fáze probíhají podle teploty, která je pro příslušnou fázi reakce optimální (denaturace DNA 95°C, hybridizace primerů 40-60 °C podle sekvence, syntéza DNA 72°C), a cyklicky se opakují 25-40x.

Konstrukce systému „real-time“ (HIGUCHI *et al.* 1992,1993) umožnila sledovat akumulaci produktů PCR s využitím interkalace ethidium bromidu. Ta byla pod kontrolou počítačem řízené chlazené CCD kamery, která po ozáření vzorků UV světlem zaznamenávala nárůst fluorescence. Vynesemím závislosti vzestupu fluorescence versus počet cyklů byly získány informace o průběhu PCR. To byl zásadní rozdíl oproti běžné PCR, kde získáme hodnoty akumulace až po proběhnutí fixně zadaných počtů cyklů. Vzhledem k tomu, že při použití ethidium bromidu generovaly signál i nespecifické produkty bylo od této metody upuštěno.

HOLLAND *et al.* (1991) první demonstroval pokus, při kterém došlo ke štěpení cílové radioaktivně značené sondy 5' nukleázovou aktivitou *Taq* DNA polymerázy, čímž bylo možné detekovat amplifikaci pouze specifického produktu. Sonda měla blokovaný 3' konec, který tak nemohl sloužit jako primer. Připojením sondy na cílovou sekvenci během amplifikace se generoval substrát, který byl štěpen 5' nukleázovou aktivitou polymerázy posunující se od „*upstream*“ primeru do oblasti sondy. Tato závislost na polymeraci zajišťovala, že se sonda štěpí pouze při amplifikaci cílové sekvence. Štěpení sondy bylo měřeno papírovou chromatografií oddělením sondy štěpené a intaktní.

Vývoj sond fluorogenních (LEE *et al.*, 1993) umožnil eliminovat post-PCR procesy nutné k analýze degradace sondy. Fluorogenní sondy jsou oligonukleotidové sekvence nesoucí fluorofor (*reporter fluorescent dye*) a zhášec (*quencher dye*). Emise fluorescence uvolněné fluoroforem díky Försterovu rezonančnímu přenosu energie (FRET) v prostoru je u intaktní volné sondy účinně redukována zhášečem. Návrhy a syntézu nových sond značně zjednodušil objev LIVAK *et al.* (1995), který zjistil, že adekvátního zhášení se dosáhne, pokud sonda nese fluorofor na 5' konci a zhášeč na 3' konci.

Výhodou fluorogenních sond oproti DNA vazebným barvivům je to, že pro vznik fluorescenčního signálu je nutná specifická hybridizace mezi sondou a cílovou sekvencí, tudíž nespecificky amplifikované artefakty signál negenerují. Další výhodou těchto sond je možnost značení různými, vzájemně odlišitelnými fluorofory, čímž je možné detekovat dvě různé sekvence v rámci jedné PCR reakce.

2.5.2. Nástroje

Firma Perkin Elmer Biosystems navrhla přístroje pro detekci fluorescence během teplotních cyklů PCR reakce. Naše laboratoř měla k dispozici přístroj ABI PRISM®7700 Sequence Detection System. System 7700 má zabudovaný termální cykler a laser vedený vlákny optických kabelů ke každé z 96 zkumavek se vzorky. Emitovaná fluorescence prochází přes kabely zpět k CCD kamerovému detektoru. Jelikož každá zkumavka je ozářena zvlášť, CCD kamera je schopná rozlišit spektrum emitované fluorescence a tudíž detekovat i různé fluorofory v rámci jedné zkumavky. Software počítače analyzuje nejprve příspěvek každého fluoroforu k celkovému spektru. Signály z jednotlivých fluoroforů jsou poté porovnány s intenzitou fluorescence vnitřní referenční barvy ROX, čímž se vyčlení non-PCR fluktuace fluorescence, ke kterým dochází mezi jednotlivými zkumavkami například v důsledku nepřesností při pipetování. Použití vnitřního referenčního barviva zvyšuje přesnost dat získaných systémem ABI PRISM 7700.

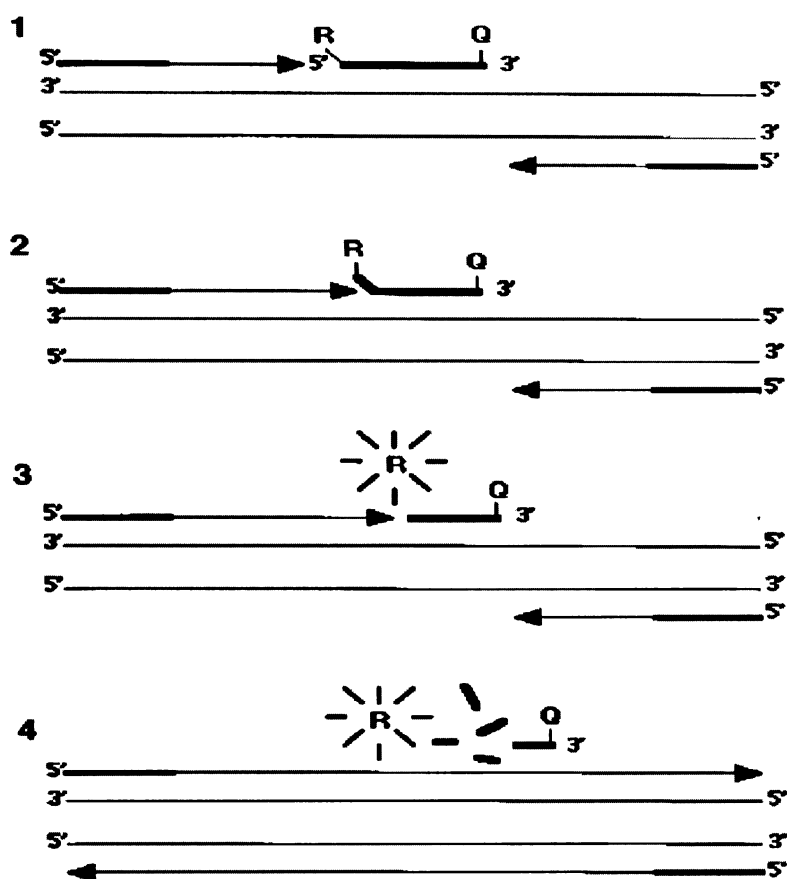
2.5.3. Kvantifikace PCR v reálném čase

Možnost monitorovat PCR v reálném čase kompletně změnila přístup k PCR amplifikaci DNA¹. Reakce není charakterizována konečným množstvím PCR produktu naakumulovaným po fixním počtu cyklů, ale parametrem C_T (*threshold cycle*). Hodnota C_T je bod v části cyklu, kdy je poprvé detekován amplifikovaný PCR produkt a zároveň je zaznamenán nárůst fluorescence přes hodnotu, která je označována jako práh (*threshold*). Kvantifikace množství DNA ve vzorku se dosáhne měřením hodnoty C_T a použitím standardní křivky k určení počátečního množství kopií. Tyto výpočty zajišťuje software počítače. Základní princip kvantifikace pomocí PCR v reálném čase je jednoduchý: čím větší je počáteční množství genomové DNA, tím dříve je detekována akumulace produktu v PCR procesu a C_T hodnota je nižší. Prahová hodnota

¹ Příloha č.1: Ukázky výstupů z Q RT PCR analýzy

se stanovuje v exponenciální fázi PCR, což zajišťuje vysokou reprodukovatelnost C_T hodnoty. V této fázi není vyčerpání reakčních komponent limitujícím faktorem a replikace probíhá jednotně.

Někdy můžeme do stejné reakce použít různé endogenní kontroly, čímž se normalizují rozdíly v množství celkové RNA přidané do každé cDNA reakce a stejně tak i rozdíly v účinnosti reverzní transkriptasy mezi různými reverzními transkripcemi. Jako endogenní kontrola se používá např. 18sRNA, GAPDH, β -aktin, β -glukuronidáza (β -GUS), histon 3.3a, ubiquitin aj.



Obr. 3. Jednoduché schéma principu polymerázové řetězové reakce v reálném čase. V prvním kroku hybridizuje sonda nesoucí fluorofor a zhášec s komplementárním úsekem na DNA. DNA polymeráza postupující od 5'konce k 3'konci tuto sondu rozštěpí, čímž se uvolní fluorofor od zhášecí a emituje fluorescenční signál.

3. Materiál a metodika

Pro experiment jsme použili jak zamražené vzorky pacientů (periferní krev, nádorová tkáň) tak nádorové i nenádorové buněčné linie z různých zdrojů. Vzorky jsme dál zpracovali běžnými laboratorními technikami jakými jsou: izolace celkové RNA, gelová elektroforéza, převedení RNA na cDNA technikou reverzní transkripce a nakonec jsme sledovaný produkt kvantifikovali metodou kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase. Výsledky jsme vyhodnotili s využitím programu Sequence Detectin System 1.9.1. Version.

3.1. Materiál

3.1.1. Vzorky a buněčné linie

K dispozici jsem měla 39 zamražených vzorků pacientů. Z toho 14 vzorků zdravých jedinců, 25 vzorků nádorové tkáně (4 neuroblastom, 10 Ewingův sarkom, 2 chronická lymfoidní leukémie, 7 non-Hodgkinův lymfom, 1 glioblastom, 1 meduloblastom). Dále jsme použili buněčné linie odvozené od neuroblastomu: UKF-NB3, UKF-NB2- sensitivní, rezistentní na doxorubicin, vincristin, cisplatinu, UKF-NB4- kromě uvedených rezistencí i na BSRnázu. Dále jsme použili promyelocytární linii HL 60 sensitivní a lymfomovou linii 1SUNHL

3.1.2. Kultivace a zpracování

Buněčné linie:

Buněčné linie jsme kultivovali v inkubátoru (IGO150) při 37°C bez přítomnosti CO₂ v médiu o tomto složení: roztok IMDM 250ml, 10% fetální sérum 25ml, 2% glutamin 5ml, 4% NaHCO₃ 10ml, 1% gentamycin 2,5ml (4mg/ml) v kultivačních lahvích s plochou 25 cm². Linie jsme pasážovali cca 2x týdně podle nárůstu kultury. K uvolnění přisedlé kultury jsme použili trypsin, k promývání PBS. Odebranou kulturu jsme seškrábali ze dna kultivační láhve, přidali PBS a centrifugovali při 1500 ot/min. Promytí jsme 2x zopakovali, přenesli jsme vzorek do centrifugační zkumavky, opět centrifugovali, slili PBS a zamrazili v -80°C nebo ihned použili k izolaci RNA.

Vzorky :

Zpracování:

Zkumavky se vzorky periferní krve jsme doplnili lyzačním roztokem. Inkubovali jsme je při pokojové teplotě minimálně 10 minut do rozpadnutí erytrocytů, centrifugovali 1500ot/min a zpracovávali dále stejně jako buněčné linie. Vzorky nádorové tkáně bylo možné ihned izolovat. Vzorky kostní dřeně jsme zpracovávali obdobně jako periferní krev.

Lyzační roztok: NH₄Cl, NH₄HCO₃, 0,1M EDTA, pH 8,0; doplnit do 500 ml destilovanou H₂O.

3.2.1. Izolace celkové RNA

Princip:

Buňky jsou lyzovány, fenol-chloroformovou extrakcí se separují fáze vodní (obsahuje RNA) a organická, z vodní fáze se RNA vysráží isopropylalkoholem.

Materiál:

chemikálie: TRIZOL®Reagent (GIBCO BRL), chloroform, ethanol 99% (Merck), isopropylalkohol (Fluka)

roztoky:

1) 0,5M EDTA pH 8,0 ; sterilní:

EDTA.....18,6g

H₂O.....do 80ml

PH upravit pomocí NaOH na 8,0

následně autoklávovat

skladovat při laboratorní teplotě

2) 10x TBE á 500ml:

TRIS.....54g

Kyselina boritá27,5g

0,5M EDTA pH 8,0.....20ml

destilovaná H₂O.....doplnit do 500ml

skladovat při laboratorní teplotě

spotřební materiál: špičky (1000µl, 200µl, 10µl), mikrocentrifugační

zkumavky (1,5ml), vše sterilizované v autoklávu

přístroje: vortex, chlazená centrifuga, mikropipety (Eppendorf), autokláv Heraeus Instruments (FuncinLine), sterilizátor Vacusteri/P (BMT a.s. Brno)

Postup:

Izolaci celkové RNA jsem provedla modifikovanou metodou podle Chomczynského a Sacchiho (CHOMCZYNSKI a SACCHI 1987). Abych minimalizovala možnost přenosu RNA či cDNA z jednoho vzorku do druhého či kontaminaci vzorků produkty předchozích reakcí, prováděla jsem jednotlivé metody v oddělených prostorech: v místnosti 1- zpracování buněk a izolace RNA (laminární box), v místnosti 2- gelová elektroforéza, v místnosti 3- reverzní transkripce a vlastní PCR, v místnosti 4- příprava směsi pro reverzní transkripci a amplifikaci (laminární box), v místnosti 5- přidání RNA do RT směsi a cDNA do amplifikační směsi. V laminárním boxu v místnosti 1 jsem ke 150 μ l vzorku přidala 1000 μ l lyzačního činidla Trizol® a za občasného protřepání nechala působit cca 0,5-3 h dokud se tkáň či buňky úplně nerozpadly. Poté jsem přidala 200 μ l chloroformu a protřepávala na Vortexu minimálně 15s. Vzorky jsem inkubovala 5 min při pokojové teplotě. Zkumavky jsem poté přenesla do centrifugy předem vychlazené na 4 °C a centrifugovala 15 min při 13500ot/min. Suspenze se rozdělila na 3 fáze: spodní fenol-chloroformovou proteinovou fázi, interfázi obsahující DNA a horní vodní fázi s RNA. Vodní fázi jsem přenesla tak, abych ji nekontaminovala interfází, do sterilní zkumavky a precipitovala RNA přidáním 500 μ l isopropylalkoholu. Vzorky jsem nechala inkubovat 15 min při pokojové teplotě a poté jsem je centrifugovala 20 min při 12000 ot/min. Supernatant jsem slila a po přidání 1ml 70% ethanolu pro promytí RNA pelety jsem centrifugovala dalších 5 min při 12000 ot/min. Po odstranění supernatantu jsem nechala RNA pelety sušit 5 min při pokojové teplotě. Po vysušení jsem pelety rozpustila v 40 μ l sterilní vody ve vodní lázni při 55°C. Z každého vzorku jsem odebrala 4 μ l RNA a přidala 6 μ l TBE pufru do sterilní zkumavky a ponechala je na elektroforézu. Zbytek jsem rozdělila na 18 μ l aliquoty a zamrazila je při -80°C.

3.2.2. Průkaz přítomnosti RNA metodou gelové elektroforézy

Princip:

Nukleové kyseliny migrují díky svému negativnímu náboji v elektrickém poli směrem ke katodě. Rychlost pohybu molekul NK závisí na koncentraci gelu a na velikosti

a konformaci nukleové kyseliny. Po obarvení gelu se vzorky ethidium bromidem je možné RNA vizualizovat pod UV zářičem. Sledovali jsme přítomnost pruhů ribozomální RNA a difúzní pás mRNA.

Materiál:

Roztoky:

1) TBE pufr 10x koncentrovaný

Tris.....54,0g

H₃BO₃.....27,5g

EDTA pH 8,0.....20ml

Doplnit do 500ml.....dest H₂O

Uchovávat při +4°C

2) PBS pufr:

NaCl.....8,0g

KCl.....0,2g

Na₂HPO₄ krystal.....2,16g

H₂O.....ad 1000ml

pH 7,2-7,4

3) Agaróza (GIBCO BRL, Life technologies) Ultrapure

Ethidium bromid

Spotřební materiál: centrifugační zkumavky Eppendorf (1,5ml), špičky (sterilizované v autoklávu)

Přístroje:

digitální váhy (Scaltec), mikrovlnná trouba, aparatura pro horizontální elektroforézu Bio-Rad Power Pac 300 s nádobou Mini-sub® cell GT, mikropipety, transiluminátor s možností fotodokumentace pomocí programu QuantityOne®Quantitation Software(Bio-Rad) a nástroje GelDoc1000/2000

Postup:

Elektroforézu jsem prováděla v místnosti 2 (viz.3.2.1.). Navážila jsem si 0,3g agarózy a 20ml TBE pufru, směs rozvařila a směs nalila na nosič gelu, vložila do něj „hřeben“ a nechala ztuhnout 30 min. Nosič jsem vložila do elektroforetické vany naplněné TBE tak, aby jamky pro vzorky jím byly převrstvené a vyndala „hřeben“. 10μl vzorku jsem smíchala s 3μl vkladacího pufru a 11μl směsi nanasla na gel. Vzorky jsem separovala

cca 15 min při 70V. Gel jsem barvila 15 min v roztoku ethidium bromidu. Po opláchnutí destilovanou vodou jsem analyzovala přítomnost RNA na transiluminátoru pod UV s využitím softwaru Quantity One-GelDoc.

3.2.3. Převod RNA na cDNA metodou reverzní transkripce

Princip:

Při reverzní transkripci se obvykle vychází z mRNA, podle které se syntetizuje řetězec cDNA (komplementární DNA) pomocí RNA dependentní DNA polymerázy. S využitím náhodných krátkých primerů vzniká hybridní molekula DNAxRNA. RNA lze odstranit od DNA denaturací při zvýšené teplotě.

Materiál:

TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Perkin Elmer, Roche,USA) obsahuje:

10x koncentrovaný PCR pufr

25 mM MgCl₂ (finální koncentrace 5,5mM)

dNTP mix (500μM per dNTP)

Random Hexamers (2,5μM)

RNase Inhibitor (0,4 U/μl)

MultiScribe reverzní transkriptasa (3U/μl)

RNase free H₂O

Spotřební materiál: mikrozkušavky pro PCR 0,2 ml, špičky (sterilizované v autoklávu)

Přístroje: mikropipety, termocykler GeneAmp Systém 2400 (Perkin Elmer)

Postup:

V místnosti 3 (viz.3.2.1.) jsem si připravila v laminárním boxu směs pro reverzní transkripci. Reagencie jsem pipetovala do sterilní zkumavky (1,5ml) umístěné ve stojánku na ledu a doplnila sterilní vodou na požadovaný objem (viz.Tabulka 1). Směs pro reverzní transkripci jsem rozplnila do sterilních PCR mikrozkušavek (0,2ml) po 47μl.

V místnosti 4 jsem ke směsi přidala 3μl izolované RNA. Vedle testovaných vzorků jsem do každého pokusu zařadila negativní kontrolu (místo 3μl RNA stejné množství sterilní vody).

Reverzní transkripce probíhala v místnosti 3, kde jsem mikrozkušavky se vzorky vložila do termocykleru a zadala program pro konkrétní pokus:

Podmínky amplifikace:

1. 10min/25°C (denaturace a annealing připojení náhodných primerů)
2. 60min/37°C (enzymatická syntéza DNA podle RNA)
3. 5min/95°C (odstranění RNA z DNAXRNA hybridu denaturací při vysoké teplotě a denaturace enzymu)
4. 4°C (zastavení reakce)

Po provedené transkripci jsem cDNA uchovávala v mrazničce při -20°C.

Tabulka 1. Reakční směs pro N vzorků (RT)

	1 vzorek a' 50µl	Finální koncentrace složek v reakci	N vzorků a' 50µl
10 x RT pufr	5	1 x	5 x N
25 mM MgCl ₂	11	5,5 mM	11 x N
DNTP mix	10	500 µM per dNTP	10 x N
Random hexamery	2,5	2,5 µM	2,5 x N
RNase inhibitor	1	0,4 U/µl	1 x N
Multiscribe RT	3	3 U/µl	3 x N
mezisoučet	32,5		32,5 x N
—	—	—	—
RNA vzorek	3	—	3
H ₂ O (bez Rnáz)	14,5	—	14,5 x N
celkem	50 µl	—	50 x N

3.2.4. Stanovení poměru Bax/Bcl-2 metodou kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (Q-RT PCR)

Princip:

Q-RT PCR (viz. 3.1.) je modifikovaná PCR reakce, která využívá fluorogenní sondy nesoucí na svých koncích fluorofor a zhášec. Sonda specificky hybridizuje s cílovou

sekvencí na DNA. Speciální termostabilní Taq polymeráza svou exonukleázovou aktivitou sondu rozštěpí, čímž se uvolní fluorofor od zhášeče a vzniká fluorescenční signál. Množství fluorescence z uvolněných fluoroforů odpovídá počtu dokončených kopií amplifikované DNA.

Materiál:

1) TaqMan Universal PCR Mastermix: reakční mix pro TaqMan metodu bez uracil-N-glykosylázy, 200 reakcí po 50 µl obsahuje: AmpliTaq Gold® DNA polymeráza, AmpErase® UNG, deoxynukleotidtrifosfáty (včetně dUTP), pasivní reference 1 (ROX), optimalizované pufrovací složky

2) směs Sequence Detection primeru (4 nmol, oligonukleotid dle zadané sekvence, malá škála) a Taqman sondy (5-6 nmol, zhášeč TAMRA, dle zadané sekvence, malá škála) purifikované na HPLC

Sekvence sond: použili jsme komerční soupravu s již navrženými primery

Spotřební materiál: ABI Prism optické destičky (96 označených jamek), MicroAmp optické zkumavky, MicroAmp optická víčka (8 ks/ proužek)

Přístroje: laminární box, Vortex technokartell TK3S (35Hz), Centrifuge Eppendorf 5415R, ABI Prism® 7700 Sequence Detector

Software: ABI PRISM Sequence Detection Systém 1.9.1 Version

Postup:

V místnosti 3 (viz.3.2.1.) jsem si v laminárním boxu připravila amplifikační směs. Reagencie jsem pipetovala do 4 označených zkumavek (GAPDH, 18sRNA, Bax, Bcl-2) podle schématu (viz. Tabulka 2). Všechny složky bylo nutné uchovávat na ledu. Směs jsem jemně protřepala, centrifugovala a poté rozpipetovala do označených optických zkumavek po 23µl.

V místnosti 4 jsem do každé zkumavky přidala cDNA z reverzní transkripce (každý vzorek v dubletu). Výjimkou byla cDNA pro 18sRNA, kterou bylo nutné 1000x zředit vzhledem k vysokému obsahu 18sRNA v buňce. Ředila jsem 998 µl sterilní vody 2µl cDNA, čímž jsme při měření dosáhli optimálních hodnot v oblasti kolem 20.cyklu amplifikace. Zkumavky jsem uzavřela optickými víčky, stočila a vložila do komory přístroje ABI Prism ® 7700 Sequence Detector. S využitím softwaru Sequence Detectin

System 1.9.1. Version jsem zadala údaje o složení vzorků, použitých sondách, vnitřní kontrole a teplotních podmínkách amplifikace.

Podmínky amplifikace:

1. 2min / 50°C, tento krok je nezbytný pro optimální aktivitu AmpErase®UNG
2. 10min / 95°C, tento krok je požadován pro aktivaci AmpliTaq Gold DNA polymerázy
3. 15s / 95°, 40-45 opakování
4. 1min / 60°C

Tabulka 2. Amplifikační směs pro 5 vzorků o objemu 25μl

	Pro přípravu 1 vzorku (25μl)	Pro přípravu 5 vzorků (25μl)
H ₂ O	11,25- Y (8,25 μl)	41,25
2 x Taqman UM Mix	12,5	62,5
20 x primery + sonda	1,25	6,25
—	—	—
cDNA	Y (2,0 μl)	2,0
Celkem	25	5 x 25 μl

Po provedené amplifikaci jsem vzorky neuchovávala.

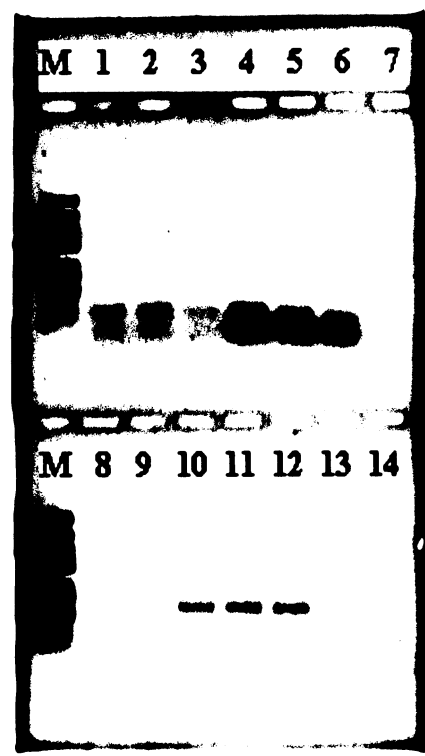
4. VÝSLEDKY

4.1. Optimalizace reakce

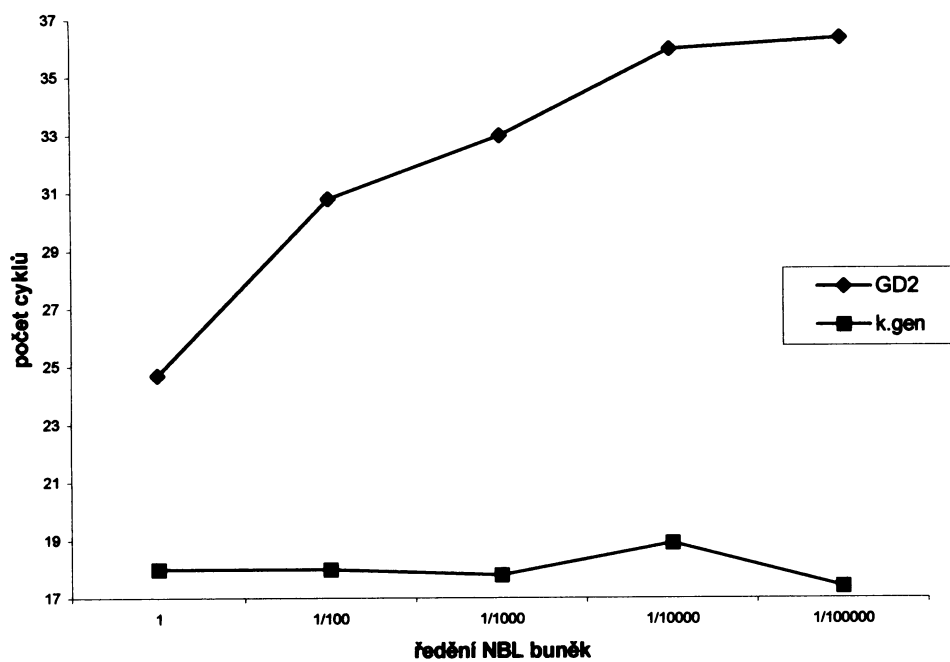
Po amplifikaci cDNA jsem sledovala účinnost komerčních kitů, zejména specifitu primerů. Pomocí gelové elektroforézy jsem si ověřila přítomnost specifických fragmentů odpovídajících expresi kontrolních genů GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza), 18sRNA a sledovaným genům Bax, Bcl-2 (viz obr.4)

První dvě měření prokázala, že obsah 18sRNA ve vzorcích mnohonásobně převyšoval obsah mRNA pro GAPDH, Bax a Bcl-2 a snižoval tak spolehlivost výsledků měření. Amplifikaci cDNA pro 18sRNA a tedy nárůst fluorescence jsme prokázali již v 8.-10. cyklu PCR v reálném čase. Za optimální a spolehlivé se ovšem považují hodnoty až od 15. cyklu výše (viz. Příloha). Rozhodla jsem se proto vzorky cDNA před přidáním do amplifikační směsi zředit 1000x tj. 2 μ l cDNA + 998 μ l H₂O. Tímto jsem dosáhla optimální amplifikace kolem 18. až 20. cyklu.

V tomto pokusu jsem se zaměřila na otestování citlivosti metody PCR v reálném čase. Připravila jsem směs buněčné kultury odvozené od neuroblastomu exprimující GD2 syntázu (enzym specifický pro neuroblastomové buňky) s leukocyty zdravého dobrovolníka které tento enzym neexprimují (viz. graf. 1.). Obě populace exprimují GAPDH, který posloužil jako endogenní kontrola. Z hodnot bylo možné určit, že PCR v reálném čase spolehlivě změří přítomnost určité sekvence v koncentraci 1/100 000 buněk (i když se předpokládá vyšší tj. až 1/1000 000).



Obr. 4. Ověření specifity reakce PCR v reálném čase gelovou elektroforézou. Můžeme rozlišit 4 různé fragmenty získané z rezistentních neuroblastomových linií: dráha M-marker, dráhy 1 až 3- Bax, dráhy 4-6-Bcl-2, dráhy 7-9-GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza), dráhy 10-12-18sRNA, dráhy 13-14-Bax.

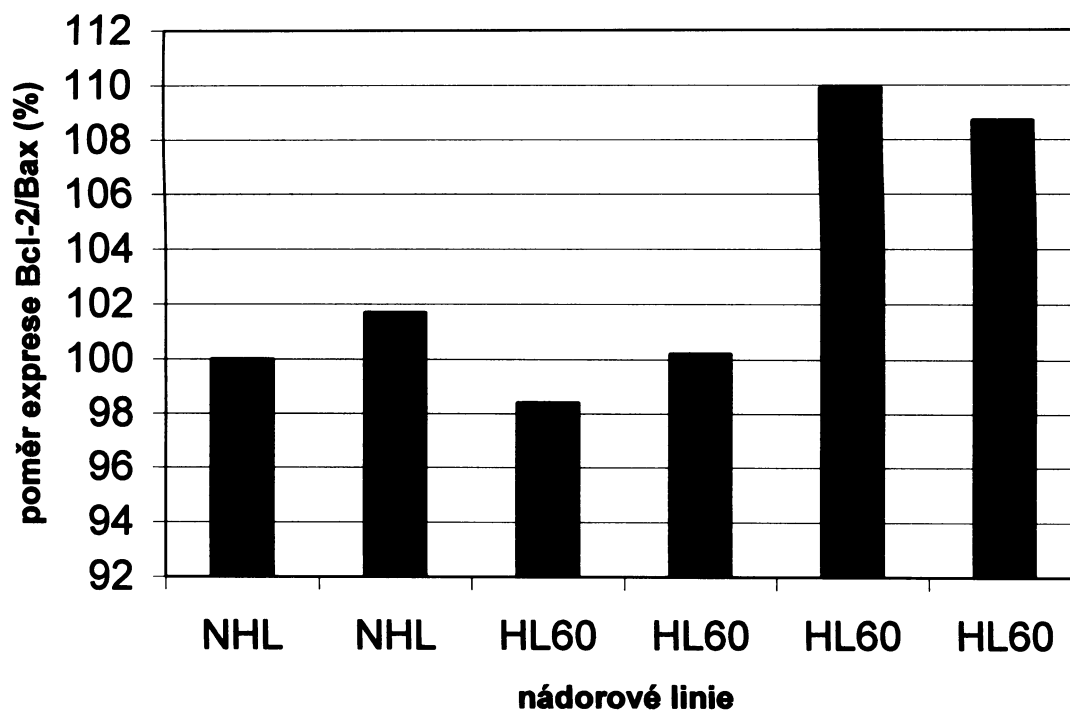


Graf 1. Měření citlivosti PCR v reálném čase dilučním testem. NBL kultura s expresí GD2 syntasy byla ředěna leukocytární kulturou bez exprese GD2 syntasy. Jako kontrola byla měřena exprese GAPDH.

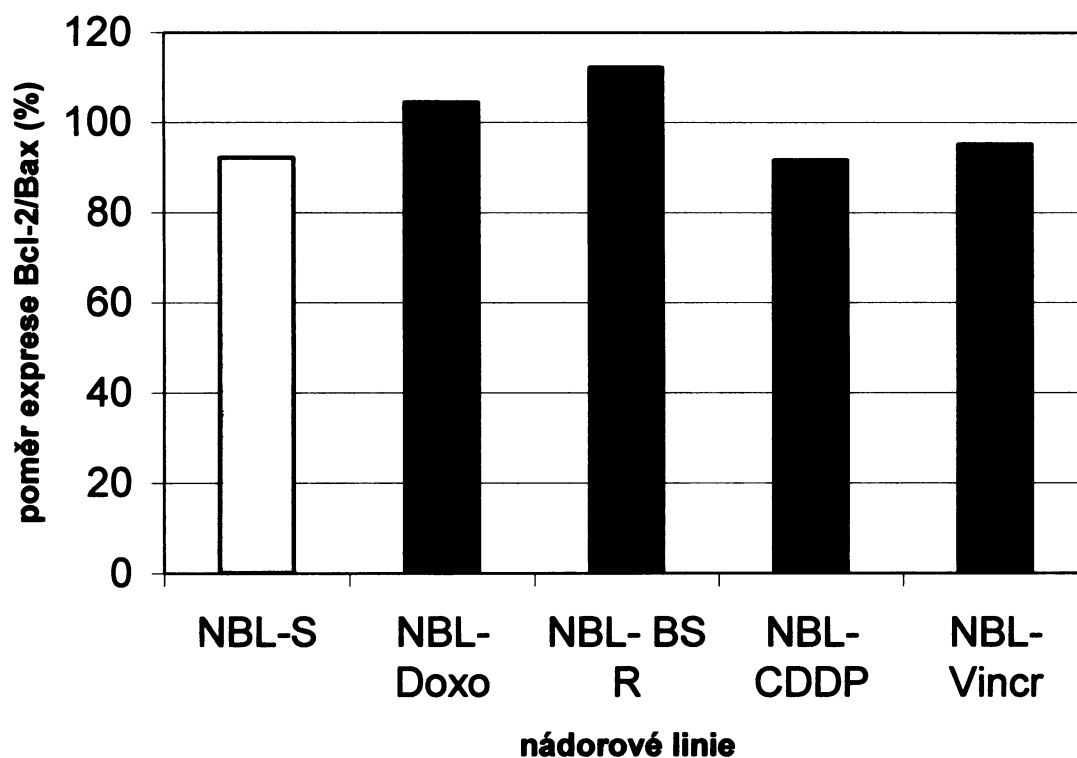
4.2. Exprese Bcl-2 a Bax u nádorových linií

Experimenty sledující expresi Bax a Bcl-2 navazují na předchozí poznatky. Zvýšená exprese Bcl-2 byla prokázána u některých krevních malignit jako je folikulární lymfom (skupina NHL), akutní a chronická myeloidní leukémie, akutní a chronická lymfoblastická leukémie (NOVOSAD *et al.* 2002) a dále také u promyelocytární linie HL60. Vzhledem k tomu, že i solidní tumory vykazují mnohočetnou lékovou rezistenci, předpokládali jsme, že i zde se může uplatnit mechanismus, kdy je ovlivněna regulace apoptotické dráhy. Kromě výše uvedených krevních malignit jsme se zaměřili také na buněčné linie odvozené od neuroblastomu a to jak na senzitivní, tak rezistentní na často používaná cytostatika doxorubicin, vincristin, cisplatinu. Kromě toho jsme získali i neuroblastomovou linii rezistentní na BS-RNázu (poskytl MUDr. Jaroslav Činátl, CSc). BS-RNáza je dimerní homolog pankreatické ribonukleázy A se specifickou protinádorovou aktivitou. Selektivně zabíjí buňky některých nádorů, proto se předpokládá, že by se BS-RNáza mohla v budoucnu stát součástí protinádorové terapie (ČINÁTL *et al.* 1999). Nicméně i zde bylo nutné ověřit vytvoření rezistence.

Metodou PCR v reálném čase jsme potvrdili zvýšenou expresi Bcl-2 u senzitivních buněk promyelocytární linie HL60 u 3 vzorků (75%) a lymfomové linie non-Hodgkinského typu u 2 vzorků (100%) (viz. graf 2.) Vysokou expresi Bcl-2 jsme prokázali u buněčných linií odvozených od neuroblastomu s navozenou rezistentních na cytostatika doxorubicin 3 vzorky (75%), vincristin 1 vzorek (20%) a BS-RNázu 3 vzorky (100%). Významné bylo i zjištění, že neuroblastomové buněčné linie u kterých nebyla experimentálně navozena chemorezistence zvýšení Bcl-2 nevykazovaly (viz. graf 2. a 3.) (linie poskytl MUDr. Jaroslav Činátl, CSc). U těchto linií rezistentních k vincristinu a doxorubicinu jsme prokázali zvýšenou expresi a funkci P-glykoproteinu (CD 243) i amplifikaci genu MDR-1, který P-glykoprotein kóduje (nepublikované údaje M.Čermáková, A.Vícha). Ukazuje se tedy, že na vzniku chemorezistence nádorových buněk se podílí více mechanismů.



Graf 2. Poměr exprese Bcl-2/Bax u lymfomové linie (NHL- non-Hodgkin lymfom) a promyelocytární linie HL60.



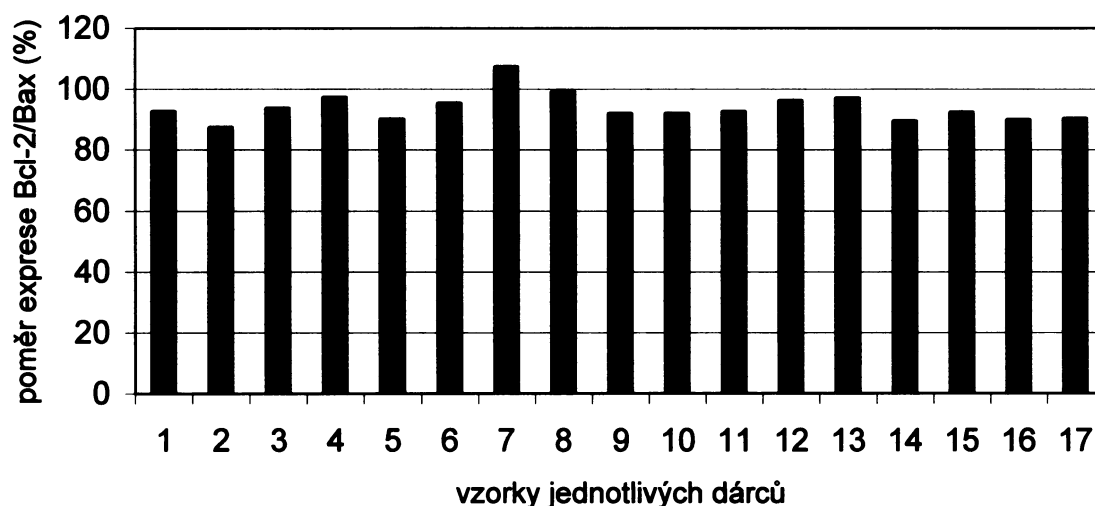
Graf 3. Porovnání poměru exprese Bcl-2/Bax neuroblastomové nádorové linie senzitivní s liniemi chemorezistentními (NBL-S- linie senzitivní, NBL-Doxo- linie s rezistencí na doxorubicin, NBL-BS R- linie s rezistencí na BS Rnázu, NBL-CDDP- linie s rezistencí na cisplatinu, NBL-Vincr- linie s rezistencí na vincristin)

4.3. Exprese Bcl-2 a Bax u zdravých dárců a u pacientů

Po zavedení a optimalizaci metodiky PCR v reálném čase a na základě výsledků získaných měření exprese Bcl-2 a Bax u nádorových linií jsme se zaměřili na skupiny pacientů s odpovídajícím nádorovým onemocněním a na vliv chemoterapie na vznik mnohočetné lékové rezistence u těchto pacientů.

4.3.1. Buňky zdravých jedinců bez nádorového onemocnění

Pro stanovení fyziologické exprese Bcl-2 jsem vyšetřila vzorky 17 dárců bez nádorového onemocnění. Vycházeli jsme z předpokladu, že dochází-li heterodimerizací Bcl-2 a Bax k neutralizaci jejich aktivit, čímž se udržuje rovnováha proapoptotických a protiapoptotických signálů v buňce, měl by být fyziologický poměr těchto proteinů menší nebo roven 1 tj. 100% a méně. U 16 vzorků (94,1%) jsem neprokázala zvýšenou expresi Bcl-2, u 1 vzorku (5,9%) jsem naměřila expresi 107,4% (viz graf 4.). Vzhledem k tomu, že nebylo možné vyšetření zopakovat pro nedostatek biologického materiálu, lze předpokládat, že výsledek u tohoto vzorku mohl být ovlivněn v preanalytické fázi (odběr, transport a skladování vzorku) nebo chybou při měření. Nicméně nelze vyloučit ani to, že tato osoba vykazuje nefyziologickou expresi Bcl-2 bez známé příčiny, která tento stav vyvolala.



Graf 4. Poměr exprese genů Bcl-2/Bax u zdravých dárců tj. bez nádorového onemocnění. V pokusu byly použity buňky kostní dřeně periferní krve. Za patologickou hranici považujeme poměr vyšší než 100%.

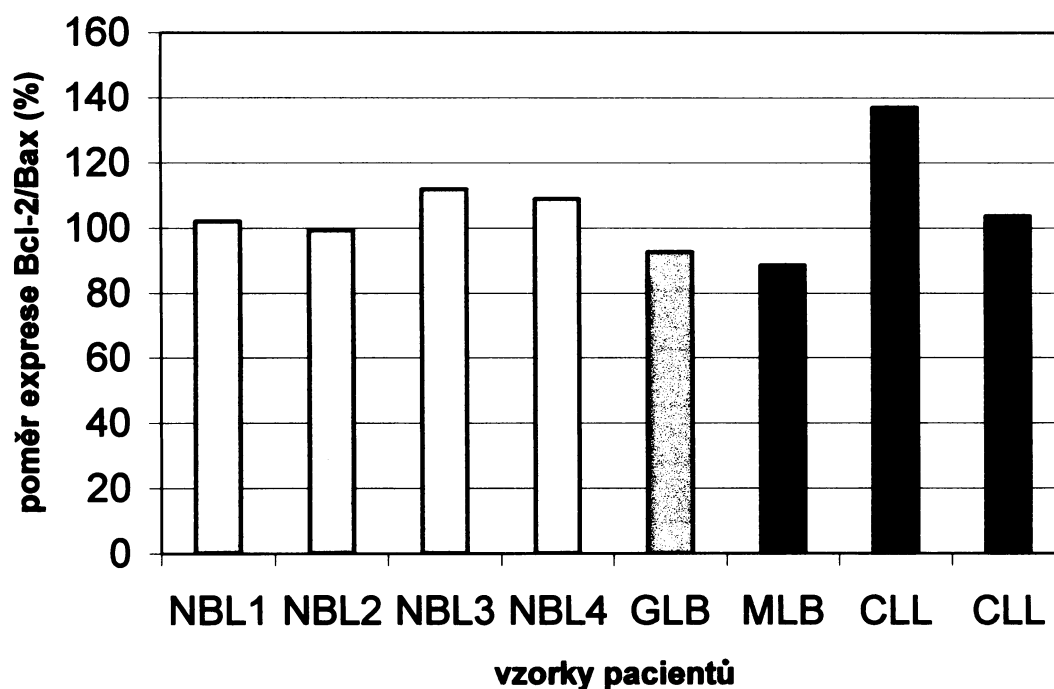
4.3.2. Buňky pacientů s nádorovým onemocněním

Pro stanovení patologické exprese jsem vyšetřila: 4 vzorky neuroblastomu, 10 vzorků Ewingova sarkomu, 2 vzorky chronické lymfoidní leukémie, 7 vzorků lymfomu non-Hodgkin typu, 1 vzorek glioblastomu a 1 vzorek meduloblastomu.

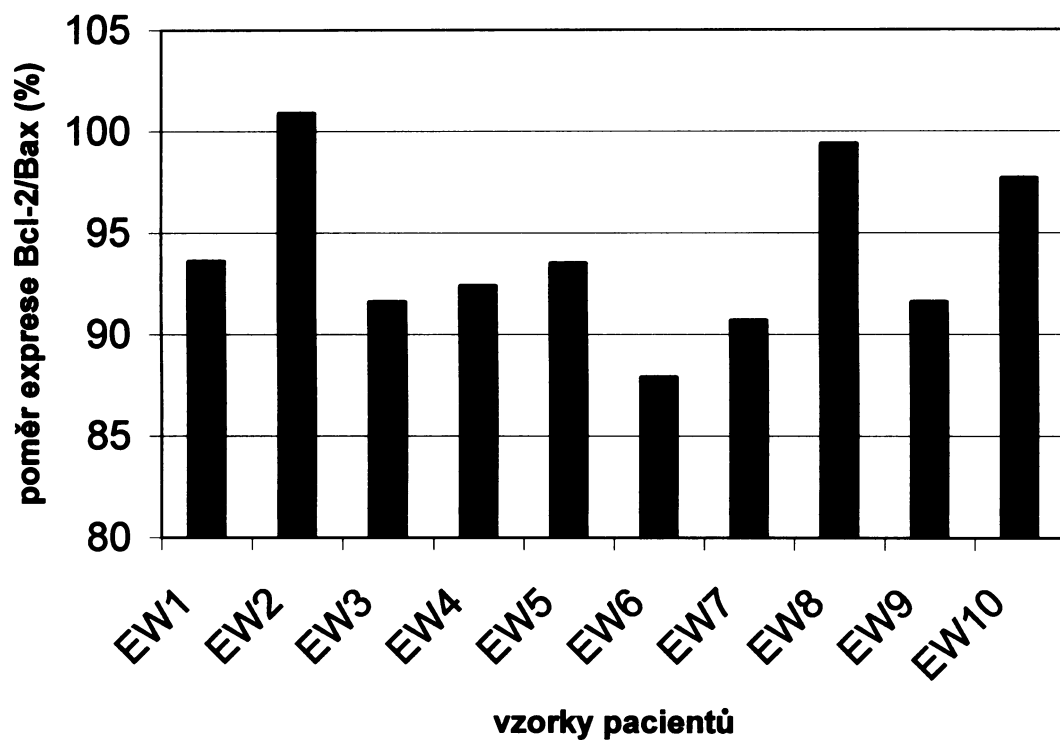
U neuroblastomových vzorků jsme prokázali zvýšenou expresi Bcl-2 u 3 pacientů (75%). Měření u pacientů s meduloblastomem a glioblastomem neprokázala zvýšení poměru Bcl-2/Bax. U pacientů s chronickou myeloidní leukémií jsme naměřili patologickou hodnotu Bcl-2 v obou případech (100%), u jednoho z nich navíc nejvyšší hodnotu vůbec (Bcl-2/Bax 137,1%) (viz graf 5.)

U pacientů s Ewingovým sarkomem jsme naměřili vyjma 1 případu (10%) fyziologickou hranici exprese Bcl-2 (90%) (viz graf 6.)

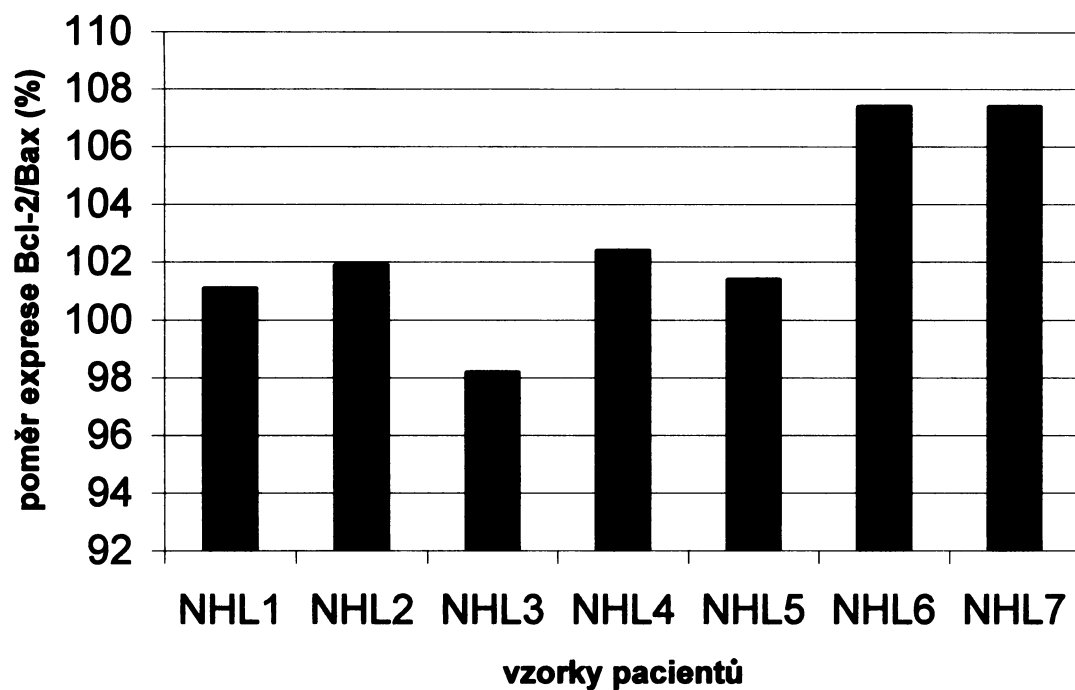
Vzorky pacientů s non-Hodgkinským lymfomem vykazovaly vyjma jednoho případu (14%) patologickou expresi Bcl-2 (86%) (viz graf 7.).



Graf 5. Poměr exprese Bcl-2/ Bax u pacientů (NBL- neuroblastom, GLB-glioblastom, MLB-medulloblastom, CLL-chronická lymfoidní leukémie).

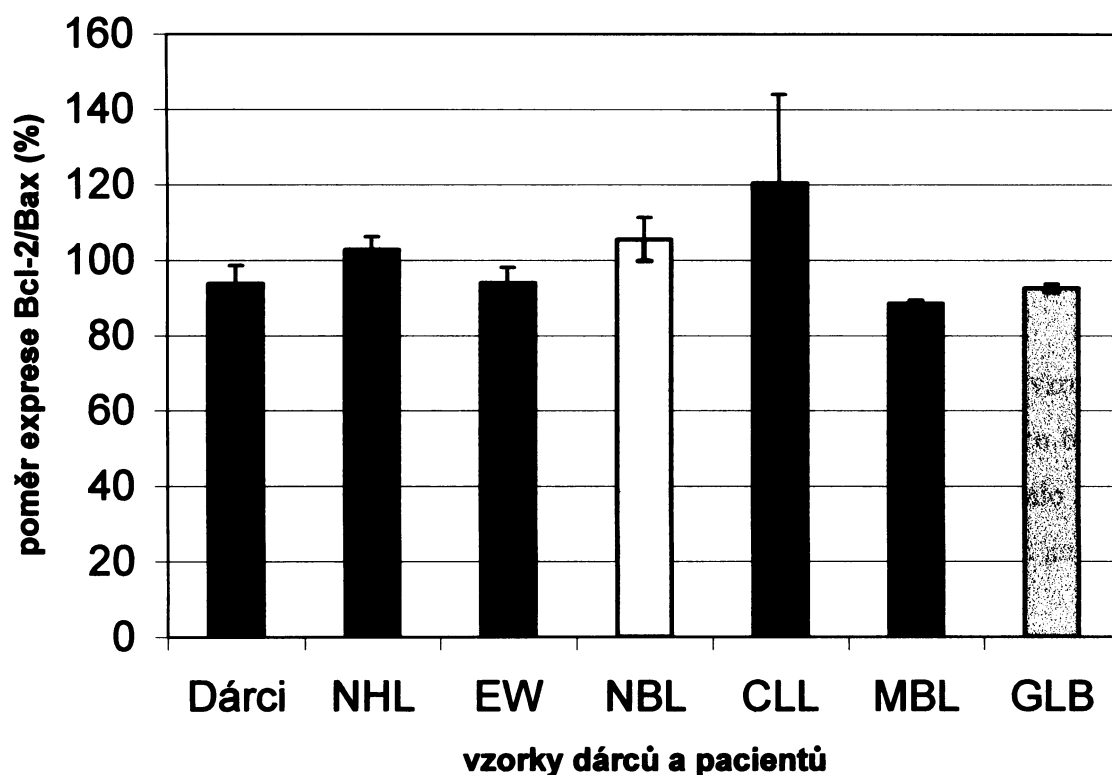


Graf 6. Poměr exprese Bcl-2/Bax u pacientů (EW- Ewingův sarkom).



Graf 7. Poměr exprese Bcl-2/Bax u pacientů (NHL-non Hodgkinův lymfom)

Porovnali jsme všechny získané hodnoty ze vzorků dárců i pacientů s nádorovým onemocněním. Přes fyziologickou hranici 100% poměru Bcl-2/Bax se dostaly vzorky non-Hodgkinského lymfomu, neuroblastomu a chronické lymfoidní leukémie (viz graf 8.). U těchto nádorů můžeme předpokládat vliv Bcl-2 na jejich rezistenci vůči cytostatikům. Bcl-2 se dostává z vlivu regulace proteinu Bax a záleží na ostatních proapoptotických proteinech a dalších ochranných mechanismech buňky, zda dokáže deregulovaný Bcl-2 blokovat a podstoupit pod vlivem cytostatik apoptózu nebo zda se apoptóza zablokuje a nádorová buňka získá selekční výhodu, bude neomezeně proliferovat a cytostatikům odolá.



Graf 8. Porovnání poměrů exprese Bcl-2/Bax u dárců a pacientů s nádorovým onemocněním (NHL- non-Hodgkinův lymfom, EW- Ewingův sarkom, NBL- neuroblastom, CLL- chronická lymfoidní leukémie, MBL- meduloblastom, GLB- glioblastom)

5. DISKUSE

V posledních letech dochází k významnému pokroku ve studiu mechanismů mnohočetné lékové rezistence, která je jednou z hlavních příčin selhání protinádorové léčby. Pochopení způsobů, jakým nádorové buňky odolávají cytostatické léčbě, může přinést nové možnosti při hledání účinnější terapie. Jedním z těchto mechanismů je ovlivnění procesů vedoucích k programované buněčné smrti-apoptóze. Právě studium některých proteinů apoptotické dráhy ve vztahu k chemorezistenci nádorů bylo tématem této práce.

5.1. Metodické aspekty studia exprese apoptotických genů

Důležitým znakem nádorových buněk je jejich vysoká proliferace. Této schopnosti mohou dosáhnout pouze za předpokladu, že obejdou nebo přímo inaktivují regulační mechanismy buňky a uniknou dozoru imunitního systému. Tímto se vyhnou iniciaci programované buněčné smrti - apoptóze, ke které dochází běžně u buněk vymykajících se předem stanovenému standardu. Apoptóza je proces nezbytný pro existenci organismu.

Zájem o apoptózu a její regulaci v souvislosti s nádorovým bujením vzrostl po objevu protiapoptotického proteinu Bcl-2 (TSUJIMOTO *et al.* 1984). Poté, co byla v dalších letech objasněna jeho struktura a funkce (SATTLER *et al.* 1987), začalo být zřejmé, že zásadní úlohu v regulaci apoptózy hraje množství Bcl-2 v poměru k jiným regulačním proteinům.

V současné době jsou běžně používané 4 metody umožňující kvantifikovat úroveň transkripce specifických genů: *northern blotting* a *in situ* hybridizace (PARKER a BARNES 1999), *RNase protection assay* (HOD 1992, SACCOMANNO *et al.* 1992) a reverzní transkripce s polymerázovou řetězovou reakcí (RT PCR). Pátá metoda tzv. cDNA microarrays (BUCHER 1999) je zatím stále finančně náročná. Analýza *northern* podává pouze informaci o velikosti mRNA, alternativním sestřihu a integritě RNA vzorku. Metoda *RNase protection* je vhodná pro mapování iniciačních a terminačních míst transkripce a pro odlišení dvou příbuzných mRNA, které migrují na stejné pozici na *northern* blotu. *In situ* hybridizace, ač nejkompexnější, umožňuje pouze lokalizaci transkriptů do specifických buněk v rámci tkáně. Navíc všechny tyto metody jsou málo citlivé.

RT PCR je *in vitro* metoda pro enzymatickou amplifikaci specifické sekvence RNA. Umožňuje odlišit blízce příbuzné mRNA, analyzovat RNA strukturu, porovnat úroveň mRNA vzorků z různých buněčných populací. Prvním krokem je vždy přepis RNA templátu do cDNA, po kterém následuje exponenciální amplifikace v PCR reakci. Tato metoda je v současné době nejpoužívanější, nicméně i ona má své nevýhody. Vzhledem k inhibitoru polymerázy přítomnému v reakci, k limitaci reagensů a k akumulaci molekul pyrofosfátu, může dojít k zastavení PCR reakce v exponenciální fázi a vzniká tzv. *plateau* fáze. Každá reakce PCR může generovat odlišné množství produktu. Z tohoto faktu vyplývá, že kvantifikace konečného produktu je nespolehlivá.

Jelikož v naší studii šlo právě o co nejpřesnější kvantifikaci, rozhodli jsme se zavést a optimalizovat v naší laboratoři metodiku PCR v reálném čase. Výhodou této metody je, že k měření produktu dochází v době, kdy stále dochází k amplifikaci tj. v exponenciální fázi. Pouze v průběhu exponenciální fáze lze navíc extrapolací určit počáteční množství templátu.

Dále bylo nutné rozhodnout o zdroji emitujícím fluorescenci. Jednou z možností je použití DNA vazebného barviva SYBR Green. Výhodou této metody je, že není nutné navrhovat specifické sondy. SYBR Green se váže do malého žlábků veškeré dvoušroubovicové DNA přítomné ve vzorku. Nevýhoda spočívá v neschopnosti tohoto barviva rozlišit artefakty. Navíc je nutné optimalizovat podmínky tak, aby nedocházelo k vytváření primer-dimerů (BUSTIN 2000). Zvolili jsme proto druhou variantu a to hybridizační sondy TaqMan. Tato sonda hybridizuje s templátem specificky mezi primery a její fluorescence je závislá na 5'-3' exonukleázové aktivitě Taq DNA polymerázy (GIBSON *et al.* 1996, HEID *et al.* 1996). Polymeráza sondu štěpí a uvolní tak fluorofor na 5'konci od zhášeče na 3'konci. Takto jsme dosáhli vysoké specifity měření a tím i vyšší spolehlivosti výsledků.

5.2. Exprese Bcl-2 a Bax u nádorových a nenádorových buněk

Cytostatické látky poškozují buňku na mnoha různých místech. Určují její osud tím, že naruší rovnováhu mezi proapoptotickými a protiapoptotickými stimuly. Přežití buňky je určováno jak vnějšími, tak vnitřními signály. Vnitřní aktivity mohou být modifikovány zvnějšku působením rozpustných cytokinů, růstových faktorů, mezibuněčnými kontakty atd. Na buněčné úrovni se dále uplatňují proteiny rodiny Bcl-2, jejichž interakce dále určují práh přežití buňky. Při dostatečném poškození buňky

dojde k vytvoření apoptozómu, uvolnění cytochromu c a k aktivaci kaspáz. Právě aktivace apoptózy je zřejmě klíčovým mechanismem v souvislosti s lékovou rezistencí. Většina studií se dosud zaměřovala pouze na Bcl-2, nicméně se ukazuje, že citlivost buněk k cytostatické léčbě nelze předpovídat pouze z obsahu Bcl-2 (LUO *et al.* 2000, VIOLETTE *et al.* 2002), ale je nutné zahrnout i další proteiny, které spolu vzájemně interreagují. Nejvhodnějším adeptem je protein Bax, protože působí antagonisticky vůči aktivitě Bcl-2 (LUO *et al.* 2000, BEIERLE *et al.* 2003).

Větší část prací se zaměřuje na detekci Bcl-2 u krevních malignit jako jsou akutní lymfoblastické (HAARMAN *et al.* 1999) a myeloblastické leukémie (KOHLENER *et al.* 1999), chronické lymfocytární leukémie (KARNOLSKY *et al.* 1999) a B a T buněčné lymfomy. Zde je zřejmá větší dostupnost vzorků i rozsáhlejší soubory pacientů.

Tato práce se zaměřuje především na solidní nádory, i když jsme zahrnuli i několik vzorků hemoblastóz a hemoblastomů, zejména pro korelaci výsledků s jinými studii.

Jako kontrolní skupinu pro stanovení fyziologické exprese jsme vybrali dárce bez nádorového onemocnění. Až na jednu výjimku byla exprese Bcl-2 nižší než exprese proapoptického proteinu Bax., takže náš předpoklad o poměru Bcl-2/Bax menším než 100% byl zřejmě správný. Pro stanovení patologické exprese jsme zvolili promyelocytární linii HL60, která vykazuje zvýšenou expresi Bcl-2 a je často používána jako pozitivní kontrola (LUO *et al.* 2000). U HL60 nemá Bcl-2 vliv na schopnost podstoupit apoptózu (WU a EL-DEIRY 1996, DURRIEU *et al.* 1999), nicméně pro nás bylo nezbytné určit, co je „zvýšená“ a co fyziologická exprese.

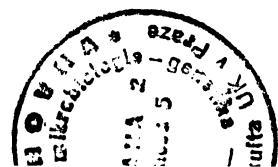
U pacientů jsme se nejprve zaměřili na neuroblastom (NBL). Neuroblastom nejčastější extrakraniální maligní nádor u dětí pod 5 let věku. Jeho charakteristickým znakem je heterogenní chování, kdy v některých případech dojde ke spontánní regresi i v metastazující fázi. U jiných naopak dochází k rychlé a fatální progresi spojené navíc se silnou neodpovídatostí na léčbu (NOESEL a VERSTEEG 2003). Z genetického hlediska je u neuroblastomu častá aneuploidie a také amplifikace genu n-myc, která je faktorem spojeným se špatnou prognózou (RAGGI *et al.* 1999). V současnosti se soudí, že amplifikace n-myc je pouze důkazem genomové nestability. Vzhledem k agresivitě a nezvyklému chování neuroblastomu jsme práci zaměřili právě na problém rezistence vůči cytostatikům. Předpokládali jsme, že jedním z mechanismů rezistence by mohly být změny v expresi genů regulujících apoptózu. Průkaz těchto změn by mohl přispět k hledání úspěšnější terapie.

Pomocí PCR v reálném čase jsme měřili poměr exprese dvou nejvýznamnějších a funkčně spjatých apoptotických genů Bcl-2 a Bax. U senzitivních buněk jsme předpokládali poměr 1:1 a menší. U rezistentních buněk jsme předpokládali naopak zvýšení tohoto poměru. Z našich výsledků vyplývá, že jsme prokázali zvýšenou expresi Bcl-2 u linií odvozených od neuroblastomu rezistentních na doxorubicin, vincristin a BSRnázu v porovnání se senzitivními liniemi. Změnu exprese Bcl-2 nevykazovaly linie rezistentní na cisplatinu. Rovněž jsme prokázali významné zvýšení exprese Bcl-2 i u 2 pacientů s neuroblastomovým onemocněním. Můžeme tedy říci, že zvýšená exprese Bcl-2 u neuroblastomu zřejmě přispívá k mnohočetné lékové rezistenci.

Přestože jsme měli k dispozici pouze jeden vzorek meduloblastomu a glioblastomu, provedli jsme i u nich orientační měření, které neprokázalo zvýšenou expresi Bcl-2 ani u jednoho z nich. Samozřejmě v tomto případě by bylo nutné provést měření u více vzorků popř. linií z těchto nádorů odvozených, my jsme bohužel další biologický materiál nezískali. I tak náš velmi limitovaný výsledek podporuje práce NAMA *et al.* 2000, která dokazuje, že Bcl-2 není u meduloblastomu prognostickým faktorem.

Chronická lymfoidní leukémie (CLL) je charakteristická akumulací neproliferujících B-lymfocytů. Zvýšená exprese Bcl-2 u chronické lymfoidní leukémie (CLL) se vyskytuje u většiny případů (více než 70%), přestože nedochází k přestavbě *bcl-2* genu, ale zřejmě přispívá k přežívání B-CLL buněk (KUSENDA 1998). Toto potvrdil i náš výsledek, kdy naměřená exprese Bcl-2 u CLL byla jednou z nejvyšších vůbec v námi vyšetřovaném souboru. U CLL se zřejmě Bcl-2 na chemorezistenci nepodílí (BOSANQUET *et al.* 2002), ale je vhodným cílem pro novou terapii a v současnosti probíhají klinické zkoušky s antisense oligonukleotidy cílenými proti Bcl-2 (SCHIMMER *et al.* 2003). Nám měření opět posloužilo jako pozitivní kontrola.

Mezi maligní kostní nádory s vysokou incidencí u dětí a mladistvých patří Ewingův sarkom. Tyto sarkomy se vyznačují specifickými chromozomálními translokacemi postihujícími gen EWS na 22. chromozómu a některé z genů rodiny ETS. Jako sekundární změny jsou často nacházeny polyzomie 8. a 12. chromozómu (ECKSCHLAGER a PRŮŠA 2002). Naše měření poměru exprese Bcl-2/Bax prokázala pouze mírně zvýšenou expresi u jednoho pacienta, u ostatních pacientů byla exprese pod patologickou hranicí. K obdobnému závěru došel Van VALEN *et al.* 2003, kteří porovnávali expresi různých proteinů u fibroblastů a nádorových buněk. U Ewingova sarkomu se na lékové rezistenci zřejmě podílejí jiné mechanismy např. P-glykoprotein (nepublikované údaje Čermáková M., Vícha A.).



Dále jsme zaměřili na folikulární lymfom, který patří do skupiny B-non-Hodgkinských lymfomů (B-NHL) a tvoří asi 12% všech zhoubných nádorů u dětí do 18 let (ECKSCHLAGER a PRŮŠA 2002). Folikulární lymfom vychází z B-lymfocytů lymfatických foliкулů a dělí se podle histologie do několika podskupin s různým stupněm malignity. Pomalu progredující nízké maligní stádium lymfomu je prakticky neléčitelné, protože je chemorezistentní, u dětí se vyskytuje zřídka. Středně i vysoce maligní stádia onemocnění lze dobře léčit různými kombinacemi cytostatik v kombinaci s radioterapií, přežívá dlouhodobě asi 40% pacientů (WEBB *et al.* 1997). Pro 80-90% folikulárních lymfomů je charakteristická translokace t(14;18), která vede ke změně aktivity genu *bcl-2*. Tento gen se tak dostává pod působení transkripčně silného promotoru pro těžké řetězce imunoglobulinů. Zvýšená exprese Bcl-2 je charakteristickým znakem většiny NHL.

Metodou PCR v reálné čase jsme naměřili zvýšený poměr exprese Bcl-2/Bax u sensitivních linií odvozených od non-Hodgkinského lymfomu, což dokazuje nejistý vliv Bcl-2 na chemorezistenci. Odolnost vůči cytostatikům může být způsobena jiným mechanismem lékové rezistence. Nicméně Bcl-2 přispívá k vyšší životnosti nádorových buněk také svou antioxidační aktivitou, díky níž snižuje účinek volných radikálů (NOVOSAD *et al.* 2002). Co se týče pacientů, prokázali jsme zvýšený poměr exprese Bcl-2/Bax u většiny z nich (86%). Stanovením hladiny exprese Bcl-2 nezískáme sice přehled o chemorezistenci, nicméně tento údaj může pomoci přesněji typizovat onemocnění a tím určit vhodnou intenzitu léčby. Navíc u pacientů se zvýšenou hladinou exprese Bcl-2 je možné navodit vyšší chemosenzitivitu použitím antisense oligonukleotidů (WEBB *et al.* 1997).

6. Závěr

Jedním z významných mechanismů, který se podílí na vzniku mnohočetné lékové rezistence, jsou změny v regulaci procesů vedoucích k programované buněčné smrti-apoptóze. Na regulaci apoptózy se mimo jiné podílí antiapoptotický protein Bcl-2 a proapoptotický protein Bax. Tyto proteiny vytváří heterodimery, čímž vzájemně neutralizují svou funkci. Pokud se v buňce zvýší obsah Bcl-2 vůči Bax, dojde k zablokování indukce apoptózy, kterou chceme navodit cytostatiky v nádorové buňce. Detekce markerů lékové rezistence je proto důležitým prognostickým faktorem při volbě vhodné chemoterapie.

V této práci jsme využili metodiku polymerázové řetězové reakce v reálném čase. Optimalizovali jsme reakční podmínky, určili její citlivost a zaměřili se na studium exprese Bcl-2 a Bax u nádorových linií. Prokázali jsme zvýšený poměr exprese Bcl-2/Bax u neuroblastomových linií s navozenou chemorezistencí na doxorubicin, vincristin a BS-RNázu, naproti tomu stejné linie bez rezistence měly fyziologické hodnoty exprese. Senzitivní linie promyelocytární HL60 a linie odvozené od non-Hodgkinského lymfomu rovněž vykazovaly zvýšenou expresi Bcl-2.

Pro ověření spolehlivosti metody jsme výsledky z měření linií porovnali s výsledky jiných prací. Tyto výsledky odpovídaly našim poznatkům. Zaměřili jsme se tedy na měření vzorků pacientů. Fyziologickou expresi Bcl-2 jsme stanovili pomocí měření vzorků zdravých dárců. Tyto prahové hodnoty jsme porovnali s expresí Bcl-2 u pacientů a nádorovým onemocněním. Zvýšený poměr exprese Bcl-2/Bax jsme prokázali u pacientů s neuroblastomem, non-Hodgkinským lymfomem a chronickou myeloidní leukémií. Naopak fyziologické hodnoty jsme naměřili u pacientů s Ewingovým sarkomem, glioblastomem a meduloblastomem. Zde předpokládáme uplatnění jiných mechanismů mnohočetné lékové rezistence např. P-glykoproteinu aj.

Závěrem můžeme říci, že jsme našli významné rozdíly v expresi Bcl-2 a Bax u různých nádorových onemocnění, u kterých se zřejmě spolupodílí na vzniku chemorezistence (HOUŠKOVÁ *et al.* 2003). Nicméně další studie by se měly zaměřit i na ostatní proteiny apoptotické dráhy např. Bcl-x_L, na jejich interakce s Bcl-2 a Bax, na posttranslační modifikace a samozřejmě i detailnější studium ostatních mechanismů mnohočetné lékové rezistence.

7. Literatura

- Alexandrova R. (1998): Multidrug resistance and P-glykoprotein. *Exp.Path. And Paras.*, 1: 62-66.
- Antonsson B., Conti F., Ciavatta A., *et al.* (1997): Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science*, 227: 370-372.
- Arceci R.J. (1993): Clinical significance of P-glykoprotein in multidrug resistance malignancies. *Blood*, 81:2215-2222.
- Bakhshi A., Jensen J.P., Goldman P. *et al.* (1985): Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell*, 41: 899-906.
- Bardelli A. (1996): HGF receptor associated with anti-apoptotic protein Bag-1 and prevents cell death. *EMBO J.*, 15: 6205-6212.
- Beierle E., Dai W., Iyengar R., Langham M.R., Copeland III. E.M., Chen M.K. (2003): Differential expression of Bcl-2 and Bax may enhance neuroblastoma survival. *Journal of Pediatric Surgery*, 38(3): 486-491.
- Bernardi P., Broekemeier K.M., Pfeiffer D.R. (1994): Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition; a caclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 26(5): 509-517.
- Biedler J.L., Riehm H. (1970): Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic and cytogenetic studies. *Cancer Res.*, 30(4): 1174-1184.
- Boháčová V., Kvačkajová J., Barančík M. (2000): Glutathione S-transferase does not play a role in multidrug resistance of L1210/VCR cell line. *Physiol. Res.*, 49:447-453.
- Bosanquet A.G., Sturm I., Wieder T., Essman F., Bosanquet M.I., Head D.J., Dörken B., Daniel P.T. (2002): Bax expression correlates with cellular drug sensitivity to doxorubicin, cyclophosphamide and chlorambucil but not fludarabin, cladribine or corticosteroids in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 16: 1035-1044.
- Bradley G., Juranka P.F., Ling V. (1988): Mechanism of multidrug resistance. *Biochim. Biophys. Acta*, 948: 87-128.
- Brehm A., Miska E.A., McCance D.J., Reid J.L., Bannister A.J. (1998): Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature*, 391: 597-601.
- Bucher P. (1999): Regulatory elements and expression profiles. *Curr. Opin. In Struc. Biol.*, 9: 400-407.
- Bustin S.A. (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25: 169-193.

Cardoso F., Durbecq V., Larsimont D., Paesmans M., Leroy J.Y., Rouas G., Sotiriou C., Renard N., Richard V., Piccart M.J., Di Leo A. (2004): Correlation between complete response to anthracycline-based chemotherapy and topoisomerase II-alpha gene amplification and protein overexpression in locally advanced/metastatic breast cancer. *Int.J.Oncol*, 24(1): 201-209.

Cleary M.L, Sklar J. (1998): Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 82: 7439-7443.

Clem R.J., Cheng E.H., Karp C.L. *et al.* (1998): Modulation of cell death by Bcl-x_L through caspase interaction. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 95: 554-559.

Conradt B., Horvitz H.R. (1998). The *C. elegans* protei EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell*, 93: 519-529.

Cory S.(1995): Bcl-2 family and lymphocyte survival. *Annu.Rev.Immunol.*, 13: 513-543.

Činátl J. jr., Činátl J., Kotchetkov R., Vogel J.U., Woodcock B.G., Matousek J., Poucková P., Kornhuber B. (1999): Bovine seminal ribonuclease selectively kills human multidrug-resistant neuroblastoma cells via induction of apoptosis.*Int.J.Oncol.*, 15: 1001-1009.

Dimmeler S., Breitschopf K., Haendeler J., Zeiher A.M. (1999): Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and proteasome pathway. *J.Exp.Med.*, 189: 1815-1822.

Dubská L., Sheard M.A. (2003): Apoptóza zprostředkovaná death receptory: úloha FasL a TRAIL při smrti maligních buněk. *Kliciká onkologie* 16(6): 257-264.

Durrieu F., Belaud-Rotureau M.-A., Lacombe F. *et al.* (1999): Synthesis of Bcl-2 in response to anthracycline treatment may contribute to an apoptosis-resistant phenotype in leukemic cell lines. *Cytometry*, 36:140-149.

Eckschlager T., Průša R. (2002): Laboratorní vyšetření v onkologii. Nakladatelství Triton, kapitola 4: 152-153.

Ellis R.E., Yuan J.Y., Horvitz H.R. (1991): Mechanisms and functions of cell death. *Annu.Rev.Cell.Biol.*, 7: 663-698.

Evan G.I., Brown L., Whyte M., Harrington E. (1995): Apoptosis and the cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7: 825-834.

Fang W., Rivard J.J., Mueller D.L., Behrens T.W. (1994): Cloning and molecular characterization of mouse bcl-x in B lymphocytes and T lymphocytes. *J.Immunol.*, 153: 4388-4398.

- Gaidano G. (1997): Molecular genetics of malignant lymphoma. *Rev.Clin.Exp.Hematol.*, 2: 27-44.
- Garcia-Diaz M., Bebenek K., Krahn J.M., Blanco L., Kunkel T.A., Pedersen L.C. (2004): A structural solution for the DNA polymerase lambda-dependent repair of DNA gaps with minimal homology. *Mol.Cell*, 13(4): 561-572.
- Gershenson L.E., Rotello R.J. (1992): Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB J.*, 6: 2450-2455.
- Gibson U.E.M., Heid C.A., Williams P.M. (1996): A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.*, 6: 995-1001.
- Gordon W. *et al.* (2000): 154 chromosome abnormalities in hematologic malignancies. *Leukemia Research*, 24: 487-489.
- Green D. R., Reed J.C. (1998): Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281: 1309-1312.
- Haarman E.G., Kaspers G.J., Pieters R., van Zantwijk C.H., Broekema G.J., Hahlen K., Veerman A.J. (1999): Bcl-2 expression in childhood leukemia versus spontaneous apoptosis, drug induced apoptosis and in vitro resistance. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 457: 325-333.
- Hale A.J., Smith C.J., Sutherland L.C. *et al.* (1996): Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur.J.Biochem.*, 236: 1-26.
- Haldar S., Negrini M., Monne M., Sabbioni S., Croce C.M. (1994): Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res.*, 54: 2095-2097.
- Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. (1996): Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, 6: 986-994.
- Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R. (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, 10: 413-417.
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R., Gelfand D.H. (1993): Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11: 1026-1030.
- Hirose M. (2002): Biology and modulation of multidrug resistance (MDR) in hematological malignancies. *Int.J.of Hem*, supplement II, 76: 206-211.
- Hockenbery D., Nun ez G., Miliman C., Schreiber R.D., Korsmeyer S.J. (1990): Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, 348: 334-336.
- Hod Y. (1992): A simplified ribonuclease protection assay. *Biotechniques*, 13: 852-854.
- Holland P.M., Abramson R.D., Watson R. *et al.* (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 88: 7276-7280.

Houšková L., Cinek O., Činátl J., Eckschlager T. (2003): Provází overexprese bcl-2 mnohočetnou lékovou rezistenci? VII. Celostátní konference DNA diagnostiky, buněčné a genové terapie, Praha.

Hsu Y.T., Wolter K.G., Youle R.J. (1997): Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-x_L during apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 94:3668-3672.

Cheng E.H., Levine B., Boise L.H., Thompson C.B., Hardwic J.M. (1996): Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-x_L. *Nature*, 379: 554-556.

Cheng E.H., Kirsch D.G., Clem R.J., *et al.* (1997): Conversion of Bcl2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science*, 278: 1966-1968.

Chittenden T., Flemington C., Houghton A.B., Ebb R.G., Gallo G.J., Elagovan B., Chinnadurai G., Lutz R.J. (1995): A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J.*, 14: 5589-5596.

Chomczynski P., Sacchi N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.*,162(1):156-159.

Ishikawa T., Zhang S.S.M., Qin X., Takahashi Y., Oda H., Nakatsuru Y., Ide F. (2004): DNA repair and cancer: Lessons from mutant mouse models. *Cancer Sci.*, 95(2): 112-117.

Ito T., Deng X., Carr B., May W.S. (1997): Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *J.Biol.Chem.*, 272: 11671-11673.

Izquierdo M.A., Scheffer G.L., Schroeijers A.B., de Jong M.C., Scheper R.J. (1998): Vault-related resistance to anticancer drugs determined by the expression of the major vault protein LRP. *Cytotechnology*, 27: 137-148.

Juliano R.L., Ling V. (1976): A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta*, 455: 152-162.

Kang M.R., Muller M.T., Chung I.K. (2004): Telomeric DNA damage by topoisomerase I: a possible mechanism for cell killing by camptothecin. *J.Biol.Chem*, 279(13): 12535-12541.

Karnolsky I. (2000): Cytogenetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia. *Folia. Med (Plovdiv)*, 42 (3): 5-10.

Kerr J.F.,Wylie A.H.,Currie A.R. (1972):Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26: 239-257.

Keshelava N., Zuo J.J., Chen P., Waidyaratne S.N., Luna M.C., Gomer C.J., Triche T.J., Reynolds P. (2001): Loss of p53 function confers high-level multidrug resistance in neuroblastoma cell lines. *Cancer Res.*, 61: 6185-6193.

Klener P. (1998): Inhibitory topoizomerázy a jejich klinické uplatnění. *Remedia*, 8(3): 172-178.

- Kluck R.M., Bossy-Wetzel E., Green D.R., Newmeyer D.D. (1997): The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*, 275: 1132-1136.
- Knudson C.M., Korsmeyer S.J. (1997): Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death. *Nature Genet.*, 16: 358-363.
- Kodyková K., Krejsek J. (2000): Rezistence buněk krevních malignit vůči cytostatikům I.část. *Čas.lék.čes.*, 18: 553- 556.
- Kohler T., Leiblein S., Borchert S. *et al.* (1999): Absolute levels of MDR-1, MRP and Bcl-2 mRNA and tumor remission in acute leukemia. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 457:177-85.
- Koutecký J., Boček P., Čumlivski R., Eckschlager T., Kavan P., Mališ J., Mottl H., Příbylová O., Starý J., Šmelhaus V. (1997): *Nádorová onemocnění dětí a mladistvých.* Karolinum, Praha.
- Král V., Hajdúch M., Neoral Č., Klein J., Mihál V., Orel M., Aujeský R., Vysloužil K., Cwiertka K., Kolek V., Nosková V. (2000): Význam a možnosti současné cytostatické léčby maligních nádorů; testování účinnosti cytostatik. *Rozhl. Chir.*, 79(3): 134-138.
- Kroemer G. (1997): The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature Med.*, 3: 614-620.
- Kroemer G., Dallaporta B., Resche-Rigon M. (1998): The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu.Rev.Physiol.*, 60: 619-642.
- Kusenda J. (1998): Bcl-2 family proteins and leukemia. *Neoplasma*, 45(3): 117-121.
- Lane D.P. (1992): Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358: 15.
- Lee L.G., Connell C.R. and Bloch W. (1993): Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Research*, 21: 3761-3766.
- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., *et al.* (1997): Cytochrome c and dATP- dependent formation of Apaf-1(caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91:479-489.
- Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemmerson R., Wang Z. (1996): Induction of apoptotic program in cell free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86: 147-157.
- Livak K.J., Flood S.J.A., Marmaro J. *et al.* (1995): Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR methods and Applications*, 4:357-362.
- Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.E. (2001): *Molecular biology of the cell.* W. H. Freeman and Company, fourth edition, chapter 12: 478-480, chapter 24: 1078-1079.

Lowe S.W. *et al.* (1993): p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*, 362: 847-849.

Luo D., Cheng S.C.S., Xie H., Xie Y. (2000): Effects of Bcl-2 and Bcl-X_L protein levels on chemoresistance of hepatoblastoma HepG2 cell line. *Biochem. Cell Biol.*, 78: 119-126.

Majsterek I., Slupianek A., Hoser G., Skorski T., Blasiak J. (2004): ABL-fusion oncoproteins activate multi-pathway of DNA repair: role in drug resistance?. *Biochimie*, 86(1): 53-65.

Mao Y., Yu C., Hsieh T. *et al.* (1999): Mutations of human topoisomerases II alpha affecting multidrug resistance and sensitivity. *Biochemistry*, 38(33): 10793-800.

Marti T.M., Fleck O. (2004): DNA repair nucleases. *Cell Mol. Life. Sci.*, 61(3): 336-354.

Martin B., Paesmans M., Berghmans T., Branle F., Ghidsdal L., Mascaux C., Meert A.P., Steels E., Vallot F., Verdebout J.M., Lafitte J.J., Sculier J.P. (2003): Role of Bcl-2 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br. J. Cancer*, 89: 55-64.

Meng LH., Zhang JS., Ding J. (2001): Salvicine, a novel DNA topoisomerase II inhibitor, exerting its effects by trapping enzyme-DNA cleavage complexes. *Biochem. Pharmacol.*, 62(6): 733-41.

Mignotte B., Vayssiere J.L. (1998): Mitochondria and apoptosis. *Eur. J. Biochem.*, 252: 1-15.

Minn A.J., Velez P., Schendel S.L., *et al.* (1997): Bcl-x_L forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature*, 385: 353-357.

Morrow C.S., Diah S., Smitherman P.K., Schneider E., Townsend A.J. (1998): Multidrug resistance protein and glutathione S-transferase P1-1 act in synergy to confer protection from 4-nitroquinoline 1-oxide toxicity. *Carcinogen.*, 19(1): 109-115.

Mossink M.H., van Zon A., Scheper R.J., Sonneveld P., Wiemer E.A. (2003): Vaults: a ribonucleoprotein particle involved in drug resistance? *Oncogene*, 22(47): 7458-7467.

Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. (1998): *Harperova biochemie*. Lange Medical Publ., 23. issue, translation H&H, 2. vydání, Praha, s. 743-748.

Nam D.H., Wang K.C., Kim Y.M., Chi J.G., Kim S.K., Cho B.K. (2000): The effect of isochromosome 17q presence, proliferative and apoptotic indices, expression of c-erbB-2, bcl-2 and p53 proteins on the prognosis of medulloblastoma. *J.Korean Med.Sci.*, 15(4): 452-456.

Nguyen M., Branton P.E., Walton P.A., Oltvai Z.N., Korsmeyer S.J., Shore G.C. (1994): Role of membrane anchor domain of Bcl-2 in suppression of apoptosis caused by E1B-defective adenovirus. *J.Biol.Chem.*, 269: 16521-16524.

- van Noesel M.M., Versteeg R. (2004): Pediatric neuroblastomas: genetic and epigenetic „Danse macabre“. *Gene*, 325: 1-15.
- Nosková V., Hajdúch M., Mihál V., Cwierka K. (2000): Mechanizmy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi. *Klinická Onkologie*, 2: 4-14.
- Novosad J., Jankovičová K., Krejsek J. (2002): Protein Bcl-2 a jeho úloha v maligní transformaci buňky. *Klinická onkologie*, 15(1): 3-5.
- Oberhammer F. *et al.* (1993): Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J.*, 12: 371-377.
- Oltvai Z.N., Milliman C.L., Korsmeyer S.J. (1993): Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74: 609-619.
- Parker R.M., Barnes N.M. (1999): mRNA: detection by *in situ* and northern hybridization. *Methods in Molecular Biology*, 106: 247-283.
- Paumi C.M., Ledford B.G., Smitherman P.K., Townsend A.J., Morrow C.S. (2001): Role of multidrug resistance protein 1 (MRP1) and glutathion-S-transferase A1-1 in alkylating agent resistance. Kinetics of glutathione conjugate formation and efflux govern differential cellular sensitivity to chlorambucil versus melphalan toxicity. *J.Biol. Chem.*, 276(11): 7952-7956.
- Pessina A., Raimondi A., Acchini M. *et al.* (2001): Altered DNA-cleavage activity of topoisomerase II. from WEHI-3B leukemia cells with specific resistance to ciprofloxacin. *Anticancer drugs*, 12(5): 441-51.
- Petty R., Evans A., Duncan I. *et al.* (1998): Drug resistance in ovarian cancer- the role of p53. *Pathol. Oncol. Res.*, 4(2) :97-102.
- Poljak L., Kas E. (1995): Resolving the role of topoisomerase II in chromatin structure and function. *Trends Cell Biol.*, 5(9): 348-354.
- Raggi C.C., Bagnoni M.L., Tonini G.P., Maggi M., Vona G., Pinzani P., Mazzocco K., Bernardi B., Pazzagli M., Orlando C. (1999): Real-time quantitative PCR for the measurement of MYCN amplification in human neuroblastoma with the TagMan Detection System. *Clinical Biochemistry*, 45(11): 1918-1924.
- Reed J.C. (1997): Promise and problems of Bcl-2 antisense therapy. *J.Natl.Cancer Inst.*, 89: 988-990.
- Rosypal S.(1999): Úvod do molekulární biologie. Brno 1999, díl druhý, 478-484.
- Rothenberg M.L. (1997): Topoisomerase I inhibitors. Review and update. *Ann.Oncol*, 23 (suppl 3): 34-41.
- Saccomanno C.F., Bordonaro M., Chen J.S, Nordström J.L. (1992): A faster ribonuclease protection assay. *Biotechniques*, 13: 846-850.

- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F. *et al.* (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350-1354.
- Sattler M., Liang H., Nettesheim D., *et al.* (1997): Structure of Bcl-x_L-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*, 275: 983-986.
- Selvakumaran M., Lin H.K., Miyashita T., Wang H.G., Krajewski S., Reed J.C., Hoffman B., Lieberman D. (1994): Immediate early-up regulation of bax expression by p53 but not TGFβ1: A paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene*, 9: 1791-1798.
- Shiotani B., Ashida H. (2004): 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyridol[[!LB]]4,3-b[[!RB]]indole (Trp-P-1) triggers apoptosis by DNA double-strand breaks caused by inhibition of topoisomerase I. *Carcinogenesis*, (epub ahead of print).
- Schendel S.L., Xie Z., Montal M.O., Matsuyama S., Montal M., Reed J.C. (1997): Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 94:5113-5118.
- Schimmer A.D., Munk-Pedersen I., Minden M.D., Reed J.C. (2003): Bcl-2 and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Curr.Treat.Options Oncol.*, 4(3): 211-218.
- Schlesinger P.H., Gross A., Yin X.M., *et al.* (1997): Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 94: 11357-11362.
- Simin K., Wu H., Lu L., Pinkel D., Albertson D., Cardiff R.D., van Dyke T. (2004): pRb inactivation in mammary cells reveals common mechanism for tumor initiation and progression in divergent epithelia. *PloS Biol.*, 2(2): e22.
- Srivastava R.K., Srivastava A.R., Korsmeyer S.J., Nesterova M., Cho-Chung Y.S., Longo D.L. (1998): Involvement of microtubules in regulation of Bcl-2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol. Cell Biol.*, 18: 3509-3517).
- Stavrovskaya A. (2000): Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc)*, 65(1):95- 106.
- Steller H. (1995): Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, 267: 1445-1449.
- Takatoshi I., Zhang S.S.M., Qin X., Takahashi Y., Oda H., Nakatsuru Y., Ide F. (2004): DNA repair and cancer: Lessons from mutant mouse models. *Cancer Sci.*, 95(2): 112-117.
- Takayama S., Sato T., Krajewski S., *et al.* (1995): Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell*, 80: 279-284.
- Thompson C.B. (1995): Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267: 1456-1462.

- Thornberry N.A., Lazebnik Y. (1998): Caspases: enemies within. *Science*, 281: 1312-1316.
- Tsujimoto Y., Finger L.R., Yunis J., Nowell P.C., Croce C.M. (1984): Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*, 226: 1097-1109.
- Tsujimoto Y., Cossman J., Jaffe E., Croce C.M. (1985): Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*, 228: 1440-1443.
- Tsujimoto Y., Croce C.M. (1986): Analysis of the structure transcripts and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 83: 5214-5218.
- Tsujimoto Y. (1998): Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes to Cells*, 3(11): 1365-1443.
- Tu Y., Renner S., Xu F. *et al.* (1998): BCL-X expression in multiple myeloma: possible indicator of chemoresistance. *Cancer Res.*, 58(2):256-62.
- Van Brussel J.P., van Steenbrugge G.J., Romijn J.C.*et al.*(1999): Chemosensitivity of prostate cancer cell lines and expression of multidrug resistance-related proteins. *Eur. J. Cancer*, 35(4): 664-71.
- Van Brussel J.P., Jan Van Steenbrugge G., Van Krimpen C. *et al.* (2001): Expression of multidrug resistance related proteins and proliferative activity is increased in advanced clinical prostate cancer. *J. Urol.*, 165(1): 130-5.
- Van Valen F., Fulda S., Schafer K.L., Truckenbrod B., Hotfilder M., Poremba C., Debatin K.M., Winkelman W. (2003): Selective and nonselective toxicity of TRAIL/Apo2L combined with chemotherapy in human bone tumor cells vs. normal human cells. *Int.J. Cancer*, 107(6): 929-940.
- Van Zon A., Mossink M.H., Scheper R.J., Sonneveld P., Wiemer E.A. (2003): The vault complex. *Cell Mol.life Sci.*, 60(9): 1828-1837.
- Violette S., Poulain L., Dussaulx E., Pepin D., Faussat A.M., Chambaz J., Lacorte J.M., Staedal C., Lesuffleur T. (2002): Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-X(L) in addition to Bax and p53 status. *Int. J. Cancer*, 98: 498-504.
- Wall M., Wani M.C., Cooke C.E. (1966): Plant anti-tumor agents: the isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and antitumor inhibitor from *Camptotheca accuminata*. *J.Am.Chem.Soc.*, 88: 3888-3890.
- Webb A., Cunningham D., Cotter F. *et al.* (1997): BCL-2 antisense therapy in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Lancet*, 349: 1137-41.
- Wu G.S., El-Deiry W.S. (1996): Apoptotic death of tumor cells correlates with chemosensitivity, independent of p53 or Bcl-2. *Clin.Cancer Res.*, 2: 623-633.

- Wyllie A.H., Kerr J.F.R., Currie A.R. (1980): Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, 68: 251-306.
- Yang E., Korsmeyer S.J. (1996): Molecular thanatopsis: A discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood*, 88: 386-401.
- Zamzami N., Brenner C., Marzo I., Susin S.A., Kroemer G. (1998): Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene*, 16: 2265-2282.
- Zha J.P., Harada H., Yang E., Jockel J., Korsmeyer S.J. (1996): Serine phosphorylation of death agonist Bad in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not Bcl-x_L. *Cell*, 87: 619-628.
- Zhang H., Heim J., Meyback B. (1998): Redistribution of Bax from cytosol to membranes is induced by apoptotic stimuli and is early step in the apoptotic pathway. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 251: 454-459.
- Zhang Y., Fujita N., Tsuruo T. (1999): p21/Waf1/Cip1 acts in synergy with Bcl-2 to confer multidrug resistance in a camptothecin-selected human lung-cancer cell line. *Int. J. Cancer*, 83(6): 790-7.
- Zhou H., Henzel W.J., Liu X., Lutschg A., Wang X. (1997): Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4 participates in cytochrom c-dependent activation of caspase 3. *Cell*, 90: 405-413.
- Zoratti M., Szabo I. (1995): The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta*, 1241: 139-176.
- Zubercová O., Babušíková O. (1998): The multidrug resistance in human leukemias. *Neoplasma*, 45: 53- 59.

Příloha č. 1: Ukázky výstupů z Q RT PCR analýzy

