

**M A S A R Y K O V A
U N I V E R Z I T A**

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Úloha serotoninových receptorů a jimi zprostředkované signalizace u neuroblastomu

Diplomová práce

LUKÁŠ SOURADA

Vedoucí práce: RNDr. Jan Škoda, Ph.D.

Ústav experimentální biologie

obor Bioanalytická laboratorní diagnostika
ve zdravotnictví - Lékařská genetika
a molekulární diagnostika

Brno 2021

MUNI



Bibliografický záznam

Autor:	Lukáš SOURADA Přírodovědecká fakulta Masarykova univerzita Ústav experimentální biologie
Název práce:	Úloha serotoninových receptorů a jimi zprostředkované signalizace u neuroblastomu
Studijní program:	Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví – Lékařská genetika a molekulární diagnostika
Studijní obor:	Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví – Lékařská genetika a molekulární diagnostika
Vedoucí práce:	RNDr. Jan Škoda, Ph.D.
Rok:	2021
Počet stran:	94
Klíčová slova:	neuroblastom; serotonin; 5-HT; bridge cells; nadledviny; HTR3A; serotonergní signalizace; nádorové kmenové buňky; buněčný původ; diferenciac

Bibliographic record

Author: Lukáš SOURADA
Faculty of Science
Masaryk University
Department of Experimental Biology

Title of Thesis: The role of serotonin receptors and the serotonin receptor-mediated signaling in neuroblastoma

Degree Programme: Bioanalytical Laboratory Diagnostics in Medicine – Medical Genetics and Molecular Diagnostics

Field of Study: Bioanalytical Laboratory Diagnostics in Medicine – Medical Genetics and Molecular Diagnostics

Supervisor: RNDr. Jan Škoda, Ph.D.

Year: 2021

Number of Pages: 94

Keywords: neuroblastoma; serotonin; 5-HT; bridge cells; adrenal glands; HTR3A; serotonergic signaling; cancer stem cells; cellular origin; differentiation

Abstrakt

Neuroblastom je maligní dětský nádor, který je charakteristický vysoce variabilním klinickým průběhem. Zatímco někteří pacienti trpí vysoce agresivní formou onemocnění s časnými metastázami, v jiných případech naopak dochází ke spontánní regresi nádoru. Tento nádor vychází nejčastěji z oblasti dřeně nadledvin, která představuje derivát neurální lišty. Během prenatálního vývoje se v této oblasti vyskytuje přechodná populace buněk zvaných bridge cells, jež je charakteristická mj. expresí HTR3A, podjednotky receptoru pro serotonin (HTR3). Některé recentní studie poukazují na možnou souvislost deregulace této populace se vznikem neuroblastomu. Cílem této práce proto bylo blíže a systematicky prozkoumat možnou roli HTR3A v patogenezi neuroblastomu. Součástí práce je charakterizace exprese HTR3A v rámci panelu šesti neuroblastomových buněčných linií a následné posouzení vlivu farmakologické modulace aktivity tohoto receptoru na fenotyp neuroblastomových buněk. Práce také zahrnuje výsledky experimentálního umlčení exprese HTR3A metodami CRISPR a RNA interference.

Při charakterizaci buněčných linií byly zjištěny výrazné rozdíly v expresi HTR3A, která přitom korelovala s expresí onkoproteinu c-MYC. Působení agonistů HTR3 vedlo u linií s vysokou expresí HTR3A k výraznému potlačení růstových parametrů. Vliv agonistů na kmenovost a fenotyp neuroblastomových buněk přitom nebyl pozorován. Korelační analýzy exprese HTR3A a vybraných markerů spolu s neúspěšnými pokusy o získání modelu s uměle utlumenou expresí HTR3A naznačují, že HTR3A má pro neuroblastomové buňky značný význam a může mít souvislost s agresivitou konkrétního nádoru. Závěry této práce dokládají, že HTR3A může představovat důležitý marker odrážející heterogenitu onemocnění. To činí HTR3A zajímavým cílem pro studie zaměřené na zhodnocení jeho prognostického potenciálu stejně jako pro další výzkum týkající se buněčného původu neuroblastomu.

Abstract

Neuroblastoma is a malignant pediatric tumor characterized by a highly variable clinical course. While some patients suffer from a highly aggressive form of the disease with early metastases, in other cases, spontaneous tumor regression occurs. Most commonly, this tumor arises from the adrenal medulla, which is a derivative of the neural crest. During prenatal development, a transient population of so-called bridge cells is present in this area. Among other features, bridge cells are characterized by the expression of HTR3A, a subunit of the serotonin receptor (HTR3). Recent studies have suggested a possible link between deregulation of this population and the development of neuroblastoma. Therefore, the aim of this thesis was to thoroughly investigate the possible role of HTR3A in the pathogenesis of neuroblastoma. This thesis focused on the characterization of HTR3A expression within a panel of six neuroblastoma cell lines followed by an assessment of the effect of pharmacological modulation of the HTR3A activity on the phenotype of neuroblastoma cells. Experimental silencing of HTR3A expression by CRISPR and RNA interference methods was also performed.

Expression analyses of the examined cell lines revealed significant differences in the levels of HTR3A, which correlated with the expression of the c-MYC oncoprotein. The treatment with HTR3 agonists led to a significant suppression of growth parameters in the cell lines with high levels of HTR3A. The effect of agonists on stemness and phenotype of neuroblastoma cells was not observed. Correlation analyses of HTR3A expression and selected markers, together with unsuccessful attempts to obtain a model with artificially silenced HTR3A, suggest that HTR3A is of considerable importance for neuroblastoma cells and may be related to the aggressiveness of a particular tumor. The findings of this thesis demonstrate that HTR3A may represent an important marker reflecting the disease heterogeneity. This makes HTR3A an interesting target for studies aimed at evaluating its prognostic potential as well as for further research regarding the cellular origin of neuroblastoma.

ZADÁNÍ
DIPLOMOVÉ PRÁCE

Akademický rok: 2019/2020

Ústav:	Ústav experimentální biologie
Student:	Bc. Lukáš Sourada
Program:	Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví - Lékařská genetika a molekulární diagnostika
Obor:	Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví - Lékařská genetika a molekulární diagnostika

Ředitel Ústavu experimentální biologie PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje diplomovou práci s názvem:

Název práce:	Úloha serotoninových receptorů a jimi zprostředkované signalizace u neuroblastomu
Název práce anglicky:	The role of serotonin receptors and the serotonin receptor-mediated signaling in neuroblastoma

Oficiální zadání:

Aktuální studie dokazují, že pro vývoj nadledvinek je důležitá specifická populace buněk odvozená od prekursorů buněk Schwannových. Existuje předpoklad, že deregulace právě této populace buněk, která se vyznačuje expresí genu HTR3A kódujícího receptor pro serotonin, by mohla být jednou z příčin vzniku neuroblastomu. Cílem diplomové práce bude proto analýza úlohy serotoninových receptorů a jimi zprostředkované signalizace u buněčných linií derivovaných z neuroblastomu. Experimentální přístupy budou zahrnovat spektrum molekulárních a buněčně biologických metod, přičemž výsledky získané in vitro mohou být následně ověřeny na myším modelu. Výstupem práce bude posouzení možností modulace serotoninové signalizace z hlediska případného využití v léčbě neuroblastomu.

Jazyk závěrečné práce: čeština**Vedoucí práce:** RNDr. Jan Škoda, Ph.D.**Konzultant:** RNDr. Petr Chlapek, DiS., Ph.D.**Datum zadání práce:** 1. 10. 2019**V Brně dne:** 3. 10. 2019

Souhlasím se zadáním (podpis, datum):

.....
Bc. Lukáš Sourada
student.....
RNDr. Jan Škoda, Ph.D.
vedoucí práce.....
RNDr. Pavel Lízal, Ph.D.
zástupce ředitele Ústavu experimentální biologie pro pedagogické záležitosti

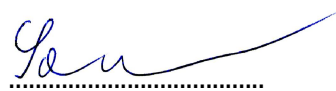
Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením vedoucího práce s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány. Text práce jsem vypracoval podle pravidel a zodpovídám za jeho jazykovou správnost.

V důsledku protiepidemických opatření v souvislosti s pandemií COVID-19 byly některé experimenty replikovány či provedeny členy laboratoře, ve které byla práce řešena, a jsou pro úplnost zařazeny do diplomové práce. Veškeré analýzy finálních souborů dat, grafické zpracování i interpretaci těchto výsledků jsem provedl samostatně pod vedením vedoucího práce. Níže je uveden přehled výsledků na jejichž vzniku se experimentálně podíleli další osoby, včetně rozsahu prací provedených konkrétní osobou:

Graf 9 – 4 z 5 biologických opakování byla provedena dr. Petrem Chlapkem

V Brně 24. května 2021


.....
Lukáš SOURADA

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli RNDr. Janu Škodovi, Ph.D. za věnovaný čas a velice vstřícný a motivující přístup. Velmi si vážím možnosti kdykoli konzultovat detaily prováděných experimentů a v neposlední řadě také zprostředkování stáže na Medizinische Universität ve Vídni, která mi otevřela zcela nové obzory.

Dále bych chtěl poděkovat svému konzultantovi RNDr. Petru Chlapkovi, DiS., Ph.D. za odborné rady a připomínky, a také kolegyni Mgr. Karolíně Bořánkové za cenné rady k provádění experimentů a asistenci s řešením mnohých technických problémů. Své poděkování chci také vyjádřit naší laborantce Johaně Marešové, díky níž jsem si osvojil základní kultivační postupy. Děkuji také Mgr. Tomáši Lojovi, Ph.D. za odbornou pomoc a poskytnutí technického vybavení při provádění FACS.

Nakonec bych rád poděkoval celému kolektivu Laboratoře nádorové biologie pod vedením prof. RNDr. Renaty Veselské, Ph.D., M.Sc. za vytvoření příjemné pracovní atmosféry, pomoc a podporu při realizaci mnohých experimentů.

Tato práce byla podpořena z Evropského fondu pro regionální rozvoj – projekt ENOCH (reg. č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868).

Obsah

Seznam zkratek	12
1 Úvod a problematika	15
1.1 Neuroblastom (NB)	15
1.1.1 Příznaky onemocnění	15
1.1.2 Diagnostika NB	16
1.1.3 Prognóza NB	17
1.1.4 Molekulární biomarkery a genetické změny u NB	18
1.1.5 Současné možnosti léčby NB	20
1.2 Serotonin (5-HT) a serotoninové receptory	22
1.2.1 Biochemie 5-HT	23
1.2.2 Rozmanitost serotoninových receptorů	24
1.2.3 HTR3	25
1.2.4 Modulace signalizace	28
1.2.5 Serotonergní signalizace v prenatálním období	30
1.3 Vývoj nadledvin a etiologie NB	30
1.3.1 Migrace neurálních progenitorů během ontogeneze	31
1.3.2 Klasický model vývoje nadledvin	32
1.3.3 Nový model buněčného původu nadledvin	34
1.3.4 Etiologie a buněčný původ NB	37
2 Cíl diplomové práce	39
3 Materiál a metody	40
3.1 Buněčné linie	40
3.2 Kultivační podmínky	40
3.3 Příprava vzorků RNA a proteinů z buněčných lyzátů	41
3.4 Reverzní transkripce a qPCR	42
3.5 Western blotting	44
3.6 Ovlivňování buněk a testy viability a proliferace	46
3.7 Funkční testy nádorových kmenových buněk (tvorba sfér)	48
3.8 Editace genu <i>HTR3A</i> metodou CRISPR	48
3.9 RNA interference	49
4 Výsledky	51
4.1 Porovnání exprese <i>HTR3A</i> u šesti buněčných linií NB	51

4.2	Korelační analýza exprese vybraných markerů buněčných populací dřeně nadledvin a jejich prekurzorů.....	54
4.3	Testy viability a proliferace buněk a modulace serotonergní signalizace.....	57
4.4	Test tvorby buněčných sfér <i>in vitro</i>	64
4.5	Umlčení exprese genu <i>HTR3A</i> pomocí metody CRISPR	66
4.6	RNA interference	71
5	Diskuze	72
5.1	Exprese <i>HTR3A</i> a vybraných markerů u šesti buněčných linií NB.....	73
5.2	Modulace signalizace	76
5.3	Pokusy o utlumení exprese <i>HTR3A</i>	78
5.4	Klinický potenciál <i>HTR3A</i> u NB.....	81
6	Souhrn	83
7	Summary	84
8	Literatura	85

Seznam zkratek

5-HT	5-hydroxytryptamin; serotonin
AADC	aromatic amino acid decarboxylase; dekarboxyláza aromatických aminokyselin
AAVS1	adeno-associated virus integration site 1; místo integrace adeno-asociovaných virů
ALK	anaplastic lymphoma kinase; kináza anaplastického lymfomu
AMPK	adenosine monophosphate-activated protein kinase; proteinkináza aktivovaná adenosinmonofosfátem
anti-GD2	monoklonální protilátka namířená proti disialogangliosidu (GD2)
ASCL1	Achaete-scute homolog 1; též <i>MASH1</i> ; transkripční faktor regulující diferenciaci neurálních progenitorů
ATRA	all- <i>trans</i> -retinoic acid; kyselina all- <i>trans</i> retinová (konkrétní izomer kyseliny)
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BMPs	bone morphogenetic proteins; kostní morfogenetické proteiny
CaMK	Ca ²⁺ /kalmodulin dependentní kináza
CAR	chimérický antigenní receptor
CINV	chemotherapy-induced nausea and vomiting; nevolnost vyvolaná léčbou cytostatiky (někdy též CIE; chemotherapy-induced emesis)
CNVs	copy number variations; variabilní počty kopií segmentů DNA
CREB	cAMP response element binding protein; transkripční faktor, jehož aktivita je regulována mj. hladinou cAMP
CSCs	cancer stem cells; nádorové kmenové buňky
Ct	threshold cycle; počet cyklů, který vznikající fluorescence potřebuje k překročení prahu detekce respektive pozadí (též baseline)
DAG	diacylglycerol
DBH	dopamin-β-hydroxyláza
DDC	dopa-dekarboxyláza
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Dulbeccova modifikace Eaglova média
DMSO	dimethylsulfoxid
EMT	epithelial-mesenchymal transition; epitelo-mezenchymální tranzice
ERBB3	receptorová tyrozinkináza z rodiny receptorů pro epidermální růstové faktory
FBS	fetální bovinní sérum
¹⁸FDG	fluorodeoxyglukóza s izotopem fluoru ¹⁸ F
FGFs	fibroblast growth factors; fibroblastové růstové faktory
GAP43	growth associated protein 43

GIT	gastrointestinální trakt
GPCRs	G protein-coupled receptors; receptory spojené (spřažené) s G proteinem
HRM	high resolution melting; analýza křivky tání
HSP90AB1	Heat shock protein 90 alpha family class B member 1
HTRs	5-hydroxytryptamine receptors; serotoninové receptory
HVA	homovanilová kyselina
ChB	chromafinní (neuroendokrinní) buňky dřeně nadledvin
CHGA	chromogranin A; gen kódující kyselý protein neuroendokrinních tkání
CHRNA3	Cholinergic Receptor Nicotinic Alpha 3 Subunit; nikotinový cholinergní receptor alfa 3
IBS	irritable bowel syndrome; syndrom dráždivého tračníku
IC₅₀	half maximal inhibitory concentration; koncentrace činidla, jež vyvolá snížení viability či proliferace buněk o 50 %
IGF-2	insulin-like growth factor 2; inzulinu podobný růstový faktor 2
INRGSS	International Neuroblastoma Risk Group Staging System
INSS	International Neuroblastoma Staging System
IP₃	inositol-1,4,5-trifosfát
KDO	Klinika dětské onkologie
LDH	laktátdehydrogenáza
LGIC	ligand-gated ion channel; ligandem řízený (vrátkovaný) iontový kanál
m-CPBG	m-chlorfenylbiguanid
MIBG	metaiodobenzylguanidin
MKI	mitosis-karyorrhexis index; index mitóza-karyorexe
MRD	minimal residual disease; minimální reziduální nemoc – jde o stav, kdy v těle zůstávají pouze nádorové buňky, které nejsou běžnými metodami prokazatelné, ale mohou být příčinou relapsu onemocnění
NB	neuroblastom
NCSCs	neural crest stem cells; kmenové buňky neurální lišty
NDRG1	N-MYC downstream regulated gene 1
NEAA	non-essential amino acids; neesenciální aminokyseliny
NGF	nerve growth factor; nervový růstový faktor
NMQ	N-methylquipazine
NSE	neuronespecifická enoláza
NTRK2	neurotrophic tyrosine kinase receptor 2
PBG	fenylbiguanid
PBS	phosphate-buffered saline; pufovaný fyziologický roztok

PET	pozitronová emisní tomografie
<i>PHOX2B</i>	paired-like homeobox 2B
PIP₂	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
<i>PLP1</i>	proteolipid protein 1; myelinový proteolipidový protein 1
PNMT	fenyletanolamin-N-metyltransferáza
PNS	periferní nervový systém
RT-qPCR	reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction; kvantitativní real-time PCR po reverzní transkripci
SCPs	Schwann cell precursors; prekurzory Schwannových buněk
scRNA-seq	single-cell RNA sequencing; sekvenování RNA z jednotlivých buněk
SEM	standard error of the mean; střední chyba průměru
SERT	serotoninový transportér
<i>SLC6A4</i>	Solute Carrier Family 6 Member 4
SPECT	single-photon emission computed tomography; jednofotonová emisní výpočetní tomografie
SSRI	selective serotonin reuptake inhibitors; selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu
<i>TH</i>	tyrosin hydroxyláza
T_m	melting temperature; teplota tání DNA
TPH	tryptofan hydroxyláza
TrkB	tropomyosin receptor kinase B
VMA	vanilmandlová kyselina

1 Úvod a problematika

1.1 Neuroblastom (NB)

Neuroblastom (NB) je maligní embryonální nádor vycházející z tkáně sympatického nervového systému. Z histogenetického hlediska patří mezi neuroektodermální tumory. Jde o nejčastější dětský extrakraniální solidní nádor, který tvoří zhruba 8 % všech dětských malignit a je zodpovědný za 15 % úmrtí na nádorová onemocnění v dětském věku, tedy neproporcionálně významnou část (Newman a Nuchtern, 2016). Jen v České republice je ročně diagnostikováno asi 25 případů NB a udávaná incidence ve světě je 1:100 000 dětí ročně (Štěrbá *et al.*, 2004; Newman a Nuchtern, 2016).

Většinu pacientů s NB tvoří malé děti, přičemž medián věku v době diagnózy je 2 roky a vrchol výskytu je v 18 měsících, nicméně asi 10 % případů tohoto typu nádoru postihuje jedince v druhé dekádě života či později (Štěrbá *et al.*, 2004; Mazánek, 2016). Drtivá většina případů je sporadických, pouze u 1 % nemocných se jedná o familiární výskyt s autozomálně dominantní dědičností (Newman a Nuchtern, 2016).

NB vzniká z prekurzorových pluripotentních buněk neurální lišty v různém stupni diferenciaci, které během embryonálního vývoje migrují do celého těla a dávají vzniknout mj. veškerým strukturám periferního nervového systému (Brodeur, 2003). Primární nádor je pak nejčastěji lokalizován v dřeni nadledvin, méně často vychází z paraspinálních ganglií retroperitonea, pánve, hrudníku či krku (Maris *et al.*, 2007).

NB představuje velmi heterogenní onemocnění a je typický svým variabilním klinickým projevem, pokud jde o agresivitu a s ní související šanci na vyléčení. Zatímco u některých pacientů (obvykle starší děti s metastázami) vykazuje NB agresivní fenotyp rezistentní vůči multimodální terapii zahrnující cytostatika, radioterapii, chirurgickou resekci i biologickou léčbu, v jiných případech (obvykle u novorozenců a kojenců s lokalizovaným onemocněním) naopak pozorujeme dokonce spontánní regresi nádoru bez nutnosti lékařské intervence (Matthay *et al.*, 1999; Nuchtern *et al.*, 2012; Mazánek, 2016).

1.1.1 Příznaky onemocnění

Příznaky NB jsou značně variabilní a závisí na lokalizaci nádoru a stádiu onemocnění. Často jsou navíc prvními příznaky nemoci až ty související s výskytem metastáz, které jsou přítomny zhruba u poloviny pacientů s NB a nejčastěji napadají kostní dřeň, lymfatické uzliny a játra (Maris *et al.*, 2007; Luksch *et al.*, 2016). Do těchto nespecifických systémových příznaků

spadají horečky, váhový úbytek, nevolnost a ztráta chuti k jídlu, malátnost a celková únava, dále může jít o poruchy vyprazdňování, bledost v důsledku anémie, noční pocení, bolesti kostí a kloubů a bolestivou chůzi (Štěrbá *et al.*, 2004; Maris *et al.*, 2007; Mazánek, 2016). V důsledku prorůstání tumoru do páteřního kanálu a lokální míšní komprese se mohou objevit i neurologické příznaky, například ochrnutí končetin (De Bernardi *et al.*, 2014). Specifickým příznakem NB je tzv. Hornerovo trias, zahrnující trojici symptomů – pokles víčka (ptóza), zúžení zornice (mióza) a oko vkleslé do očníce, tedy zdánlivý enoftalmus (Mazánek, 2016).

1.1.2 Diagnostika NB

Vedle klinických příznaků, které u značné části pacientů nemusí být zřetelně rozvinuty, vede k podezření na NB často náhodný nález při ultrazvukovém vyšetření z jiného důvodu, kdy je typicky v břišní dutině objevena nádorová masa o velikosti několika centimetrů, kterou lze často detekovat i palpačně (Mazánek, 2016). Z hlediska klinické biochemie má zásadní význam vyšetření katecholaminů a jejich metabolitů v moči. Jedná se o kyselinu homovanilovou (HVA) a vanilmandlovou (VMA), dále dopamin, adrenalin a noradrenalin (Mazánek, 2016). V krvi pacientů jsou zase detekovány zvýšené hodnoty nespecifických markerů NSE (neuronspecifická enoláza), LDH (laktátdehydrogenáza), ferritinu a kyseliny močové (Luksch *et al.*, 2016).

Mimo ultrasonografie se jako doplňující diagnostické zobrazovací vyšetření používá magnetická rezonance, která slouží k detailnějšímu přehledu o rozsahu onemocnění, a z metod nukleární medicíny poté scintigrafie skeletu s využitím ^{99m}Tc – tzv. SPECT (jednofotonová emisní výpočetní tomografie), dále PET (pozitronová emisní tomografie) s využitím ^{18}F FDG (fluorodeoxyglukózy) a především celotělová scintigrafie ^{123}I -MIBG (Leung *et al.*, 1997; Brisse *et al.*, 2011). Toto specifické vyšetření slouží k detekci metastáz a spočívá v nitrožilní aplikaci radioaktivně značeného metaiodobenzylguanidinu (s izotopem jódu ^{123}I), označovaného též jako falešný neurotransmitter, jenž je jakožto analog noradrenalinu selektivně vychytáván nádorovou tkání produkující katecholaminy (Maris *et al.*, 2007; Táborská, 2011). Pod detekčním systémem se pak specificky rozzáří místa v těle infiltrovaná NB.

Většina ze zmíněných zobrazovacích metod se používá též ke sledování úspěšnosti léčby a během následného dlouhodobého sledování po úspěšné léčbě a navození remise. Vždy je samozřejmě preferováno vyšetření s co nejmenší radiační zátěží, zároveň ale s dostatečnou senzitivitou a specificitou (Vázquez *et al.*, 2003; Štěrbá *et al.*, 2004; Federico *et al.*, 2015).

Nezastupitelnou roli má v diagnostice NB histologické vyšetření biopsie primárního tumoru, případně metastáz (například v podobě dobře dostupných lymfatických uzlin), spolu s aspirací a trepanobiopsií kostní dřeně, které společně s cytogenetickými a molekulárně

genetickými metodami slouží k přesné charakterizaci nádoru a k určení rozsahu nemoci (Ambros *et al.*, 2009; Brisse *et al.*, 2011; van Wezel *et al.*, 2016). Z hlediska morfologie je NB charakteristický malými kulatými buňkami s hyperchromním jádrem a minimálním lemem cytoplazmy (Newman a Nuchtern, 2016).

1.1.3 Prognóza NB

Po stanovení diagnózy NB je v současné době klíčová přesná stratifikace pacientů do různých rizikových skupin dle prognózy, která by měla odrážet výraznou genetickou i klinickou heterogenitu onemocnění a posléze umožnit individualizovanou terapii – od pouhého monitorování stavu až po velmi agresivní multimodální léčbu (Štěrbá *et al.*, 2004). Ke stanovení stádia nemoci se využívá v poněkud modifikované podobě již téměř 30 let starý systém INSS (International Neuroblastoma Staging System), který je založený na určení možnosti resekce nádoru chirurgem v čase diagnózy a odhadu rozsahu nemoci dle zobrazovacích metod a zahrnuje pět kategorií (Brodeur *et al.*, 1993):

- Stádium 1: lokalizovaný nádor s možností kompletní chirurgické resekce
- Stádium 2: lokalizovaný nádor, pouze nekompletní chirurgické odstranění
- Stádium 3: neresekovatelný bilaterálně lokalizovaný nádor (tedy překračující páteř), nekompletní chirurgické odstranění; případně unilaterální tumor s infiltrací lymfatických uzlin
- Stádium 4: jakýkoliv primární nádor se vzdálenými metastázami v kostech, lymfatických uzlinách, játrech (vyjma případů zahrnutých v 4S)
- Stádium 4S: specifický případ; primární nádor stádia 1 a 2 u dítěte mladšího 12 měsíců s metastázami v kůži, játrech nebo kostní dřeni

Na základě modernějšího klasifikačního přístupu vycházejícího z kritérií INRGSS (International Neuroblastoma Risk Group Staging System) jsou pacienti rozděleni do kategorií nízkého, středního či vysokého rizika (Cohn *et al.*, 2009). Zatímco u NB nízkého rizika se daří vyléčit více než 90 % dětí, u pacientů s NB vysokého rizika je úspěšnost léčby stále neuspokojivá, a sice necelých 50 % (Irwin a Park, 2015; Dobrotkova *et al.*, 2019).

Do INRGSS jsou zahrnuty prognostické faktory klinické, biologické a genetické. Mezi klinické faktory patří stádium nemoci (L1, L2, M a MS – vesměs analogické stádiím 1, 2/3, 4 a 4S v INSS) a věk, kdy klíčová je hranice 18 měsíců (Cohn *et al.*, 2009). Do skupiny faktorů biologických náleží tzv. MKI – mitosis-karyorrhexis index (procentuální zastoupení buněk v mitóze a buněk s jádrem rozpadlým na malé fragmenty), stupeň diferenciacie neuroblastů,

stupeň ploidie (diploidie/hyperdiploidie/polyploidie) a zastoupení stromatu ze Schwannových buněk v histologickém preparátu (Cohn *et al.*, 2009; Irwin a Park, 2015). Z genetických změn má pak význam amplifikace onkogenu *MYCN* a aberace chromozomu 11q (Cohn *et al.*, 2009).

Nejagresivnější tumor dle INRGSS zařazený do kategorie vysokého rizika pak reprezentuje nediferencovaný diploidní NB se vzdálenými metastázami (včetně infiltrace kostní dřeně), který je chudý na stroma ze Schwannových buněk, má vysoký index MKI, amplifikaci *MYCN* a delecii 11q a je diagnostikován u jedince staršího 18 měsíců (Cohn *et al.*, 2009; Luksch *et al.*, 2016).

1.1.4 Molekulární biomarkery a genetické změny u NB

Biomarkerem obecně rozumíme jakýkoli znak, který lze objektivně změřit a použít jako indikátor fyziologických či patologických procesů v těle, dle charakteru se pak tradičně biomarkery dělí na klasické (například histologie nádoru, přítomnost metastáz, věk, pohlaví) a molekulární, kterými jsou kupříkladu biomolekuly genomu, transkriptomu či metabolomu (de Castro *et al.*, 2013; Foretová *et al.*, 2014). Dle jejich využití lze biomarkery rozdělit do tří hlavních skupin: 1) diagnostické, jejichž výskyt je asociován s přítomností či rozsahem určité nemoci, 2) prognostické, které jsou spojovány s přežitím pacientů, a 3) prediktivní, které předpovídají odpověď onemocnění na určitý druh terapie (Brooks, 2012; de Castro *et al.*, 2013). Někdy se ještě vyčleňuje čtvrtá skupina biomarkerů rizika, jež slouží k identifikaci osob se zvýšeným rizikem rozvoje určitého onemocnění oproti obecné populaci a vedou k náležité primární a sekundární prevenci (Foretová *et al.*, 2014).

V posledních letech narůstá v onkologii význam biomarkerů na úrovni nukleových kyselin (Brooks, 2012). V praxi by se v případě NB mohl uplatnit například panel pěti mRNA markerů, který je s využitím RT-qPCR (kvantitativní PCR po reverzní transkripci) schopen detekovat nádorové buňky ve vzorku kostní dřeně s mnohem větší senzitivitou než klasické histologické vyšetření (van Wezel *et al.*, 2016). V rámci navrženého panelu se vyhodnocuje exprese těchto pěti genů: *PHOX2B* (paired-like homeobox 2B), *DDC* (dopa-dekarboxyláza), *TH* (tyrosin hydroxyláza), *CHRNA3* (nikotinový cholinergní receptor alfa 3) a *GAP43* (growth associated protein 43), přičemž použití komplexního panelu dává lepší výsledky než informace o expresi pouze jediného genu ze souboru (van Wezel *et al.*, 2016). *PHOX2B* kóduje transkripční faktor zapojený do diferenciaci neuroblastů, stejně jako *GAP43*, který je klíčový pro vytvoření axonu, zatímco produkty genů *DDC* i *TH* jsou enzymy biosyntézy katecholaminů v nadledvinách a *CHRNA3* má roli v neurotransmisii (Nakagawara *et al.*, 2018). Další potenciální molekulární biomarkery NB odhalili Chen *et al.* (2021), kteří pomocí

bioinformatických analýz dat z mikročipů, dostupných v elektronických databázích, našli dokonce 238 odlišně exprimovaných genů u NB.

Z cytogenetických abnormalit přítomných u NB jsou významné zejména amplifikace onkogenu *MYCN*, delece v oblasti 1p36 a 11q, a dále zisk genetického materiálu v oblastech 1q, 2p a 17q, přičemž NB je všeobecně charakteristický značným množstvím CNVs (copy number variations) (Depuydt *et al.*, 2018). Gen *MYCN* (2p24) kódující transkripční faktor N-MYC bývá amplifikován ve více než 10 kopiích zhruba u 22 % pacientů s NB a je tak jednou z nejčastějších pozorovaných aberací u NB (Newman a Nuchtern, 2016). Jeho název je odvozen od homologního v-Myc u viru ptačí myelocytomatózy a amplifikace je spojena se špatnou prognózou (Irwin a Park, 2015). Nadprodukce N-MYC vede k deregulaci růstu a proliferace buněk, a proto je amplifikace tohoto genu dokonce považována za jeden ze spouštěčů („driver“) onemocnění (Newman a Nuchtern, 2016). Působení proteinu N-MYC je vysoce komplexní a zasahuje do širokého spektra signálních drah, například PI3K/AKT, MAPK, TGF- β či EGFR, u nichž konkrétně byla prokázána nepřímá regulace přes potlačení exprese inhibitoru růstu *NDRG1* (N-MYC downstream regulated gene 1) (Kovacevic *et al.*, 2016).

Nízká exprese samotného *NDRG1* je přitom asociována s nepříznivou prognózou i u pacientů bez amplifikace *MYCN* (Matsushita *et al.*, 2013). Některé NB se špatnou prognózou vykazují rovněž vysokou expresi transkripčního faktoru c-MYC, který funkčně zastupuje N-MYC, coby člen stejné rodiny protoonkogenů (Yang *et al.*, 2017; Wei *et al.*, 2020). Nedochozí přitom přímo k amplifikaci celého genu jako je tomu u *MYCN*, ale obvykle je aberantní exprese důsledkem amplifikace nebo translokace zesilovačů transkripce, přičemž také tato genetická událost může představovat spouštěč onemocnění (Zimmerman *et al.*, 2018).

V oblasti 1p36, která bývá často deletována u pacientů s NB, je kódováno hned několik kandidátních nádorových supresorů, které mohou být kauzálně zapojeny do patogeneze NB. Jde například o gen *KIF1B β* , kódující motorový protein ze skupiny kinezinů, důležitý v regulaci apoptózy, nebo gen *CHD5*, jehož produkt je zapojen do remodelace chromatinu a vedle apoptózy kontroluje i proliferaci a buněčnou senescenci (Nakagawara *et al.*, 2018). Naopak kandidátní onkogeny v oblasti 17q reprezentuje například gen *BIRC5* kódující inhibitor apoptózy survivin (Irwin a Park, 2015).

Výzkumy zaměřené na familiární případy NB odhalily možné genetické predispozice ke vzniku NB. Zvýšená incidence NB byla popsána například v kontextu neurofibromatózy typu 1 a první zárodečnou mutací, u níž bylo prokázáno, že predisponuje k rozvoji NB, byla missense mutace v genu *PHOX2B* v oblasti 4p12 (Trochet *et al.*, 2004; Schleiermacher *et al.*, 2014). Dalšími geny, které bývají u NB mutované, jsou *BARD1* a *ALK* (anaplastic lymphoma

kinase) v oblastech 2q35 a 2p23 (Schleiermacher *et al.*, 2014). Je pozoruhodné, že v bezprostřední blízkosti lokusu pro *ALK* se nachází i *MYCN*. Mutace *ALK* vedoucí ke vzniku konstitutivně aktivní varianty této receptorové tyrosinkinázy se vyskytují u 8–10 % všech NB a obvykle jsou spojovány s nepříznivou prognózou (Schleiermacher *et al.*, 2014).

S nepříznivou prognózou je dále spojována nadměrná exprese TrkB (tropomyosin receptor kinase B) z rodiny transmembránových receptorových tyrosinkináz, kódované genem *NTRK2* (neurotrophic tyrosine kinase receptor 2) v oblasti 9q22 (Brodeur *et al.*, 2009). V případě koexprese TrkB a jejího ligandu BDNF (brain-derived neurotrophic factor) bývá NB vysoce invazivní, metastazující, angiogenní a často rezistentní na protinádorovou terapii (Iyer *et al.*, 2016). Naopak exprese příbuzných receptorů TrkA a TrkC, kódovaných geny *NTRK1* a *NTRK3* v oblastech 1q21 a 15q25, je charakteristická pro NB nízkého rizika (Brodeur *et al.*, 2009). TrkA, mající úlohu v diferenciaci neuroblastů, je aktivována vazbou ligandu NGF (nerve growth factor), zatímco ligandem TrkC je neurotrophin-3 (Brodeur *et al.*, 2009). Dokonce se zdá, že dráha NGF/TrkA je klíčovým faktorem při spontánní regresi NB (Iyer *et al.*, 2016).

1.1.5 Současné možnosti léčby NB

Vysoká klinická heterogenita NB podmiňuje rovněž vysokou variabilitu terapeutických strategií. Dle zařazení do jedné z rizikových skupin a konkrétních molekulárních charakteristik nádoru je tak u každého pacienta stanoven individuální léčebný protokol (Luksch *et al.*, 2016). Obecně se v současnosti daří navodit remisi u přibližně 70 % pacientů, nicméně u NB vysokého rizika samostatně je to pouze necelých 50 % (Laverdière *et al.*, 2009; Irwin a Park, 2015).

U pacientů s NB nízkého rizika, tedy typicky u dětí do 6 měsíců věku a prenatalních diagnóz, je poměrně vysoká šance spontánní regrese nádoru a často se tedy přistupuje pouze k průběžnému sledování stavu (ultrazvuk, katecholaminy) (Nuchtern *et al.*, 2012). Zatímco u pacientů v kategorii NB středního rizika je obvyklým postupem chemoterapie a chirurgický zákrok, v případě NB vysokého rizika je léčba velmi komplexní a zahrnuje několik léčebných modalit, od indukční chemoterapie přes chirurgický zákrok a radioterapii až po konsolidační terapii, diferenciací bioterapii a imunoterapii (Matthay *et al.*, 1999; Irwin a Park, 2015).

Mezi konkrétní cytostatika podávaná v rámci několika cyklů indukční chemoterapie patří inhibitory topoizomeráz topotecan, etoposid a doxorubicin, interkalátor cisplatina, alkylační činidlo cyklofosfamid a inhibitor polymerace mikrotubulů vinkristin (Simon *et al.*, 2011; Veselska *et al.*, 2019). Během podávání cytostatik trpí pacienti vedlejšími účinky jako je alopecie (vypadávání vlasů), nevolnost a pancytopenie projevující se záněty a krvácením ze sliznic, těžkými průjmy a imunodeficitem (Demaria *et al.*, 2016; Nurgali *et al.*, 2018).

Cílem následného chirurgického zákroku je minimalizovat zbytky nádoru v těle. Pro snížení závažnosti pooperačních komplikací se provádí resekce rezidua přítomného v oblasti primárního tumoru obvykle laparoskopicky (Kelleher *et al.*, 2013). Poté pacienti většinou podstupují ozařování této oblasti (nejčastěji břišní dutiny), případně významných míst metastáz, přičemž NB je jedním z nejvíce radiosenzitivních nádorů (Irwin a Park, 2015).

Konsolidační chemoterapií se rozumí použití specifické kombinace cytostatik v maximální tolerovatelné dávce, jež má vymýtit poslední zbytky nemoci v těle (Ladenstein *et al.*, 2017). Tato tzv. vysokodávková myeloablativní chemoterapie má výrazný cytotoxický efekt, bývá proto následována autologní transplantací čištěných progenitorů krvetvorby, jež byly odebrány pacientovi v průběhu prvních měsíců léčby a jejichž úkolem je osídlit nefunkční kostní dřeň pacienta a obnovit hematopoézu (Matthay *et al.*, 1999; Štěrbá *et al.*, 2004). Používanými cytostatiky jsou vedle alkylačních činidel melfalanu s busulfanem také interkalátor karboplatina a inhibitor topoizomerázy II etoposid (Ladenstein *et al.*, 2017).

Po dosažení minimální reziduální nemoci (MRD; minimal residual disease) je dále používána biologická léčba indukující diferenciaci buněk, jež spočívá v dlouhodobém podávání retinoidu (derivátu vitamínu A), konkrétně ATRA (*all-trans* retinoic acid) nebo izotretinoinu (chemicky 13-*cis*-retinoic acid) (Matthay *et al.*, 1999; Dobrotkova *et al.*, 2019). Další léčebnou modalitou je imunoterapie, která využívá odlišností v antigenní výbavě nádorových buněk. Klinicky používané jsou například monoklonální protilátky antigangliosidázy (anti-GD2), jejichž příkladem je dinutuximab (Yu *et al.*, 2010; Newman a Nuchtern, 2016).

Nové poznatky o molekulární biologii NB, jako je identifikace konkrétních genů zapojených do tumorigeneze a rozkrytí molekulárních drah, umožňují zavádět do léčebných postupů nové metody (Almstedt *et al.*, 2020). Takovým případem je inhibitor histon deacetyláz Cpd2 (Rettig *et al.*, 2015), inhibitor ALK crizotinib (Mossé *et al.*, 2013), nebo alisertib, což je inhibitor Aurora kinázy A, která má roli ve stabilizaci N-MYC (DuBois *et al.*, 2016). Nadějným se jeví také regorafenib, inhibitor celé řady kináz vč. MAPK i PI3K (Subramonian *et al.*, 2020).

Po úspěšné onkologické léčbě by měli být pacienti v remisi dlouhodobě sledováni pro včasný záchyt případného relapsu onemocnění nebo sekundární malignity vyvolané agresivní léčbou cytostatiky či ozařováním, z nichž dominují akutní myeloidní leukémie a karcinomy štítné žlázy, prsu, jater či ledvin (Laverdière *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2014; Luksch *et al.*, 2016). Jejich kumulativní incidence do 15 let po léčbě přitom může dosahovat až 34 % (Martin *et al.*, 2014). Další výzvou je včasné odhalení, léčba či zmírnění pozdních léčebných následků jako jsou poruchy plodnosti, zhoršená funkce štítné žlázy, hypertenze, chronické poškození plic a ledvin či ztráta sluchu (Laverdière *et al.*, 2009; Elzembely *et al.*, 2018).

1.2 Serotonin (5-HT) a serotoninové receptory

Serotonin, chemicky 5-hydroxytryptamin (5-HT), patří mezi monoaminy a jde o jednu z evolučně nejstarších signálních molekul, kterou můžeme nalézt už u některých jednobuněčných organismů (Hannon a Hoyer, 2008). Název získal díky svému výskytu v séru, odkud byl také ve 40. letech 20. století izolován, a díky tomu, že byl popsán jeho vliv na tonus hladkého svalstva stěn cév (Rapport *et al.*, 1948). 5-HT je molekulou nervového i endokrinního systému – jde tedy o hormon a současně neurotransmitter. Jak obě dvě funkční role, tak zásoby 5-HT jsou přitom díky hematoencefalické bariéře oddělené a odhaduje se, že až 95 % veškerého 5-HT v těle je lokalizováno a syntetizováno mimo CNS (Sahu *et al.*, 2018).

Kromě neuronů se 5-HT nachází v buňkách gastrointestinálního traktu (GIT) a v leukocytech, jejichž funkce (včetně fagocytózy) reguluje (Mössner a Lesch, 1998). Je také přítomen v krevních destičkách, jež vychytávají 5-HT pocházející z GIT a posléze jej jakožto jeho hlavní nosiče v krevním řečišti dopravují do různých částí těla a uvolňují například v místech tkáňového poškození, kde napomáhá v udržení hemostázy a v regeneraci tkáně (Lesurtel *et al.*, 2006). Konkrétně po aktivaci destiček je 5-HT spolu s dalším obsahem denzních granúl v cytoplazmě sekretován do okolí a podílí se na agregaci trombocytů a lokální vazokonstrikci (Berger *et al.*, 2009).

Jakožto hormon, přesněji autokrinní, parakrinní i endokrinní faktor, ovlivňuje 5-HT proliferaci, migraci i apoptózu buněk a je také zapojen do regulace metabolismu lipidů a glukózy či do kontroly dýchacích pohybů (Manzke *et al.*, 2010; El-Merahbi *et al.*, 2015; Sahu *et al.*, 2018). Zajímavým jevem je tzv. serotonylace, která představuje posttranslační modifikaci proteinů, při níž 5-HT slouží jako substrát pro enzym transglutaminázu, která jej přenáší na glutamin v polypeptidovém řetězci (Walther *et al.*, 2003a). Poprvé byla serotonylace prokázána u trombocytů, kde slouží jako signál pro exocytózu α -granul (Walther *et al.*, 2003a). Dále k ní dochází například v buňkách hladké svaloviny cév, kde má význam při svalové kontrakci (Guilluy *et al.*, 2007). 5-HT zasahuje prostřednictvím této modifikace i do epigenetických procesů. Během diferenciací neurálních progenitorů byla totiž pozorována serotonylace histonů vedoucí ke změnám genové exprese (Farrelly *et al.*, 2019).

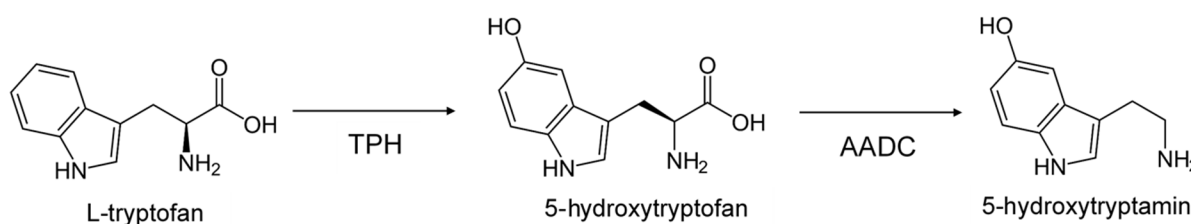
Pokud jde o CNS, je prokázán vliv 5-HT na paměť a učení, kognitivní funkce, vnímání bolesti, termoregulaci, příjem potravy i cirkadiánní rytmus a kvalitu spánku (Berger *et al.*, 2009; Jenkins *et al.*, 2016). Pro svou roli v regulaci nálady je 5-HT také označován za hormon štěstí a právě nedostatek 5-HT je jednou z příčin depresí (Jenkins *et al.*, 2016). Nadbytek 5-HT (obvykle v souvislosti s léčbou depresí) může naopak způsobovat hypertenzi, pocení,

tachykardii, bolesti hlavy, třesavku, mimovolní svalové záškuby a celkové přehřátí organismu, tedy příznaky souhrnně označované jako serotoninový syndrom (Boyer a Shannon, 2005).

1.2.1 Biochemie 5-HT

Aminy obecně jsou jednou ze skupin dusíkatých derivátů uhlovodíků, biogenní monoaminy lze navíc považovat za deriváty aminokyselin, které obsahují aminoskupinu ($\text{NH}_2 -$) připojenou k aromatickému kruhu přes uhlíkový řetězec. Konkrétně 5-HT je derivátem tryptofanu a spadá mezi biogenní monoaminy sloužící jako neurotransmitery, kam se dále řadí katecholaminy dopamin, adrenalin a noradrenalin, jež jsou odvozené od fenylalaninu respektive tyrosinu (Sahu *et al.*, 2018; Yeung *et al.*, 2019).

Ačkoli 5-HT jako takový je v potravě běžně přijímán, organismus si jej pro biologické funkce tvoří sám a hematoencefalickou bariérou jsou schopny projít pouze prekurzory 5-HT (Jenkins *et al.*, 2016). Biosyntéza 5-HT probíhá ve dvou metabolických krocích (Obr. 1).



Obrázek 1: Biosyntéza serotoninu. Nejprve je esenciální aminokyselina tryptofan přijatá v bílkovinné potravě hydroxylována na 5-hydroxytryptofan pomocí enzymu tryptofan hydroxylázy (TPH), posléze dochází k dekarboxylaci 5-hydroxytryptofanu pomocí dekarboxylázy aromatických aminokyselin (AADC). (El-Merahbi *et al.*, 2015; upraveno)

Syntéza 5-HT jakožto mediátoru v rámci CNS probíhá ve speciálních neuronech Raphových jadérek mozkového kmene (Jenkins *et al.*, 2016). Periferní 5-HT coby hormon v systémové cirkulaci je tvořen střevními myenterickými neurony a enterochromafinními buňkami, což jsou specializované endokrinní buňky, z nichž se poté 5-HT dostává do krevního řečiště (Yano *et al.*, 2015; Jenkins *et al.*, 2016). Při biosyntéze 5-HT v GIT je přičítána velká role i střevní mikroflóře (Yano *et al.*, 2015). Celkově téměř 95 % veškerého 5-HT v těle pochází z GIT (Berger *et al.*, 2009). Stojí za povšimnutí, že zatímco v GIT vzniká 5-HT působením izoenzymu TPH1, v mozku je klíčovým enzymem jeho tvorby TPH2 (Walther *et al.*, 2003b).

Naopak odbourávání 5-HT zajišťuje v neuronech, játrech, plicích a buňkách GIT enzym monoaminoxidáza typu A spolu s acetaldehyd dehydrogenázou, výsledným metabolitem je potom 5-hydroxyindolacetát vylučovaný z těla močí (Tyce, 1990; Jenkins *et al.*, 2016). Další

katabolickou drahou je syntéza „hormonu spánku“ melatoninu přes meziprodukt N-acetylserotonin, která probíhá v epifyze v mezimozku (Tyce, 1990).

1.2.2 Rozmanitost serotoninových receptorů

Mezi všemi monoaminovými neurotransmitery je 5-HT výjimečný nesmírně širokým spektrem receptorů, jež jako ligand aktivuje (Hannon a Hoyer, 2008). Dosud bylo identifikováno 14 funkčně i strukturně odlišných subtypů transmembránových receptorů pro serotonin (HTRs; 5-hydroxytryptamine receptors), které jsou vedle neuronů CNS a PNS (periferní nervový systém) přítomny také na povrchu enterocytů, lymfocytů, monocytů a makrofágů (Mössner a Lesch, 1998; Hoffman *et al.*, 2012; Sahu *et al.*, 2018). Serotonergní neurony inervují různé oblasti mozku a v CNS tvoří difúzní síť (Jenkins *et al.*, 2016). Dosud bylo definováno sedm rodin HTRs (HTR1–7) a odhaduje se, že jednotlivé rodiny se začaly oddělovat zhruba před 750 miliony let (Hannon a Hoyer, 2008), zatímco počátky jejich klasifikace sahají do roku 1957 (Gaddum a Picarelli, 1957). K ještě větší heterogenitě systému HTRs přispívá alternativní sestřih a také tvorba heteromerních HTRs složených z více typů podjednotek (Hannon a Hoyer, 2008).

Kromě HTR3, který je iontovým kanálem (viz níže), se jedná o metabotropní receptory spojené s G proteinem (GPCRs, G protein-coupled receptors), které za pomoci druhých posílají přenáší signál k efektorům (Hannon a Hoyer, 2008). GPCRs se skládají z extracelulárního N-konce, transmembránové domény tvořené α -helixy, která sedmkrát prochází membránou, a z C-konce v cytoplazmě (Pierce *et al.*, 2002). Po vazbě ligandu dochází ke změně konformace receptorového proteinu a k interakci intracelulární části s G proteinem, z něž je poté uvolněn GDP a nahrazuje jej GTP a následuje disociace G proteinu na podjednotku α a dimer $\beta\gamma$ (Pierce *et al.*, 2002). Dle typu G proteinu (respektive jeho α podjednotky), s kterým jsou HTRs spřaženy, pak dochází k různým dějům v buňce.

HTR2 spřažený s podjednotkou G_q aktivuje hydrolýzu PIP_2 (fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát) na IP_3 (inositol-1,4,5-trifosfát) a DAG (diacylglycerol) fosfolipázou $C\beta$ (Van Oekelen *et al.*, 2003; Hannon a Hoyer, 2008). Výsledkem je aktivace membránové proteinkinázy C a nárůst intracelulární hladiny Ca^{2+} vlivem uvolnění iontů z endoplazmatického retikula a finální odpovědí buňky je změna genové exprese či excitace (Van Oekelen *et al.*, 2003).

HTR4, HTR6 a HTR7 interagují s G_s a stimulují tak enzym adenylátcyklázu (Hannon a Hoyer, 2008). Následný nárůst hladiny cAMP pak ovlivňuje aktivitu dalších iontových kanálů a také aktivuje proteinkinázu A, která fosforyluje celou řadu substrátů včetně transkripčního

faktoru CREB (cAMP response element binding protein), což vede ke změnám genové exprese (Hannon a Hoyer, 2008).

Signalizace skrze HTR1 a HTR5 spojené s G_i působí naopak na adenylátcyklázu inhibičně a konečným buněčným efektem může být hyperpolarizace membrány a inhibice přenosu vzruchu, i když některé výzkumy naznačují i odlišné účinky a spřažení s jinými G proteiny v závislosti na typu buněk (Cowen, 2007; Hannon a Hoyer, 2008).

Z uvedeného je zřejmé, že působení 5-HT na jednotlivé buňky je dáno spektrem receptorů, které tyto buňky exprimují na svém povrchu. Byly také pozorovány odlišnosti v signalizaci přes konkrétní HTR v závislosti na typu tkáně, ve které probíhá (Cowen, 2007; Sahu *et al.*, 2018). Obecně lze shrnout, že aktivace HTRs ligandem spouští kaskádu dějů spojených s modulací intracelulární hladiny Ca^{2+} či cAMP, případně se změnou membránového potenciálu, přičemž výsledný účinek může být velmi komplexní a zahrnuje změny v genové expresi, aktivaci různých proteinkináz a modulaci uvolňování dalších neurotransmiterů i hormonů (Cowen, 2007; Hannon a Hoyer, 2008; Sahu *et al.*, 2018).

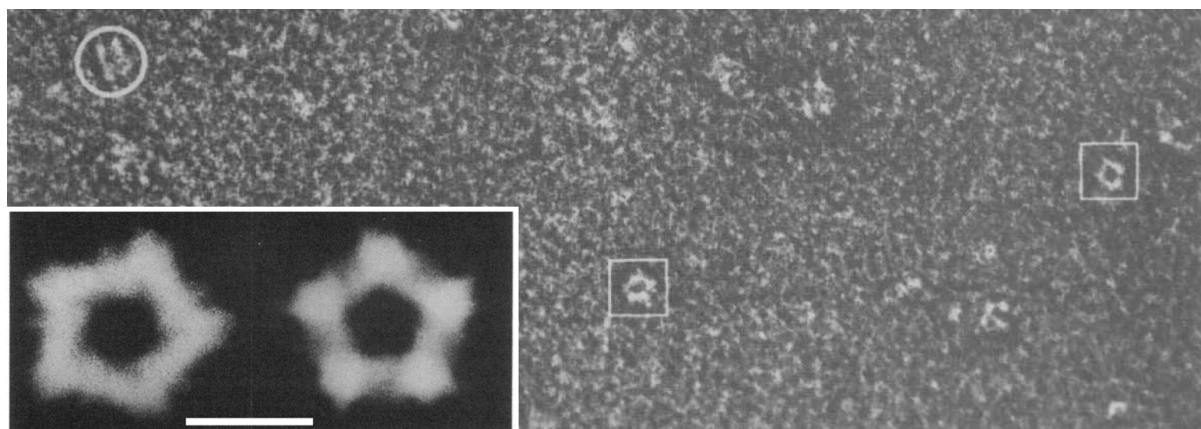
Z recentní studie, která zmapovala serotoninovou dráhu, vyplývá, že HTRs navíc zasahují do širokého spektra signálních drah a biologických procesů, z nichž většina není kontrolována pouze jedním typem HTR, ale obvykle jde o výsledek kombinace aktivit několika různých receptorů, které tak tvoří provázanou síť (Sahu *et al.*, 2018). Jde například o MAP kinázovou dráhu (též Ras-Raf-MEK-ERK) nebo signalizaci přes PI3K/AKT, které zásadním způsobem regulují proliferaci, růst buněk i apoptózu (Sahu *et al.*, 2018). Z určitého úhlu pohledu tak lze 5-HT vzhledem k jeho úloze v prorůstových signálních drahách považovat i za růstový faktor (Cowen, 2007).

1.2.3 HTR3

Na rozdíl od ostatních HTRs je HTR3 ligandem řízený iontový kanál (LGIC; ligand-gated ion channel) pro draslíkové, sodíkové i vápenaté ionty (Niesler *et al.*, 2008; Sahu *et al.*, 2018). V souvislosti s tématem této práce je zajímavé, že byl identifikován a izolován z buněčných linií NB (Maricq *et al.*, 1991). Díky snímkům z elektronového mikroskopu víme, že HTR3 je pentamer složený z pěti symetricky uspořádaných podjednotek obklopujících centrální kanál (Boess *et al.*, 1995; Obr. 2). Každá podjednotka HTR3 se skládá z extracelulární domény vázající ligand, transmembránové domény ze čtyř α -helixů a cytoplazmatické domény, která ovlivňuje propustnost kanálu pro ionty (Thompson *et al.*, 2010; Obr. 3).

Dnes je známo pět typů podjednotek kódovaných geny *HTR3A* až *HTR3E* v lokusech 11q23 (A, B) respektive 3q27 (C, D, E) (Niesler *et al.*, 2008; Holbrook *et al.*, 2009). Nejběžnější

podjednotka HTR3A, která je jako jediná ze všech pěti podjednotek schopna tvořit funkční homopentamer, má 487 aminokyselin, zatímco HTR3B sestává z 441 aminokyselin (Maricq *et al.*, 1991; Dubin *et al.*, 1999; Niesler *et al.*, 2008). Zbylé tři podjednotky, objevené na základě sekvenční homologie, mají pravděpodobně menší význam, jejich přesná role dosud nebyla objasněna a jejich distribuce a exprese je tkáňově specifická (Niesler *et al.*, 2003; Holbrook *et al.*, 2009). Kupříkladu podjednotky D a E jsou exprimovány prakticky výhradně v GIT (Niesler *et al.*, 2003). Funkční diverzitu HTR3 dále navyšuje také alternativní sestřih, který se uplatňuje u *HTR3A* i *HTR3C* (Karnovsky *et al.*, 2003).

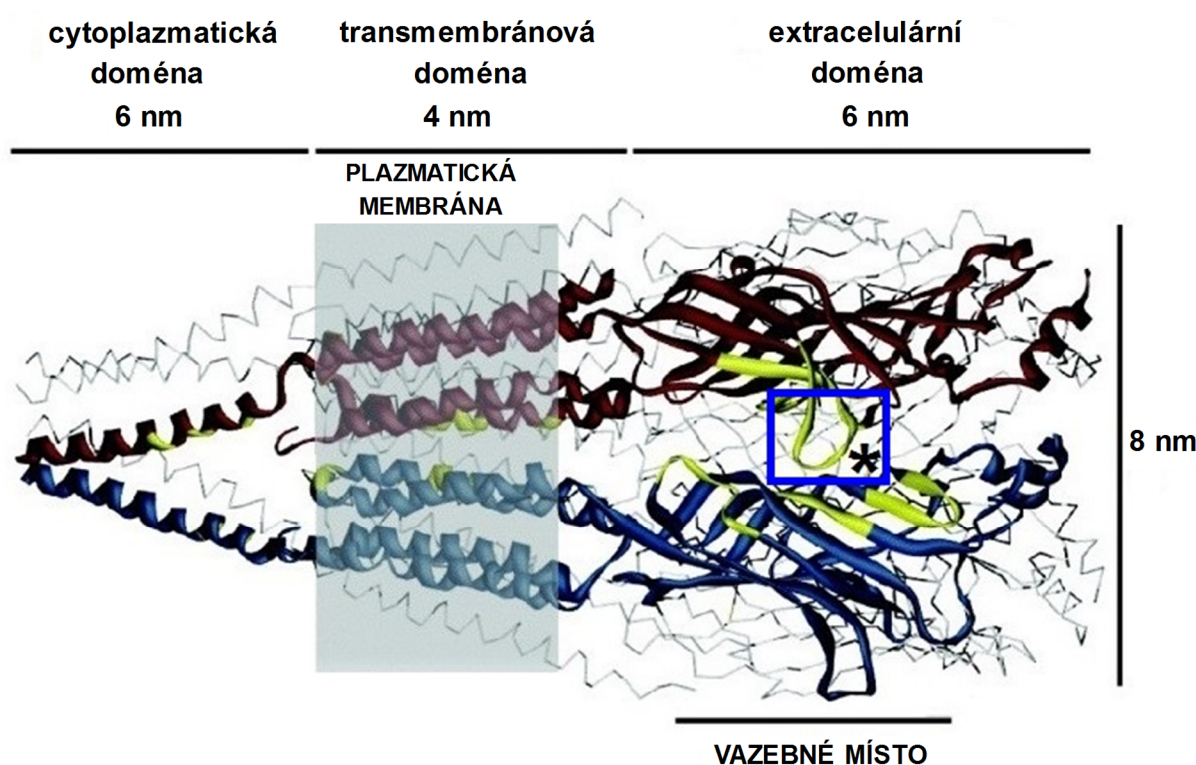


Obrázek 2: HTR3 na snímku z elektronového mikroskopu. Jedná se o HTR3 získané z buněčných lyzátů purifikovaných pomocí afinitní chromatografie a následně nanesené na měděnou mřížku a barvené (metodou negativního kontrastu) 1% uranyl acetátem. Receptory zarámované čtvercem jsou HTR3 při pohledu shora (podél osy), zakroužkovaný HTR3 představuje boční pohled na receptor. Měřítka = 10 nm. V levé dolní části obrázku je potom zvětšený pentamer HTR3 z následné spektrální analýzy. Bílé měřítko = 5 nm. (Boess *et al.*, 1995)

Maximální aktivitou a propustností kanálu se vyznačuje HTR3 s heteromerní kombinací podjednotek HTR3A a HTR3B, což odpovídá i fyziologickému výskytu v těle (Davies *et al.*, 1999). Homopentamer složený pouze z pěti podjednotek HTR3B naopak funkční receptory vůbec netvoří (Boyd *et al.*, 2002). Propustnost kanálu je také ovlivněna posttranslačními modifikacemi receptorových proteinů, například fosforylací konkrétních aminokyselin (Van Hooft a Vijverberg, 1995). Značný funkční dopad mohou mít i drobné strukturní změny, například záměna jedné aminokyseliny (Yakel *et al.*, 1993).

HTR3 má oproti ostatním HTRs nižší afinitu k 5-HT, ale velmi rychle se aktivuje, konkrétně v řádu několika milisekund (Gellynck *et al.*, 2013). Nachází se na presynaptických i postsynaptických nervových zakončeních v CNS i PNS, kde jeho aktivace spouští rychlou depolarizaci a excitaci neuronů, která je zprostředkována vtokem Na^+ a Ca^{2+} do buňky současně s vypuštěním K^+ z neuronu (Hannon a Hoyer, 2008). Zvýšená koncentrace vápenatých iontů

v cytosolu poté spouští nespočet dalších efektů v buňce (Hannon a Hoyer, 2008; García-González *et al.*, 2017). Jako sekundární poslové aktivují další proteiny buď přímo nebo prostřednictvím kalmodulinu, jednoho z buněčných senzorů pro Ca^{2+} , který poté přes různé kinázy z rodiny CaMK (Ca^{2+} /kalmodulin dependentní kináza) zasahuje například do signální dráhy MAPK nebo AMPK (adenosine monophosphate-activated protein kinase) a také reguluje genovou expresi přes fosforylaci transkripčního faktoru CREB (Tebar *et al.*, 2002; Fujiwara *et al.*, 2016).

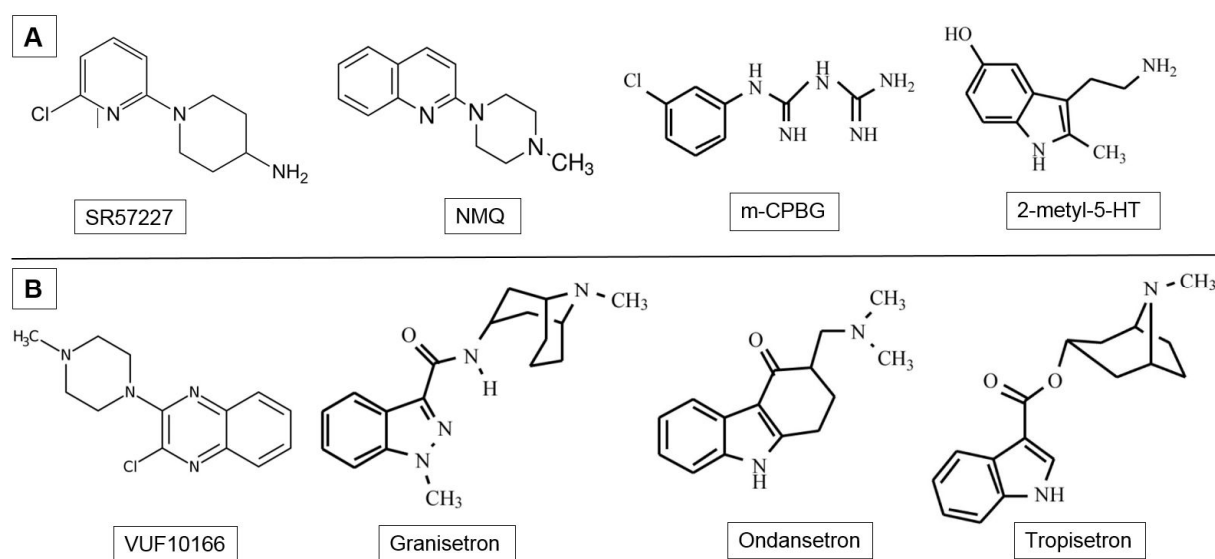


Obrázek 3: Model kvartérní struktury HTR3 (boční pohled). Dvě z pěti podjednotek jsou barevně zvýrazněny, konkrétně červeně a modře. Lze si všimnout α -helixů v transmembránové doméně, charakteristické smyčky v extracelulární doméně (*) i místa vazby ligandu. Průchod receptoru plazmatickou membránou je naznačen šedým podbarvením. (Thompson *et al.*, 2010; upraveno)

Aktivace HTR3 může řídit například migraci buněk nebo může mít proapoptotický efekt (Cowen, 2007; García-González *et al.*, 2017). V neuronech pak signalizace přes tyto receptory rovněž moduluje uvolnění dalších neurotransmiterů jako je dopamin, GABA, acetylcholin či glutamát a vede také k uvolnění samotného 5-HT, což může naznačovat existenci jakési pozitivní zpětné vazby (Martin *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 2017). V rámci PNS má HTR3 vliv na kardiovaskulární systém i GIT, kde reguluje motilitu střev, peristaltiku i exokrinní sekreci (Thompson a Lummis, 2006; Hannon a Hoyer, 2008). Inhibice aktivace HTR3 má antiemetické, anxiolytické a antipsychotické účinky a HTR3 tak představuje významný terapeutický cíl v léčbě nevolnosti, deprese či úzkosti (Thompson a Lummis, 2006).

1.2.4 Modulace signalizace

S HTR3 interaguje selektivně, případně neselektivně, velké množství ligandů. Mezi agonisty patří 2-metyl-5-hydroxytryptamin, NMQ (N-methylquipazine), SR57227 (4-amino-1-(6-chloro-2-pyridyl)-piperidine), m-CPBG (m-chlorfenylbiguanid), PBG (fenylbiguanid) a další arylbiguanidy i arylguanidy (Dukat *et al.*, 1996; Thompson a Lummis, 2006; Hannon a Hoyer, 2008; Obr. 4). Mezi sebou se liší svou účinností ve srovnání s 5-HT, přičemž například m-CPBG je desetkrát účinnější než přirozený ligand HTRs (Thompson a Lummis, 2006).



Obrázek 4: Vybraní agonisté (A) a antagonisté (B) HTR3. Použité zkratky: 2-metyl-5-HT, 2-metyl-5-hydroxytryptamin; m-CPBG, m-chlorfenylbiguanid; NMQ, N-methylquipazine; SR57227, 4-amino-1-(6-chloro-2-pyridyl)-piperidine. (Thompson a Lummis, 2006; upraveno)

Mezi antagonisty se řadí granisetron, ondansetron, tropisetron, dolasetron, bemesetron, alosetron, zacopride a VUF10166, který ale při vyšších koncentracích působí také jako parciální agonista (Thompson a Lummis, 2006; Thompson *et al.*, 2012; Obr. 4). Antagonisté sdílí základní aromatickou strukturu s 5-HT i agonisty, ale oproti nim mají větší vzdálenost mezi aromatickým kruhem a aminovou skupinou, a většina z nich působí již v nanomolárních koncentracích (Thompson a Lummis, 2006). Navzdory odlišným funkčním vlastnostem homomerních a heteromerních receptorů je obvykle afinita agonistů a antagonistů nezávislá na podjednotkovém složení pentamerů HTR3 (Hannon a Hoyer, 2008). Všechny tyto látky jsou tedy účinné proti HTR3A a jejich efekty na buňku jsou závislé právě na přítomnosti této podjednotky, která je zásadní pro tvorbu funkčního receptoru.

Z dalších modulátorů HTR3 jsou významné některé dvojmocné ionty (například Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+}), které mohou působit jako inhibitory receptoru (Gill *et al.*, 1995). Serotonergní systém a konkrétně HTR3 je také zodpovědný za některé z účinků sedativ, celkových anestetik

trichlorethanolu, halotanu, isofluranu, ketaminu, metohexitalu a lokálních anestetik prokainu, tetrakainu, lidokainu i kokainu, jež na něj působí inhibičně (Parker *et al.*, 1996). Signalizaci přes HTR3 inhibují i steroidní hormony estradiol a progesteron (Wetzel *et al.*, 1998).

Hlavní klinické využití HTR3 spočívá v potlačování nevolnosti vyvolané léčbou cytostatiky (CINV; chemotherapy-induced nausea and vomiting) a v léčbě syndromu dráždivého tračníku (IBS; irritable bowel syndrome) (Thompson a Lummis, 2006). Pokud jde o CINV, antagonisté HTR3 slouží už několik let jako zlatý standard při léčbě tohoto vůbec nejčastějšího nežádoucího účinku chemoterapeutik, přičemž konkrétně blokují HTR3 na bloudivém nervu, který zvracení vyvolává (Schnell, 2003). U IBS se zase antagonistá HTR3 alosetron uplatňuje jako analgetikum a také zpomaluje průchod tráveniny střevy a zvyšuje absorpci (Jones *et al.*, 1999; Thompson a Lummis, 2006). HTR3 jsou dále cílem léků proti úzkosti, svědění, ranní nevolnosti během těhotenství a antagonisté HTR3 mají význam i v léčbě schizofrenie, deprese či epilepsie (Thompson a Lummis, 2006; Kim *et al.*, 2017).

Agonisty ostatních HTRs reprezentuje například sumatriptan a gepirone u HTR1, psilocibin a 5-methoxytryptamin u HTR2, cisaprid a BIMU1 u HTR4 a renzaprid u HTR5 (Barnes a Sharp, 1999; Hannon a Hoyer, 2008). Z antagonistů jsou významné například ritanserin a WAY 100635 u HTR1, ketanserin, mesulergin, mianserin a spiperon u HTR2 či klopazin a metitepin u HTR6 (Barnes a Sharp, 1999; Hannon a Hoyer, 2008).

Vedle HTRs je dalším významným a terapeuticky využívaným cílem serotoninový transportér (SERT), který je zodpovědný za přenos extracelulárního 5-HT do buněk, a tedy regulaci hladiny 5-HT schopného aktivace serotonergní signalizace (Sahu *et al.*, 2018). V případě trombocytů, jež shromažďují 5-HT v granulích v cytoplazmě, jde o vychytávání nasyntetizovaného 5-HT uvolněného do cirkulace, zatímco u neuronů se jedná o zpětné vychytávání volného 5-HT v synaptické šterbině po proběhlé signalizaci a jeho odklizení do váček v presynaptické části (Ramamoorthy *et al.*, 2011; Sahu *et al.*, 2018).

SERT, kódovaný genem *SLC6A4* (Solute Carrier Family 6 Member 4) v oblasti 17q11, tvoří dvanáct transmembránových α -helixů a nachází se vedle neuronů a trombocytů i na povrchu lymfocytů, monocytů a makrofágů (Mössner a Lesch, 1998; Mercado a Kilic, 2010; Ramamoorthy *et al.*, 2011). Mechanismem přenosu je symport 5-HT a Na^+ s Cl^- a současně antiport K^+ , přičemž vše je poháněno právě gradienty iontů, které jsou vytvářeny Na^+/K^+ pumpou (Murphy *et al.*, 2004). Mutace v SERT jsou asociovány s některými vývojovými poruchami, například s autismem (Sutcliffe *et al.*, 2005).

Látky blokující SERT a zvyšující tak extracelulární koncentraci 5-HT jsou používány jako antidepresiva a anxiolytika, případně také při léčbě alkoholismu či migrény (Murphy *et al.*,

2004; Sahu *et al.*, 2018). Jde o psychoaktivní léčiva označovaná jako tzv. selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI; selective serotonin reuptake inhibitors), které představují vůbec nejčastější typ antidepresiv (Gualano *et al.*, 2014). Inhibicí SERT dochází ke hromadění 5-HT v synaptické štěrbině a ten tak může opětovně aktivovat HTRs, čímž dochází ke krátkodobému zvýšení serotonergní signalizace (Ramamoorthy *et al.*, 2011). Mezi nejčastěji předepisovaná antidepresiva ze skupiny SSRI patří escitalopram (komerčně známý jako Cipralex či Lexapro), sertralin (Zoloft) či fluoxetin (Prozac) (Ramamoorthy *et al.*, 2011; Kirino, 2012). Alternativním antidepresivem k SSRI je prekurzor 5-HT, tedy 5-hydroxytryptofan, který lze koupit v lékárně jako doplněk stravy (Kious *et al.*, 2017).

1.2.5 Serotonergní signalizace v prenatálním období

Během embryogeneze a fetálního období vyniká vedle dalších úloh 5-HT zejména jeho působení jakožto růstového faktoru. Je totiž nezbytný pro správný vývoj mozku a také osy hypothalamus-hypofýza-nadledviny, klíčové při stresové reakci (Oberlander, 2012). Pokud jde o vývoj CNS i PNS, 5-HT konkrétně reguluje tvorbu synapsí, myelinizaci a diferenciaci buněk (Oberlander, 2012). Fyziologický vývoj přitom může být narušen vlivem změn v serotonergní signalizaci, vyvolaných například stresem prožívaným matkou či antidepresivy ze skupiny SSRI užívanými během těhotenství (Oberlander, 2012). V této souvislosti bylo prokázáno, že psychické rozpoložení matky spoluutváří mozek plodu a promítá se do života potomka, kdy má vliv například na jeho chování či inteligenci (Oberlander, 2012).

V rámci CNS řídí serotonergní systém také chemotaxi neurálních progenitorů zprostředkovanou HTR3, kdy 5-HT tvořený neurony Raphových jader moduluje rychlost a směr migrace buněk (García-González *et al.*, 2017). Migrace neurálních progenitorů je zásadní i při vývoji dřeně nadledvin (Štěrba *et al.*, 2004).

1.3 Vývoj nadledvin a etiologie NB

První náznak adrenálního primordia na dorzolaterální straně ledviny lze pozorovat již na začátku 4. týdne gestace (Crowder, 1957). Tato kortikální masa, odvozená od coelomového epitelu ventrálně od aorty, později rapidně roste a tvoří se také vazivové pouzdro a cévní zásobení skrze sinusoidy, přičemž těsně po porodu pak dochází k degeneraci fetální kůry a její celkové reorganizaci (Crowder, 1957; Turkel a Itabashi, 1974; Mora a Gerald, 2004). Faktický vznik dřeně nadledvin je důsledkem invaze neurálních progenitorů, které během extenzivní

migrace penetrují tkáň stojící v cestě, včetně již vzniklé kůry nadledvin, jež je rozrušena a kortikální buňky jsou rozděleny do klastrů (Crowder, 1957).

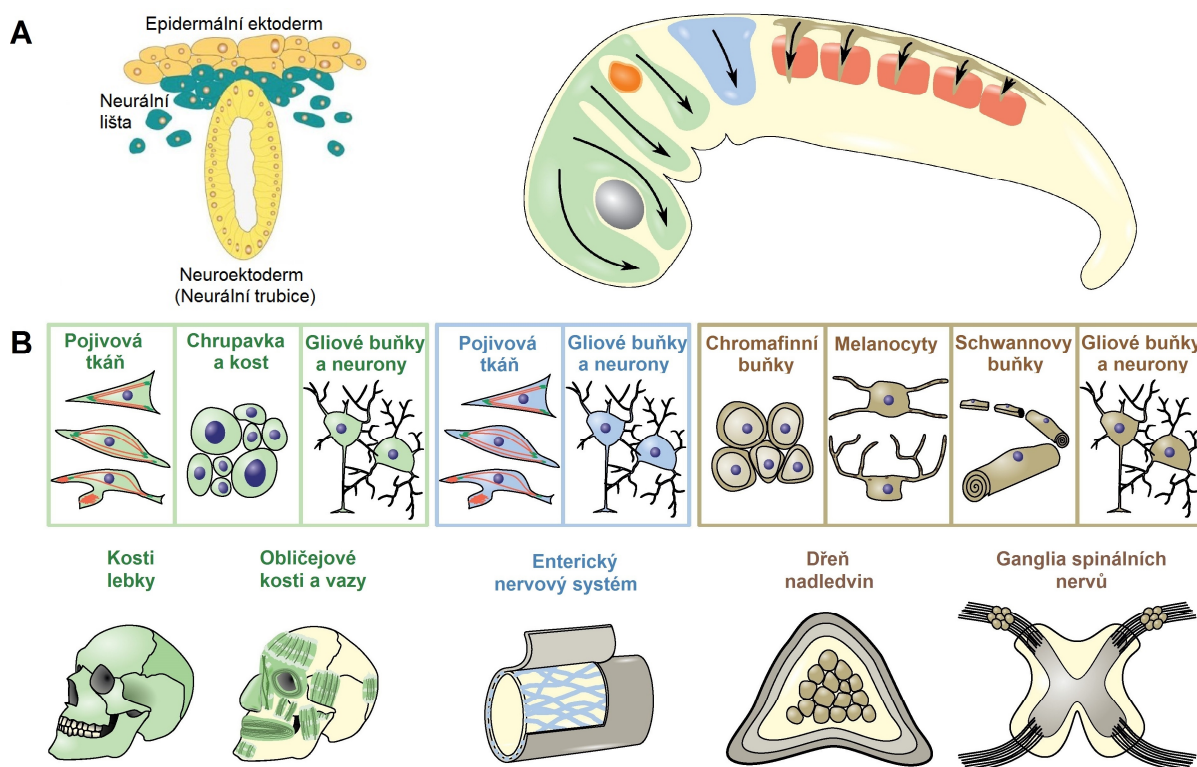
1.3.1 Migrace neurálních progenitorů během ontogeneze

Dřeň nadledvin je tradičně označovaná za derivát neurální lišty, jež představuje přechodnou populaci nediferencovaných pluripotentních buněk vzniklou z embryonálního ektodermu dorzálně od uzavírající se neurální trubice (Hall, 2000; Šterba *et al.*, 2004; Szabó a Mayor, 2018; Obr. 5). Buňky neurální lišty označované také jako NCSCs (neural crest stem cells) prochází tzv. delaminací, tedy oddělením od neuroepitelu (Szabó a Mayor, 2018). Delaminace je zprostředkována procesem EMT (epitelo-mezenchymální tranzice), která je koordinována zejména signalizací přes Wnt, BMPs (kostní morfogenetické proteiny), FGFs (fibroblastové růstové faktory) a malé G proteiny z rodiny Rho GTPáz, přičemž se předpokládá, že deregulace této signalizace může stát za vznikem NB (Johnsen *et al.*, 2019).

Buňky neurální lišty tak získávají vysoký migrační potenciál a po opuštění oblasti neurální trubice v embryonální fázi vývoje extenzivně migrují do nejrůznějších částí těla a osidlují sympatická ganglia, dřeň nadledvin i kůži, kde následně diferencují a dávají vzniknout melanocytům, sympatickým neuronům, enterickým nervovým vláknům, Schwannovým i jiným gliovým buňkám a také buňkám chrupavky, kosti, hladké svaloviny, pojivové tkáň i chromafinním (neuroendokrinním) buňkám (ChB) dřeně nadledvin (Szabó a Mayor, 2018; Obr. 5). S ohledem na takto obrovský diferenciační potenciál bývá neurální lišta dokonce někdy označována jako čtvrtá zárodečná vrstva (Hall, 2000).

Schopnost migrace je u NCSCs regulována zejména prostřednictvím signalizace Hedgehog a Wnt indukující expresi transkripčního faktoru N-MYC (Jiang *et al.*, 2011). V časných fázích vývoje N-MYC blokuje diferenciaci a udržuje vysoký replikační potenciál, ale v pozdějších fázích naopak navozuje diferenciaci (Wakamatsu *et al.*, 1997). Exprese N-MYC je klíčová pro správný vývoj PNS, jak dokládá nižší počet neuronů v gangliích PNS u myši s delecí tohoto genu (Wakamatsu *et al.*, 1997). Úplná ztráta funkce *MYCN* je v rámci myšního modelu embryonálně letální (Stanton *et al.*, 1992). Naopak na rybím modelu *Danio rerio* i na transgenních myších bylo ukázáno, že nadměrná exprese *MYCN* u migrujících buněk neurální lišty znemožňuje zrání a diferenciaci v ChB a také nezbytnou apoptózu nadbytečných buněk, což může představovat iniciační událost v tumorigenezi NB, přičemž *MYCN* zde působí jako hlavní spouštěč NB, zatímco *ALK* pouze urychluje jeho vývoj (Jiang *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2012). N-MYC blokuje diferenciaci buněk například prostřednictvím suprese signální

dráhy NGF/TrkA skrze nepřímé snížení exprese *NTRK1* přes interferující miR-18a (Dzieran *et al.*, 2018).



Obrázek 5: Diferenční potenciál buněk neurální lišty a její deriváty. **A**, Původ neurální lišty v dorzální oblasti embrya na pomezí epidermálního ektodermu a neuroektodermu, který představuje již uzavřená neurální trubice. Po delaminaci buňky migrují ventrálním směrem, a to buď kolektivně, nebo samostatně, obvykle ale v rámci dané oblasti podél anteroposteriorní osy embrya. **B**, Deriváty neurální lišty, tedy potomci migrujících buněk, a cílové orgány v oblasti hlavy (zeleně), hrudníku (modře) a břicha či pánve (hnědě). Navádění buněk během migrace je zprostředkováno interakcemi samotných buněk a zejména pak komponentami extracelulární matrix (versican, fibronectin), chemoatraktanty (Sdf1 = stromal cell-derived factor 1, PDGF, VEGF, FGFs, BMPs) a chemorepelenty (ephryny, semaforiny) v okolních tkáních. (Szabó a Mayor, 2018 a Kholodenko *et al.*, 2018; upraveno)

1.3.2 Klasický model vývoje nadledvin

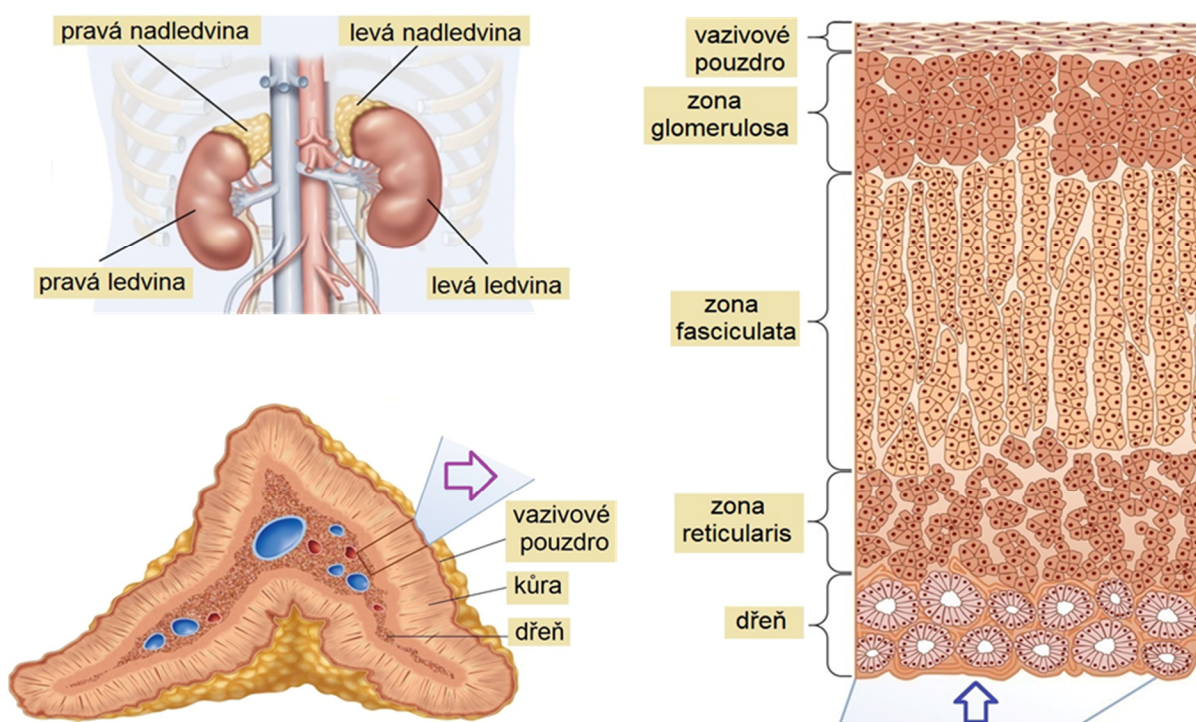
Neurální progenitory, exprimující vedle *MYCN* také transkripční faktor *SOX10*, během migrace reagují na morfogenní signály z dorzální aorty (například BMP2, BMP4, BMP7) a poté se v této oblasti shlukují (Mora a Gerald, 2004; Jiang *et al.*, 2011). Vzniká tak tzv. sympatoadrenální linie neuroblastů. BMPs určují osud buněk a indukují jejich diferenciaci tím, že stimulují expresi transkripčních faktorů *ASCL1* (Achaete-scute homolog 1; též *MASH1*) a *PHOX2B* (Jiang *et al.*, 2011). Tyto transkripční faktory následně regulují expresi TrkA, TrkB,

TrkC typických pro neurony sympatiku a *TH*, *DBH* (dopamin- β -hydroxyláza) a dalších enzymů potřebných pro biosyntézu katecholaminů charakteristickou spíše pro ChB (Mora a Gerald, 2004; Jiang *et al.*, 2011). Jemným vyladěním hladin všech těchto proteinů je pak dáno oddělení sympatické a adrenální linie, přičemž tato determinace osudu buněk je spojena s jejich další migrací, konkrétně do oblasti budoucích paraspinálních ganglií, respektive dřeně nadledvin, kde pak buňky dokončí diferenciaci (Jiang *et al.*, 2011). Markery této diferenciaci jsou dále BCL-2, N-MYC, NSE, CD44 u sympatoadrenální linie; později pak BCL-2, GAP-43 a neuropeptid Y u sympatické neuronální linie a IGF-2 (inzulinu podobný růstový faktor 2) a fenyletanolamin-N-metyltransferáza (PNMT) u adrenální linie (Mora a Gerald, 2004).

Fetální dřeň nadledviny obsahuje tři různé typy buněk: 1) již diferencované ChB, 2) podpůrné buňky, podobné Schwannovým buňkám (z angl. Schwann-like cells), a 3) nezralé neuroblasty, které tvoří avaskulární shluky (též hnízda či noduly) obklopené buňkami kůry i cévami (Mora a Gerald, 2004). Embryonální neuroblastické noduly se formují již během prvních měsíců gestace a během 17.–20. týdne dosahují maximální velikosti i počtu, kdy je v dřeni několik desítek nodulů o velikosti kolem 60 μm (Turkel a Itabashi, 1974; Mazánek, 2016). Poté již nové noduly nevznikají, stávající noduly postupně vyzrávají a regredují a struktura dřeně se postupně homogenizuje. V době porodu již noduly s neuroblasty nebývají detekovatelné, buďto jsou neuroblasty plně diferencovány v ChB a zralé gangliové neurony, nebo odumírají apoptózou (Mora a Gerald, 2004; Mazánek, 2016). Nicméně pokud některé z nich přetrvávají do postnatálního období, mohou být podle některých autorů příčinou NB a cystických změn v dřeni (Mazánek, 2016). Proto jsou noduly u novorozenců někdy označovány jako „neuroblastom *in situ*“, i když jiní autoři je považují za neškodné, respektive za součást vývojového programu a přirozenou variabilitu v ontogenezi (Turkel a Itabashi, 1974).

Samotné oválné neuroblasty v nodulech jsou velké zhruba 3,5–6 μm a jsou charakteristické úzkým lemem cytoplazmy a prominentními jádérky (Turkel a Itabashi, 1974). Na periferii nodulů jsou pak polyhedrální kortikální buňky produkující glukokortikoidy, které se přes sinusoidy dostávají k neuroblastům a stimulují jejich diferenciaci v třikrát větší ChB produkující a skladující katecholaminy (Turkel a Itabashi, 1974; Mora a Gerald, 2004). Finální diferenciaci neuroblastů v neurony sympatiku probíhá působením NGF, IGFs, FGFs, neurotrophinu-3 a kyseliny retinové (Mora a Gerald, 2004). Přítomnost NGF je velmi důležitá pro přežití diferencujících buněk, zároveň ale velká část vyvíjejících se neuronů podstupuje apoptózu (Nakagawara *et al.*, 2018). Apoptóza má při vývoji PNS obecně velký význam a její narušení u buněk neurální lišty může vést k jejich nádorové transformaci (Jiang *et al.*, 2011).

Během prvních dnů a týdnů po porodu dochází spolu s involucí kůry ke kompletní reorganizaci celé nadledviny, kdy se ChB a neurony původně rozmístěné po celé fetální kůře shlukují okolo centrální žíly (Crowder, 1957; Turkel a Itabashi, 1974). Během prvních tří let života pak celá dřeň zvětšuje svůj objem v důsledku expanze ChB. Tento proces přestavby spojené i s pokračující diferenciací neurálních progenitorů v nervová vlákna a ChB poté probíhá se slábnoucí intenzitou ještě v průběhu celé první dekády života (Turkel a Itabashi, 1974). Remodelace nadledvin v dětství je regulována hladinami EGF, FGFs a IGF-2 (Jiang *et al.*, 2011). Přehledné shrnutí anatomie a fyziologie adultní nadledviny poskytuje Obr. 6.



Obrázek 6: Anatomie a fyziologie nadledvin. Tyto endokrinní žlázy trojúhelníkovitého tvaru měří na délku asi 5 cm a na šířku asi 3 cm, jejich tloušťka je potom kolem 1 cm. V dřeň se tvoří katecholaminy adrenalin a noradrenalin, kůra je z hlediska fyziologie rozdělena na tři části produkující různé steroidní hormony: ve vnitřní zona reticularis se syntetizují androgeny jako dehydroepiandrosteron (DHEA) či testosteron; střední zona fasciculata produkuje glukokortikoidy, zejména kortizol (též hydrokortizon); vnější zona glomerulosa tvoří mineralokortikoidy, především aldosteron. (Utiger, 2019; upraveno)

1.3.3 Nový model buněčného původu nadledvin

Výše popsané poznatky o formování dřeně nadledvin z buněk sympatoadrenální linie, jež relativně pozdně segregují v sympatoblasty a ChB, byly v posledních letech zpochybněny. Furlan *et al.* (2017) totiž zjistili, že značná část dřeně je odvozená od prekursorů buněk

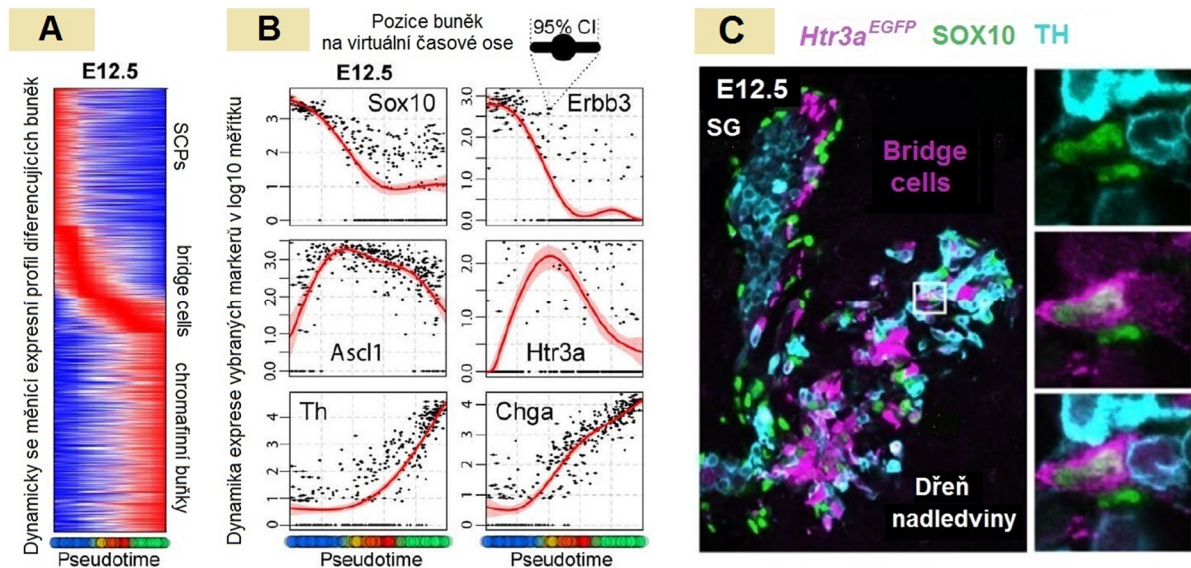
Schwannových (SCPs; Schwann cell precursors) migrujících podél pregangliových vláken inervujících danou oblast. Výsledky studie provedené na myších vyvrací existenci společné sympatoadrenální linie a ukazují, že k rozdělení NCSCs na sympatickou a adrenální linii dochází mnohem dříve, než se doposud myslelo. SCPs jsou multipotentní gliové buňky se schopností sebeobnovy, které se šíří po těle spolu s postupující inervací a dávají vzniknout také melanocytům, neuronům i gliím a většině parasympatického PNS obecně (Adameyko *et al.*, 2009; Dyachuk *et al.*, 2014). Předpokládá se, že SCPs vznikají z buněk neurální lišty, jež se po migraci zprostředkované EMT usadily na povrchu periferních nervů, aniž by se nějak dramaticky změnil jejich fenotyp (Furlan a Adameyko, 2018).

U myší lze první SCPs detekovat ve stádiu E9.5, tedy desátý den od oplození (respektive kopulace), přičemž délka březosti u myší je obvykle 20 dnů (Furlan a Adameyko, 2018). Při vývoji SCPs je přikládán velký význam signalizaci Notch a molekulám z rodiny EGF zvaným neureguliny (Furlan a Adameyko, 2018). Na rozdíl od pouze přechodně se vyskytující populace NCSCs existují SCPs v těle i po narození (Furlan a Adameyko, 2018). Zatímco NCSCs migrují volně, SCPs migrují podél nervů, a jejich přítomnost v nadledvině je tak závislá na její inervaci – ablace pregangliového motorického vlákna vedla k úbytku ChB o 78 % (Furlan *et al.*, 2017). Autoři zmíněné studie také experimentálně zamezili diferenciaci SCPs a poté mohli v dření detekovat právě tyto prekurzory namísto zralých ChB (Furlan *et al.*, 2017).

Ve studiích tohoto typu se využívá techniky tzv. mapování osudu buněk (fate mapping; též cell lineage tracing), kdy se ve specifické fázi vývoje označí buňky zájmu dle exprese konkrétního markeru pomocí reportérového genu (například *YFP*) a posléze lze detekovat jejich veškeré potomky. V případně této studie byl jako marker SCPs a jejich potomků použit *SOX10* současně s *PLP1* (myelinový proteolipidový protein 1), jehož exprese byla přítom díky genetické modifikaci přítomné u použité myší linie ROSA26 (*Plp1^{CreERT2/+}; R26R^{YFP/+}*) provázána s expresí reportérového genu *YFP* (Furlan *et al.*, 2017). Tu bylo navíc možné spustit specificky v určitém vývojovém stádiu (například E11.5) skrze aplikaci tamoxifenu, který aktivuje Cre rekombinázu (konstitutivně exprimovanou pouze v buňkách zájmu díky umístění za promotor genu zájmu) a indukuje tak rekombinaci mezi loxP místy ohraničujícími tzv. STOP sekvencí, jež je tímto vyštěpena (Furlan *et al.*, 2017). Jako marker gliových buněk posloužil *SOX10* samostatně a jako marker ChB se uplatnila exprese *TH* (Furlan *et al.*, 2017).

Komplexní vývojový program diferenciaci SCPs v ChB je regulovaný prostřednictvím specifických změn v genové expresi (Furlan *et al.*, 2017). Metodou scRNA-seq (sekvenování RNA z jednotlivých buněk) bylo objeveno, že SCPs diferencují v ChB přes přechodné stádium tzv. bridge cells (Furlan *et al.*, 2017; Obr. 7). Prostřednictvím charakteristického expresního

profilu buněk, který se dynamicky mění, lze přitom mapovat celý proces diferenciace a lze ho rozdělit do tří fází dle klíčových exprimovaných genů (Furlan *et al.*, 2017; Obr. 7).



Obrázek 7: Bridge cells a komplexní vývojový program diferenciace SCPs v ChB z pohledu genové exprese. **A, B,** Metodou scRNA-seq byla sekvenována RNA jednotlivých buněk izolovaných z dřeně nadledvin myších embryí ve stádiu E12.5. K interpretaci sekvenačních dat byla použita bioinformatická metoda tzv. „pseudotime analysis“, která umožňuje rekonstruovat a vizualizovat plynulé změny v transkriptomu buněk. Algoritmus umísťuje každou buňku na konkrétní pozici na virtuální časové ose (pseudotime) tak, aby buňky s podobným expresním profilem byly v grafu blízko sebe. **A,** Expres 1 480 genů asociovaných s diferenciálním programem (funkce „pseudotime“), seřazených tak, aby geny vytvořily jakési tři umělé shluky v grafu: 1) geny exprimované časně (charakteristické pro SCPs), 2) geny s přechodnou expresí (typické pro bridge cells) a 3) geny exprimované nejpozději (příznačné pro ChB). Graf pak uchopitelně vizualizuje populaci bridge cells, jež je z hlediska genové exprese na pomezí SCPs a ChB. **B,** Vybrané geny, jejichž exprese se v čase dynamicky mění a charakterizuje konkrétní buněčnou populaci – SCPs, bridge cells nebo zralé ChB. Každá tečka reprezentuje jednu buňku, jejíž souřadnice v grafu jsou dány expresí daného markeru (osa y) a její pozicí na virtuální časové ose dle celkového expresního profilu (osa x). Pozice všech buněk pak vykreslí jakýsi trend a díky tomu lze pak vidět dynamiku exprese klíčových genů v čase. **C,** Imunohistochemické barvení řezu nadledvinou myšího embrya stádia E12.5. Lze identifikovat buňky, které exprimují HTR3A (hodnoceno skrze detekci exprese reportéru EGFP). Jak je patrné z výřezu, tyto buňky jsou TH negativní a odpovídají expresnímu profilu bridge cells. Expres SOX10, markeru SCPs i zralých gliových buněk, je u některých z nich zachována. Použitá zkratka: SG = sympatické ganglion. (Furlan *et al.*, 2017; upraveno)

V transkripčním profilu diferencujících buněk lze rozeznat časné stádium s vysokou expresí *SOX10* a *ERBB3* (receptorová tyrozinkináza z rodiny EGFR), přechodné stádium bridge cells s klíčovými geny *ASCL1*, *HTR3A* a *PHOX2B* a pozdní výsledné chromafinní stádium, v němž dominuje exprese *CHGA* (chromogranin A) a *TH* (Furlan *et al.*, 2017). SCPs i bridge cells se také vyznačují expresí vysokých hladin onkogenů *MYCN* a *SOX2*, které mají

roli v růstu a proliferaci buněk, respektive v udržení pluripotence a kmenového potenciálu (Adameyko *et al.*, 2012; Furlan *et al.*, 2017). Bridge cells, jež jsou lokalizovány disperzně v dřeni, dosahují u myši maximálního počtu okolo stádia E12.5, kdy se také v nadledvině objevují první ChB, a několik jich přetrvává do pozdějších období (Furlan *et al.*, 2017).

Podle nového modelu vývoje nadledvin představeného výše tedy převážná část ChB nevzniká ze společných sympatoadrenálních progenitorů, jak předpokládá klasický model, ale ze SCPs diferenciací přes stádium bridge cells. Neurony sympatiku potom vznikají přímo z NCSCs. V dřeni nadledvin se přitom nachází celkem tři typy buněk: vedle ChB a zásoby multipotentních nediferencovaných SCPs jsou to ještě zralé gliové buňky odvozené rovněž od SCPs. Samotné SCPs vznikají z buněk neurální lišty, usazených na povrchu periferních nervů. Nicméně vztah mezi SCPs a NCSCs může být i opačný, protože nelze vyloučit, že by dokonce celá neurální lišta mohla vznikat ze SCPs (Furlan a Adameyko, 2018).

Ačkoli tento nový model stojí na výsledcích jediné komplexní studie, existence SCPs a bridge cells byla již potvrzena i nezávislými výzkumy, jež také poukázaly na přímý původ ChB v SCPs (Dong *et al.*, 2020; Hanemaaijer *et al.*, 2021; Jansky *et al.*, 2021). Zatímco u myši byla populace bridge cells detekována okolo stádia E12.5, u lidských embryí se tato přechodná populace buněk objevuje kolem 7.–8. týdne gravidity (Furlan *et al.*, 2017; Jansky *et al.*, 2021).

1.3.4 Etiologie a buněčný původ NB

Přestože etiologie NB nebyla dosud spolehlivě vysvětlena, obecně lze říci, že příčina rozvoje NB tkví v deregulaci buněčných procesů během časně embryogeneze (Johnsen *et al.*, 2019). NB totiž vzniká maligní transformací buněk odvozených od neurální lišty v různém stupni diferenciaci, tradičně (a spíše nepřesně) označovaných také obecným pojmem neuroblasty (Mora a Gerald, 2004; Štěrba *et al.*, 2004). Význam tohoto pojmu však není ustálen a ve skutečnosti se může jednat o multipotentní NCSCs, nebo SCPs, bridge cells či jiné neurální progenitory. Kauzální příčinu NB na buněčné úrovni může představovat blok v procesu diferenciaci neurálních progenitorů v ChB nebo neurony sympatiku (Johnsen *et al.*, 2019).

V rámci každé heterogenní nádorové masy se obvykle vyskytuje určitá, většinou malá subpopulace vysoce tumorigenních buněk označovaných jako nádorové kmenové buňky (CSCs; cancer stem cells), která je zodpovědná za rezistenci k léčbě, tvorbu metastáz i relaps nádoru (Batlle a Clevers, 2017). Pro udržení schopnosti sebeobnovy, kmenového potenciálu a dediferencovaného stavu buněk je v případě NB důležitá exprese *SOX2*, *MYCN* a *OCT4* (Nakagawara *et al.*, 2018). CSCs by přitom konkrétně u tohoto nádoru mohly vycházet z populace NCSCs, ale i z jiných buněk, jak naznačují experimenty s dediferenciací navozenou

například hypoxií přes expresi HIF (Nakagawara *et al.*, 2018). Jednu z příčin vzniku NB by mohla představovat také patologická deregulace SCPs nebo populace bridge cells exprimujících vysoké hladiny onkogenů *MYCN* a *SOX2* (Furlan *et al.*, 2017).

Pro bridge cells je navíc charakteristická exprese *HTR3A* (Furlan *et al.*, 2017). Z tohoto pohledu je zajímavé, že některé studie dávají vznik NB do souvislosti s užíváním některých typů antidepresiv, analgetik, diuretik, pohlavních hormonů, sedativ, kanabinoidů, halucinogenů a stimulačních drog v průběhu těhotenství, přičemž všechny tyto látky působí přes serotonergní systém, respektive ovlivňují serotoninovou signalizaci (Bluhm *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2008). Konkrétní průkaz maligní transformace buněk neurální lišty vyvolané těmito léky ale zatím chybí, i když v této souvislosti je pozoruhodné, že u myší reguluje hladina 5-HT v krvi matky migraci a morfogenezi buněk neurální lišty vyvíjejícího se embrya (Johnson *et al.*, 2008). Toto vše naznačuje, že by mohla existovat korelace mezi expresí *HTR3A*, deregulací bridge cells a vznikem NB.

Vodítkem k odhalení buněčného původu NB může být porovnání transkripčních profilů buněk NB s buňkami jednotlivých vývojových stádií, fyziologicky přítomných v dřeni nadledvin. Zatímco Hanemaaijer *et al.* (2021) a Jansky *et al.* (2021) poukázali na fenotypovou podobnost buněk NB s neuroblasty (ve smyslu prekursorů sympatických neuronů), v případě studie čínských vědců byl fenotyp buněk NB podobný spíše fenotypu ChB (Dong *et al.*, 2020). Protichůdné závěry tří zmíněných recentních studií zkoumajících NB a nadledviny na úrovni jednotlivých buněk snad mohou být vysvětleny odlišnou anotací buněk (zejména v případě hojně používaného pojmu neuroblast) a také použitím různých markerů jednotlivých buněčných populací (Dong *et al.*, 2020; Hanemaaijer *et al.*, 2021; Jansky *et al.*, 2021). Problematika buněčného původu NB tedy zůstává stále otevřená a na základě několika málo průlomových studií zatím nelze jednoznačně říct, zda NB nejčastěji vychází z NCSCs, SCPs, bridge cells, ChB nebo neuroblastů v užším slova smyslu.

Ve světle všech těchto nových poznatků se nabízí otázka, zda v současné době nejsou jako NB označovány minimálně dvě různé biologické entity, které mají velmi podobný klinický projev vzhledem k totožnému tkáňovému původu, ale jejichž buněčný původ je zcela odlišný. V tomto směru je také třeba vzít v úvahu existenci dalšího nádoru vycházejícího z nadledvin, kterým je feochromocytom. Ten sice představuje nádor postihující dospělé pacienty, ale některé analýzy odhalily řadu společných rysů NB a feochromocytomu (Szabó *et al.*, 2012). Není tedy vyloučené, že některé nádory klasifikované jako NB (s ohledem na dětský věk pacientů) by ve skutečnosti mohly představovat feochromocytomy a možná i *vice versa*.

2 Cíl diplomové práce

Některá epidemiologická data poukazují na souvislost mezi rozvojem NB u dětí a užíváním látek ovlivňujících serotonergní signalizaci v průběhu těhotenství (Bluhm *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2008). Avšak systematická analýza role HTRs a 5-HT v patogenezi tohoto nejčastějšího extrakraniálního solidního nádoru dětí dosud nebyla provedena. Expres některých HTRs (včetně HTR3) u NB byla sice prokázána již v 90. letech bezprostředně po identifikaci a izolaci HTR3 právě z buněčných linií NB (Maricq *et al.*, 1991; Pranzatelli a Balletti, 1992), ale jejich význam v patogenezi NB zůstává nejasný.

Hlavním cílem práce proto bylo prozkoumání významu serotonergní signalizace u buněčných linií derivovaných z NB se zaměřením na *HTR3A*. Z hlediska potenciálního přenesení získaných poznatků do praxe a jejich využití v prevenci či terapii NB bylo důležitou součástí práce také posouzení možností modulace aktivity *HTR3A* a zhodnocení vlivu této intervence na viabilitu a fenotyp buněk NB *in vitro*.

Realizace práce proběhla v Laboratoři nádorové biologie, kde je NB jedním z nejvíce studovaných nádorů. Na základě pilotních výsledků byla vyslovena hypotéza, že existuje korelace mezi expresí *HTR3A* a kmenovostí, dediferenciací a tumorigenicitou buněk NB. V rámci diplomové práce bylo tedy také posuzováno, zda by exprese *HTR3A* u NB mohla reflektovat vznik těchto buněk skrze deregulaci nediferencovaných bridge cells, které vycházejí ze SCPs a vyznačují se mj. expresí vysokých hladin *HTR3A*, *SOX2* a *MYCN*. Dílčí cíle diplomové práce byly stanoveny takto:

- 1) Charakterizace souboru vybraných buněčných linií NB z hlediska exprese *HTR3A* na úrovni mRNA i proteinu
- 2) Posouzení citlivosti jednotlivých buněčných linií k vybraným látkám modulujícím serotonergní signalizaci z hlediska působení na viabilitu a fenotyp buněk NB
- 3) Experimentální validace výsledků pomocí umlčení exprese *HTR3A* metodami CRISPR a RNA interference

3 Materiál a metody

3.1 Buněčné linie

Jako experimentální materiál bylo v diplomové práci využito celkem šest buněčných linií NB zahrnujících široce používanou referenční sbírkovou linii SH-SY5Y (ECACC 94030304), dále linie CHLA-15 a CHLA-20 (Children's Oncology Group Cell Line & Xenograft Repository), které pocházejí od jednoho pacienta, ale liší se klinickou charakteristikou zdrojového primárního nádoru (před terapií vs. po relapsu onemocnění), a také linie NBL-28, NBL-38 a NBL-40. Ty byly derivovány ze vzorků nádorové tkáně, jež byly během standardní léčby na základě informovaného souhlasu odebrány pacientům z Kliniky dětské onkologie (KDO) FN Brno v rámci výzkumného projektu NR/9125-4 (IGA MZČR). Projekt byl schválen Etickou komisí Lékařské fakulty MU (Approval No. 23/2005). Jedná se o adherentní linie roustoucí pomaleji než adherentní linie SH-SY5Y či polysuspenní linie CHLA-15 a CHLA-20.

Pro některé experimenty byla jako pozitivní kontrola použita adherentní sbírková linie maligního pluripotentního embryonálního karcinomu NTERA-2 (klon D1; ECACC 01071221).

3.2 Kultivační podmínky

Kultivace buněčné linie NTERA-2 probíhala v DMEM (Dulbeccova modifikace Eaglova média; kat. č. LM-D1112/500; Biosera, Nuaille, Francie) s přidavkem 10 % fetálního bovinního séra (FBS). Pro kultivaci buněčných linií NBL-28, NBL-38, NBL-40 a SH-SY5Y byla využita směs médií DMEM/F12 v poměru 1:1 (kat. č. LM-D1224/500; Biosera) obohacená o 20 % FBS a 1 % neesenciálních aminokyselin (NEAA; Biosera). Buněčné linie CHLA-15 a CHLA-20 byly kultivovány v DMEM/F12 s přidavkem 10 % FBS, 1 % NEAA a 0,12 % ITS-X (roztok ve složení 5 µg/ml inzulinu, 5 µg/ml transferinu, 5 ng/ml kyseliny seleničité; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Všechna používaná média obsahovala navíc také 2 mM L-glutaminu, 100 IU/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu (vše Biosera).

Kultivace všech uvedených buněčných linií probíhala v příslušném médiu v kultivačních lahvích pro tkáňové kultury (kat. č. 70075; SPL Life Sciences, Naechon-myeon, Jižní Korea) za standardních podmínek při teplotě 37 °C, s vysokou vzdušnou vlhkostí, v atmosféře obsahující 5 % CO₂. Všechny buněčné linie byly pasážovány zhruba 1–2× týdně

v závislosti na rychlosti růstu a stupni konfluence. Adherentní buněčné linie byly rutinně pasážovány s využitím 4× ředěného 0,05% roztoku trypsinu s EDTA (kat. č. SH30236.01; HyClone, Cytiva, Marlborough, MA, USA). Při pasážování polospenních linií CHLA-15 a CHLA-20 byla použita akutáza (kat. č. LM-T1735/100; Biosera). Ta napomáhá rozvolnění shluků buněk a jakožto šetrnější enzym byla využita při nasazování buněk na jakékoli experimenty.

Buněčné linie byly pomocí kryokonzervace průběžně archivovány pro případný další výzkum. Pelet buněk určených ke kryokonzervaci byl převeden do 1 ml FBS s 10 % kryoprotektantu dimethylsulfoxidu (DMSO; Penta, Chrudim, ČR). Pozvolného zchlazení buněk (1 °C/min) bylo dosaženo užitím mrazící nádoby CoolCell LX (Brooks Life Sciences, Chelmsford, MA, USA) a uložením do –80 °C. Po 24 hodinách byla kryoampule přemístěna do hlubokomrazicího boxu s teplotou kolem –150 °C. Rozmražení pak probíhalo rychlým rozpuštěním při pokojové teplotě a postupným přidáváním 4 ml média chlazeného na ledu rychlostí 0,2 ml/min. Po centrifugaci a resuspendování v kompletním médiu (37 °C) byly buňky přeneseny do kultivační lahve.

3.3 Příprava vzorků RNA a proteinů z buněčných lyzátů

Pro získání vzorků RNA byly buněčné linie nasazeny na povrchově ošetřené Petriho misky pro tkáňové kultury s plochou 57,5 cm² (90×20 mm; kat. č. 20101; SPL Life Sciences). Po následné několikadenní kultivaci (1–5 dní; v závislosti na rychlosti růstu nebo konkrétním experimentu) byly buňky dvakrát opláchnuty ledovým PBS (phosphate-buffered saline). Následně bylo přidáno 500 µl lyzačního roztoku s 5 µl 2-merkaptoetanolu (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Německo; součást kitu – viz níže). Po 1–2 minutách inkubace na ledu byl vzniklý lyzát stažen do malé zkumavky. Z lyzátu pak byla RNA izolována a purifikována pomocí kitu GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) doplněném o krok štěpení genomické DNA (s využitím On-Column DNase I Digestion Set; Sigma-Aldrich).

Výsledkem celého procesu byl roztok RNA v elučním pufru o objemu 50–80 µl, který byl poté uchováván při –80 °C. Koncentrace a čistota RNA v jednotlivých vzorcích byla stanovena spektrofotometricky na přístroji NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific) na základě absorbance roztoku při vlnové délce 260 nm a poměru A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230} . Pro následné analýzy byla použita jen nekontaminovaná RNA s poměrem $A_{260}/A_{280} \approx 2$ a $A_{260}/A_{230} > 2$, přičemž izolace byla provedena u 3–5 biologických replikátů od každé linie.

Příprava proteinových lyzátů probíhala obdobně, ale po dvojnásobném oplachu ledovým PBS byl jako lyzační roztok použit RIPA pufr (50mM TrisCl pH 7,4; 150mM NaCl; 0,1% SDS; 1% NP40; 0,5% deoxycholát sodný; 2mM EDTA) s inhibitory proteáz (cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail, kat. č. 4693124001; a PhosSTOP™, kat. č. 4906837001; Sigma-Aldrich) v objemu 300 µl na jednu Petriho misku. Lýza probíhala po dobu 20 minut na ledě. Stažený lyzát byl po přenesení do zkumavky centrifugován 20 minut při 4 °C a 12 000 g. Supernatant byl následně přenesen do nové mikrozkušavky a vzorky byly poté uchovávány při –20 °C (krátkodobě) či –80 °C (dlouhodobě). Koncentrace proteinů byla změřena pomocí kolorimetrického kitu DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Jako standard pro kalibrační řadu sloužil BSA (Sigma-Aldrich) rozpuštěný v RIPA. Koncentrace byla stanovena změřením absorbance při 620 nm na přístroji Sunrise Absorbance Reader (Tecan, Männedorf, Švýcarsko) s analytickým softwarem KIM vždy v technických triplicátech na 96jamkové mikrotitrační destičce.

Od každé buněčné linie byly takto připraveny proteinové lyzáty minimálně ze tří pasáží (obvykle ale ze čtyř či pěti pro případ kontaminace či nedostačující koncentrace) představujících tři biologické replikáty. Jejich koncentrace se nacházely v rozmezí 0,66–8,15 mg/ml.

3.4 Reverzní transkripce a qPCR

Expres *HTR3A* na úrovni mRNA byla detekována s využitím reverzní transkripce s následnou kvantitativní PCR v reálném čase (RT-qPCR). U všech vzorků byla izolovaná RNA nejprve naředěna PCR Ultra H₂O (Top-Bio, Praha, ČR) tak, aby její koncentrace ve výsledné reakční směsi pro reverzní transkripci byla 25 ng/µl. K naředěné RNA o objemu 35 µl bylo poté přidáno 3,5 µl dNTP mixu (každý z nukleotidů v koncentraci 10 mM; Top-Bio) a 3,5 µl oligo-dT₁₅₋₁₈ primerů o koncentraci 50 µM (Elisabeth Pharmakon, Brno, ČR). Po krátkém stočení byly zkumavky inkubovány 5 minut při 65 °C pro rozvolnění sekundárních struktur na RNA a dimerů primerů. Po rychlém zchlazení na ledu bylo následně v podobě mastermixu do každé zkumavky přidáno 14 µl 5× koncentrovaného M-MLV reakčního pufru, 7 µl 100mM DTT a dále 7 µl (25 U) M-MLV reverzní transkriptázy (kat. č. M024; vše Top-Bio) nebo 7 µl PCR Ultra H₂O v případě negativních kontrol (no-RT kontroly pro každý vzorek RNA zvlášť).

Celkový objem finální reakční směsi byl tedy 70 µl. Samotný zpětný přepis mRNA do cDNA probíhal v termocykleru TAdvanced 96 G (Biometra, Analytik Jena, Jena, Německo) při 37 °C po dobu 60 minut. Na závěr byl přidán krok zajišťující denaturaci M-MLV reverzní

transkriptázy, který spočíval v zahřátí zkumavek na 80 °C po dobu 15 minut. Po reverzní transkripci byla cDNA skladována při –20 °C a později použita pro qPCR analýzu.

qPCR byla prováděna v 96jamkové MicroAmp™ destičce (kat. č. 4483354; Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) v reakčním objemu 10 µl s využitím kitu KAPA SYBR® FAST (kat. č. KK4618; Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA). Samotná reakce probíhala v přístroji 7500 Fast Real-Time PCR System a data byla analyzována pomocí počítačového programu 7500 Software v. 2.0.6 (vše Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Jako endogenní referenční kontrola sloužil provozní (housekeeping) gen *HSP90ABI* (Heat shock protein 90 alpha family class B member 1).

Byly použity primery pro lidský *HTR3A* (referenční sekvence NM_213621.3) a *HSP90ABI* (referenční sekvence NM_001271969.2) s následujícími sekvencemi navrženými s využitím nástroje NCBI Primer-BLAST (velikosti produktů PCR jsou uvedeny v závorce):

- *HTR3A* (174 bp): Přímý primer 5′- AGGAAGCCAACCACCGTATC - 3′
 Reverzní primer: 5′- GTCCGTGGGGATGGACAAC - 3′
- *HSP90ABI* (169 bp): Přímý primer 5′- CGCATGAAGGAGACACAGAA - 3′
 Reverzní primer: 5′- TCCCATCAAATTCCTTGAGC - 3′

Primer mixy o zásobní koncentraci 25 µM byly připraveny smícháním příslušného přímého a zpětného primeru (Elisabeth Pharmacon) v poměru 1:1 a finální koncentrace primerů v každé jamce pak byla 0,4 µM.

Do jednotlivých jamek bylo pipetováno 6 µl připravené reakční směsi (SYBR master mix s primery) a 4 µl cDNA, která byla předtím 4× ředěna v PCR Ultra H₂O. Destička byla poté překryta optickou adhezivní fólií (MicroAmp™ Optical Adhesive Film; Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) a po krátké centrifugaci byla umístěna do termocykleru. Teplotní profil qPCR lze shrnout takto: počáteční denaturace při 95 °C po dobu 5 minut, následovaná 40 (případně 45) cykly denaturace (95 °C/3 s) a nasedání primerů s elongací řetězce (60 °C/45 s). Na závěr byla zařazena analýza křivky tání (HRM; high resolution melting) pro odhalení případných nespecifických produktů. Genová exprese byla hodnocena číslem Ct (threshold cycle) neboli počtem cyklů, který odpovídá nárůstu fluorescence nad prahovou hodnotu (tzv. baseline) určenou softwarem.

Pro exaktní vyhodnocení exprese jednotlivých genů byly od každé buněčné linie analyzovány celkem tři biologické replikáty (tři pasáže; na třech deskách) hodnocené ve třech technických opakováních (pro *HTR3A* i pro *HSP90ABI*; na jedné desce). Pro vyloučení zkreslení výsledků přítomností genomické DNA či kontaminací mastermixu byly v každém

experimentu zařazeny vzorky no-RT kontrol, respektive negativní technické kontroly obsahující 4 µl PCR Ultra H₂O místo příslušné ředěné cDNA. Jelikož samotná qPCR může dle cílových sekvencí použitých primerů probíhat s odlišnou účinností, bylo třeba před prováděním všech experimentů nejprve stanovit tuto účinnost pro *HTR3A* i *HSP90AB1*, aby bylo možné exaktně hodnotit rozdíly v Ct mezi cílovým a referenčním genem. K tomu bylo využito analýzy koncentrační řady vstupní cDNA v log₂ škále pro *HTR3A* a log₁₀ škále pro *HSP90AB1* s následnou lineární regresí.

Pro statistickou analýzu dat z qPCR byl využit program MS Excel a GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Relativní kvantifikace byla provedena metodou komparativní Ct. Průměrné hodnoty Ct analyzovaných cDNA v technických triplicátech byly normalizovány za použití referenčního genu *HSP90AB1* podle vzorce: $\Delta Ct(\text{cílového genu}) = Ct(\text{cílového genu}) - Ct(\text{referenčního genu})$; a relativní exprese *HTR3A* byla zjištěna dle vzorce: $RQ (\text{relative quantity}) = 2^{-\Delta Ct(\text{cílového genu})}$. Hladina exprese *HTR3A* u jednotlivých buněčných linií byla vztažena k expresi u buněčné linie SH-SY5Y. Relativní genová exprese *HTR3A* pak byla vypočítána metodou $2^{-\Delta \Delta Ct}$ (Livak a Schmittgen, 2001) celkem pro tři biologické replikáty. Jako pozitivní kontrola sloužila linie NTERA-2. V rámci statistické analýzy dat byl použit test analýzy rozptylu (ordinary one-way ANOVA) s Dunnettovou metodou mnohonásobného porovnávání s korekcí p-hodnot (post-hoc test). Za signifikantní rozdíly byla přitom považována hladina významnosti $p < 0,05$.

3.5 Western blotting

Kromě *HTR3A* byla pomocí western blottingu v rámci různých experimentů detekována také exprese TH, SOX2, SOX10, c-MYC, N-MYC, PROM1 a štěpené kaspázy 3. Jako nanášecí kontrola sloužila detekce hladiny proteinu GAPDH nebo α -tubulinu.

Naředěné vzorky proteinových lyzátů byly po denuraci při 95–100 °C po dobu 5 minut naneseny na 10% polyakrylamidový gel (Acrylamide/Bis-acrylamide, 30% solution; kat. č. A3574; Sigma-Aldrich) o šířce 1,5 mm (10–30 µg proteinu v každé jamce dle konkrétního experimentu, obvykle ale 15 či 20 µg). Do první a poslední jamky gelu byl nanesen vzorek markeru (Precision Plus Protein Dual Color Standards; kat. č. 1610394; Bio-Rad Laboratories). Při následné SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis; elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného) bylo pro průchod proteinů horním zaostřovacím gelem použito napětí 80 V (cca 25 minut), průchod spodním rozdělovacím gelem pak probíhal při napětí 120 V (po dobu cca 50 minut). Poté

proběhl westernový přenos separovaných proteinů na metanolem aktivovanou PVDF membránu (polyvinylidene difluoride; kat. č. 1620177; Bio-Rad Laboratories) při 100 V po dobu 60–70 minut, respektive později metodou semi-dry transfer (Trans-Blot Turbo Transfer System; kat. č. 1704150; Bio-Rad Laboratories) při 25 V (1 A) po dobu 30 minut.

Membrána byla následně blokována 60 minut v 5% roztoku sušeného mléka v TBS-Tween při pokojové teplotě a poté inkubována s příslušnou primární protilátkou (Tab. 1) ředěnou v 5% roztoku sušeného mléka v TBS-Tween při 4 °C přes noc. Druhý den byla membrána promyta v TBS-Tween (3×5 minut) a inkubována se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou (HRP; horseradish peroxidase; Tab. 1) opět ředěnou v 5% roztoku sušeného mléka v TBS-Tween po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě.

Tabulka 1: Použité primární i sekundární protilátky včetně používaného ředění

POUŽITÍ	ANTIGEN	TYP PROTILÁTKY	KLON	KATALOGOVÉ ČÍSLO (VÝROBCE)*	ŘEDĚNÍ
primární	c-Myc (60 kDa)	králičí monoklonální IgG	D84C12	5605 (Cell Signaling Technology)	1:1000
primární	HTR3A (55 kDa)	králičí polyklonální IgG		ab13897 (Abcam)	1:5000
primární	N-Myc (62 kDa)	králičí monoklonální IgG	D1V2A	84406 (Cell Signaling Technology)	1:1000
primární	Prominin-1 (CD133)	králičí polyklonální IgG		ab19898 (Abcam)	1:1000
primární	SOX2 (35 kDa)	králičí monoklonální IgG	D6D9	3579 (Cell Signaling Technology)	1:1000
primární	SOX10 (60 kDa)	kozí polyklonální IgG		AF-2864-SP (Bio-Techne)	1:2000
primární	štěpená kaspáza 3 / Asp175/ (17 kDa)	králičí monoklonální IgG	5A1E	9664 (Cell Signaling Technology)	1:1000
primární	TH (60 kDa)	králičí polyklonální IgG		NB-300-109 (Bio-Techne)	1:1000
primární	α-tubulin (50 kDa)	myší monoklonální IgG	DM1A	ab7291 (Abcam)	1:10000
primární	GAPDH (36 kDa)	králičí monoklonální IgG	14C10	2118 (Cell Signaling Technology)	1:10000
sekundární	kozí imunoglobulin	myší IgG konjugovaná s HRP		sc-2354 (Santa Cruz Biotechnology)	1:2000
sekundární	králičí imunoglobulin	kozí IgG konjugovaná s HRP		7074 (Cell Signaling Technology)	1:10000
sekundární	myší imunoglobulin	koňská IgG konjugovaná s HRP		7076 (Cell Signaling Technology)	1:10000

*Výrobci: Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA; Abcam, Cambridge, VB; Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA.

Po opětovném promytí membrán v TBS-Tween (3×5 minut) byla provedena chemiluminiscenční vizualizace proteinů pomocí detekčního systému ECL (ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent; kat. č. GERPN2236; GE Healthcare, Cytiva). Chemiluminiscence byla poté detekována pomocí dokumentačního systému Azure c600 (Azure Biosystems, Dublin, CA, USA), případně vyvoláním na světlocitlivé filmy v temné komoře.

Vyhodnocení a zpracování dat včetně denzitometrické analýzy nasnímaných membrán bylo provedeno s využitím volně dostupných programů FastStone Image Viewer a ImageJ. Pro statistickou analýzu dat v programu GraphPad Prism 9.0 byl použit nepárový jednostranný t-test s Welchovou korekcí. Za signifikantní rozdíly byla přitom považována hladina významnosti $p < 0,05$.

3.6 Ovlivňování buněk a testy viability a proliferace

Viabilita, proliferace a metabolická aktivita buněk byla hodnocena kolorimetricky pomocí MTT testu. Tato analýza je založená na detekci metabolické přeměny žluté rozpustné tetrazoliové soli MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) na nerozpustný formazan ve formě fialových krystalků (Foretová *et al.*, 2014). Ty jsou poté rozpuštěny přidavkem silného detergentu (DMSO). Vyhodnocení je spektrofotometrické, kdy se stanovuje absorbance roztoku při vlnové délce 570 nm. Této redukční přeměny jsou schopny pouze živé metabolicky aktivní buňky s funkčními dehydrogenázami (Foretová *et al.*, 2014).

Nejprve bylo třeba připravit čerstvé bezsérové médium (bez FBS), aby 5-HT přítomný v séru nezkresloval výsledky pokusu. Jednalo se o médium DMEM/F12 (s NEAA a antibiotiky) s přidavkem 10 ng/ml EGF (Sigma-Aldrich), 20 ng/ml FGF2 (Sigma-Aldrich), 2 % B-27 supplement w/o vit. A (Gibco) a 2 mM L-glutaminu (a v případě linií CHLA-15 a CHLA-20 rovněž 0,12 % ITS-X). Buňky byly opláchnuty pomocí PBS a převedeny na suspenzi působením akutázy. Po centrifugaci byl pelet buněk ve zkumavce resuspendován v 3–4 ml média bez FBS. Pomocí Bürkerovy komůrky byl s využitím trypanové modři, která proniká pouze do mrtvých buněk, určen celkový počet živých buněk v suspenzi. Ta byla poté finálně naředěna v médiu bez FBS tak, aby koncentrace buněk odpovídala 50 000 buněk/ml média v případě pomalu rostoucích linií (NBL-28, NBL-38, NBL-40) a 10 000 buněk/ml média u rychleji rostoucích linií. Buňky byly poté nasazeny na 96jamkovou mikrotitrační destičku v objemu 100 μ l suspenze na jamku odpovídající 5000, respektive 1000 buněk na jamku tak, aby nedošlo k předčasné kontaktní inhibici růstu buněk v jamkách.

Po 24 hodinách od nasazení byly buňky ovlivňovány aplikací jednoho z činidel modulujících serotonergní signalizaci. Do každé jamky bylo přidáno dalších 100 μ l čerstvého bezsérového média s 5-HT či daným agonistou či antagonistou HTR3 v různých koncentracích (Tab. 2). V případě antagonistů byl pro stimulaci HTR3 navíc v médiu přítomen 5-HT v koncentraci 1 μ M, aby bylo možné zhodnotit vliv inhibice HTR3A. Pro danou koncentraci činidla bylo vždy u každé linie testováno celkem pět technických replikátů a byla snaha získat

výsledky z alespoň tří biologických replikátů (různých pasáží). Jako negativní kontrola sloužily neovlivněné buňky, které byly kultivované pouze v bezsérovém médiu s odpovídající koncentrací příslušného rozpouštědla.

Tabulka 2: Použitá činidla modulující serotonergní signalizaci a testovaná rozmezí koncentrací

ČINIDLO *	CELÝ NÁZEV	KATALOGOVÉ ČÍSLO (VÝROBCE)	TESTOVANÉ KONCENTRACE
NMQ (agonista)	N-methylquipazine dimaleate	0566 (Tocris, Bristol, VB)	0-200 μ M
m-CPBG (agonista)	1-[3-chlorophenyl]biguanide hydrochloride	C144 (Sigma-Aldrich)	01000 μ M
SR57227 (agonista)	SR57227 hydrochloride	1205 (Tocris)	0400 μ M
Granisetron (antagonista)	granisetron hydrochloride	2903 (Tocris)	0-200 μ M
VUF10166 (antagonista)	VUF10166	4532 (Tocris)	01000 nM
5-HT (přirozený ligand)	serotonin hydrochloride	H9523 (Sigma-Aldrich)	0-100 μ M

* V případě NMQ, SR57227 a VUF10166 bylo jako rozpouštědlo použito DMSO, ostatní činidla byla rozpuštěna ve vodě.

Proliferační a metabolická aktivita buněk byla analyzována po pěti dnech od ovlivnění. K 200 μ l média v jamce bylo přidáno 20 μ l zásobního roztoku MTT (kat. č. M2128; Sigma-Aldrich) o koncentraci 5 mg/ml (ředěno v PBS). Po 2,5–3 hodinách inkubace při 37 °C bylo médium odsáto a nahrazeno 200 μ l DMSO pro rozpuštění vzniklého produktu. Obsah jamek byl důkladně zhomogenizován pipetou a následně byla změřena absorbance při 570 nm s referenční vlnovou délkou 620 nm na přístroji Sunrise Absorbance Reader (Tecan) s analytickým softwarem KIM. Statistická analýza dat a jejich grafická vizualizace byla provedena s využitím programu GraphPad Prism 9.0. Po aplikaci logistického regresního modelu bylo možné ze sigmoidálního průběhu křivky stanovit hodnotu IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration).

Pro posouzení vlivu činidel na expresi některých konkrétních markerů jednotlivých buněčných populací, respektive markerů diferenciacce (TH – ChB; HTR3A – bridge cells; SOX10 – SCPs), kmenového potenciálu (SOX2, c-MYC, N-MYC) a apoptózy (štěpená kaspáza 3), bylo prováděno ovlivnění buněk vysazených přímo na Petriho misky (linie SH-SY5Y a NBL-28). K tomu byl použit agonista HTR3 NMQ o koncentraci 50 μ M, respektive 25 μ M. Jako negativní kontrola sloužily buňky ovlivněné odpovídající koncentrací příslušného rozpouštědla (DMSO). Po pěti dnech kultivace byly z buněk získány proteinové lyzáty, které byly posléze analyzovány metodou western blottingu.

3.7 Funkční testy nádorových kmenových buněk (tvorba sfér)

Test tvorby buněčných sfér slouží k identifikaci CSCs *in vitro* a pro určení schopnosti sebeobnovy, diferenciace a proliferace buněk. Tento test hodnotí frekvenci, se kterou jsou schopny nasazené buňky v suspenzi vytvářet kulovité klonální shluky (sféry), a to v tekutém médiu s definovaným obsahem růstových faktorů a v podmínkách, které zabraňují adhezii buněk.

Nejprve byly kultivované buňky sklizeny pomocí akutázy, která zajistila disociaci shluků na jednotlivé buňky v suspenzi. Po centrifugaci byl pelet resuspendován v bezsérovém médiu (složení viz výše). Po spočítání buněk v Bürkerově komůrce bylo odpovídající množství buněk (200, 100, 50, 25, 5 a 1 na jamku) vysazeno v 0,5 ml média vždy do 4 jamek 24jamkové destičky (Corning® ultra-low attachment 24-well plate; kat. č. CLS3473; Corning, NY, USA). Buňky byly poté kultivovány při 37 °C po dobu 7 dní, přičemž 3. a 5. den bylo do jamek přidáno 50 µl média s čerstvým EGF a FGF2. V závěru experimentu byly jamky nasnímány pod světelným mikroskopem a byla vyhodnocena přítomnost sfér v jednotlivých jamkách. Jako sféry byly započítány pouze útvary o velikosti $\geq 50 \mu\text{m}$. Počet jamek se sférami pak odpovídá zastoupení CSCs v heterogenní buněčné populaci, protože pouze CSCs jsou schopny vytvářet kompaktní klonální shluky. V případě testů, které hodnotily vliv NMQ na kmenovost buněk, byly buňky nejprve vystaveny pětidennímu působení 75 µM NMQ či příslušné koncentraci rozpouštědla (DMSO) a poté vysazeny do bezsérového média dle postupu výše.

3.8 Editace genu *HTR3A* metodou CRISPR

Buňky linie SH-SY5Y byly po zpasážování nasazeny v kompletním médiu na 6jamkovou destičku s ošetřeným povrchem (kat. č. 30006; SPL Life Sciences). Po dvou dnech kultivace (konfluence cca 50 %) byly buňky transfekovány připravenou směsí lipofekčního činidla (Lipofectamine™ CRISPRMAX™ Cas9 Transfection Reagent; CMAX00008; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), rekombinantní nukleázy Cas9-GFP (CAS9GFPPRO; Sigma-Aldrich) a konkrétní syntetické sgRNA (SgRNA® Synthetic CRISPR guide RNAs; Sigma-Aldrich) v médiu Opti-MEM (kat. č. 31985062; Gibco, Thermo Fisher Scientific). Z předem navržených sgRNA byly vybrány celkem tři různé sgRNA cílící na gen *HTR3A* (referenční sekvence NM_001161772; exony 3 a 5), dále dvě negativní kontroly, které by neměly cílit na žádnou sekvenci v lidském genomu, a také pozitivní kontrola, cílící proti lokusu AAVS1 (adeno-associated virus integration site 1; místo integrace adeno-asociovaných virů). Přehled použitých sgRNA poskytuje Tab. 3.

Tabulka 3: Použité sgRNA v rámci metody CRISPR

MISSION™ gRNA ID	Označení	Lokus	Sekvence: 5'-3'	PAM	Vlákn	Exon	Koordináty
HSPD0000020297	sgHTR3A#1	HTR3A	GACCACCUACAUCUGGUAC	CGG	+	3	113979253
HSPD0000020295	sgHTR3A#2	HTR3A	AUGCCGAAUUAUACACGUAC	GGG	-	5	113983147
HSPD0000020298	sgHTR3A#3	HTR3A	GCAGUUCUGGACAUCGAAG	GGG	-	5	113983237
HScontrol_AAVS1	sgAAVS1	AAVS1	GGGGCCACUAGGGACAGGAU	TGG	+		11102837
NegativeControl1	sgNC1		CGCGAUAGCGCGAAUUAUU	NGG			
NegativeControl2	sgNC2		GCGCGAUAGCGCGAAUUAUAC	NGG			

Postup transfekce vycházel z protokolu pro lipofekci dodávaného výrobcem lipofekčního činidla (Thermo Fisher Scientific). Nejprve byl připraven roztok Opti-MEM média s 37,5 pmol Cas9 a 75 pmol příslušné sgRNA, paralelně bylo v Opti-MEM médiu naředěno lipofekční činidlo CRISPRMAX. Poté byl obsah obou zkumavek smíchán a po 15 minutách inkubace při pokojové teplotě (vznik komplexů) byla směs (250 µl) pipetována k buňkám v 6jamkové destičce.

Po 24 hodinách od transfekce byly buňky promyty PBS, staženy akutázou a převedeny do FACS pufru (5 mM EDTA v PBS s 3 % FBS). Následně byly s využitím průtokové cytometrie sortovány buňky, u nichž proběhla transfekce s vysokou účinností (buňky s fluorescenčním signálem díky GFP – součást rekombinantní nukleázy Cas9). Tyto buňky byly nasazeny do jamek s kompletním médiem (celkem dvě 96jamkové desky pro každou sgRNA). Kromě 192 buněk kultivovaných jednotlivě v jamkách byl na další desce kultivován rovněž zbylý pool buněk. Pro sorting byl využit průtokový cytometr se softwarem BD FACS Diva (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Po několikadenní až několikaměsíční kultivaci v závislosti na rychlosti proliferace jednotlivých buněk byly od každého vzniklého klonu (a také od šesti poolů) získány proteinové lyzáty, které byly následně analyzovány, co se týče exprese HTR3A (western blotting).

3.9 RNA interference

Pro posttranskripční umlčení exprese *HTR3A* pomocí siRNA byly buňky nejprve nasazeny na 6jamkové destičky. Po 24 hodinách kultivace v kompletním médiu (konfluencce cca 50 %) byly buňky transfekovány 250 µl připravené směsi lipofekčního činidla (Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent; kat. č. 13778150; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) s konkrétní siRNA (Silencer™ Pre-Designed siRNA; Ambion, Thermo

Fisher Scientific) v médiu Opti-MEM podle pokynů výrobce (postup analogický s metodou CRISPR). Byly vybrány celkem tři různé siRNA cílící na mRNA genu *HTR3A* (referenční sekvence NM_001161772.2; exony 2 a 4; Tab. 4). Výrobce sekvenci siRNA ani komplementární oblast na mRNA neuvádí, je vždy uvedena pouze jedna koordináta cíle a konkrétní exon.

Tabulka 4: Použité siRNA v rámci RNA interference

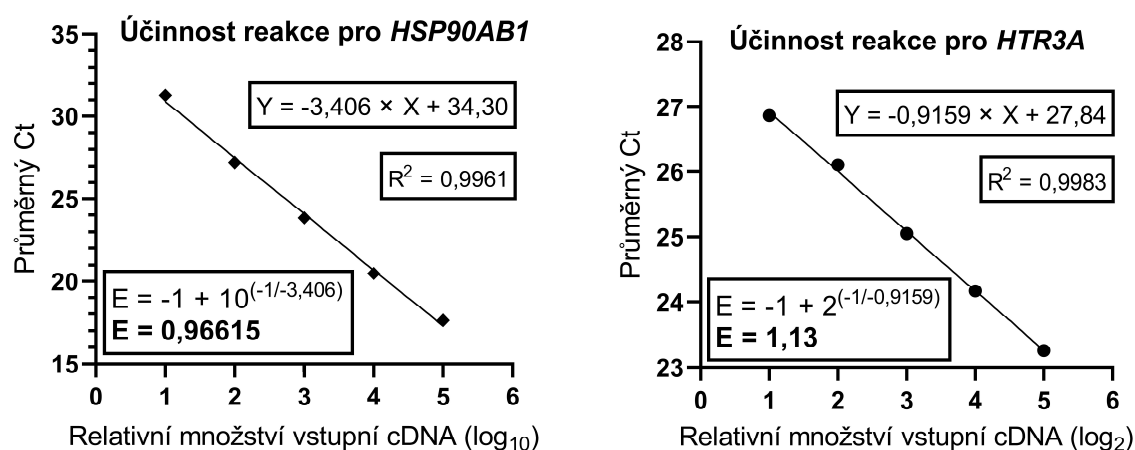
siRNA ID	Označení	Koordináta cíle	Sekvence mRNA v okolí cíle (50 bází): 5'-3'
1989	siHTR3A#1	125 (G, exon2)	AGGCCCGCUC UGCUGAGGCU GUCG <u>G</u> AUUAC CUUUUGACCA ACUACAGGAA (báze 101-150)
2084	siHTR3A#2	318 (A, exon 4)	UCCAGUG GAACCCUGAG GACUUUG <u>A</u> CA ACAUCACCAA GUUGUCCAUC CCC (báze 294-343)
105417	siHTR3A#3	189 (C, exon2)	UGAGGG ACUGGAGGAA GCCAACCA <u>C</u> C GUAUCCAUUG ACGUCAUUGU CUAU (báze 165-214)

Byly vyzkoušeny celkem čtyři různé podmínky: dvě různé koncentrace siRNA v kombinaci s různým množstvím lipofekčního činidla (finální množství siRNA v jedné jamce bylo 25 pmol, respektive 125 pmol; a objem činidla v jamce byl 3,75 µl, respektive 7,5 µl). Vedle dvou negativních kontrol, jež necílí žádný genový produkt a výrobce garantuje minimální efekt na genovou expresi (siNC1, kat. č. 4390843; siNC2, kat. č. 4390846), byla do experimentu zařazena také jedna pozitivní kontrola siPROM1 interferující s transkriptem genu *PROM1* (prominin-1; CD133), který je u použité linie SH-SY5Y exprimován (siRNA ID: s16879) a jehož posttranskripčního umlčení bylo v rámci naší laboratoře již dříve dosaženo. Pro ověření úspěšnosti umlčení genu *HTR3A* byly z buněk po 48 hodinách a 72 hodinách od transfekce připraveny proteinové lyzáty, které byly analyzovány pomocí metody western blotting.

4 Výsledky

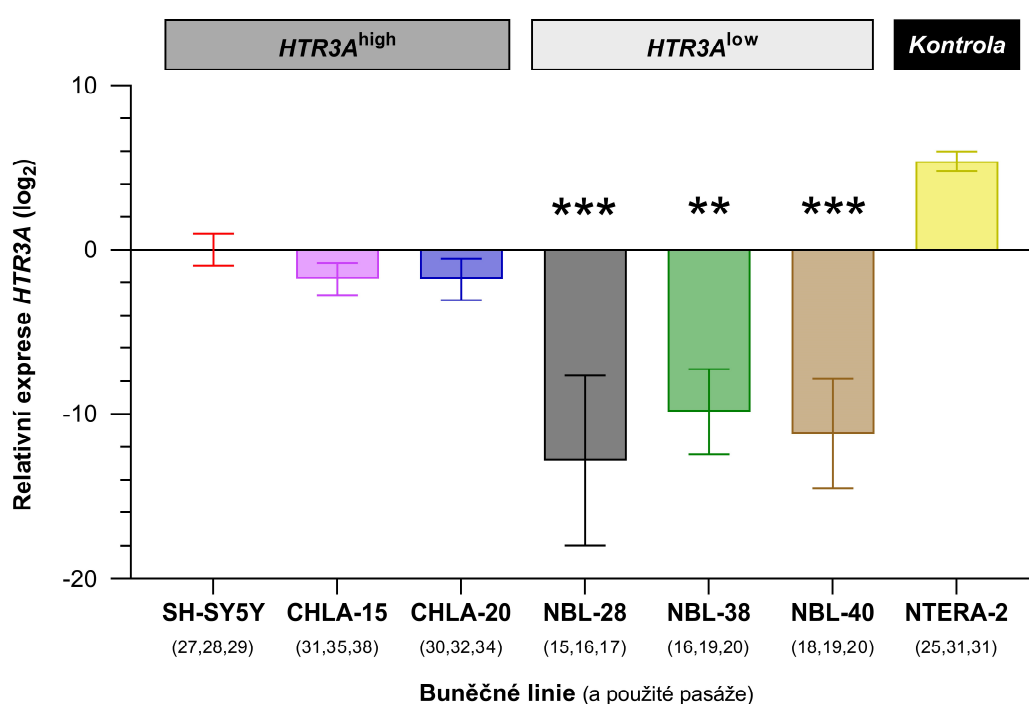
4.1 Porovnání exprese *HTR3A* u šesti buněčných linií NB

Jako experimentální materiál jsem v diplomové práci využil celkem šest buněčných linií NB. Tento soubor jsem nejprve charakterizoval z hlediska exprese *HTR3A* na úrovni mRNA i proteinu. Analýza exprese na úrovni mRNA byla provedena pomocí RT-qPCR. Na začátku jsem ověřil účinnost qPCR pro jednotlivé cíle (produkty), tedy *HTR3A* a *HSP90AB1* tak, aby bylo možné exaktně určit hodnoty ΔC_t a $\Delta\Delta C_t$ (Graf 1).



Graf 1: Stanovení účinnosti qPCR pro *HTR3A* a *HSP90AB1*. K tomuto účelu jsem použil templátovou cDNA linie SH-SY5Y, která byla ředěna geometrickou řadou (celkem pět hodnot). Hodnota 5 u relativního množství vzorku přitom představuje neředěný vzorek, hodnota 1 pak vzorek cDNA ředěný $16 \times$ (u *HTR3A*), respektive $10\,000 \times$ (u *HSP90AB1*). Z rovnice regresní přímky byl zjištěn sklon křivky (a) a vypočtena účinnost reakce (E) dle vzorce $E = -1 + 10^{(-1/a)}$, respektive $E = -1 + 2^{(-1/a)}$. Všechny hodnoty C_t , jež byly výstupem následných analýz, byly poté korigovány na 100% účinnost podle vzorce $C_{tE100} = C_t \times \log(1+E) / \log 2$ (Livak a Schmittgen, 2001). Pro výpočet hodnot ΔC_t a $\Delta\Delta C_t$ jsem pak použil právě hodnoty C_{tE100} .

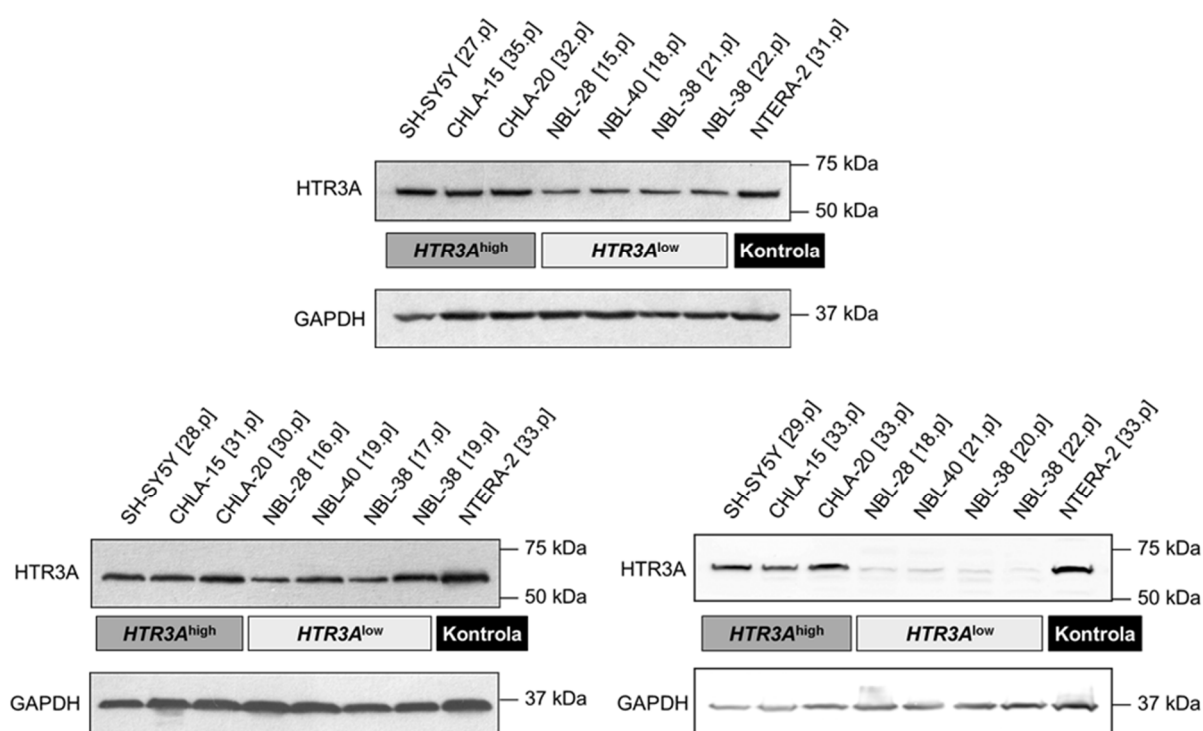
Samotná analýza exprese provedená v rámci panelu NB linií odhalila statisticky významné rozdíly v expresi *HTR3A* (Graf 2), na jejichž základě jsou linie NBL-28, NBL-38 a NBL-40 v rámci práce souhrnně označovány jako *HTR3A*^{low}, jelikož u nich byla detekována velmi nízká exprese *HTR3A* (C_{tE100} v rozmezí 32–42, v některých technických replikátech dokonce nedetekováno). Naopak linie SH-SY5Y, CHLA-15 a CHLA-20 jsou dále označovány jako *HTR3A*^{high}, protože v jejich případě byla exprese *HTR3A* (C_{tE100} v rozmezí 23–27) podobná jako u pozitivní kontroly NTERA-2 (C_{tE100} v rozmezí 18–20).



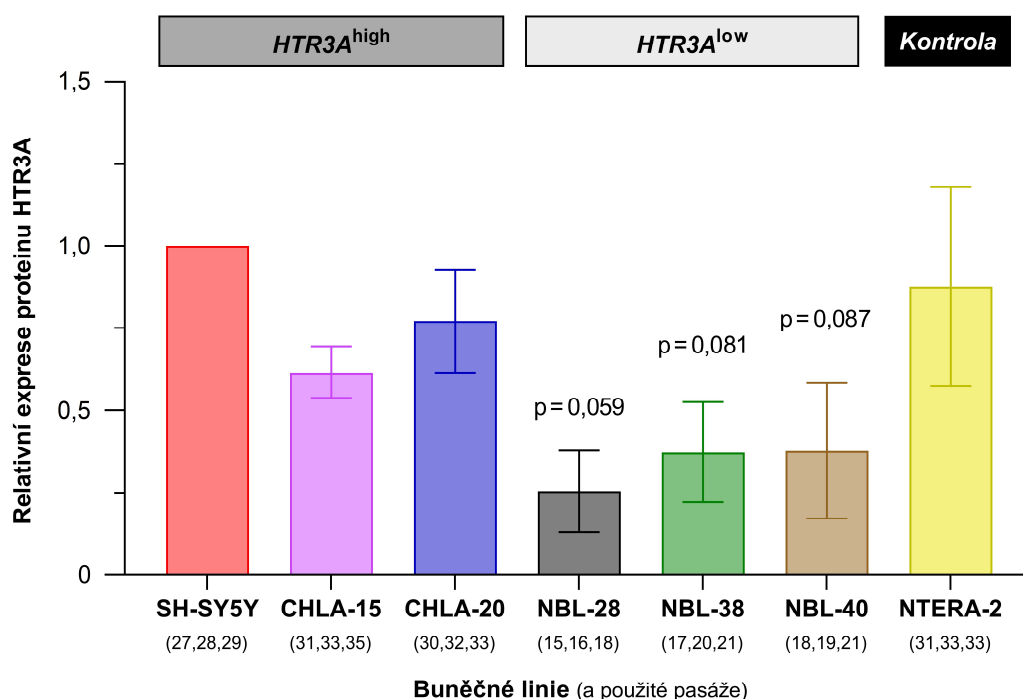
Graf 2: Relativní exprese *HTR3A* na úrovni mRNA detekovaná pomocí RT-qPCR. Exprese jednotlivých linií (průměr ± směrodatná odchylka; N = 3) je vztažena k expresi sbírkové linie SH-SY5Y. Linie NTERA-2 sloužila pouze jako pozitivní kontrola exprese *HTR3A*. Pro statistickou analýzu dat byla použita jednofaktorová ANOVA (ordinary one-way ANOVA) s Dunnettovou metodou mnohonásobného porovnávání s korekcí p-hodnot (post-hoc test), kdy byla každá linie srovnána vůči linii SH-SY5Y. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

S ohledem na možnou posttranskripční regulaci genové exprese bylo nutné výše uvedené výsledky ověřit také na úrovni exprese proteinu metodou western blotting. Touto metodou byla opakovaně potvrzena rozdílná exprese *HTR3A* u linií *HTR3A*^{high} a *HTR3A*^{low} také na úrovni proteinu (Obr. 8).

Denzitometrická analýza nasnímaných membrán jasně ukázala odlišný trend v expresi proteinu *HTR3A* u *HTR3A*^{low} a *HTR3A*^{high} linií (Graf 3), ačkoliv tyto rozdíly, zejména vzhledem k větší technické variabilitě (změna detekčního systému v průběhu realizace diplomové práce), nebyly vyhodnoceny jako statisticky signifikantní.



Obrázek 8: Exprese *HTR3A* na úrovni proteinu. Rozdíly mezi *HTR3A*^{low} a *HTR3A*^{high} liniemi jsou patrné i na úrovni exprese proteinu *HTR3A*, nicméně biologická opakování vykazovala vyšší (i technickou) variabilitu a tyto rozdíly proto nebyly vždy tak markantní. Zobrazeny jsou tři reprezentativní obrázky z celkem 6 experimentů. Nanášecí kontrola: GAPDH.

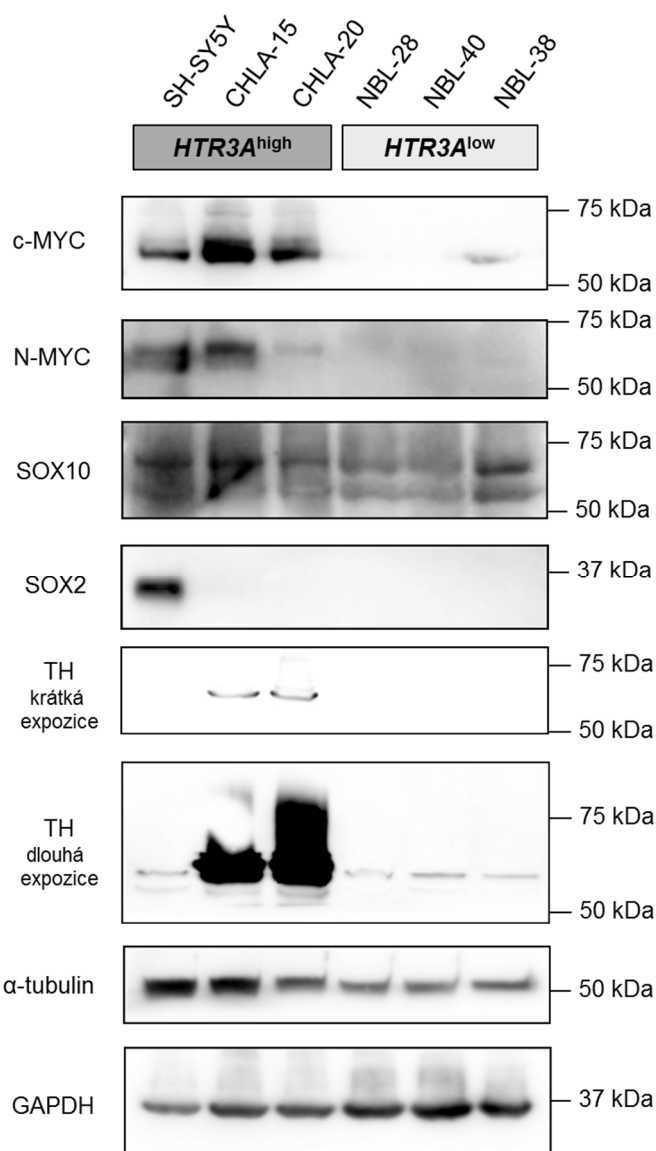


Graf 3: Relativní exprese HTR3A na úrovni proteinu. Průměrná exprese $\pm$ střední chyba průměru (SEM; standard error of the mean) u jednotlivých linií vztažená k expresi u sávkové linie SH-SY5Y. Denzitometrická data pro HTR3A byla vždy normalizována k příslušné nanášecí kontrole (GAPDH). U NBL-28, NBL-38 a NBL-40 byla pozorována přibližně 2–5× nižší exprese HTR3A oproti referenční linii SH-SY5Y. Vzhledem k nehomogenitě rozptylu byl pro statistickou analýzu dat použit nepárový jednostranný t-test s Welchovou korekcí, kdy jsem testoval hypotézu o odlišné expresi HTR3A u $HTR3A^{low}$ linií oproti linii SH-SY5Y. Pozorované rozdíly v expresi HTR3A na úrovni proteinu nedosáhly statistické významnosti ani u jedné z těchto tří linií. $N = 3$.

4.2 Korelační analýza exprese vybraných markerů buněčných populací dřeně nadledvin a jejich prekurzorů

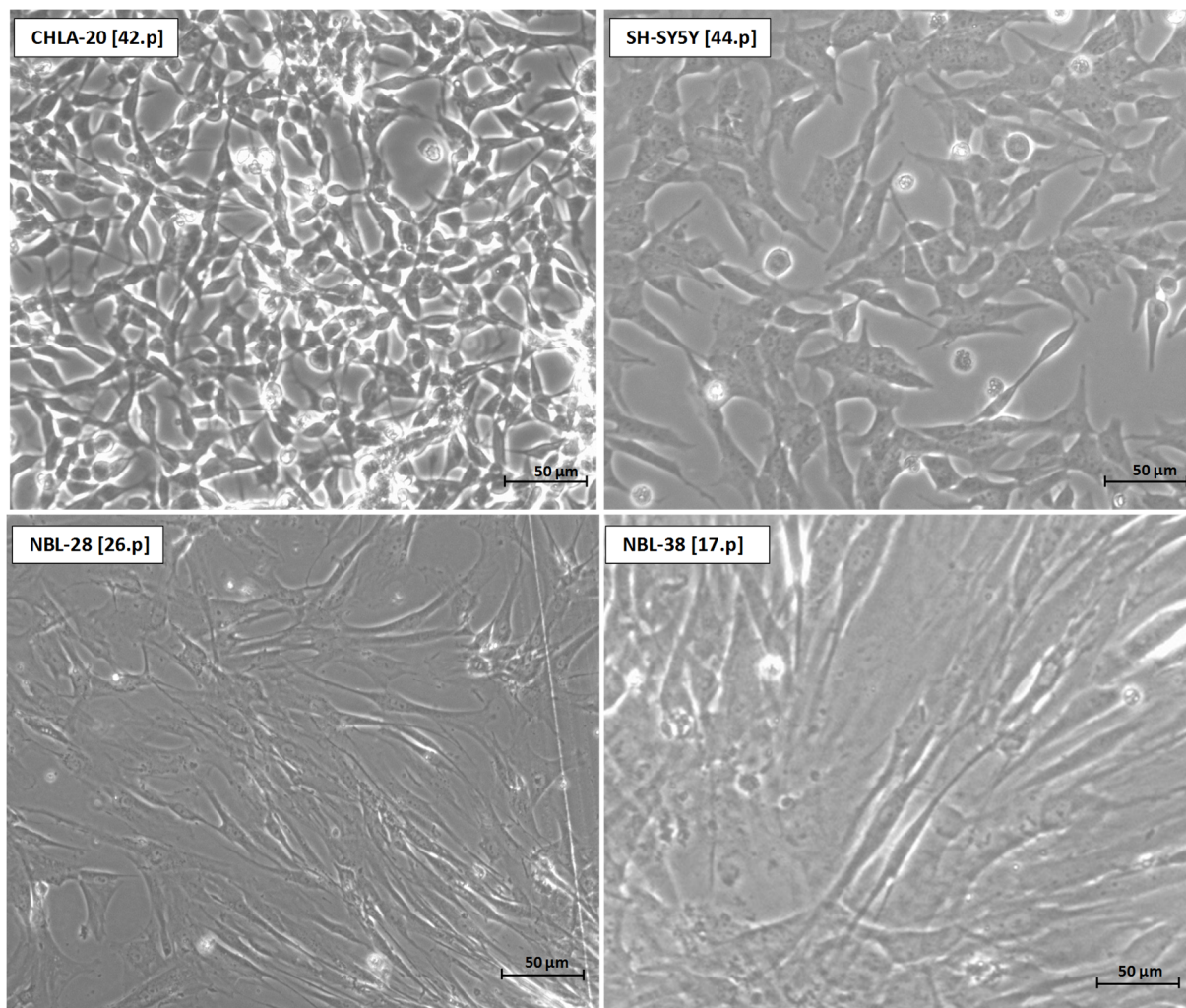
Na základě zjištěné variability exprese *HTR3A* v rámci panelu buněčných linií jsem se rozhodl posoudit, zda lze pozorovat také rozdíly v expresi některých dalších markerů typických pro různá vývojová stadia buněk dřeně nadledvin (SCPs, bridge cells, ChB) či markerů souvisejících s kmenovostí buněk. Proto jsem provedl screening exprese TH, SOX2, SOX10, c-MYC a N-MYC na úrovni proteinu metodou western blotting (Obr. 9) s cílem získat alespoň letmý vhled do buněčného původu zkoumaných linií NB, který by mohl naznačit některé další obecné rozdíly mezi $HTR3A^{high}$ a $HTR3A^{low}$ liniemi či poukázat na případnou korelaci exprese HTR3A se zkoumanými proteiny.

Výsledky tohoto screeningu skutečně ukázaly, že *HTR3A*^{high} linie exprimují oproti *HTR3A*^{low} liniím vyšší hladiny onkoproteinu c-MYC, přičemž u dvou *HTR3A*^{low} linií, NBL-28 a NBL-40, nebyl c-MYC dokonce vůbec detekován (Obr. 9). Pozoruhodné jsou značné rozdíly v expresi TH, jejíž hladina je výrazně vyšší u linií CHLA-15 a CHLA-20 oproti všem ostatním liniím a úroveň exprese TH tedy nekoreluje s rozdíly v expresi *HTR3A*. SOX2 byl detekován pouze u linie SH-SY5Y. Kvalitní výstupy v případě SOX10 a N-MYC se nepodařilo získat.



Obrázek 9: Exprese c-MYC, N-MYC, SOX10, SOX2 a TH na úrovni proteinu. *HTR3A*^{high} linie vykazují oproti *HTR3A*^{low} liniím rovněž vyšší expresi onkoproteinu c-MYC. U linií NBL-28 a NBL-40 nebyl c-MYC detekován. Dále byly pozorovány značné rozdíly v expresi TH, které nicméně nekorelují s rozdíly v expresi *HTR3A*. SOX2 byl detekován pouze u linie SH-SY5Y. Výstupy v případě detekce N-MYC a SOX10 bohužel nejsou optimální a vzhledem k tomu, že nebylo možné experiment zopakovat, nelze výsledky s jistotou interpretovat. Přesto je patrný trend vyšší exprese N-MYC u *HTR3A*^{high} linií. Nanášecí kontrola: GAPDH, α-tubulin.

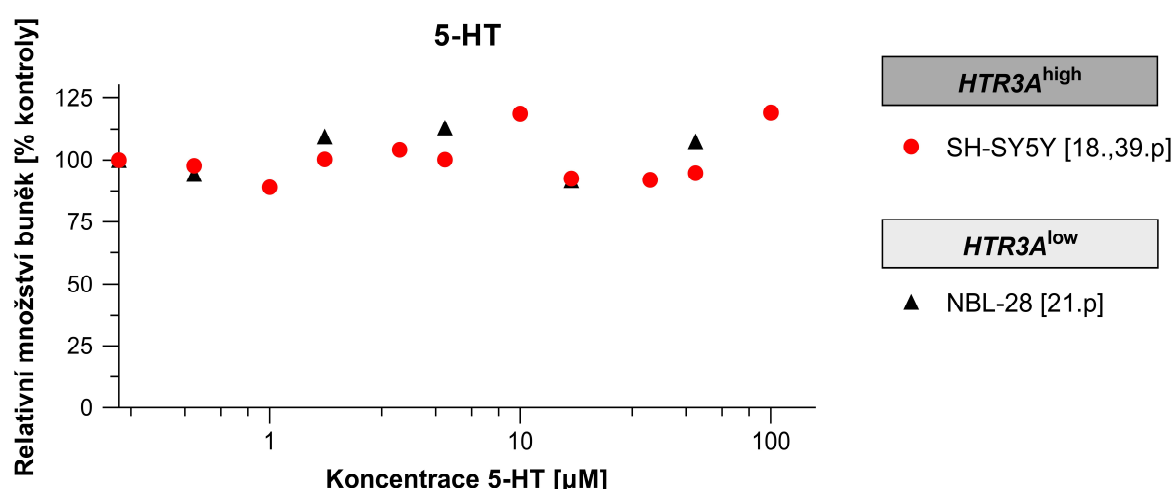
S ohledem na rozdíly v expresi markerů různých vývojových stádií buněk dřeně nadledvin jsem se zaměřil i na morfologické srovnání buněk jednotlivých linií. Buňky *HTR3A*^{high} byly celkově menší a morfologicky připomínaly nezralé neurální progenitory, zatímco buňky *HTR3A*^{low} linií byly charakteristické delšími výběžky (Obr. 10).



Obrázek 10: Morfologické srovnání *HTR3A*^{high} linií CHLA-20, SH-SY5Y a *HTR3A*^{low} linií NBL-28 a NBL-38. *HTR3A*^{high} linie vykazují oproti *HTR3A*^{low} liniím menší velikost buněk a kratší výběžky.

4.3 Testy viability a proliferace buněk a modulace serotonergní signalizace

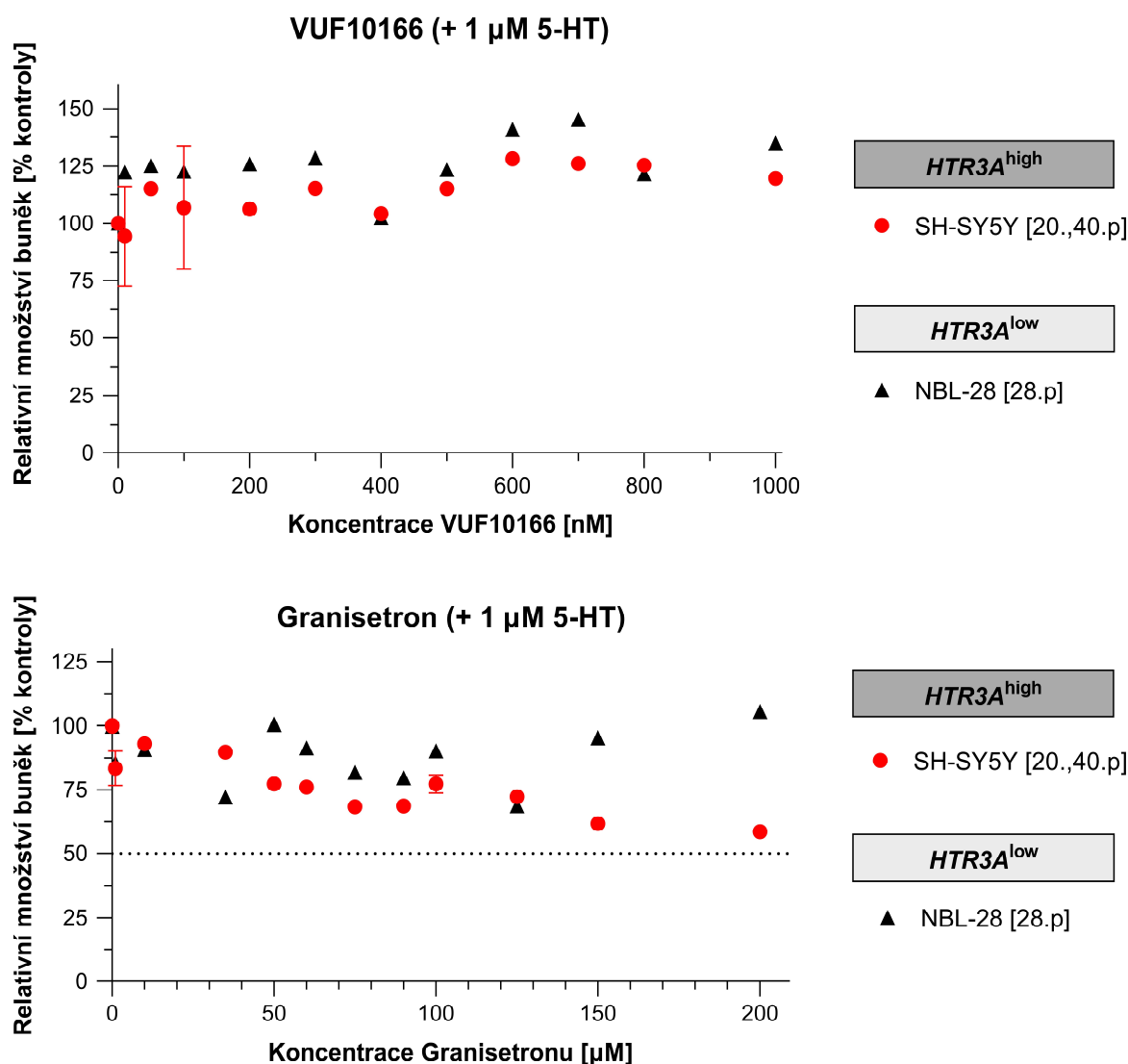
V návaznosti na zjištěné rozdíly v expresi *HTR3A* v rámci panelu linií NB bylo dalším logickým cílem této práce porovnat vybrané linie NB z hlediska vlivu 5-HT, agonistů a antagonistů HTR3 na proliferaci a viabilitu buněk. K tomuto účelu jsem využil MTT test a na modelovém páru *HTR3A*^{high} linie SH-SY5Y a *HTR3A*^{low} linie NBL-28 jsem nejprve zhodnotil účinky působení samotného 5-HT (ve formě serotonin hydrochlorid). Žádný jasný trend ani rozdíl v účinku 5-HT na buňky linie SH-SY5Y a NBL-28 však nebyl pozorován (Graf 4).



Graf 4: Výsledky MTT testu u buněk ovlivněných 5-HT po dobu tří dnů. V daném rozsahu koncentrací nebyl pozorován žádný vliv 5-HT na viabilitu či proliferaci buněk, a to jak v případě vybraného zástupce *HTR3A*^{high} linií, tak i v případě zástupce *HTR3A*^{low} linií. Relativní množství buněk v procentech představuje vyjádření hodnot absorbance normalizovaných na hodnotu absorbance negativní kontroly. Hodnoty v grafu jsou průměrem hodnot pěti technických replikátů. Osa x je pro přehlednost zobrazena v logaritmickém měřítku. Kvůli opatřením v souvislosti s pandemií COVID-19 jsem data získal pouze pro jeden biologický replikát pro dané koncentrace, ale u linie SH-SY5Y je použita jemnější koncentrační řada než u linie NBL-28 díky dvěma fyzickým provedením experimentu (pokaždé s jiným rozmezím koncentrací).

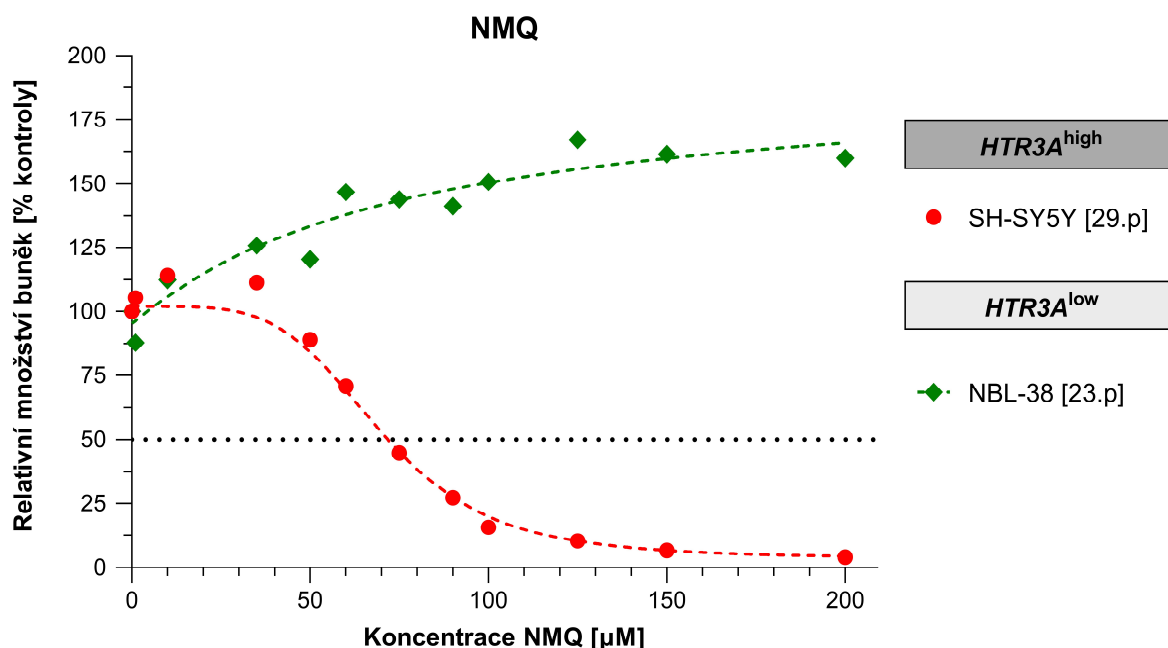
Následně jsem se s využitím stejného modelového páru linií NB zaměřil na ovlivňování buněk antagonisty HTR3 – VUF10166 a granisetronem (ve formě granisetron hydrochlorid). Ani inhibice aktivity HTR3A těmito činidly však neměla výrazný vliv na růstové parametry buněk NB (Graf 5).

Konkrétně v případě VUF10166 nebyl v daném rozsahu koncentrací pozorován žádný vliv, diskutabilní je pouze působení granisetronu na buňky linie SH-SY5Y, které vykazovaly při nejvyšší použité koncentraci pokles viability či proliferace o 40 %, zatímco růstové parametry buněk zástupce *HTR3A*^{low} linií touto koncentrací činidla ovlivněny nebyly. S ohledem na pouze jeden biologický replikát pro koncentrace nad 100 μM je ale třeba tento výsledek brát s rezervou.



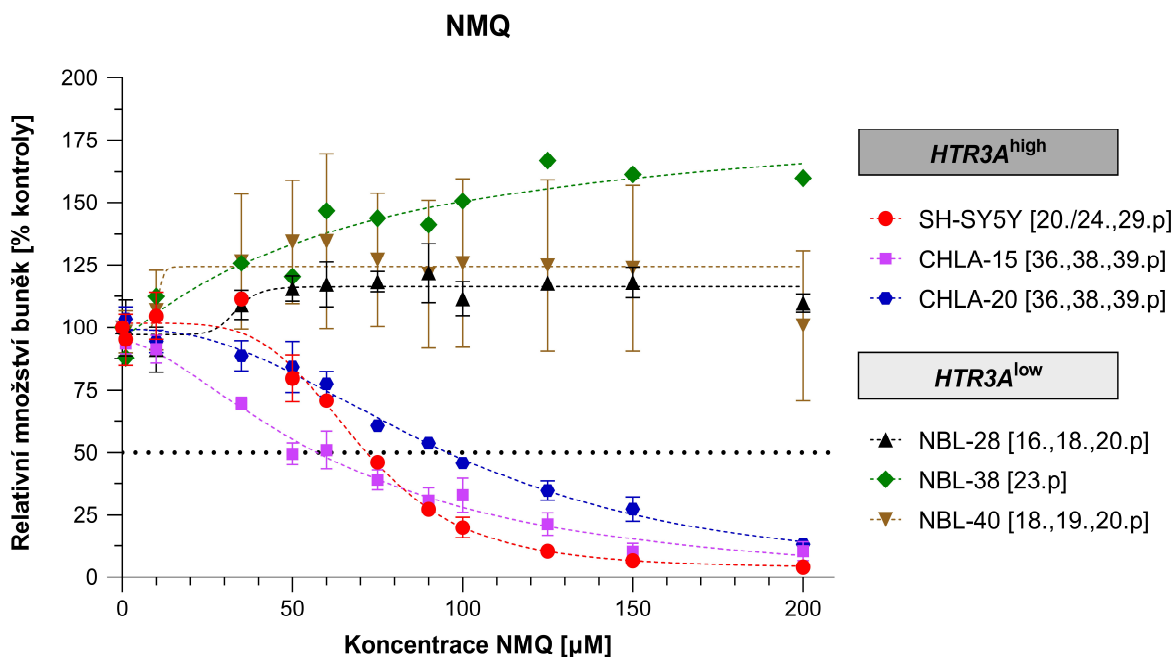
Graf 5: Výsledky MTT testu u buněk ovlivněných VUF10166, respektive granisetronem po pěti dnech působení. Aby bylo možné zhodnotit vliv inhibice HTR3, byl v každé jamce vedle antagonisty přítomen také 5-HT v koncentraci 1 μM . Relativní množství buněk v procentech představuje vyjádření hodnot absorbance normalizovaných na hodnotu absorbance negativní kontroly. Kvůli opatřením v souvislosti s pandemií COVID-19 jsem data z více replikátů ($N = 2$; hodnoty zobrazeny jako průměr $\pm$ směrodatná odchylka) získal pouze pro některé koncentrace u linie SH-SY5Y, v ostatních případech je $N = 1$ a hodnoty v grafu jsou průměrem hodnot pěti technických replikátů.

Naopak významné rozdíly v odpovědi $HTR3A^{high}$ linií a $HTR3A^{low}$ linií ale byly zjištěny u buněk ovlivněných agonistou NMQ (ve formě N-methylquipazine dimaleate). Po pěti dnech působení NMQ byl totiž pozorován výrazný pokles viability či proliferace u buněk linie SH-SY5Y ($HTR3A^{high}$), zatímco na růstové parametry buněk linie NBL-38 ($HTR3A^{low}$) měl tento agonista spíše opačný vliv (Graf 6).



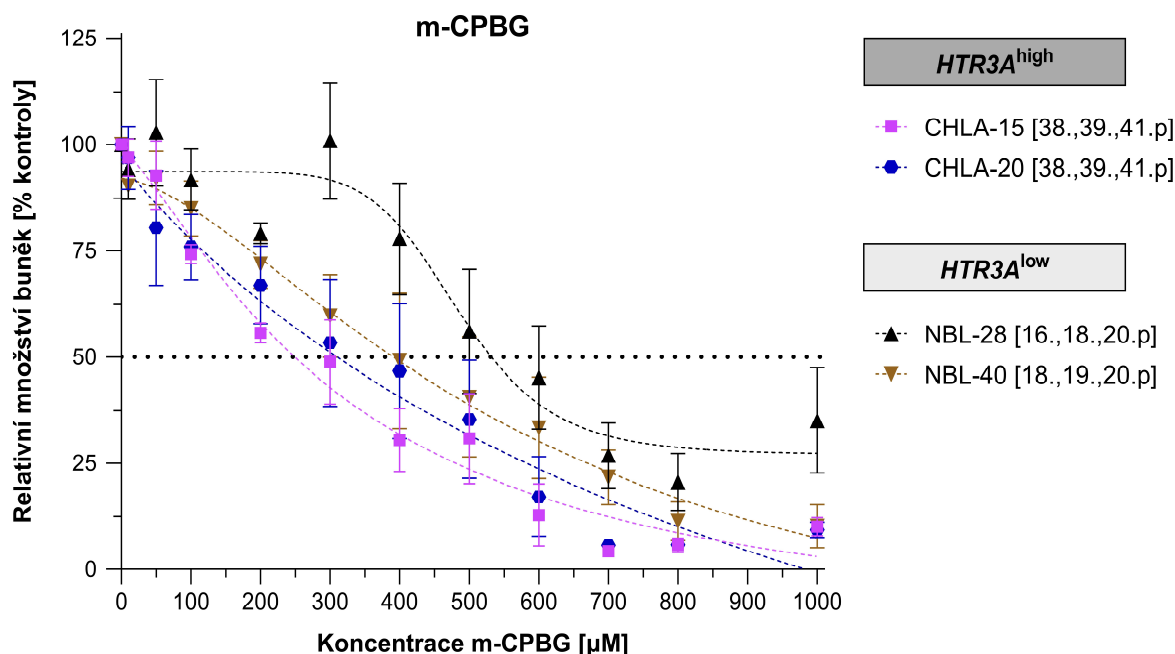
Graf 6: Výsledky MTT testu u buněk ovlivněných NMQ po pěti dnech působení. Při vyšších koncentracích činidla byla proliferace buněk linie SH-SY5Y prakticky zastavena. Naopak linie NBL-38 vykazovala při vyšších koncentracích agonisty zvýšenou proliferaci oproti kontrole. Relativní množství buněk v procentech představuje vyjádření hodnot absorbance normalizovaných na hodnotu absorbance negativní kontroly. N = 1.

Rozdílný účinek NMQ jsem poté ověřil i u ostatních čtyř používaných buněčných linií, kdy se u linií CHLA-15 a CHLA-20 podařilo docílit při nejvyšší koncentraci činidla poklesu viability či proliferace prakticky o 90 %, zatímco růstové parametry buněk linie NBL-28 a NBL-40 nijak negativně ovlivněny nebyly (Graf 7). Po aplikaci logistického regresního modelu jsem mohl pro $HTR3A^{high}$ linie stanovit hodnoty IC_{50} . Ty byly určeny jako $\sim 70 \mu$ M pro linii SH-SY5Y, $\sim 60 \mu$ M pro linii CHLA-15 a $\sim 95 \mu$ M u linie CHLA-20.



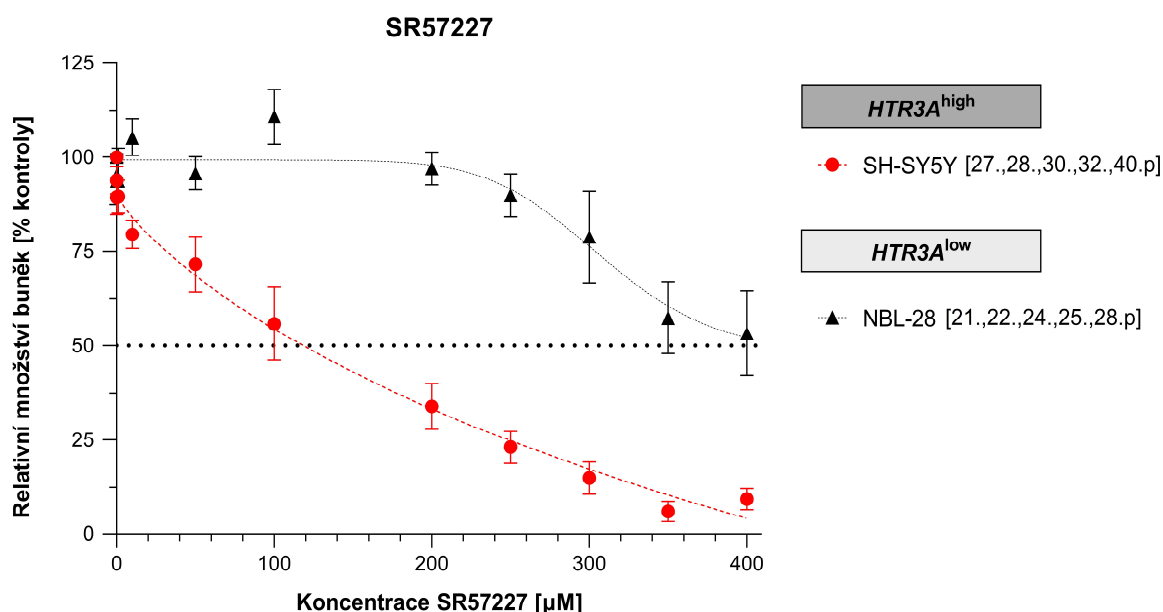
Graf 7: Výsledky MTT testu u kompletního panelu linií ovlivněných NMQ po pěti dnech působení. Při vyšších koncentracích činidla byla absorbance u *HTR3A^{high}* linií výrazně snížena (pravděpodobně vlivem zpomalení proliferace). Naopak *HTR3A^{low}* linie nebyly působením činidla ovlivněny. Relativní množství buněk v procentech představuje vyjádření hodnot absorbance normalizovaných na hodnotu absorbance negativní kontroly. Hodnoty v grafu vyjadřují průměr $\pm$ SEM ze tří biologických replikátů (nicméně v případě linie NBL-38 je $N = 1$ a u linie SH-SY5Y je u některých koncentracích činidla $N = 1$, u jiných $N = 2$).

Pro ověření inhibičního působení agonistů HTR3 na *HTR3A^{high}* linie jsem dále testoval účinek další látky z této skupiny činidel, a sice m-CPBG (ve formě 1-[3-chlorophenyl]biguanide hydrochloride) na růstové parametry buněk linie CHLA-15, CHLA-20, NBL-28 a NBL-40. Podle očekávání způsobil agonista ve vyšších koncentracích pokles viability či proliferace u *HTR3A^{high}* linií, nicméně podobný pokles byl pozorován i v případě linie NBL-40 coby zástupce *HTR3A^{low}* linií (Graf 8). Linie NBL-28 reagovala rovněž poklesem oproti kontrole, který ale nebyl tak výrazný a docházelo k němu až při vyšších koncentracích než v případě ostatních linií. Hodnoty IC_{50} byly určeny jako $\sim 250 \mu\text{M}$ pro linii CHLA-15, $\sim 310 \mu\text{M}$ pro linii CHLA-20, $\sim 400 \mu\text{M}$ v případě linie NBL-40 a na $\sim 530 \mu\text{M}$ u linie NBL-28.



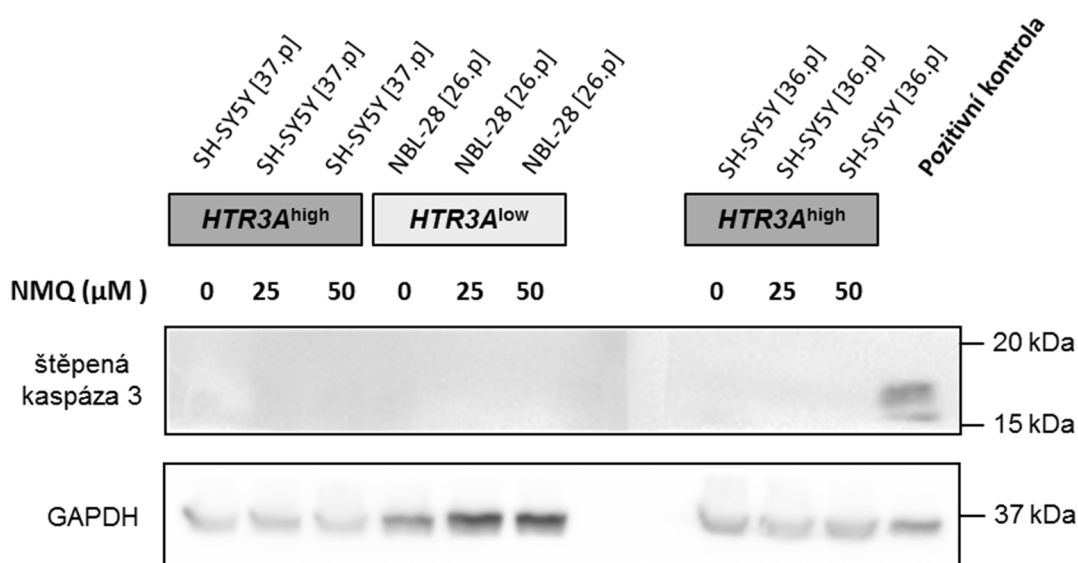
Graf 8: Výsledky MTT testu u buněk ovlivněných m-CPBG po pěti dnech působení. Při vyšších koncentracích činidla byla absorbance u buněk *HTR3A^{high}* linií výrazně snížena (pravděpodobně vlivem zpomalení proliferace). Působením činidla byly negativně ovlivněny rovněž *HTR3A^{low}* linie, i když v případě linie NBL-28 není pokles absorbance tak výrazný. Relativní množství buněk v procentech představuje vyjádření hodnot absorbance normalizovaných na hodnotu absorbance negativní kontroly. $N = 3$; data jsou zobrazena jako průměr $\pm$ SEM.

Vzhledem k nejednoznačnému výsledku testování vlivu m-CPBG na buňky bylo třeba provést obdobné pokusy ještě s dalším agonistou HTR3. Byl zvolen SR57227 (ve formě SR57227 hydrochloride), přičemž bylo hodnoceno jeho působení na buňky linie SH-SY5Y a NBL-28. MTT testy po ovlivnění buněk tímto činidlem potvrdily závěry získané z experimentů s NMQ ohledně rozdílné citlivosti *HTR3A^{high}* linií a *HTR3A^{low}* linií k agonistům. Ačkoliv nelze tvrdit, že by linie NBL-28 nebyla působením agonisty ovlivněna, lze shrnout, že vliv agonisty na tuto linii je patrný až při vyšších koncentracích (Graf 9). Hodnota IC_{50} byla pro linii SH-SY5Y stanovena na $\sim 120 \mu\text{M}$, zatímco u linie NBL-28 nedosáhla hodnoty IC_{50} ani nejvyšší testovaná koncentrace $400 \mu\text{M}$.



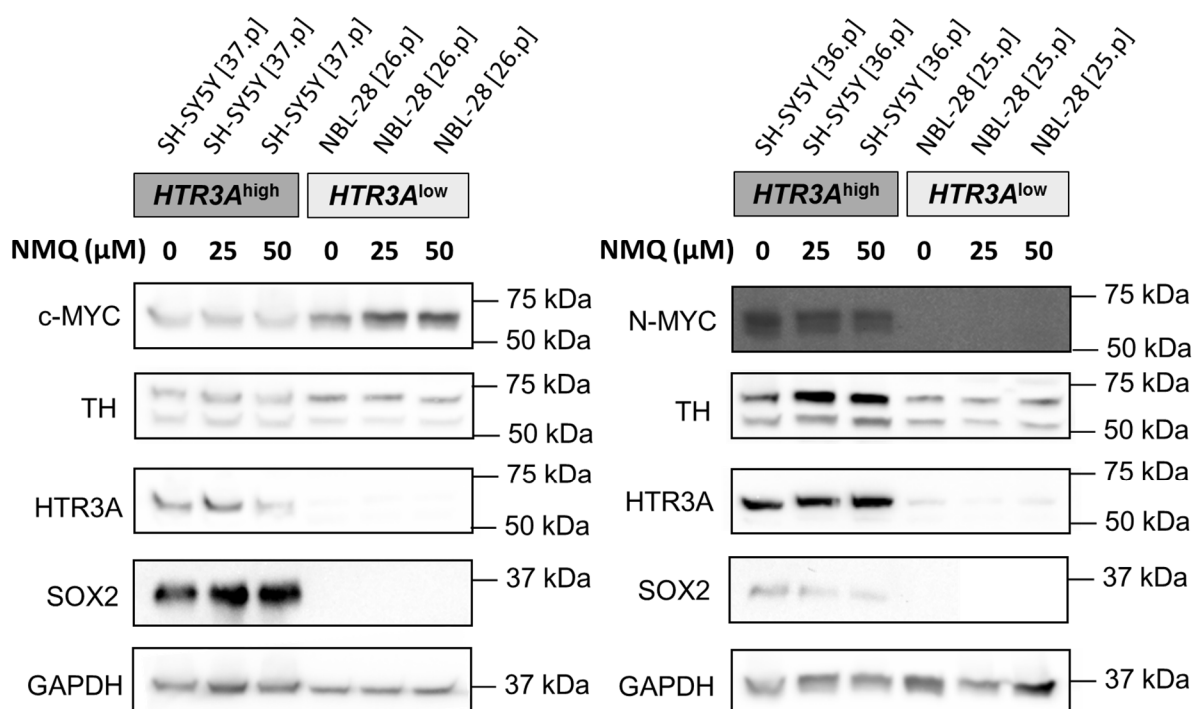
Graf 9: Výsledky MTT testu u buněk ovlivněných SR57227 po pěti dnech působení. Se vzrůstající koncentrací činidla se hodnoty absorbance u linie SH-SY5Y výrazně snižovaly (pravděpodobně vlivem zpomalení proliferace). Linie NBL-28 reagovala až na vyšší koncentrace činidla a pokles viability či proliferace u ní není tak patrný. Relativní množství buněk v procentech představuje vyjádření hodnot absorbance normalizovaných na hodnotu absorbance negativní kontroly. N = 5; data jsou zobrazena jako průměr ± SEM.

Z výsledků MTT testů samotných není možné jednoznačně určit, zda byl pokles naměřené absorbance po působení agonistů způsoben cytotoxickým, či spíše cytostatickým efektem. Nepřítomnost plovoucích odumřelých buněk při kontrole v optickém mikroskopu však naznačovala spíše druhou možnost. Pro ověření této hypotézy jsem v dalším experimentu po pětidenním ovlivnění buněk NMQ detekoval pomocí western blottingu štěpenou kaspázu 3, jakožto marker probíhající apoptózy. Díky zařazení pozitivní kontroly pro apoptózu pak výsledky těchto pokusů jednoznačně dokazují, že k indukci tohoto typu buněčné smrti po působení NMQ nedochází (Obr. 11). Tento agonista má tedy spíše cytostatický účinek.



Obrázek 11: Detekce apoptózy u linií SH-SY5Y a NBL-28 ovlivněných NMQ. V žádném ze zkoumaných vzorků nebyla štěpená kaspáza 3 detekována, což naznačuje, že pokles viability buněk po působení NMQ nesouvisí s indukcí apoptózy a jde spíše o cytostatický efekt. Buňky byly vystaveny 5dennímu působení NMQ ve dvou koncentracích (25 μM; 50 μM). Jako negativní kontrola sloužilo příslušné rozpouštědlo (DMSO; 0 μM). Pozitivní kontrola: CHLA-20 [35.p] (100 nM staurosporin/24 hodin). Nanášecí kontrola: GAPDH.

Po posouzení vlivu činidel na růstové parametry buněk mě zajímalo, jakým konkrétním způsobem je ovlivněn fenotyp buněk NB, tedy zda agonisté HTR3 zasahují například do diferenciaci a kmenového potenciálu buněk. Proto jsem posléze pomocí metody western blotting sledoval vliv agonistů na expresi některých konkrétních markerů (HTR3A, TH, SOX2, c-MYC a N-MYC). Z agonistů jsem zvolil opět NMQ, jehož působení na buňky bylo v předchozích experimentech nejvýraznější. V rámci dvou biologických replikátů se v případě linií SH-SY5Y a NBL-28 nepodařilo prokázat změnu exprese u žádného z analyzovaných markerů (Obr. 12).



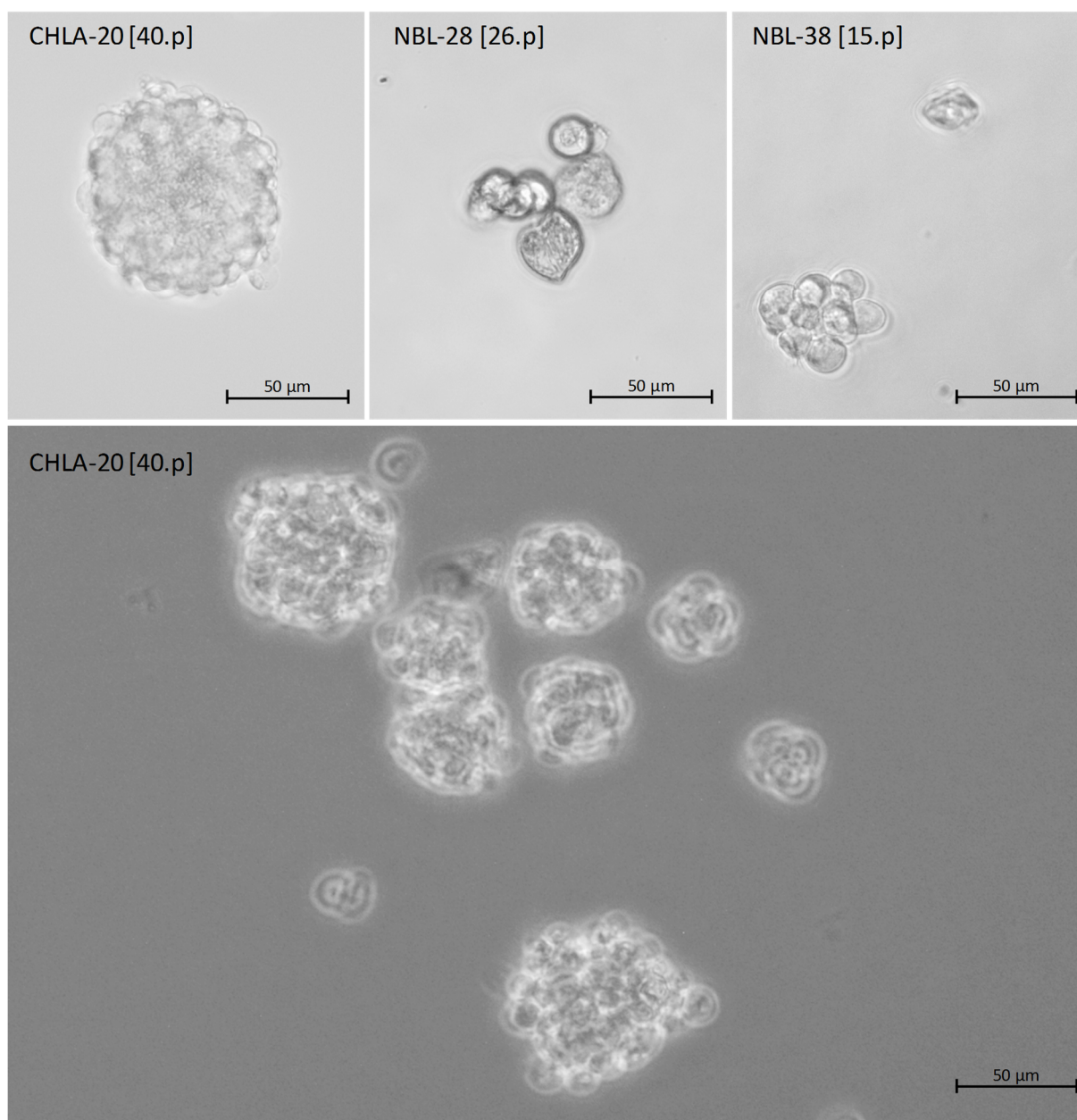
Obrázek 12: Expresse HTR3A, TH, SOX2, c-MYC a N-MYC po modulaci serotonergní signalizace agonistou HTR3 NMQ. Nebyl prokázán žádný konkrétní dopad této intervence. Zajímavým zjištěním, které je v rozporu s předchozími experimenty, je v jednom z opakování vyšší exprese onkoproteinu c-MYC u *HTR3A*^{low} linie oproti *HTR3A*^{high} linii. S ohledem na nekvalitní výstupy (značné nespecifické pozadí na membráně, nepřesnosti v nanášení, protichůdné výstupy dvou replikátů) bohužel nebylo možné exaktně vyhodnotit výsledky pomocí denzitometrické analýzy. Z dosažených výsledků každopádně není jasný případný trend změny a experimenty by bylo zapotřebí zopakovat. Použité koncentrace NMQ pro pětidenní kultivaci: 50 μM, 25 μM + negativní kontrola (NK) pouze s rozpouštědlem používaným u NMQ (DMSO). Nanášecí kontrola: GAPDH.

4.4 Test tvorby buněčných sfér *in vitro*

Potenciální dopady modulace serotonergní signalizace by se mohly projevit rovněž ve schopnosti tvořit sféry. Dalším krokem proto bylo posouzení kmenovosti zkoumaných linií pomocí testu CSCs *in vitro*. Z pohledu porovnání zastoupení CSCs v rámci heterogenní masy buněk tato analýza dokládá jednoznačné rozdíly mezi *HTR3A*^{high} a *HTR3A*^{low} liniemi. Buňky linie CHLA-20 coby zástupce *HTR3A*^{high} linií tvoří sféry s mnohem větší frekvencí než *HTR3A*^{low} linie NBL-28 a NBL-38 (Obr. 13; Graf 10).

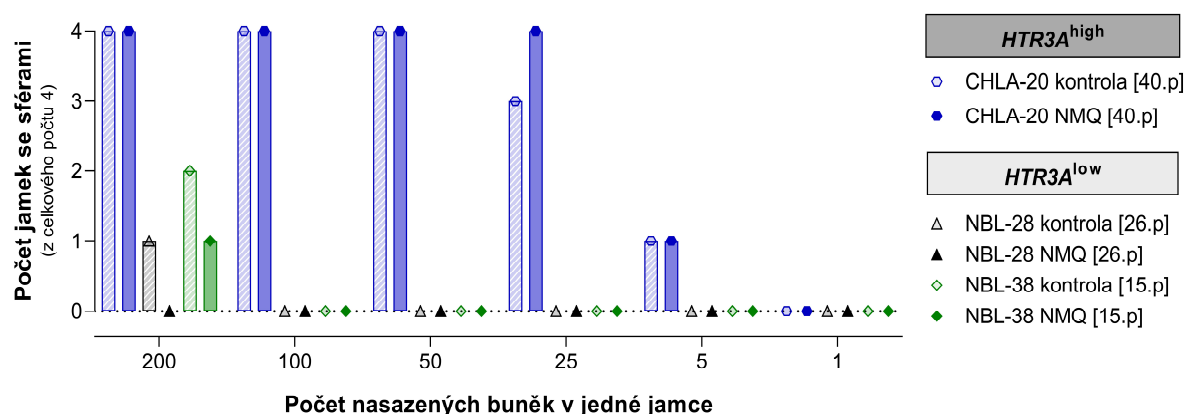
Naopak v rámci jednotlivých linií nebyl pozorován žádný výrazný rozdíl mezi buňkami ovlivněnými pětidenním působením NMQ (75 μM) před zahájením experimentu a neovlivněnou kontrolou (Graf 10). V souladu s výsledky analýz exprese markerů kmenovosti

tedy žádný zásah do kmenového potenciálu buněk při ovlivnění agonistou HTR3 nebyl pozorován.



Obrázek 13: Srovnání vybraných linií z hlediska schopnosti tvorby buněčných sfér *in vitro*.

Přítomnost sfér v jamkách byla vyhodnocována po sedmi dnech kultivace v bezsérovém médiu. Jako sféry byly počítány pouze kulovité kompaktní klonální útvary o velikosti $\geq 50 \mu\text{m}$. Na tomto obrázku toto kritérium splňuje pouze linie CHLA-20, která obecně vykazovala značně vysokou schopnost tvořit sféry, jak dokládá i spodní část obrázku s několika sférami v zorném poli (konkrétně šlo o jamku, kde bylo nasazeno celkem 100 jednotlivých buněk). Naopak u linie NBL-38 byly pozorovány pouze jednotky sfér a v případě linie NBL-28 se vytvořila sféra pouze v jediné jamce v rámci experimentů. Pro srovnání morfologie nejčastěji pozorovaných útvarů zde tedy nejsou v případě těchto dvou *HTR3A*^{low} linií zachyceny sféry, ale pouze menší klonální útvary.



Graf 10: Test tvorby buněčných sfér *in vitro* u linie CHLA-20 a NBL-38 a testování vlivu působení NMQ. Před zahájením testu byly buňky vystaveny 5dennímu působení 75 μ M NMQ ($\sim$ IC₅₀ pro *HTR3A^{high}* linie) nebo DMSO (negativní kontrola). Přítomnost sfér v jamkách byla vyhodnocována po 7 dnech kultivace. Linie CHLA-20 vykazovala schopnost tvořit sféry i v jamkách, kde bylo nasazeno pouze 5 buněk; v případě 200, 100 či 50 nasazených buněk na jamku byly přítomny sféry ve všech čtyřech vyhodnocovaných jamkách. Naopak u linie NBL-38 byly sféry pozorovány pouze při nasazení 200 buněk na jamku a linie NBL-28 vykazovala nejnižší schopnost tvorby sfér. V případě této linie totiž byla pozorována dokonce pouze jedna sféra v jediné jamce negativní kontroly při nasazení 200 buněk na jamku. Výrazný vliv NMQ na zastoupení jamek se sférami nebyl pozorován ani u jedné z testovaných linií, protože rozdíl v jedné jamce ze čtyř nelze s ohledem na pouze jeden biologický replikát považovat za vypovídající.

4.5 Umlčení exprese genu *HTR3A* pomocí metody CRISPR

Pro ověření, zda má přítomnost podjednotky *HTR3A* na povrchu buněk NB opravdu výrazný vliv na jejich fenotyp a zda odlišná odpověď *HTR3A^{high}* a *HTR3A^{low}* linií na působení agonistů tohoto receptoru je skutečně kauzální, jsem následně přistoupil k přípravě experimentálního modelu *HTR3A^{high}* linie s uměle sníženou expresí *HTR3A*. Metodou první volby byla příprava geneticky modifikované linie SH-SY5Y s úplným umlčením (knockoutem) genu *HTR3A*. Za tímto účelem byly využity ribonukleoproteinové částice Cas9-GFP/sgRNA a po lipofekci byly úspěšně transfekované buňky (vysoce pozitivní pro GFP) sortovány pomocí FACS jako 1) jednotlivé buňky do 96jamkových destiček a 2) směs buněk (dále označována jako pool) do kultivační lahve pro další kultivaci. Celkem byly využity tři sgRNA specifické pro *HTR3A* (sgHTR3A#1, sgHTR3A#2 a sgHTR3A#3) a tři kontrolní sgRNA – dvě negativní kontroly (sgNC1 a sgNC2) a jedna pozitivní kontrola cílící proti lokusu AAVS1 (sgAAVS1). Od každé varianty dle použité sgRNA z celkových 192 jednotlivě izolovaných

transfekovaných buněk se podařilo získat zhruba 15–25 klonálně rostoucích populací, což odpovídá asi 10 % viabilních buněk, jež absolvovaly transfekci a sortrování. Ostatní sortrované buňky nebyly viabilní. Některé z těchto klonů ale rostly tak pomalu, že po třech měsících kultivace a klonální expanze se podařilo získat proteinové lyzáty pouze z 95 klonů a 6 směsných (pool) linií (Tab. 5).

Tabulka 5: Získané proteinové lyzáty z jednotlivých buněčných klonů po transfekci, sortrování jednotlivých buněk a následné dlouhodobé kultivaci

	sgAAVS1	sgNC1	sgNC2	sgHTR3A#1	sgHTR3A#2	sgHTR3A#3
1	pool	pool	pool	pool	pool	pool
2	klon 5	klon 3	klon 5	klon 2	klon 1	klon 10
3	klon 20	klon 5	klon 12	klon 4	klon 8	klon 14
4	klon 8	klon 10	klon 15	klon 21	klon 2	klon 11
5	klon 23	klon 15	klon 17	klon 3	klon 5	klon 12
6	klon 10	klon 6	klon 6	klon 22	klon 13	klon 9
7	klon 11	klon 14	klon 9	klon 6	klon 18	klon 13
8	klon 18	klon 4	klon 14	klon 11	klon 3	klon 15
9	klon 19	klon 11	klon 16	klon 7	klon 9	klon 1
10	klon 15	klon 8	klon 2	klon 13	klon 10	klon 2
11	klon 21		klon 3	klon 24	klon 11	klon 3
12	klon 22		klon 13	klon 1	klon 17	klon 7
13	klon 3		klon 18	klon 17	klon 4	klon 5
14	klon 12		klon 1	klon 19	klon 7	klon 4
15	klon 17		klon 7	klon 20	klon 14	
16	klon 4		klon 8	klon 18	klon 12	
17	klon 14		klon 11	klon 12	klon 16	
18	klon 6		klon 4	klon 9		
19	klon 9		klon 19	klon 5		
20	klon 16			klon 8		
21				klon 15		

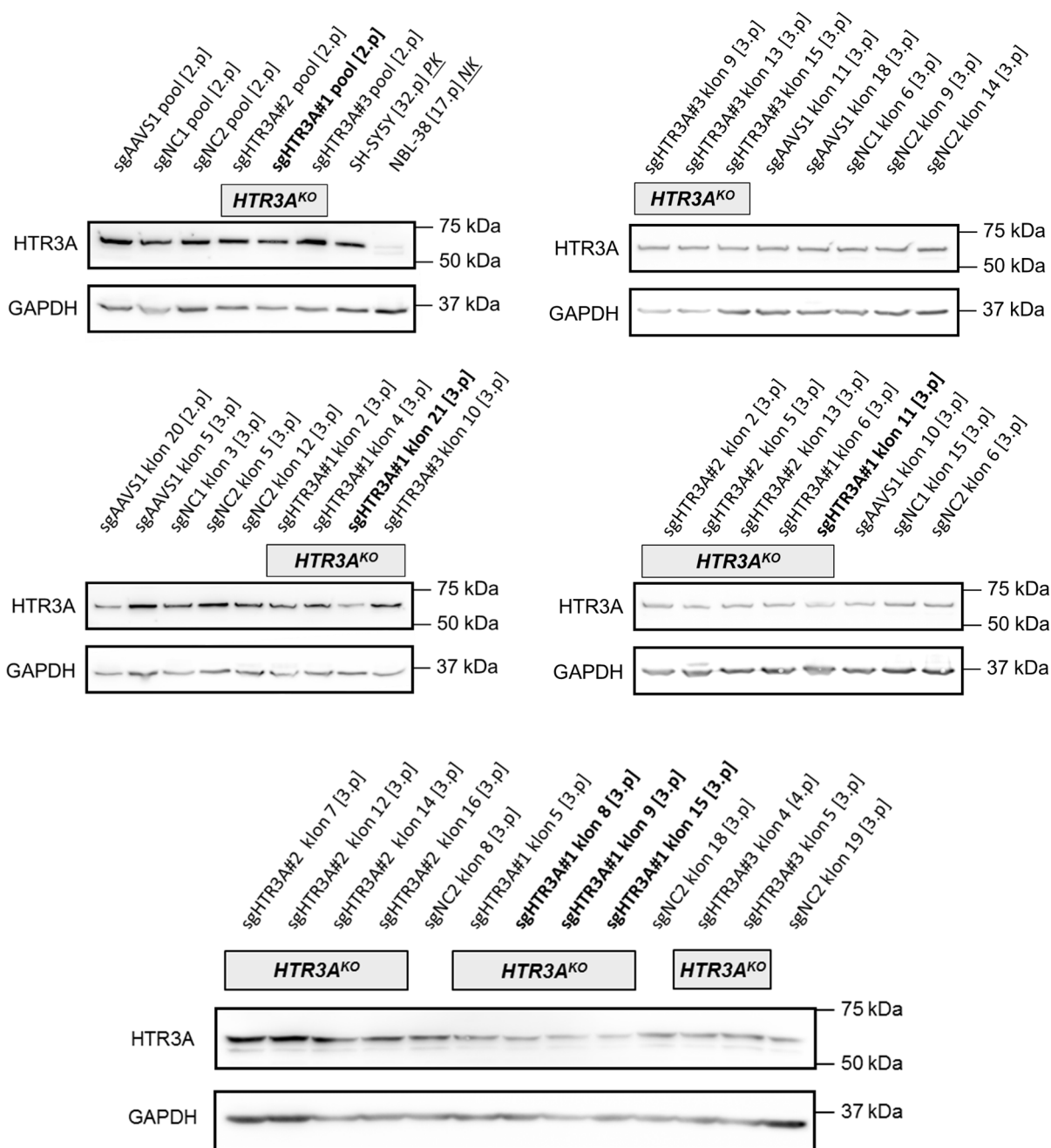
V tabulce jsou zaznamenány všechny proteinové lyzáty řazené do šesti skupin dle použité sgRNA v pořadí, v jakém byly získávány. Jedná se celkem o 95 klonů a 6 poolů, přičemž pomocí metody western blotting byla následně analyzována exprese *HTR3A* celkem u 70+6 z nich (šedé podbarvení). Tučně zvýrazněny jsou potom klony (a jeden pool), které podle výsledků analýzy vykazují oproti ostatním klonům sníženou expresi *HTR3A* (viz též Obr. 14 a Obr. 15).

Následně jsem provedl screening exprese proteinu *HTR3A* u 38 jednotlivých klonů a 6 poolů buněk s cílem ověřit úspěšnost metody a vytipovat klony, u kterých bylo dosaženo inaktivace genu *HTR3A* (Obr. 14). Bohužel se v expresi *HTR3A* ani jeden z poolů, tedy

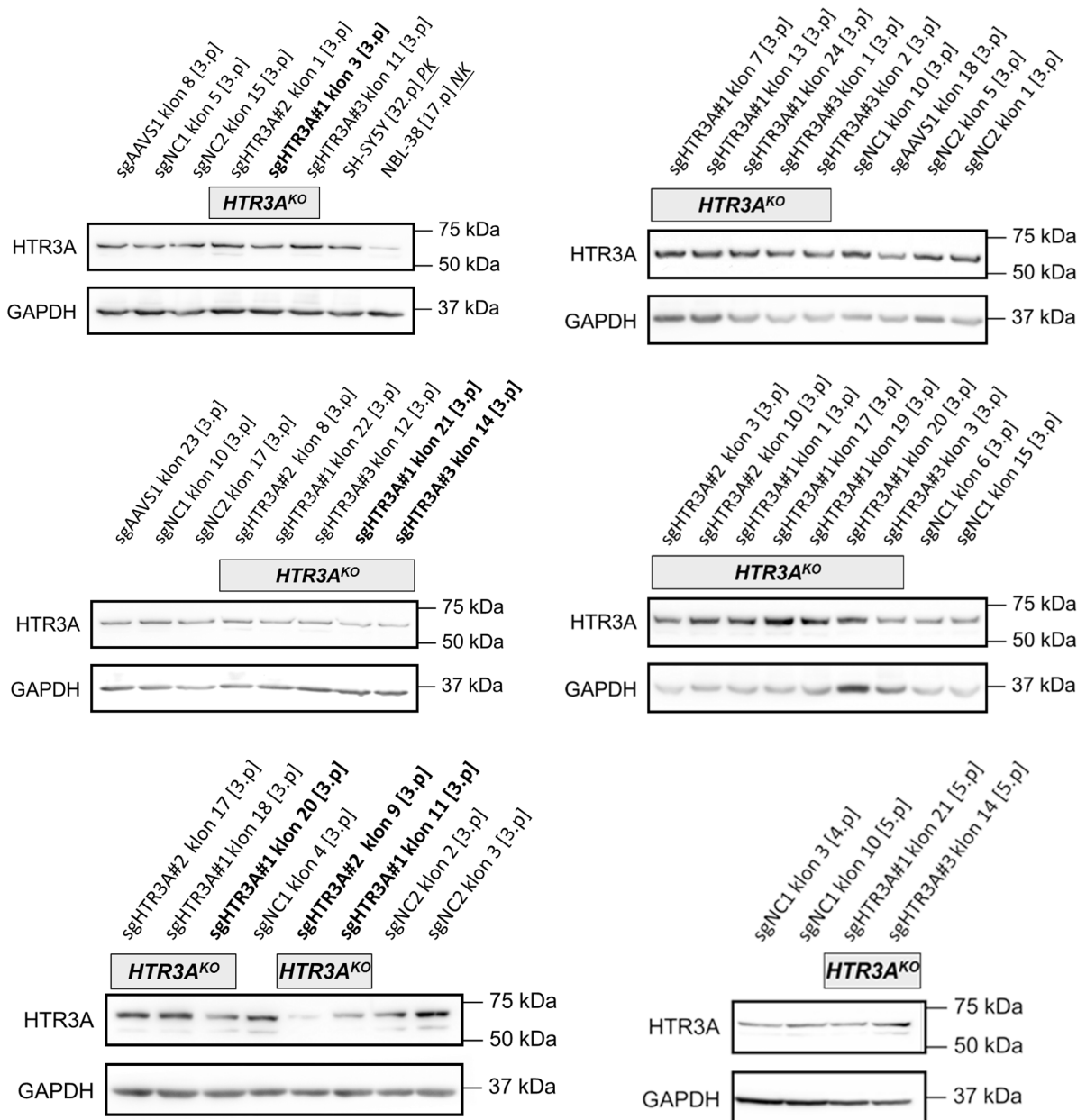
sgHTR3A#1-pool, sgHTR3A#2-pool ani sgHTR3A#3-pool, nelišil od kontrolních ani původních netransfekovaných buněk. Ačkoli tento první screening poukázal na některé konkrétní klony, u nichž byla hladina HTR3A oproti ostatním klonům o něco nižší, rozhodně není možné tyto klony označit jako úspěšně knockoutované, protože rozdíl v expresi nebyl ani zdaleka tak markantní jako je tomu v porovnání *HTR3A*^{high} linií oproti *HTR3A*^{low} liniím.

Screening jsem následně doplnil o dalších 32 klonů, jež byly v rámci konkrétních protokolů pro western blotting testovány společně s některými již dříve analyzovanými klony, které byly vytipovány jako klony vykazující nižší hladinu HTR3A a mohly by tak být využity jako model *HTR3A*^{low} buněk, jež jsou na stejném genetickém pozadí jako původní *HTR3A*^{high} linie (Obr. 15). U žádného z 32 klonů nebylo snížení exprese přesvědčivé a nižší hladina HTR3A nebyla stabilní ani v rámci dalších biologických replikátů konkrétních vytipovaných klonů. Většinou se tedy jednalo spíše o projevy biologické variability jednotlivých klonů, která je v případě několika desítek analyzovaných vzorků očekávatelná.

Závěrem lze tedy shrnout, že analýza exprese pomocí metody western blotting ukázala, že v porovnání s negativní kontrolou sgNC1 a sgNC2 nedošlo u žádného klonu ze skupiny sgHTR3A#1, sgHTR3A#2 ani sgHTR3A#3 k signifikantnímu snížení exprese proteinu HTR3A a pokus o knockout genu *HTR3A* pomocí metody CRISPR tak nebyl úspěšný. Lze pouze spekulovat o tom, zda došlo u některých klonů k editaci genu *HTR3A* alespoň v rámci jedné ze dvou alel. Pro účely validačních experimentů by však ani takové klony nebyly vhodné, protože by nebylo možné vyloučit, že skrze kompenzační mechanismy nedojde v průběhu dlouhodobé kultivace k obnově vyšší hladiny exprese HTR3A.



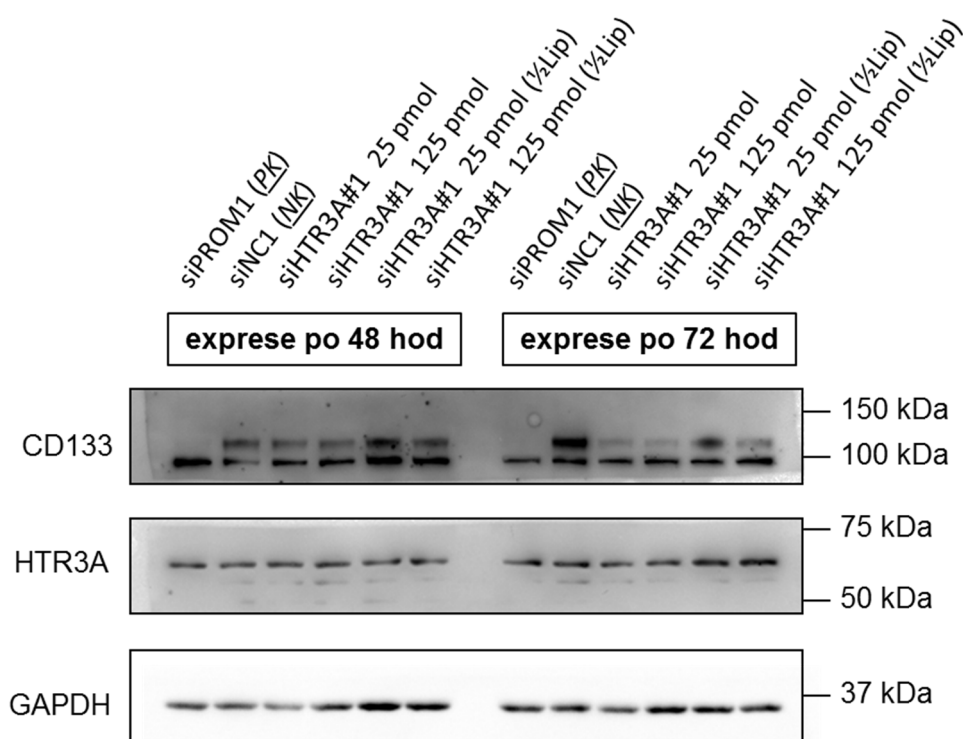
Obrázek 14: Screening exprese HTR3A u 38 jednotlivých klonů a 6 poolů odvozených z buněk linie SH-SY5Y transfekovaných příslušnými CRISPR RNP. Vzorky z buněk, u kterých byla využita sgRNA cílící na *HTR3A* a u nichž byla očekávána inaktivace tohoto genu, jsou označeny rámečkem s popiskem *HTR3A^{KO}*. Tučně zvýrazněny jsou vzorky, které oproti ostatním vykazují mírné snížení exprese HTR3A. Tyto rozdíly nicméně nelze srovnávat s rozdílem v hladině HTR3A u kontrolních netransfekovaných buněk linie SH-SY5Y (*PK*) a linie NBL-38 (*NK*). Úplný knockout genu *HTR3A* lze tedy u všech analyzovaných klonů vyloučit. Nanášecí kontrola: GAPDH.



Obrázek 15: Expres HTR3A u dalších 32 jednotlivých klonů odvozených z buněk linie SH-SY5Y transfekovaných příslušnými CRISPR RNP. Vzorky z buněk, u kterých byla využita sgRNA cílící na *HTR3A* a u nichž byla očekávána inaktivace tohoto genu, jsou označeny rámečkem s popiskem *HTR3A^{KO}*. Tučně zvýrazněny jsou vzorky, které oproti ostatním vykazují mírné snížení exprese HTR3A. Tyto rozdíly nicméně nelze srovnávat s rozdílem v hladině HTR3A u kontrolních netransfekovaných buněk linie SH-SY5Y (PK) a linie NBL-38 (NK). Jedinou výjimkou by mohl být klon 9 ze skupiny sgHTR3A#2. Vpravo dole je potom druhý biologický replikát čtyř konkrétních klonů, které byly na základě screeningu vytipovány jako klony s rozdílnou expresí HTR3A. Rozdílná exprese se ale u druhé analyzované pasáže nepotvrdila. Pozn.: Rovněž analýza dalších dvou pasáží klonu 9 ze skupiny sgHTR3A#2 snížení exprese patrné u 3. pasáže nepotvrdila. Nanášecí kontrola: GAPDH.

4.6 RNA interference

Po neúspěšném utlumení exprese *HTR3A* pomocí metody CRISPR byla zvolena další alternativa, posttranskripční umlčení exprese pomocí tří různých siRNA navržených proti transkriptu genu *HTR3A* (siHTR3A#1, siHTR3A#2 a siHTR3A#3). Bohužel ani s využitím této metody se mi při pilotní optimalizaci podmínek transfekce nepodařilo získat experimentální model se sníženou expresí proteinu zájmu (Obr. 16). Funkčnost metody přitom byla úspěšně ověřena díky zařazení pozitivní kontroly, siRNA cílící na transkript genu *PROM1* (siPROM1).



Obrázek 16: Výsledky western blottingu v rámci pokusu o posttranskripční umlčení exprese *HTR3A* pomocí siHTR3A#1 u linie SH-SY5Y. Na úrovni proteinů se nepodařilo dosáhnout snížení exprese *HTR3A* po 48, ani 72 hodinách po transfekci. Vedle optimalizace časového intervalu pro transfekci buněk bylo přitom vyzkoušeno různé množství siHTR3A#1 a také různé množství lipofekčního činidla (označení 1/2Lip odpovídá polovině množství RNAiMAX doporučeného výrobcem). Pozitivní kontrola: siPROM1 proti transkriptu genu *PROM1* (kódujícího povrchový protein CD133). Negativní kontrola: siNC1. Nanášecí kontrola: GAPDH. Pozn.: Rovněž při použití dalších dvou siRNA (siHTR3A#2 a siHTR3A#3) nepotvrdila analýza pomocí western blottingu snížení exprese *HTR3A*.

5 Diskuze

NB představuje relativně častý dětský nádor příznačný svým variabilním klinickým projevem. U některých pacientů dochází ke spontánní diferenciaci, maturaci či regresi nádoru, zatímco jiní pacienti jsou postiženi vysoce agresivní formou onemocnění s časnými metastázami, u níž je prognóza velmi nepříznivá a mortalita dosahuje stále více než 50 %, a to i přes dlouholeté úsilí vědecké komunity a zavádění nových léčebných modalit (Irwin a Park, 2015; Veselska *et al.*, 2019; Tas *et al.*, 2020). Úspěšnost léčby NB je hluboko pod průměrem ostatních diagnóz v dětské onkologii, který činí asi 80 % (Adamson, 2015). Právě neproporčně vysoká mortalita spolu s relativně vysokou mírou incidence NB (8 % všech dětských malignit, ale 15 % úmrtí v pediatrické onkologii) motivuje klinické onkology a vědce k hledání nových biomarkerů onemocnění, jež by umožnily předpovídat průběh onemocnění u konkrétního pacienta (Irwin a Park, 2015; Newman a Nuchtern, 2016). Zpřesnění stratifikace pacientů a zvýšení spolehlivosti prognózy by mohly poskytnout výzkumy ohledně buněčného původu NB a identifikace nových biomarkerů, jež by reflektovaly právě odlišnou etiologii NB u konkrétních pacientů (Jansky *et al.*, 2021; Hanemaaijer *et al.*, 2021).

Ačkoli je tkáňový původ NB jasně definován, jeho buněčný původ zůstává záhadou. Časný věk v době diagnózy a heterogenita onemocnění vedly k předpokladu, že NB vzniká v důsledku deregulace vývoje neurální lišty, respektive jejích derivátů (Mora a Gerald, 2004; Johnsen *et al.*, 2019). Není ale jasné, jaké konkrétní okamžiky během ontogeneze mohou být spojeny s procesem nádorové transformace. Hned několik recentních studií se proto zaměřilo na zkoumání NB na úrovni jednotlivých buněk a hledání souvislostí s fyziologickými vývojovými procesy v nadledvině (Dong *et al.*, 2020; Hanemaaijer *et al.*, 2021; Jansky *et al.*, 2021). Zatímco Dong *et al.* (2020) dospěli k závěru, že většina buněk NB fenotypově odpovídá ChB, podle jiných vědců jsou transkripční profily buněk NB podobné převážně neuroblastům (ve smyslu prekursorů sympatických nervových vláken) a konkrétní klinické subtypy NB lze navíc mapovat do odlišných přechodných stádií v procesu diferenciaci neuroblastů (Hanemaaijer *et al.*, 2021; Jansky *et al.*, 2021). Dle Jansky *et al.* (2021) jsou mezi NB nízkého rizika nejvíce zastoupeny buňky podobné pozdním, relativně zralým stádiím neuroblastů, vyznačujících se expresí markerů *GAP43* či *NTRK1*, zatímco u NB vysokého rizika, a zvláště v případě NB s amplifikací *MYCN*, jsou nádorové buňky podobné spíše časnějším prekursorům, například populaci bridge cells.

V návaznosti na recentní studie prenatálního vývoje dřeně nadledvin, které poukazují na možnou souvislost bridge cells s rozvojem NB, tato práce zkoumá klinický potenciál

HTR3A, jehož exprese a funkční úloha u NB dosud nebyla systematicky studována (Furlan *et al.*, 2017; Furlan a Adameyko, 2018). Nicméně už v 90. letech byl diskutován klinický význam HTRs u NB obecně, když byla poprvé prokázána přítomnost HTR3 a HTR1 na povrchu nádorových buněk, přičemž autoři spekulovali o možné souvislosti HTRs s agresivitou konkrétního nádoru (Pranzatelli a Balletti, 1992).

5.1 Exprese *HTR3A* a vybraných markerů u šesti buněčných linií NB

Východiskem pro tuto práci bylo stanovení exprese *HTR3A* u šesti buněčných linií derivovaných z NB. V rámci analyzovaného panelu byly rozdíly v expresi *HTR3A* tak významné, že umožnily jednoznačné rozdělení linií na *HTR3A*^{high} a *HTR3A*^{low} linie. V budoucnu by bylo zajímavé zaměřit se na studium exprese *HTR3A* u širšího panelu linií NB, protože se nabízí otázka, zda lze všechny linie NB jednoznačně rozdělit do diskrétních kategorií *HTR3A*^{high} a *HTR3A*^{low}. Tyto poznatky by snad více napověděly, do jaké míry souvisí exprese *HTR3A* s buněčným původem NB.

Podle nového modelu vývoje nadledvin je exprese *HTR3A* u myši omezena na diskrétní stádium v podobě bridge cells (Furlan *et al.*, 2017). Dle jiné studie ale u člověka dochází ještě v průběhu diferenciaci v ChB k dalšímu nárůstu exprese *HTR3A*, zatímco její pokles doprovází pouze diferenciaci v sympatoblasty (Dong *et al.*, 2020). Bylo by tedy ošidné na základě exprese jediného markeru hledat možný původ *HTR3A*^{high} linií pouze v bridge cells. Stádium bridge cells přitom může představovat klíčovou populaci v období kritickém pro správný vývoj nadledvin (Furlan *et al.*, 2017). S ohledem na roli 5-HT při intrauterinním vývoji obecně lze spekulovat, zda se právě v tomto stádiu díky přítomnosti HTRs na povrchu diferencujících buněk nadledviny neuplatňuje jakási zpětnovazebná smyčka v expresi 5-HT a reakci na něj, která by byla náchylná na narušení (Johnson *et al.*, 2008; Oberlander, 2012; García-González *et al.*, 2017; Lv a Liu, 2017).

V další fázi řešení své diplomové práce jsem se u NB linií zaměřil také na vztah mezi expresí *HTR3A*, expresí markerů kmenovosti a markerů charakteristických pro SCPs i ChB, abych mohl jednotlivé linie blíže charakterizovat a pokusit se nastínit, jaké fyziologické protějšky ve smyslu různých vývojových stádií adrenálních buněk mohou zkoumané linie NB reprezentovat. Tento screening naznačil, že exprese c-MYC koreluje s expresí *HTR3A*. Exprese c-MYC je přitom považována za znak vysokého kmenového potenciálu a agresivity nádorových buněk, včetně NB (Yang *et al.*, 2017; Zimmerman *et al.*, 2018; Skoda *et al.*, 2019).

Tato skutečnost nás opět přivádí k první studii zkoumající HTRs u NB, v níž byla diskutována možná souvislost agresivity nádoru a exprese HTRs (Pranzatelli a Balletti, 1992).

Pokud jde o transkripční faktor N-MYC, je patrný trend vyšší exprese N-MYC u *HTR3A*^{high} linií, přestože detekce pomocí western blottingu nebyla technicky optimální. Vysoká exprese *MYCN* je fyziologicky detekována v průběhu embryonálního vývoje například u migrujících buněk neurální lišty, ale jeho hladina je striktně regulována a během vývoje postupně klesá (Jiang *et al.*, 2011; Johnsen *et al.*, 2019; Hanemaaijer *et al.*, 2021). Lze proto spekulovat, zda není v určitém období prenatálního vývoje lokus *MYCN* náchylnější k mutaci či amplifikaci vzhledem k jeho zvýšené transkripční aktivitě v neurálních progenitorech a zda NB ze skupiny *HTR3A*^{high} linií nemohou vznikat právě v důsledku podobné iniciační události. N-MYC se podílí na udržení nediferencovaného proliferujícího stavu buněk a jeho protějškem je TrkA, kdy exprese této kinázy je naopak typická pro NB s vysokým stupněm diferenciaci a bývá spojována s regresí NB (Zhu *et al.*, 2012; Brodeur a Bagatell, 2014).

Expresí SOX10 je typická pro časnější stadia buněk v rámci vývoje neurální lišty a jejích derivátů (vč. SCPs), diferenciaci v ChB či sympatoblasty je potom spojena s plynulým poklesem exprese tohoto transkripčního faktoru (Dong *et al.*, 2020). V rámci diplomové práce se u panelu šesti linií NB bohužel nepodařilo SOX10 spolehlivě stanovit, nicméně jeho vysoká exprese byla nedávno asociována s příznivou prognózou NB (Yang *et al.*, 2020).

Velmi zajímavá je řádově vyšší exprese TH u linií CHLA-15 a CHLA-20 oproti referenční linii SH-SY5Y. Významné rozdíly v expresi TH v rámci mnou studovaného panelu linií mohou samy o sobě poukazovat na odlišný buněčný původ NB, nebo na různý stupeň diferenciaci u buněk jednotlivých linií. Expresí tohoto enzymu biosyntézy katecholaminů je u NB přitom již delší dobu známým faktem a byla zvažována také jako marker pro monitorování MRD (Wang *et al.*, 2000). Autoři studie upozorňovali na vyšší diagnostickou senzitivitu markeru na bázi sledování exprese TH než u standardně využívané detekce produkce katecholaminů. Značná variabilita v expresi TH pozorovaná mezi jednotlivými buněčnými liniemi v rámci mé diplomové práce je v souladu s výsledky autorů, kteří expresi TH zkoumali u sedmnácti linií NB (Wang *et al.*, 2000). Extrémně vysoká exprese TH u linií CHLA-15 a CHLA-20 potom nutí k zamyšlení nad jejich buněčným původem, protože TH typicky exprimují spíše diferencovanější stadia buněk v dřeni nadledvin, tedy především ChB, ale rovněž neuroblasty (Dong *et al.*, 2020). S ohledem na současnou expresi TH a HTR3A u těchto dvou linií NB by nejjednodušším vysvětlením byl původ v buňkách odvozených od bridge cells, jež už byly v rámci diferenciační dráhy blíže k fenotypu ChB, ale zatím neztratily expresi HTR3A. Samozřejmě je potřeba mít stále na paměti, že v případě nádorové transformace by

k dosažení tohoto stavu mohlo dojít i skrze částečnou dediferenciaci buněk, která je u nádorů poměrně častá (Edsjö *et al.*, 2007).

Naopak linie SH-SY5Y jako další zástupce *HTR3A*^{high} linií by mohla vycházet přímo z bridge cells. Pouze u této linie jsem totiž prokázal expresi transkripčního faktoru SOX2, jehož vysoké hladiny exprimuje právě tato buněčná populace (Furlan *et al.*, 2017). Není překvapivé, že exprese tohoto markeru kmenovosti je spojena s pokročilejším onemocněním a s vyšší tumorigenitou a nižším stupněm diferenciaci buněk NB (Yang *et al.*, 2015). Naopak lze uvažovat o tom, že všechny tři *HTR3A*^{low} linie by s ohledem na nízkou expresi *HTR3A*, TH, c-MYC a SOX2 i s ohledem na jejich morfologii mohly představovat spíše více či méně zralé sympatoblasty. Tyto linie jsou totiž charakteristické většími výběžky připomínajícími nervová vlákna, zatímco všechny tři *HTR3A*^{high} linie jsou tvořeny kompaktnějšími buňkami.

Jelikož jsem zkoumal pouze šest buněčných linií a jednotky markerů, poskytují tyto analýzy exprese pouze letmý vhled do problematiky buněčného původu NB. Do budoucna by bylo nesmírně zajímavé rozšířit studovaný panel linií NB, což by mohlo umožnit vytvoření jakési časové osy, na niž by byly umísťovány jednotlivé linie na základě modelu diferenciacní dráhy navrženého autory jedné z recentních studií (Hanemaaijer *et al.*, 2021; Jansky *et al.*, 2021). Pak by snad bylo možné i přibližně odhadnout, kdy během ontogeneze došlo k nádorové transformaci. Překážkou k dosažení tohoto cíle je nicméně skutečnost, že i každá z buněčných linií NB je sama o sobě dosti heterogenní a že buňky nádorové linie kultivované *in vitro* nemusí nutně být fenotypově shodné s původními buňkami v primárním nádoru, s ohledem na možnost spontánní diferenciaci či indukované dediferenciaci (Edsjö *et al.*, 2007; Persson *et al.*, 2017; van Groningen *et al.*, 2017; Jansky *et al.*, 2021).

K odhalení molekulární podstaty heterogenity NB přitom může významně přispět právě porovnávání expresních profilů nádorových buněk s jejich fyziologickými protějšky diskutovanými výše. Například Jansky *et al.* (2021) ukázali, že ačkoli lze mnohé NB označit za NB vycházející převážně z neuroblastů, proporce tohoto typu buněk v rámci nádorové masy není nikdy 100 %. Pomocí analýzy transkriptomu jednotlivých buněk bylo zjištěno, že linie SK-N-SH, z níž je mimochodem odvozena i linie SH-SY5Y využitá v rámci mé práce, zahrnuje nejen buňky podobné neuroblastům (35 %), ale také buněčné populace, které svým expresním profilem odpovídaly charakteristikám SCPs (30 %), bridge cells (15 %), ChB (10 %) a buněk, jež představují bezprostřední potomky bridge cells (10 %) (Jansky *et al.*, 2021).

Vedle screeningu exprese vybraných významných markerů (vč. markerů kmenovosti SOX2 a c-MYC) byly v rámci diplomové práce provedeny také funkční testy CSCs, které umožnily posoudit, zda se zastoupení CSCs v rámci heterogenní masy buněk liší mezi

jednotlivými liniemi, zejména s přihlédnutím k rozdělení na *HTR3A*^{high} a *HTR3A*^{low} linie. Přestože byly tyto experimenty provedeny pouze pro tři vybrané linie z panelu, jejich výsledky naznačují, že schopnost tvorby sfér pravděpodobně koreluje s expresí *HTR3A*. Frekvence CSCs byla totiž řádově nižší u *HTR3A*^{low} linií, což je konzistentní s nižší hladinou onkoproteinu c-MYC. Pro ověření hypotézy ohledně rozdílné kmenovosti *HTR3A*^{high} a *HTR3A*^{low} linií však bude třeba v první řadě provést obdobné testy alespoň u zbylých tří linií v rámci panelu, protože možné vysvětlení pozorovaných výsledků lze hledat i v tom, že vysoká schopnost tvořit sféry je specifická pro linii CHLA-20 jakožto polosuspenní linii.

Během dlouhodobé kultivace buněčných linií jsem také empiricky vypořádal, že *HTR3A*^{high} linie vykazovaly obecně rychlejší růst a kratší generační dobu. Tyto rozdíly bude však nutné experimentálně ověřit a současná pozorování v žádném případě neprokazují kauzální souvislost mezi expresí *HTR3A* a růstovými parametry buněk NB.

5.2 Modulace signalizace

HTR3A je nejvýznamnější podjednotkou receptoru *HTR3* zapojeného do serotonergní signalizace, jehož aktivace ligandem spouští nespočet dalších efektů v buňce zprostředkovaných vtokem Na^+ a Ca^{2+} do buňky současně s vypuštěním K^+ (Hannon a Hoyer, 2008). Modulace aktivity *HTR3A* by tedy mohla mít významný vliv například na viabilitu a růstové parametry buněk či expresi některých konkrétních markerů diferenciaci a kmenovosti. Testy MTT po několikadenním ovlivnění buněk neprokázaly žádný významný vliv samotného 5-HT na buňky a ani působení antagonistů *HTR3*, granisetronu a VUF10166, nevedlo k významným rozdílům ve viabilitě či proliferaci buněk. Pouze v případě nejvyšších koncentrací granisetronu (ve formě granisetron hydrochlorid) byl pozorován pokles viability či proliferace u linie SH-SY5Y. Lze ale spekulovat, zda tento efekt nemůže být způsoben pouhou vyšší koncentrací kyseliny chlorovodíkové v důsledku využití dané formy léčiva.

Naopak experimenty s agonisty *HTR3* naznačují, že u *HTR3A*^{high} linií způsobuje nadměrná aktivace receptoru zastavení proliferace, což ale není spojeno s cytotoxickým efektem. To dokládá několik zjištění: 1) během působení agonistů *HTR3* nebyla empiricky pozorována žádná selekce buněk ani plavající mrtvé buňky v jamkách, 2) štěpená kaspáza jakožto marker apoptózy nebyla detekována ani u buněk ovlivněných NMQ, 3) exprese markerů diferenciaci či kmenovosti zůstala nezměněna. Zpomalení či zástava proliferace je tedy nejpravděpodobnějším vysvětlením pozorovaného účinku agonistů na *HTR3A*^{high} buňky, ačkoliv v případě m-CPBG nebyly rozdíly mezi reakcí *HTR3A*^{high} a *HTR3A*^{low} linií tak výrazné.

Rozdílná odpověď *HTR3A*^{high} a *HTR3A*^{low} linií na působení agonistů HTR3 je svým způsobem očekávatelná, protože rozdílná exprese *HTR3A* by měla odpovídat rozdílnému počtu funkčních receptorů na povrchu buněk. S ohledem na fakt, že další podjednotky HTR3 nejsou schopny tvořit funkční homopentamery a jejich distribuce a exprese je tkáňově specifická (Niesler *et al.*, 2003; Niesler *et al.*, 2008; Holbrook *et al.*, 2009) je zřejmé, že úroveň exprese *HTR3A* zásadně ovlivňuje reakci na testovaná činidla.

Pozorovaný útlum proliferace po působení agonistů, zejména NMQ a SR57227, je z molekulárního pohledu poněkud překvapivý, protože u agonistů lze z podstaty jejich aktivity očekávat stejný efekt jako v případě přirozeného ligandu 5-HT, jehož hlavním efektem po navázání na HTR3 je vzrůst koncentrace vápenatých iontů v cytoplazmě (Hannon a Hoyer, 2008). Nadbytek Ca^{2+} sice může způsobit úbytek buněk díky své toxicitě po precipitaci s fosfátovými skupinami ATP (Lange *et al.*, 2019), ale tento mechanismus je v rozporu s cytostatickým účinkem agonistů HTR3, který byl pozorován u *HTR3A*^{high} linií NB v rámci této práce. Vzrůst koncentrace Ca^{2+} v cytoplazmě je navíc obecně považován za prorůstový signál spojený s průchodem buněčným cyklem (Kahl a Means, 2003; Monaco *et al.*, 2015).

Ačkoliv získané výsledky ohledně působení agonistů HTR3 na buňky NB jsou v kontextu výše uvedených poznatků nečekané, vysvětlení by bylo možné hledat ve vysoké vazebné afinitě a nefyziologické nadměrné aktivaci HTR3A, kterou tato léčiva způsobují. Lze se domnívat, že koncentrace 5-HT a agonistů, jež by vyvolaly stejnou fyziologickou odpověď, se řádově liší. Role samotného Ca^{2+} jakožto sekundárního posla je navíc nesmírně komplexní. Ca^{2+} zasahuje do širokého spektra signálních drah a následně tak nepřímo reguluje expresi řady genů, včetně mnohých transkripčních faktorů (Fujiwara *et al.*, 2016; Patergnani *et al.*, 2020). Stojí za zmínku, že přímo na sbírkové linii SH-SY5Y bylo demonstrováno, že narušení přirozené dynamiky a oscilace intracelulárního Ca^{2+} vedlo k navození klidového stavu (angl. quiescence) a vstupu do G₀ fáze buněčného cyklu (Cecchi *et al.*, 2000).

Jedno z možných vysvětlení působení Ca^{2+} poskytuje také studie zkoumající neuronální diferenciaci a růst neuritů, jejíž výsledky dokládají, že CaMK regulují prodlužování axonů a jsou schopny indukovat diferenciaci NB (Schmitt *et al.*, 2004). Detailní hodnocení diferenciaci nebylo předmětem této diplomové práce. Navíc po působení agonistů nebyl v rámci pilotních experimentů pozorován pokles vybraných markerů neurálních prekursorů. Přesto je nutné připomenout, že jednou z léčebných modalit používaných u NB vysokého rizika je právě diferenciatní terapie pomocí izotretinoinu (Dobrotkova *et al.*, 2019). Některé studie přitom naznačují, že indukce diferenciaci pomocí izotretinoinu může být zprostředkována skrze stejné efekторы, jež jsou ovlivněny signalizací přes Ca^{2+} (Biernat *et al.*, 2002).

Ačkoliv tuto hypotézu nelze opřít o žádné dosud publikované práce, jako nejpravděpodobnější příčina pozorovaného útlumu proliferace se jeví možnost narušení celkové homeostázy Ca^{2+} při dlouhodobé aktivaci HTR3 nefyziologickými hladinami ligandu, která již byla nastíněna výše. Pro otestování této hypotézy by bylo každopádně vhodné provést elektrofyzilogické měření aktivity iontových kanálů a na základě změřených toků iontů určit, jaké intracelulární hladiny Ca^{2+} jsou dosaženy po působení syntetických agonistů HTR3 ve srovnání s přirozeným ligandem.

Pro otestování, zda a jak se mění fenotyp buněk po působení agonistů, byl následně posuzován vliv pětidenního působení NMQ také na zastoupení CSCs v rámci buněčné populace a schopnost tvořit sféry. Zásah do kmenovosti buněk přitom nebyl pozorován u zástupců *HTR3A*^{high} ani *HTR3A*^{low} linií. Funkční testy CSCs tedy v souladu s výsledky analýz exprese spíše naznačují, že krátkodobá aktivace HTR3A nemá výraznější vliv na diferenciaci buněk a nesnižuje viabilitu buněk s fenotypem CSCs, což je velmi zajímavé v kontextu potlačené proliferace *HTR3A*^{high} linií detekované pomocí MTT testu.

Lze tedy shrnout, že kromě absence apoptózy nebyl prokázán žádný konkrétní dopad působení NMQ na buňky. Přestože se nepodařilo prokázat korelaci mezi poklesem proliferace a diferenciačním statutem buněk, je nicméně možné, že jsem konkrétní mechanismus působení pouze nezachytil. Z dosažených výsledků analýz exprese řady markerů po působení NMQ sice není jasný trend změny, ale bylo by potřeba tyto experimenty zopakovat s ohledem na nedostatek kvalitních opakování analýzy pomocí western blottingu. Přínosné by v tomto směru mohly být experimenty s diferenciací buněk *HTR3A*^{high} linie navozenou pomocí ATRA a následné posouzení citlivosti takto ovlivněných buněk k působení NMQ spolu s analýzou exprese *HTR3A*, protože tyto fenotypové vlastnosti by se indukcí diferenciace mohly změnit, jako je tomu ostatně v případě změn v expresi řady jiných genů (Chlapek *et al.*, 2010).

Pro ověření, že pozorované efekty v rámci experimentů s agonisty HTR3 byly způsobeny skutečně modulací HTR3A, by bylo vhodné využít testování působení kombinace antagonisty HTR3 s jeho agonistou, tedy například použití NMQ v koncentraci IC_{50} společně s různými koncentracemi granisetronu.

5.3 Pokusy o utlumení exprese *HTR3A*

Jelikož jednotlivé buněčné linie mohou nést řadu mutací, jež by mohly vysvětlit jejich odlišné chování nezávisle na serotonergní signalizaci, bylo následně třeba provést experimenty s uměle navozeným snížením exprese *HTR3A* u některé z *HTR3A*^{high} linií a ověřit tak hypotézu

ohledně souvislosti *HTR3A* s kmenovostí a tumorigenitou buněk, která vzešla z korelačních analýz. Použití metod CRISPR ani RNA interference u zvolené sbírkové linie SH-SY5Y nicméně nevedlo ke kýženým výsledkům a model *HTR3A*^{low} buněk, jež by byly na stejném genetickém pozadí jako původní *HTR3A*^{high} linie SH-SY5Y, se nepodařilo vytvořit. Přitom v případě RNA interference byla funkčnost metody ověřena zařazením pozitivní kontroly. To je samo o sobě zajímavé zjištění, které vede k řadě otázek ohledně toho, do jaké míry jsou *HTR3A*^{high} buňky závislé na expresi *HTR3A*. Některé z klonů v rámci metody CRISPR měly totiž značně omezené růstové schopnosti a jejich dlouhodobá kultivace byla neúspěšná.

Obecně mohu konstatovat, že prakticky u všech klonů jsem pozoroval zpomalený růst po transfekci a celém procesu spojeném s metodou CRISPR oproti netransfekovaným buňkám linie SH-SY5Y. V případě jednotlivých izolovaných transfekovaných buněk v rámci metody CRISPR, kterých bylo celkem 192 od každé použité sgRNA, bylo možné očekávat zisk rostoucích klonů pouze z některých z nich, protože v rámci heterogenní nádorové masy je zastoupení CSCs schopných dát vznik nové populaci obecně velmi nízké. Přesto bylo pozoruhodné všimnout si značné variability v růstových parametrech jednotlivých klonů a extrémního zpomalení růstu u některých z nich. Zatímco od některých klonů bylo možné získat lyzáty již po třech týdnech kultivace (za tři týdny tedy jedna sortrovaná buňka dala vzniknout několika milionům dceřinných buněk), u jiných klonů se podařilo získat lyzáty až po třech měsících. Konkrétně bylo následně možné analyzovat kolem 20 klonů od každé použité sgRNA – zdaleka ne v každé jamce tedy buňky přežily, což se ale týkalo i sgAAVS1, sgNC1 a sgNC2.

Výše popsaná variabilita v rychlosti růstu nicméně mohla být dána heterogenitou přítomnou u linie SH-SY5Y již před zahájením experimentu a nemusí se nutně jednat o projev rozdílné úspěšnosti knockoutu. Interindividuální i intraindividuální heterogenita je jedním z nejcharakterističtějších rysů NB a její pozorování v rámci jednotlivých CRISPR klonů odvozených od linie SH-SY5Y je v souladu s výsledky studie, která se zabývala mj. linií SK-N-SH, od níž byla tato linie odvozena (Jansky *et al.*, 2021).

S ohledem na tyto skutečnosti tedy nelze v současné chvíli s jistotou tvrdit, že k editaci genu *HTR3A* touto metodou nedošlo. Z průběhu experimentu a z dosažených výsledků však vyvozují, že metodicky je velmi problematické buňky s knockoutem *HTR3A* zkoumat, protože růstové parametry takových buněk, alespoň v případě linie SH-SY5Y, zřejmě znemožňují základní kultivační postupy. Zjištění, že všechny rostoucí klony exprimovaly *HTR3A*, pouze potvrzuje, že buňky této sbírkové linie zkrátka potřebují *HTR3A* pro aktivní proliferaci a schopnost růstu se tak u nich neslučuje s úplným vypnutím exprese *HTR3A*. Analýza

směsných (pool) linií transfekovaných buněk představuje v tomto směru ujištění, že by mi snad neměly uniknout klony se sníženou expresí HTR3A, protože i v případě heterogenity by se snížení exprese mělo na této úrovni alespoň trochu projevit.

Rovněž v případě RNA interference bylo možné si všimnout toho, že buněčná linie SH-SY5Y transfekovaná siHTR3A#1 vykazovala odlišnou dynamiku nárůstu buněčné populace než kontrolní vzorky. Ani tato metoda nevedla k zisku experimentálního modelu se sníženou expresí proteinu zájmu. Pokud jde navíc o analýzy exprese na úrovni proteinu, je možné, že v případě HTR3A se efekt umlčení pomocí siRNA nemusí z krátkodobého hlediska vůbec projevit. Lze totiž soudit, že u HTR3A jakožto podjednotky receptoru nedochází v případě aktivace ligandem k internalizaci (Hannon a Hoyer, 2008) a je proto možné, že ačkoliv množství transkriptu genu *HTR3A* bylo úspěšně sníženo, stačilo na pokrytí obratu proteinu. Přestože jsem na žádnou studii zabývající se problematikou obratu HTR3A v dostupné literatuře nenarazil, bylo by určitě přínosné zaměřit se po RNA interferenci také na zhodnocení exprese *HTR3A* na úrovni mRNA. Další možné vysvětlení neúspěchu této metody může být stejné jako v případě metody CRISPR, tedy neslučitelnost experimentálního zásahu s proliferací a metabolickou aktivitou buněk, což by se na úrovni buněčné populace projevilo nižším zastoupením buněk s úspěšným umlčením exprese *HTR3A* (zůstávajících v klidovém stavu), jehož efekt by překryly ostatní nezasažené buňky.

Neúspěšné snahy o přípravu modelu se sníženou expresí HTR3A pro následné validační experimenty tedy naznačují, že HTR3A má zřejmě důležitou úlohu v růstu buněk a jeho exprese může korelovat i s kmenovostí buněk, přičemž zůstává otázkou, zda u *HTR3A*^{low} linií nemůže mít v případě této biologické funkce zástupnou roli nějaký jiný receptor ze skupiny HTRs. To mě opět přivádí k hypotéze, že *HTR3A*^{low} NB vychází pravděpodobně z jiných buněk než *HTR3A*^{high} linie. Jistě by bylo přínosné provést screening exprese dalších podjednotek HTR3 a také dalších 13 subtypů HTRs u *HTR3A*^{low} linií. Nicméně zástupná role HTRs mimo HTR3 je nepravděpodobná, protože HTR3 je mezi všemi HTRs jediný LGIC, ostatní receptory patří mezi GPCRs (Hannon a Hoyer, 2008).

O utlumení exprese HTR3A se snažila řada výzkumníků, jejichž výsledky podporují má pozorování. U buněk kolorektálního karcinomu a karcinomu plic bylo totiž zjištěno, že tento experimentální zásah vede k útlumu proliferace, zástavě buněčného cyklu, a navíc také indukci apoptózy (Tang *et al.*, 2018; Tone *et al.*, 2020). Co se týče podmínek *in vitro*, může se závažnost zásahu, a tedy proveditelnost metody, asi lišit dle použité buněčné linie. Výsledky další studie, v níž autoři zkoumali účinek antidepressiv působících přes SERT, dokládají, že knockout *HTR3A* je proveditelný i na úrovni celého organismu (Martin *et al.*, 2017). To bylo potvrzeno

i v rámci jiné studie, která však poukázala na narušenou schopnost migrace neurálních progenitorů u kmene myši s knockoutem tohoto genu (García-González *et al.*, 2017).

5.4 Klinický potenciál *HTR3A* u NB

Tato diplomová práce si také klade za cíl nastínit možný potenciál *HTR3A* v klinické onkologii. Počáteční vyhlídky byly takové, že by se *HTR3A* možná mohl uplatnit jako nový terapeutický cíl v případě léčebných modalit na bázi indukce diferenciací. Bohužel využití agonistů *HTR3* v léčbě NB je podle mého názoru spíše nepravděpodobné, protože podle mých výsledků nemá modulace serotonergní signalizace cytotoxický účinek a pravděpodobně by tedy vedla v nejlepším případě pouze ke zpomalení progresu onemocnění, nehledě na to, že mechanismus působení agonistů zatím není vůbec jasný. Navíc by bylo nutné uvážit, jaká dávka respektive koncentrace NMQ či SR57227 je tolerovatelná v podmínkách *in vivo*, případně jak zajistit dopravení činidel pouze do nádorové tkáně.

Nicméně stojí za zmínku, že modulace serotonergní signalizace je již onkology při léčbě NB využívána, a sice v rámci zmírnění nežádoucích účinků cytostatik v podobě CINV (Schnell, 2003). Zde se konkrétně využívá antagonismu *HTR3* a nejčastěji jsou pacientům podávány granisetron, ondansetron či dolasetron (Schnell, 2003). V případě potenciálního využití agonistů je tedy třeba myslet i na možnou interferenci s těmito léky a potenciální vzájemné vyrušení účinků. Nabízí se ale také otázka, zda léčba CINV samotná nebo například užívání antidepresiv působících přes serotonergní systém nemůže mít vliv na progresi NB, ať už pozitivní nebo negativní, nebo zda nemůže ovlivnit úspěšnost léčby. V tomto směru by mohly být přínosné průběžné dlouhodobé studie u pacientů s NB.

Terapeutický potenciál *HTR3A* tedy sice nebude nikterak významný, ale jinak je tomu v případě potenciálu diagnostického respektive prognostického, protože na základě provedených korelačních analýz a neúspěšných pokusů o utlumení exprese *HTR3A* jsem přesvědčen o tom, že exprese *HTR3A* by se mohla ukázat jako citlivý prognostický biomarker a mohla by tak v budoucnu doplnit sadu kritérií používaných v rámci klasifikačního systému INRGSS a zlepšit stratifikaci pacientů do jednotlivých skupin rizika. Nicméně pro ověření tohoto potenciálu *HTR3A* bude nutné rozšířit panel studovaných linií NB a především se zaměřit na izolaci RNA přímo z biotických vzorků NB. Na základě pozorované variability v expresi *HTR3A* snad poté bude možné validovat rozdělení na *HTR3A*^{high} a *HTR3A*^{low} linie a stanovit jejich četnost mezi všemi pacienty s NB a dále například pouze mezi skupinou

pacientů s NB vysokého rizika apod. Není vyloučené, že budoucí výzkumy ukáží, že je exprese *HTR3A* podobně významným prognostickým faktorem jako amplifikace *MYCN*.

Hlavní přínos výzkumu *HTR3A* nicméně vidím v rozkrývání buněčného původu NB, protože spolu s dalšími markery by analýzy exprese *HTR3A* mohly pomoci objasnit, kdy během ontogeneze může potenciálně dojít k nádorové transformaci. Výzkumy tohoto typu však komplikuje skutečnost, že ohledně některých aspektů vývoje nadledvin nepanuje ve vědecké komunitě shoda. Zastánci klasického modelu vývoje nadledvin předpokládají existenci společné sympatoadrenální linie, jež poté segreguje v sympatoblasty a ChB, kdy ventrálnější subpopulace buněk formuje dřeň nadledvin a dorzálnější subpopulace se sbíhá v sympatická paraspinální ganglia (Mora a Gerald, 2004; Jiang *et al.*, 2011). Podle nového modelu vývoje nadledvin dochází k segregaci buněk o něco dříve a buňky nadledvin tak vznikají převážně ze SCPs přes stádium bridge cells a s neurony v gangliích mají vzdálenějšího společného předka v časnějších fázích ontogeneze (Furlan *et al.*, 2017). Oba modely se tedy liší především v načasování událostí a také předpokládanou oblastí, kde dochází k segregaci dvou linií.

I v případě nového modelu je však třeba počítat v úvahách s možnou komunikací dřeně nadledvin s neurony či neuroblasty v okolních sympatických gangliích a je také třeba vzít v úvahu faktory přítomné ve fetální kůře nadledvin. Ta bezesporu může mít vliv na vývoj dřeně nadledvin, jelikož neurální progenitory právě skrz vrstvu kůry migrují (Crowder, 1957). Také nesmíme zapomínat na jeden z faktorů v rámci klasifikačního systému INRGSS, kterým je zastoupení stromatu ze Schwannových buněk v bioptickém vzorku, jež by mohlo mít souvislost s populací SCPs (Irwin a Park, 2015; Hanemaaijer *et al.*, 2021). Samotná přítomnost stromatu by přitom nemusela přímo znamenat původ NB v SCPs, ale spíše poukazuje na důležitost nádorového mikroprostředí, jehož odlišnosti se projevují na úrovni klinických charakteristik nádoru. Slovy klasiků výzkumu na poli nádorové biologie: „Nádorové buňky nevyvolávají nemoc samy, ale svádějí a korumpují ostatní buňky ve svém okolí, aby se postavily mimo zákon buněčné společnosti.“ (Hanahan a Coussens, 2012).

Bohužel tedy nemohu zaujmout jasnější stanovisko k hypotéze, zda deregulace bridge cells může představovat jednu z příčin vzniku NB. Mohu pouze konstatovat, že linie SH-SY5Y coby zástupce *HTR3A*^{high} linií je dobrým kandidátem NB vycházejícího právě z této populace. Najevo totiž nevyšly žádné skutečnosti, jež by odporovaly této hypotéze. V případě linie CHLA-15 a CHLA-20 je původ v bridge cells již méně pravděpodobný a všechny zkoumané *HTR3A*^{low} linie z tohoto pohledu reprezentují pravděpodobně spíše NB s fenotypem neuroblastů.

6 Souhrn

Tato práce s názvem *Úloha serotoninových receptorů a jimi zprostředkované signalizace u neuroblastomu* se zaměřuje na význam HTR3A v patogenezi NB, který je nejčastějším dětským extrakraniálním solidním nádorem se značně variabilním klinickým průběhem. NB nejčastěji vychází z oblasti dřeně nadledvin, jež představují derivát neurální lišty. Podle posledních výzkumů mají agresivní NB vyšší zastoupení buněk, které fenotypem připomínají přechodnou populaci buněk nadledvin, tzv. bridge cells. Ta je přitom charakteristická expresí *HTR3A*, jejíž funkční role u NB dosud nebyla systematicky prozkoumána.

Cílem předkládané práce bylo stanovit expresi *HTR3A* v rámci panelu šesti buněčných linií NB a posoudit možnosti modulace serotoninergní signalizace z hlediska vlivu na viabilitu a fenotyp buněk NB. Součástí práce byly také pokusy o experimentální utlumení exprese *HTR3A*. Na základě provedené analýzy exprese *HTR3A* na úrovni mRNA i proteinu bylo možné rozdělit buněčné linie do dvou diskrétních skupin označených *HTR3A*^{high} a *HTR3A*^{low}, přičemž vysoká exprese *HTR3A* byla navíc asociována s vysokou expresí onkoproteinu c-MYC. Buněčné linie ze skupiny *HTR3A*^{high} také na rozdíl od *HTR3A*^{low} linií reagovaly na působení agonistů HTR3. To u těchto linií vedlo k potlačení růstových parametrů u testované buněčné populace. Další experimenty, při nichž nebyl prokázán vliv této intervence na diferenciaci a kmenovost buněk ani indukci apoptózy, vedly k závěru, že nejpravděpodobnějším efektem působení agonistů HTR3 na buňky *HTR3A*^{high} linií je zpomalení či zastavení proliferace. Pokusy o přípravu experimentálního modelu s uměle sníženou expresí *HTR3A* metodami CRISPR a RNA interference bohužel nebyly úspěšné a dokládají tak důležitost této podjednotky receptoru u buněk *HTR3A*^{high} linií, jejichž růstové schopnosti byly tímto experimentálním zásahem značně negativně ovlivněny, což znemožňovalo další kultivační postupy.

Výsledky této práce poukázaly na pravděpodobně odlišný původ jednotlivých studovaných buněčných linií NB a naznačují, že agresivnější fenotyp je charakteristický pro *HTR3A*^{high} linie, které by tak mohly fenotypem odpovídat populaci bridge cells. Na základě dosažených výsledků lze shrnout, že výzkum *HTR3A* má potenciál zejména z hlediska zpřesňování prognózy pacientů s NB a jsem také přesvědčen o tom, že studium *HTR3A* spolu s dalšími markery může pomoci odhalit buněčný původ NB a význam serotoninergní signalizace pro regulaci fyziologického vývoje nadledvin.

7 Summary

This thesis, *The role of serotonin receptors and the serotonin receptor-mediated signaling in neuroblastoma*, deals with the role of *HTR3A* in the pathogenesis of neuroblastoma (NB), a common pediatric extracranial solid tumor with a highly variable clinical course. The majority of NB arises from the adrenal medulla, which represents a derivative of the neural crest. According to recent studies, aggressive NBs have a higher proportion of cells that phenotypically resemble a transient population of cells in adrenal glands, the so-called bridge cells. These cells are characterized by the expression of *HTR3A*. However, a functional role of *HTR3A* in NB has not been systematically investigated.

The aim of this thesis was to determine the expression of *HTR3A* within a panel of six NB cell lines and to assess the potential of modulating serotonergic signaling in terms of its effect on the viability and phenotype of NB cells. Approaches to experimentally silence the *HTR3A* expression were also part of the thesis. Based on the analysis of *HTR3A* expression at both mRNA and protein levels, it was possible to categorize the cell lines into two distinct groups: *HTR3A*^{high} and *HTR3A*^{low}. Importantly, high *HTR3A* expression was associated with elevated expression of the c-MYC oncoprotein. Unlike *HTR3A*^{low} cells, *HTR3A*^{high} cells were also sensitive to the treatment with HTR3 agonists, which resulted in the suppression of growth parameters in the tested *HTR3A*^{high} cell lines. Further experiments did not show any effects of this intervention on cell differentiation and stemness or induction of apoptosis, which suggests that the effect of HTR3 agonists in the *HTR3A*^{high} cell lines was most likely caused by their inhibitory activity on cell proliferation. Unfortunately, the attempts to create an experimental model with artificially silenced *HTR3A* expression by CRISPR and RNA interference methods were not successful. These experimental interventions severely affected the growth ability of *HTR3A*^{high} cell lines, making their *in vitro* cultivation impossible, which further highlights the importance of *HTR3A* in *HTR3A*^{high} NB cells.

The results of this thesis pointed to the likely different origin of the studied NB cell lines and suggest that *HTR3A*^{high} lines are associated with a more aggressive phenotype and could therefore phenotypically correspond to the bridge cell population. Overall, this thesis indicates that *HTR3A* research has a potential to provide new prognostic tools for NB patients. Future studies focusing on *HTR3A*, together with other markers, may contribute to unraveling the cellular origin of NB and elucidate the importance of serotonergic signaling in the regulation of physiological development of the adrenal glands.

8 Literatura

- Adameyko I, Lallemand F, Aquino JB, Pereira JA, Topilko P, Müller T, Fritz N, Beljajeva A, Mochii M, Liste I, Usoskin D, Suter U, Birchmeier C, Ernfors P.** 2009. Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. *Cell* 139: 366–379.
- Adameyko I, Lallemand F, Furlan A, Zinin N, Aranda S, Kitambi SS, Blanchard A, Favaro R, Nicolis S, Lübke M, Müller T, Birchmeier C, Suter U, Zaitoun I, Takahashi Y, Ernfors P.** 2012. Sox2 and Mitf cross-regulatory interactions consolidate progenitor and melanocyte lineages in the cranial neural crest. *Development* 139: 397–410.
- Adamson PC.** 2015. Improving the outcome for children with cancer: Development of targeted new agents. *CA Cancer J Clin* 65(3): 212–220. doi:10.3322/caac.21273.
- Almstedt E, Elgendy R, Hekmati N, Rosén E, Wärn C, Olsen TK, Dyberg C, Doroszkowski M, Larsson I, Sundström A, Henriksson MA, Pålman S, Bexell D, Vanlandewijck M, Kogner P, Jörnsten R, Krona C, Nelander S.** 2020. Integrative discovery of treatments for high-risk neuroblastoma. *Nat Commun* 11: 71. doi:10.1038/s41467-019-13817-8.
- Ambros PF, Ambros IM, Brodeur GM, Haber M, Khan J, Nakagawara A, Schleiermacher G, Speleman F, Spitz R, London WB, Cohn SL, Pearson ADJ, Maris JM.** 2009. International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: Report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee. *Br J Cancer* 100(9): 1471–1482.
- Barnes NM, Sharp T.** 1999. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38: 1083–1152.
- Battle E, Clevers H.** 2017. Cancer stem cells revisited. *Nat Med* 23(10): 1124–1134.
- Berger M, Gray JA, Roth BL.** 2009. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med* 60: 355–366.
- Biernat J, Wu YZ, Timm T, Zheng-Fischhöfer Q, Mandelkow E, Meijer L, Mandelkow EM.** 2002. Protein kinase MARK/PAR-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity. *Mol Biol Cell* 13: 4013–4028.
- Bluhm EC, Daniels J, Pollock BH, Olshan AF.** 2006. Maternal use of recreational drugs and neuroblastoma in offspring: a report from the Children's Oncology Group (United States). *Cancer Causes Control* 17: 663–669.
- Boess FG, Beroukhi R, Martin IL.** 1995. Ultrastructure of the 5-hydroxytryptamine₃ receptor. *J Neurochem* 64: 1401–1405.
- Boyd GW, Low P, Dunlop JL, Robertson LA, Vardy A, Lambert JJ, Peters JA, Connolly ChN.** 2002. Assembly and cell surface expression of homomeric and heteromeric 5-HT₃ receptors: The role of oligomerization and chaperone proteins. *Mol Cell Neurosci* 21: 38–50.
- Boyer EW, Shannon M.** 2005. The serotonin syndrome. *New Engl J Med* 352(11): 1112–1120.
- Brisse HJ, McCarville MB, Granata C, Krug KB, Wootton-Gorges SL, Kanegawa K, Giammarile F, Schmidt M, Shulkin BL, Matthay KK, Lewington VJ, Sarnacki S, Hero B, Kaneko M, London WB, Pearson ADJ, Cohn SL, Monclair T.** 2011. Guidelines for imaging and staging of neuroblastic tumors: consensus report from the International Neuroblastoma Risk Group Project. *Radiology* 261(1): 243–257.
- Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg F.** 1993. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* 11(8): 1466–1477.

- Brodeur GM.** 2003. Neuroblastoma: Biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 3: 203–216.
- Brodeur GM, Minturn JE, Ho R, Simpson AM, Iyer R, Varela CR, Light JE, Kolla V, Evans AE.** 2009. Trk receptor expression and inhibitoins in neuroblastomas. *Clin Cancer Res* 15(10): 3244–3250.
- Brodeur GM, Bagatell R.** 2014. Mechanisms of neuroblastoma regression. *Nat Rev Clin Oncol* 11(12): 704–713. doi:10.1038/nrclinonc.2014.168.
- Brooks JD.** 2012. Translational genomics: The challenge of developing cancer biomarkers. *Genome Res* 22: 183–187.
- Cecchi C, Liguri G, Pieri A, Degl'Innocenti D, Nediani Ch, Fiorillo C, Nassi P, Ramponi G.** 2000. Interaction between acylphosphatase and SERCA in SH-SY5Y cells. *Mol Cell Biochem* 211: 95–102.
- Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, Faldum A, Hero B, Iehara T., Machin D, Mosseri V, Simon T, Garaventa A, Castel V, Matthay KK.** 2009. The international neuroblastoma risk group (INRG) classification system: an INRG task force report. *J Clin Oncol* 27(2): 289–297.
- Cowen DS.** 2007. Serotonin and neuronal growth factors – a convergence of signaling pathways. *J Neurochem* 101: 1161–1171.
- Crowder RE.** 1957. The development of the adrenal gland in man, with special reference to origin and ultimate location of cell types and evidence in favor of the "cell migration" theory. *Contrib Embryol* 36: 193–210.
- Davies PA, Pistis M, Hanna MC, Peters JA, Lambert JJ, Hales TG, Kirkness EF.** 1999. The 5-HT_{3B} subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature* 397: 359–363.
- De Bernardi B, Quaglietta L, Haupt R, Castellano A, Tirtei E, Luksch R, Mastrangelo S, Viscardi E, Indolfi P, Cellini M, Tamburini A, Erminio G, Gandolfo C, Sorrentino S, Vetrella S, Gigliotti AR.** 2014. Neuroblastoma with symptomatic epidural compression in the infant: the AIEOP experience. *Pediatr Blood Cancer* 61 (8): 1369–1375.
- de Castro DG, Clarke PA, Al-Lazikani B, Workman P.** 2013. Personalized cancer medicine: Molecular diagnostics, predictive biomarkers, and drug resistance. *Clin Pharmacol Ther* 93(3): 252–259.
- Demaria M, O'Leary MN, Chang JH, Shao L, Liu S, Alimirah F, Koenig K, Le C, Mitin N, Deal AM, Alston S, Academia EC, Kilmarx S, Valdovinos A, Wang B, de Bruin A, Kennedy BK, Melov S, Zhou D, Sharpless NE, Muss H, Campisi J.** 2016. Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse. *Cancer Discov* 7: 165–176.
- Depuydt P, Koster J, Boeva V, Hocking TD, Speleman F, Schleiermacher G, De Preter K.** 2018. Data Descriptor: Meta-mining of copy number profiles of high-risk neuroblastoma tumors. *Scientific Data* 5: 180240. doi:10.1038/sdata.2018.240.
- Dobrotkova V, Chlapek P, Jezova M, Adamkova K, Mazanek P, Sterba J, Veselska R.** 2019. Prediction of neuroblastoma cell response to treatment with natural or synthetic retinoids using selected protein biomarkers. *PLoS One* 14(6): e0218269.
- Dong R, Yang R, Zhan Y, Lai HD, Ye ChJ, Yao XY, Luo WQ, Cheng XM, Miao JJ, Wang JF, Liu BH, Liu XQ, Xie LL, Li Y, Zhang M, Chen L, Song WC, Qian W, Gao WQ, Tang YH, Shen CY, Jiang W, Chen G, Yao W, Dong KR, Xiao XM, Zheng S, Li K, Wang J.** 2020. Single-cell characterization of malignant phenotypes and developmental trajectories of adrenal neuroblastoma. *Cancer Cell* 38: 716–733. doi:10.1016/j.ccell.2020.08.014.
- Dubin AE, Huvar R, D'Andrea MR, Pyati J, Zhu JY, Joy KC, Wilson SJ, Galindo JE, Glass ChA, Luo L, Jackson MR, Lovenberg TW, Erlander MG.** 1999. The pharmacological and

- functional characteristics of the serotonin 5-HT_{3A} receptor are specifically modified by a 5-HT_{3B} receptor subunit. *J Biol Chem* 274(43): 30799–30810.
- DuBois SG, Marachelian A, Fox E, Kudgus RA, Reid JM, Groshen S, Malvar J, Bagatell R, Wagner L, Maris JM, Hawkins R, Courtier J, Lai H, Goodarzian F, Shimada H, Czarnecki S, Tsao-Wei D, Matthay KK, Mossé YP.** 2016. Phase I study of Aurora A kinase inhibitor alisertib in combination with irinotecan and temozolomide for patients with relapsed or refractory neuroblastoma: A NANT (New Approaches to Neuroblastoma Therapy) Trial. *J Clin Oncol* 34(12): 1368–1375.
- Dukat M, Abdel-Rahman AA, Ismaiel AM, Ingher S, Teitler M, Gyermek L, Glennon RA.** 1996. Structure-activity relationships for the binding of arylpiperazines and arylbiguanides at 5-HT₃ serotonin receptors. *J Med Chem* 39: 4017–4026.
- Dyachuk V, Furlan A, Shahidi MK, Giovenco M, Kaukua N, Konstantinidou Ch, Pachnis V, Memic F, Marklund U, Müller T, Birchmeier C, Fried K, Ernfors P, Adameyko I.** 2014. Parasympathetic neurons originate from nerve-associated peripheral glial progenitors. *Science* 345(6192): 82–87.
- Dzieran J, Garcia AR, Westermarck UK, Henley AB, Sánchez EE, Träger C, Johansson HJ, Lehtiö J, Arsenian-Henriksson M.** 2018. MYCN-amplified neuroblastoma maintains an aggressive and undifferentiated phenotype by deregulation of estrogen and NGF signaling. *Proc Natl Acad Sci* 115(6): E1229–1238. doi:10.1073/pnas.1710901115.
- Edsjö A, Holmquist L, Pålman S.** 2007. Neuroblastoma as an experimental model for neuronal differentiation and hypoxia-induced tumor cell dedifferentiation. *Semin Cancer Biol* 17: 248–256.
- El-Merahbi R, Löffler M, Mayer A, Sumara G.** 2015. The roles of peripheral serotonin in metabolic homeostasis. *FEBS Lett* 589: 1728–1734.
- Elzembely MM, Dahlberg AE, Pinto N, Leger KJ, Chow EJ, Park JR, Carpenter PA, Baker KS.** 2018. Late effects in high-risk neuroblastoma survivors treated with high-dose chemotherapy and stem cell rescue. *Pediatr Blood Cancer* 66(1): e27421. doi:10.1002/pbc.27421.
- Farrelly LA, Thompson RE, Zhao S, Lepack AE, Lyu Y, Bhanu NV, Zhang B, Loh Y-HE, Ramakrishnan A, Vadodaria KC, Heard KJ, Erikson G, Nakadai T, Bastle RM, Lukasak BJ, Zebroski III H, Alenina N, Bader M, Berton O, Roeder RG, Molina H, Gage FH, Shen L, Garcia BA, Li H, Muir TW, Maze I.** 2019. Histone seserotonylation is a permissive modification that enhances TFIID binding to H3K4me3. *Nature* 567: 535–564.
- Federico SM, Brady SL, Pappo A, Wu J, Mao S, McPherson VJ, Young A, Furman WL, Kaufman R, Kaste S.** 2015. The role of chest computed tomography (CT) as a surveillance tool in children with high-risk neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 62: 976–981.
- Foretová L., Svoboda M, Slabý O.** Molekulární genetika v onkologii. Praha: Mladá fronta. Aeskulap. ISBN: 978-80-204-3236-0.
- Fujiwara Y, Kawaguchi Y, Fujimoto T, Kanayama N, Magari M, Tokumitsu H.** 2016. Differential AMP-activated protein kinase (AMPK) recognition mechanism of Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase kinase isoforms. *J Biol Chem* 291(26): 13802–13808.
- Furlan A, Dyachuk V, Kastri ME, Calvo-Enrique L, Abdo H, Hadjab S, Chontorotzea T, Akkuratova N, Usoskin D, Kamenev D, Petersen J, Sunadome K, Memic F, Marklund U, Fried K, Topilko P, Lallemand F, Kharchenko PV, Ernfors P, Adameyko I.** 2017. Multipotent peripheral glial cells generate neuroendocrine cells of the adrenal medulla. *Science* 357(6346): eaal3753. doi:10.1126/science.aal3753.
- Furlan A, Adameyko I.** 2018. Schwann cell precursor: a neural crest cell in disguise? *Dev Biol* 444: S25–S35.

- Gaddum JH, Picarelli ZP.** 1957. Two kinds of tryptamine receptor. *Brit J Pharmacol* 12: 323–328.
- García-González D, Khodosevich K, Watanabe Y, Rollenhagen A, Lübke JHR, Monyer H.** 2017. Serotonergic projections govern postnatal neuroblast migration. *Neuron* 94(3): 534–579.e9.
- Gellynck E, Heyninck K, Andressen KW, Haegeman G, Levy FO, Vanhoenacker P, Van Craenenbroeck K.** 2013. The serotonin 5-HT₇ receptors: two decades of research. *Exp Brain Res* 230(4): 555–568.
- Gill CH, Peters JA, Lambert J.** 1995. An electrophysiological investigation of the properties of a murine recombinant 5-HT₃ receptor stably expressed in HEK 293 cells. *Brit J Pharmacol* 114: 1211–1221.
- Gualano MR, Bert F, Mannocci A, La Torre G, Zeppego P, Siliquini R.** 2014. Consumption of antidepressants in Italy: Recent trends and their significance for public health. *Psychiatr Serv* 65(10): 1226–1231.
- Guilluy Ch, Rolli-Derkinderen M, Tharaux P-L, Melino G, Pacaud P, Loirand G.** 2007. Transglutaminase-dependent RhoA activation and depletion by serotonin in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 282(5): 2918–2928.
- Hall BK.** 2000. The neural crest as a fourth germ layer and vertebrates as quadroblastic not triploblastic. *Evol Dev* 2(1): 3–5.
- Hanahan D, Coussens LM.** 2012. Accessories to the crime: Functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 21: 309–322. doi:10.1016/j.ccr.2012.02.022.
- Hanemaaijer ES, Margaritis T, Sanders K, Bos FL, Candelli T, Al-Saati H, van Noesel MM, Meyer-Wentrup FAG, van de Wetering M, Holstege FCP, Clevers H.** 2021. Single-cell atlas of developing murine adrenal gland reveals relation of Schwann cell precursor signature to neuroblastoma phenotype. *Proc Natl Acad Sci* 118(5): e2022350118. doi:10.1073/pnas.2022350118.
- Hannon J, Hoyer D.** 2008. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res* 195: 198–213.
- Hoffman JM, Tyler K, Maceachern SJ, Balemba OB, Johnson AC, Brooks EM, Zhao H, Swain GM, Moses PL, Galligan JJ, Sharkey KA, Greenwood-Van Meerveld B, Mawe GM.** 2012. Activation of colonic mucosal 5-HT₄ receptors accelerates propulsive motility and inhibits visceral hypersensitivity. *Gastroenterology* 142: 844–854.
- Holbrook JD, Gill CH, Zebda N, Spencer JP, Leyland R, Rance KH, Trinh H, Balmer G, Kelly FM, Yusaf SP, Courtenay N, Luck J, Rhodes A, Modha S, Moore SE, Sanger GJ, Gunthorpe MJ.** 2009. Characterisation of 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D} and 5-HT_{3E} receptor subunits: evolution, distribution and function. *J Neurochem* 108: 384–396.
- Chen B, Ding P, Hua Z, Qin X, Li Z.** 2021. Analysis and identification of novel biomarkers involved in neuroblastoma via integrated bioinformatics. *Invest New Drug* 39: 52–65.
- Chlapek P, Redova M, Zitterbart K, Hermanova M, Sterba J, Veselska R.** 2010. Enhancement of ATRA-induced differentiation of neuroblastoma cells with LOX/COX inhibitors: an expression profiling study. *J Exp Clin Oncol* 29: 45. doi:10.1186/1756-9966-29-45.
- Irwin MS, Park JR.** 2015. Neuroblastoma paradigm for precision medicine. *Pediatr Clin N Am* 62: 225–256.
- Iyer R, Wehrmann L, Golden RL, Naraparaju K, Croucher JL, MacFarland SP, Guan P, Kolla V, Wei G, Cam N, Li G, Hornby Z, Brodeur GM.** 2016. Entrectinib is a potent inhibitor of Trk-driven neuroblastomas in a xenograft mouse model. *Cancer Lett* 372: 179–186.
- Jansky S, Sharma AK, Körber V, Quintero A, Toprak UH, Wecht EM, Gartlgruber M, Greco A, Chomsky E, Grünwald THG, Henrich KO, Tanay A, Herrmann C, Höfer T,**

- Westermann F.** 2021. Single-cell transcriptomic analyses provide insights into the developmental origins of neuroblastoma. *Nat Genet* 53: 683–693. doi:10.1038/s41588-021-00806-1.
- Jenkins TA, Nquyea JCD, Polglaze KE, Bertrand PP.** 2016. Influence of tryptophan and serotonin on mood and cognition with a possible role of the gut-brain axis. *Nutrients* 8: 56. doi:10.3390/nu8010056.
- Jiang M, Stanke J, Lahti JM.** 2011. The connections between neural crest development and neuroblastoma. *Curr Top Dev Biol* 94: 77–127.
- Johnsen JI, Dyberg C, Wickström M.** 2019. Neuroblastoma – a neural crest derived embryonal malignancy. *Front Mol Neurosci* 12: 9. doi:10.3389/fnmol.2019.00009.
- Johnson KJ, Puumala SE, Soler JT, Spector LG.** 2008. Perinatal characteristics and risk of neuroblastoma. *Int J Cancer* 123: 1166–1172.
- Jones RH, Holtmann G, Rodrigo L, Ehsanullah RSB, Crompton PM, Jacques LA, Mills JG.** 1999. Alosetron relieves pain and improves bowel function compared with mebeverine in female nonconstipated irritable bowel syndrome patients. *Aliment Pharm Ther* 13: 1419–1427.
- Kahl ChR, Means AR.** 2003. Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. *Endocr Rev* 24(6): 719–736. doi:10.1210/er.2003-0008.
- Karnovsky AM, Gotow LF, McKinley DD, Piechan JL, Ruble CL, Mills CJ, Schellin KAB, Slightom JL, Fitzgerald LR, Benjamin CW, Roberds SL.** 2003. A cluster of novel serotonin receptor 3-like genes on human chromosome 3. *Gene* 319: 137–148.
- Kelleher CM, Smithson L, Nguyen LL, Casadiego G, Nasr A, Irwin MS, Gerstle JT.** 2013. Clinical outcomes in children with adrenal neuroblastoma undergoing open versus laparoscopic adrenalectomy. *J Pediatr Surg* 48: 1727–1732.
- Kholodenko IV, Kalinovskiy DV, Doronin II, Deyev SM, Kholodenko RV.** 2018. Neuroblastoma origin and therapeutic targets for immunotherapy. *J Immunol Res* 2018: 7394268. doi:10.1155/2018/7394268.
- Kim KJ, Jeun SH, Sung K-W.** 2017. Lamotrigine, an antiepileptic drug, inhibits 5-HT₃ receptor currents in NCB-20 neuroblastoma cells. *Korean J Physiol Pha* 21: 169–177.
- Kious BM, Sabic H, Sung Y-H, Kondo DG, Renshaw P.** 2017. Open-label pilot study of combined augmentation with creatine monohydrate and 5-hydroxytryptophan for selective serotonin reuptake inhibitor– or serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor–resistant depression in adult women. *J Clin Psychopharm* 37(5): 578–583.
- Kirino E.** 2012. Escitalopram for the management of major depressive disorder: a review of its efficacy, safety, and patient acceptability. *Patient Prefer Adher* 6: 853–861.
- Kovacevic Z, Menezes SV, Sahni S, Kalinowski DS, Bae D-H, Lane DJR, Richardson DR.** 2016. The metastasis suppressor, N-MYC downstream-regulated gene-1 (NDRG1), down-regulates the ErbB family of receptors to inhibit downstream oncogenic signaling pathways. *J Biol Chem* 291(3): 1029–1052.
- Ladenstein R, Pötschger U, Pearson ADJ, Brock P, Luksch R, Castel V, Yaniv I, Papadakis V, Laureys G, Malis J, Balwierz W, Ruud E, Kogner P, Schroeder H, de Lacerda AF, Beck-Popovic M, Bician P, Garami M, Trahair T, Canete A, Ambros PF, Holmes K, Gaze M, Schreier G, Garaventa A, Vassal G, Michon J, Valteau-Couanet D.** 2017. Busulfan and melphalan versus carboplatin, etoposide, and melphalan as high-dose chemotherapy for high-risk neuroblastoma (HR-NBL1/SIOPEN): an international, randomised, multi-arm, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 18(4): 500–514.

- Lange I, Koster J, Koomoa DL.** 2019. Calcium signaling regulates fundamental processes involved in neuroblastoma progression. *Cell Calcium* 82: 102052. doi:10.1016/j.ceca.2019.06.006.
- Laverdière C, Liu Q, Yasui Y, Nathan PC, Gurney JG, Stovall M, Diller LR, Cheung N-K, Wolden S, Robison LL, Sklar ChA.** 2009. Long-term outcomes in survivors of neuroblastoma: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *JNCI-J Natl Cancer I* 101: 1131–1140.
- Lesurtel M, Graf R, Aleil B, Walther DJ, Tian Y, Jochum W, Gachet Ch, Bader M, Clavien P-A.** 2006. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science* 312: 104–107.
- Leung A, Shapiro B, Hattner R, Kim E, deKraker J, Ghazzar N, Hartmann O, Hoefnagel CA, Jamadar DA, Kloos R, Lizotte P, Lumbroso J, Rufini V, Shulkin BL, Sisson JC, Thein A, Troncone L.** 1997. Specificity of radioiodinated MIBG for neural crest tumors in childhood. *J Nucl Med* 38(9): 1352–1357.
- Livak KJ, Schmittgen TD.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* 25: 402–408.
- Luksch R, Castellani MR, Collini P, De Bernardi B, Conte M, Gambini C, Gandola L, Garaventa A, Biasoni D, Podda M, Sementa AR, Gatta G, Tonini GP.** 2016. Neuroblastoma (Peripheral neuroblastic tumours). *Crit Rev Oncol Hemat* 107: 163–181.
- Lv J, Liu F.** 2017. The role of serotonin beyond the central nervous system during embryogenesis. *Front Cell Neurosci* 11: 74. doi:10.3389/fncel.2017.00074.
- Manzke T, Niebert M, Koch UR, Caley A, Vogelgesang S, Hulsmann S, Ponimaskin E, Müller U, Smart TG, Harvey RJ, Richter DW.** 2010. Serotonin receptor 1A-modulated phosphorylation of glycine receptor $\alpha 3$ controls breathing in mice. *J Clin Invest* 120: 4118–4128.
- Maricq AV, Peterson AS, Brake AJ, Myers RM, Julius D.** 1991. Primary structure and functional expression of the 5-HT₃ receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* 254(5030): 432–437.
- Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL.** 2007. Neuroblastoma. *Lancet* 369: 2106–2120.
- Martin KF, Hannon S, Phillips I, Heal DJ.** 1992. Opposing roles for 5-HT_{1B} and 5-HT₃ receptors in the control of 5-HT release in rat hippocampus *in vivo*. *Brit J Pharmacol* 106: 139–142.
- Martin A, Schneiderman J, Helenowski IB, Morgan E, Dilley K, Danner-Koptik K, Hatahet M, Shimada H, Cohn SL, Kletzel M, Hijjiya N.** 2014. Secondary malignant neoplasms after high-dose chemotherapy and autologous stem cell rescue for high-risk neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 61: 1350–1356.
- Martin V, Riffaud A, Marday T, Brouillard Ch, Franc B, Tassin JP, Sevoz-Couche C, Mongeau R, Lanfumey.** 2017. Response of *Htr3a* knockout mice to antidepressant treatment and chronic stress. *Brit J Pharmacol* 174: 2471–2483. doi:10.1111/bph.13857.
- Matsushita K, Uchida K, Saigusa S, Ide S, Hashimoto K, Koike Y, Otake K, Inoue M, Tanaka K, Kusunoki M.** 2013. Low *NDRG1* mRNA expression predicts a poor prognosis in neuroblastoma patients. *Pediatr Surg Int* 29: 363–368.
- Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, Swift P, Shimada H, Black CT, Brodeur GM, Gerbing RB, Reynolds CP.** 1999. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. *New Engl J Med* 341(16): 1165–1173.
- Mazánek P.** 2016. Perinatální neuroblastom. *Onkologie* 10(5): 210–214.
- Mercado ChP, Kilic F.** 2010. Molecular mechanisms of SERT in platelets: Regulation of plasma serotonin levels. *Mol Interv* 10(4): 231–241.

- Monaco S, Rusciano MR, Maione AS, Soprano M, Gomathinayagam R, Todd LR, Campiglia P, Salzano S, Pastore L, Leggiero E, Wilkerson DC, Rocco M, Selleri C, Iaccarino G, Sankar U, Illario M.** 2015. A novel crosstalk between calcium/calmodulin kinases II and IV regulates cell proliferation in myeloid leukemia cells. *Cell Signal* 27: 204–214.
- Mora J, Gerald WL.** 2004. Origin of neuroblastic tumors: clues for future therapeutics. *Expert Rev Mol Diagn* 4(3): 293–302.
- Mossé YP, Lim MS, Voss SD, Wilner K, Ruffner K, Laliberte J, Rolland D, Balis FM, Maris JM, Weigel BJ, Ingle AM, Ahern Ch, Adamson PC, Blaney SM.** 2013. Safety and activity of crizotinib for paediatric patients with refractory solid tumours or anaplastic large-cell lymphoma: a Children's Oncology Group phase 1 consortium study. *Lancet Oncol* 14: 472–480.
- Mössner R, Lesch KP.** 1998. Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. *Brain Behav Immun* 12(4): 249–271.
- Murphy DL, Lerner A, Rudnick G, Lesch K-P.** 2004. Serotonin transporter: Gene, genetic disorders, and pharmacogenetics. *Mol Interv* 4(2): 109–123.
- Nakagawara A, Li Y, Izumi H, Muramori K, Inada H, Nishi M.** 2018. Neuroblastoma. *Jpn J Clin Oncol* 48(3): 241–241.
- Newman EA, Nuchtern JG.** 2016. Recent biologic and genetic advances in neuroblastoma: Implications for diagnostic, risk stratification, and treatment strategies. *Semin Pediat Surg* 25: 257–264.
- Niesler B, Frank B, Kapeller J, Rappold GA.** 2003. Cloning, physical mapping and expression analysis of the human 5-HT₃ serotonin receptor-like genes *HTR3C*, *HTR3D* and *HTR3E*. *Gene* 310: 101–111.
- Niesler B, Kapeller J, Hammer Ch, Rappold G.** 2008. Serotonin type 3 receptor genes: *HTR3A*, *B*, *C*, *D*, *E*. *Pharmacogenomics* 9(5): 501–504.
- Nuchtern JG, London WB, Barnewolt CE, Naranjo A, McGrady PW, Geiger JD, Diller L, Schmidt ML, Maris JM, Cohn SL, Shamberger RC.** 2012. A prospective study of expectant observation as primary therapy for neuroblastoma in young infants. *Ann Surg* 256(4): 573–580.
- Nurgali K, Jagoe RT, Abalo R.** 2018. Editorial: Adverse effects of cancer chemotherapy: Anything new to improve tolerance and reduce sequelae? *Front Pharmacol* 9: 245. doi:10.3389/fphar.2018.00245.
- Oberlander TF.** 2012. Fetal serotonin signaling: Setting pathways for early childhood development and behavior. *J Adolescent Health* 51: S9–S16.
- Parker RMC, Bentley KR, Barnes NM.** 1996. Allosteric modulation of 5-HT₃ receptors: focus on alcohols and anaesthetic agents. *Trends Pharmacol Sci* 17: 95–99.
- Patergnani S, Danese A, Bouhamida E, Aguiari G, Previati M, Pinton P, Giorgi C.** 2020. Various aspects of calcium signaling in the regulation of apoptosis, autophagy, cell proliferation, and cancer. *Int J Mol Sci* 21: 8323. doi:10.3390/ijms21218323
- Persson CU, von Stedingk K, Bexell D, Merselius M, Braekeveldt N, Gisselsson D, Arsenian-Henriksson M, Pålman S, Wigerup C.** 2017. Neuroblastoma patient-derived xenograft cells cultured in stemcell promoting medium retain tumorigenic and metastatic capacities but differentiate in serum. *Sci Rep-UK* 7: 10274. doi:10.1038/s41598-017-09662-8.
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ.** 2002. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 639–650.
- Pranzatelli MR, Balletti J.** 1992. Serotonin receptors in human neuroblastoma: a possible biologic tumor marker. *Exp Neurol* 115: 423–427.

- Ramamoorthy S, Shippenberg TS, Jayanthi LD.** 2011. Regulation of monoamine transporters: Role of transporter phosphorylation. *Pharmacol Therapeut* 129: 220–238.
- Rapport MM, Green AA, Page IH.** 1948. Crystalline Serotonin. *Science* 108: 329–330.
- Rettig I, Koeneke E, Trippel F, Mueller WC, Burhenne J, Kopp-Schneider A, Fabian J, Schober A, Fernekorn U, von Deimling A, Deubzer HE, Milde T, Witt O, Oehme I.** 2015. Selective inhibition of HDAC8 decreases neuroblastoma growth in vitro and in vivo and enhances retinoic acid-mediated differentiation. *Cell Death Dis* 6: e1657. doi:10.1038/cddis.2015.24.
- Sahu A, Gopalakrishnan L, Gaur N, Chatterjee O, Mol P, Modi PK, Dagamajalu S, Advani J, Jain S, Prasad TSK.** 2018. The 5-Hydroxytryptamine signaling map: an overview of serotonin-serotonin receptor mediated signaling network. *J Cell Commun Signal* 12: 731–735.
- Schleiermacher G, Janoueix-Lerosey I, Delattre O.** 2014. Recent insights into the biology of neuroblastoma. *Int J Cancer* 135: 2249–2261.
- Schmitt JM, Wayman GA, Nozaki N, Soderling TR.** 2004. Calcium activation of ERK mediated by calmodulin kinase I. *J Biol Chem* 279(23): 24064–24072.
- Schnell FM.** 2003. Chemotherapy-induced nausea and vomiting: The importance of acute antiemetic control. *Oncologist* 8: 187–198.
- Simon T, Berthold F, Borkhardt A, Kremens B, De Carolis B, Hero B.** 2011. Treatment and outcomes of patients with relapsed, high-risk neuroblastoma: Results of German trials. *Pediatr Blood Cancer* 56: 578–583.
- Skoda J, Borankova K, Jansson PJ, Huang MLH, Veselska R, Richardson DR.** 2019. Pharmacological targeting of mitochondria in cancer stem cells: An ancient organelle at the crossroad of novel anti-cancer therapies. *Pharmacol Res* 139: 298–313.
- Stanton BR, Perkins AS, Tessarollo L, Sassoon DA, Parada LF.** 1992. Loss of *N-myc* function results in embryonic lethality and failure of the epithelial component of the embryo to develop. *Genes Dev* 6: 2235–2247.
- Subramonian D, Phanthilath N, Rinehardt H, Flynn S, Huo Y, Zhang J, Messer K, Mo Q, Huang S, Lesperance J, Zage PE.** 2020. Regorafenib is effective against neuroblastoma in vitro and in vivo and inhibits the RAS/MAPK, PI3K/Akt/mTOR and Fos/Jun pathways. *Brit J Cancer* 123: 568–579.
- Sutcliffe JS, Delahanty RJ, Prasad HC, McCauley JL, Han Q, Jiang L, Li Ch, Folstein SE, Blakely RD.** 2005. Allelic heterogeneity at the serotonin transporter locus (*SLC6A4*) confers susceptibility to autism and rigid-compulsive behaviors. *Am J Hum Genet* 77: 265–279.
- Szabó PM, Pintér M, Szabó DR, Zsippai A, Patócs A, Falus A, Rácz K, Igaz P.** 2012. Integrative analysis of neuroblastoma and pheochromocytoma genomics data. *BMC Med Genomics* 5: 48. doi:10.1186/1755-8794-5-48.
- Szabó A, Mayor R.** 2018. Mechanisms of neural crest migration. *Annu Rev Genet* 52: 43–63.
- Štěrbá J, Mazánek P, Bajčiová V.** 2004. Pokroky v diagnostice a léčbě neuroblastomu u dětí. *Postgraduální medicína* 6(4): 373–379.
- Táborská K.** 2011. Funkční zobrazení a léčba neuroendokrinních tumorů pomocí metajodbenzylguanidinu. *Onkologie* 5(6): 333–335.
- Tang J, Wang Z, Liu J, Zhou Ch, Chen J.** 2018. Downregulation of 5-hydroxytryptamine receptor 3A expression exerts an anticancer activity against cell growth in colorectal carcinoma cells *in vitro*. *Oncol Lett* 16: 6100–6108. doi:10.3892/ol.2018.9351.
- Tas ML, Reedijk AMJ, Karim-Kos HE, Kremer LCM, van de Ven CP, Dierselhuys MP, van Eijkelenburg NKA, van Grotel M, Kraal KCJM, Peek AML, Coebergh JWW, Janssens**

- GOR, de Keizer B, de Krijger RR, Pieters R, Tytgat GAM, van Noesel MM.** 2020. Neuroblastoma between 1990 and 2014 in the Netherlands: Increased incidence and improved survival of high-risk neuroblastoma. *Eur J Cancer* 124: 47–55.
- Tebar F, Villalonga P, Sorkina T, Agell N, Sorkin A, Enrich C.** 2002. Calmodulin regulates intracellular trafficking of epidermal growth factor receptor and the MAPK signaling pathway. *Mol Biol Cell* 13: 2057–2068.
- Thompson AJ, Lummis SCR.** 2006. 5-HT₃ receptors. *Curr Pharm Des* 12(28): 3615–3630.
- Thompson AJ, Lester HA, Lummis SCR.** 2010. The structural basis of function in Cys-loop receptors. *Q Rev Biophys* 43: 449–499.
- Thompson AJ, Verheij MHP, de Esch IJP, Lummis SCR.** 2012. VUF10166, a novel compound with differing activities at 5-HT_{3A} and 5-HT_{3AB} receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 341: 350–359.
- Tone M, Tahara S, Nojima S, Motooka D, Okuzaki D, Morii E.** 2020. HTR3A is correlated with unfavorable histology and promotes proliferation through ERK phosphorylation in lung adenocarcinoma. *Cancer Sci* 111: 3953–3961. doi:10.1111/cas.14592.
- Trochet D, Bourdeaut F, Janoueix-Lerosey I, Deville A, de Pontual L, Schleiermacher G, Coze C, Philip N, Frébourg T, Munnich A, Lyonnet S, Delattre O, Amiel J.** 2004. Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (*PHOX2B*) gene in neuroblastoma. *Am J Hum Genet* 74: 761–764.
- Turkel SB, Itabashi HH.** 1974. The natural history of neuroblastic cells in the fetal adrenal gland. *Am J Pathol* 76: 225–244.
- Tyce GM.** 1990. Origin and metabolism of serotonin. *J Cardiovasc Pharm* 16(3): S1–S7.
- Utiger RD.** 2019. Adrenal gland. *Encyclopedia Britannica*. [online: <https://www.britannica.com/science/adrenal-gland#/media/1/6405/121578> (cit. 2021-02-28)]
- van Groningen T, Koster J, Valentijn LJ, Zwijnenburg DA, Akogul N, Hasselt NE, Broekmans M, Haneveld F, Nowakowska N, Bras J, van Noesel CJM, Jongejan A, van Kampen AH, Koster L, Baas F, van Dijk-Kerkhoven L, Huizer-Smit M, Lecca MC, Chan A, Lakeman A, Molenaar P, Volckmann R, Westerhout EM, Hamdi M, van Sluis PG, Ebus ME, Molenaar JJ, Tytgat GA, Westerman BA, van Nes J, Versteeg R.** 2017. Neuroblastoma is composed of two super-enhancer-associated differentiation states. *Nat Genet* 49(8): 1261–1268. doi:10.1038/ng.3899.
- Van Hooft JA, Vijverberg HPM.** 1995. Phosphorylation controls conductance of 5-HT₃ receptor ligand-gated ion channels. *Receptor Channel* 3: 7–12.
- Van Oekelen D, Luyten WHML, Leysen JE.** 2003. 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors and their atypical regulation properties. *Life Sci* 72: 2429–2449.
- van Wezel EM, Decarolis B, Stutterheim J, Zappeij-Kannegieter L, Berthold F, Schumacher-Kuckelkorn R, Simon T, Fiocco M, van Noesel MM, Caron HN, van der Schoot CE, Hero B, Tytgat GAM.** 2016. Neuroblastoma messenger RNA is frequently detected in bone marrow at diagnosis of localised neuroblastoma patients. *Eur J Cancer* 54: 149–158.
- Vázquez E, Castellote A, Piqueras J, Ortuño P, Sánchez-Toledo J, Nogués P, Lucaya J.** 2003. Second malignancies in pediatric patients: Imaging findings and differential diagnosis. *RadioGraphics* 23: 1155–1172.
- Veselska R, Jezova M, Kyr M, Mazanek P, Chlapek P, Dobrotkova V, Sterba J.** 2019. Comparative analysis of putative prognostic and predictive markers in neuroblastomas: high expression of PBX1 is associated with a poor response to induction therapy. *Front Oncol* 9: 1221.
- Wakamatsu Y, Watanabe Y, Nakamura H, Kondoh H.** 1997. Regulation of the neural crest cell fate by N-myc: promotion of ventral migration and neuronal differentiation. *Development* 124: 1953–1962.

- Walther DJ, Peter J-U, Winter S, Hölting M, Paulmann N, Grohmann M, Vowinckel J, Alamo-Bethencourt V, Wilhelm CS, Ahnert-Hilger G, Bader M. 2003a. Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet α -granule release. *Cell* 115: 851–862.
- Walther DJ, Peter J-U, Bashammakh S, Hörtnagl H, Voits M, Fink H, Bader M. 2003b. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* 299: 76.
- Wang Y, Einhorn P, Triche TJ, Seeger RC, Reynolds CP. 2000. Expression of *Protein Gene Product 9.5* and *Tyrosine Hydroxylase* in childhood small round cell tumors. *Clin Cancer Res* 6: 551–558.
- Wei S-J, Nguyen TH, Yang I-H, Mook DG, Makena MR, Verlekar D, Hindle A, Martinez GM, Yang S, Shimada H, Reynolds CP, Kang MH. 2020. *MYC* transcription activation mediated by OCT4 as a mechanism of resistance to 13-*cis*RA-mediated differentiation in neuroblastoma. *Cell Death Dis* 11: 368. doi:10.1038/s41419-020-2563-4.
- Wetzel ChHR, Hermann B, Behl Ch, Pestel E, Rammes G, Zieglgänsberger W, Holsboer F, Rupprecht R. 1998. Functional antagonism of gonadal steroids at the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor. *Mol Endocrinol* 12: 1441–1451.
- Yakel JL, Lagrutta A, Adelman JP, North RA. 1993. Single amino acid substitution affects desensitization of the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci* 90: 5030–5033.
- Yang S, Zheng J, Xiao X, Xu T, Tang W, Zhu H, Yang L, Zheng S, Dong K, Zhou G, Wang Y. 2015. SOX2 promotes tumorigenicity and inhibits the differentiation of I-type neuroblastoma cells. *Int J Oncol* 46: 317–323. doi:10.3892/ijo.2014.2713.
- Yang XA, Tang FM, Shin J, Cunningham JM. 2017. A c-Myc-regulated stem cell-like signature in high-risk neuroblastoma: A systematic discovery (Target neuroblastoma ESC-like signature). *Sci Rep-UK* 7: 41. doi:10.1038/s41598-017-00122-x.
- Yang CL, Serra-Roma A, Gualandi M, Bodmer N, Niggli F, Schulte JH, Bode PK, Shakhova O. 2020. Lineage-restricted sympathoadrenal progenitors confer neuroblastoma origin and its tumorigenicity. *Oncotarget* 11(24): 2357–2371. doi:10.18632/oncotarget.27636.
- Yano JM, Yu K, Donaldson GP, Shastri GG, Ann P, Ma L, Nagler CR, Ismagilov RF, Mazmanian SK, Hsiao EY. 2015. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell* 161: 264–276.
- Yeung AWK, Georgieva MG, Atanasov AG, Tzvetkov NT. 2019. Monoamine oxidases (MAOs) as privileged molecular targets in neuroscience: Research literature analysis. *Front Mol Neurosci* 12: 143. doi:10.3389/fnmol.2019.00143.
- Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, London WB, Kreissman SG, Chen HX, Smith M, Anderson B, Villablanca JG, Matthay KK, Shimada H, Grupp SA, Seeger R, Reynolds P, Buxton A, Reisfeld R, Gillies S, Cohn SL, Maris JM, Sondel PM. 2010. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *New Engl J Med* 363(14): 1324–1334.
- Zimmerman MW, Liu Y, He S, Durbin AD, Abraham BJ, Easton J, Shao Y, Xu B, Zhu S, Zhang X, Li Z, Weichert-Leahey N, Young RA, Zhang J, Look AT. 2018. *MYC* drives a subset of high-risk pediatric neuroblastomas and is activated through mechanisms including enhancer hijacking and focal enhancer amplification. *Cancer Discov* 8: 320–335.
- Zhu S, Lee J-S, Guo F, Shin J, Perez-Atayde AR, Kutok JL, Rodig SJ, Neuberg DS, Helman D, Feng H, Stewart RA, Wang W, George RE, Kanki JP, Look AT. 2012. Activated ALK collaborates with MYCN in neuroblastoma pathogenesis. *Cancer Cell* 21: 362–373.