



**MASARYKOVA UNIVERZITA**

**Přírodovědecká fakulta**

**Ústav experimentální biologie**

**RNDr. Petr CHLAPEK, DiS.**

**EXPRESNÍ PROFILY BUNĚČNÝCH LINIÍ  
EMBRYONÁLNÍCH NÁDORŮ PŘI APLIKACI  
KOMBINOVANÉ DIFERENCIAČNÍ TERAPIE**

**Disertační práce**

Školitel: doc. RNDr. Renata Veselská, Ph.D., M.Sc.

Brno, 2012

## Bibliografická identifikace

|                                  |                                                                                                                             |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Jméno a příjmení autora:         | RNDr. Petr Chlapek, DiS.                                                                                                    |
| Název disertační práce:          | Expresní profily buněčných linií embryonálních nádorů při aplikaci kombinované diferenciační terapie                        |
| Název disertační práce anglicky: | Expression profiles of the embryonal tumor cell lines after application of the combined differentiation therapy             |
| Studijní program:                | Biologie                                                                                                                    |
| Studijní obor:                   | Molekulární a buněčná biologie                                                                                              |
| Školitel:                        | doc. RNDr. Renata VESELSKÁ, Ph.D., M.Sc.                                                                                    |
| Rok obhajoby:                    | 2012                                                                                                                        |
| Klíčová slova v češtině:         | Kyselina <i>all-trans</i> retinová (ATRA), diferenciacie, kyselina kávová (CA), celecoxib (CX), neuroblastom, meduloblastom |
| Klíčová slova v angličtině:      | <i>All-trans</i> retinoic acid (ATRA), differentiation, caffeic acid (CA), celecoxib (CX), neuroblastoma, medulloblastoma   |



Na tomto místě bych rád poděkoval své školitelce doc. RNDr. Renatě Veselské, Ph.D., M.Sc. za odborné vedení a pomoc při zpracování dané problematiky a rovněž celému kolektivu Laboratoře nádorové biologie za odborné konzultace a vytvoření tvůrčí a přátelské pracovní atmosféry.

Tato disertační práce vznikla s finanční podporou grantů IGA MZ ČR NR/9341-3 a NS/10218-3, dále grantu GAČR 204/08/H054 a výzkumného záměru MŠMT VZ MSM0021622415.

## Abstrakt disertační práce

### EXPRESNÍ PROFILY BUNĚČNÝCH LINIÍ EMBRYONÁLNÍCH NÁDORŮ PŘI APLIKACI KOMBINOVANÉ DIFERENCIAČNÍ TERAPIE

Retinoidy jsou známy jako efektivní induktory buněčné diferenciace, a to jak v podmínkách *in vivo*, tak *in vitro*. Díky této schopnosti jsou retinoidy často používány v protinádorové terapii. Předkládaná disertační práce je zaměřena na studium možností zesílení antineoplastického efektu kyseliny all-*trans* retinové pomocí kombinované aplikace s inhibitory lipooxygenáz (LOX) a cyklooxygenáz (COX). V této studii byly používány kyselina kávová jako inhibitor 5-lipoxygenázy a celecoxib jako inhibitor cyklooxygenázy-2. Jako biologické modely byly vybrány dvě neuroblastomové (SK-N-BE(2) a SH-SY5Y) a dvě smeduloblastomové (Daoy a D283 Med) sbírkové buněčné linie; část experimentů byla prováděna rovněž na 4 patientských meduloblastomových liniích. Pro monitorování změn v expresi 440 genů funkčně spojených s biologií nádorů byly použity nízkohustotní oligonukleotidové mikročipy Human Cancer Oligo GEArray (SABiosciences). Změny exprese vybraných kandidátních genů (*CDKN1A*, *GDF15*, *HLA-C*, *HMGA1*, *TIMP1*) byly následně potvrzeny pomocí RT-PCR. Analýza detekovaných změn genové exprese prokázala zvýšení exprese genů zapojených v procesech retinoidy indukované diferenciace v závislosti na koncentraci použitých činidel; zejména se jednalo o geny obecně spojované s buněčnou diferenciací, geny podílející se na regulaci přestaveb cytoskeletu, geny zapojené do metabolismu mitochondrií atd. Celkově byla prokázána vyšší senzitivita neuroblastomových linií ke kombinované aplikaci ATRA s kyselinou kávovou, resp. s celecoxibem. Získané výsledky podporují naši původní hypotézu, že buněčná diferenciace indukovaná ATRA může být zesilována kombinací s LOX, resp. COX inhibitory.

## Dissertation abstract

### EXPRESSION PROFILES OF THE EMBRYONAL TUMOR CELL LINES AFTER APPLICATION OF THE COMBINED DIFFERENTIATION THERAPY

Retinoids are known to be effective inducers of cell differentiation under both *in vivo* and *in vitro* conditions. Due to this capability, retinoids are often used in recent antitumor therapy. This Ph.D. thesis is aimed to investigate possibilities of enhancement of the ATRA-induced antineoplastic effects by combined treatment with inhibitors of lipoxygenases (LOX) or cyclooxygenases (COX). Caffeic acid as an inhibitor of 5-lipoxygenase and celecoxib as an inhibitor of cyclooxygenase-2 were chosen for this study. Two neuroblastoma (SK-N-BE(2) and SH-SY5Y), and two medulloblastoma (Daoy and D283 Med) established cell lines were chosen as biological models; some experiments were also performed using 4 in-house medulloblastoma cell lines. The Human Cancer Oligo GEArray low-density oligonucleotide microchips (SABiosciences) were used to evaluate changes in expression of 440 cancer-related genes. Changes in expression of selected candidate genes (*CDKN1A*, *GDF15*, *HLA-C*, *HMGA1*, *TIMP1*) were then confirmed by RT-PCR. Analysis of detected changes in gene expression showed a concentration-dependent increase in expression of genes known to be involved in the process of retinoid-induced differentiation; especially of genes generally associated with cell differentiation, genes participating in regulation of cytoskeleton rearrangements, genes involved in mitochondrial metabolism, etc. To summarize, results also indicated higher sensitivity of neuroblastoma cell lines to the combined treatment with ATRA and caffeic acid or celecoxib. Obtained results support our initial hypothesis that ATRA-induced cell differentiation could be enhanced by its combination with LOX/COX inhibitors.

## Seznam zkratek:

|                   |                                                                                                                           |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 13- <i>cis</i> RA | kyselina 13- <i>cis</i> retinová ( <i>13-cis retinoic acid</i> )                                                          |
| 4-HPR             | fenretinid ( <i>N-(4-hydroxyphenyl)-retinamid</i> )                                                                       |
| 9- <i>cis</i> RA  | kyselina 9- <i>cis</i> retinová ( <i>9-cis retinoic acid</i> )                                                            |
| AP1               | aktivační protein 1                                                                                                       |
| ATRA              | kyselina all- <i>trans</i> retinová ( <i>all-trans retinoic acid</i> )                                                    |
| BrdU              | 5- <u>b</u> romo-2'- <u>d</u> eoxyuridin                                                                                  |
| CA                | kyselina kávová ( <i>caffeic acid</i> )                                                                                   |
| CAPE              | fenetyl-ester kyseliny kávové ( <i>caffeic acid phenethyl ester</i> )                                                     |
| COMBAT            | <i>Combined Oral Maintenance Biodifferentiating and Antiangiogenic Therapy</i>                                            |
| COX               | cyklooxygenáza ( <i>cyclooxygenase</i> )                                                                                  |
| CRABP             | buněčné proteiny vázající kyselinu retinovou ( <i>cellular retinoic acid binding proteins</i> )                           |
| CRBP              | buněčné proteiny vázající retinol ( <i>cellular retinol binding proteins</i> )                                            |
| CTL               | cytotoxické T lymfocyty                                                                                                   |
| CX                | celecoxib                                                                                                                 |
| DMEM              | <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>                                                                                 |
| DMSO              | dimetylsulfoxid ( <i>dimethyl sulfoxide</i> )                                                                             |
| ErbB2             | gen pro receptor lidského růstového faktoru 2 (v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2)                 |
| FCS               | fetální telecí sérum ( <i>fetal calf serum</i> )                                                                          |
| HDACi             | inhibitory histonových deacetyláz ( <i>histone deacetylase inhibitors</i> )                                               |
| IFN $\alpha$      | interferon $\alpha$                                                                                                       |
| IFN $\gamma$      | interferon $\gamma$                                                                                                       |
| LOX               | lipooxygenáza ( <i>lipoxygenase</i> )                                                                                     |
| LRAT              | lecitin:retinol acyltransferáza ( <i>lecithin:retinol acyl transferase</i> )                                              |
| MAPs              | s mikrotubuly asociované proteiny ( <i>microtubule-associated protein</i> )                                               |
| MBL               | meduloblastom                                                                                                             |
| MTT               | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) |

|                  |                                                                                                                                                                                                                     |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MYCC             | buněčný homolog v-myc ( <u>c</u> ellular homolog of v- <u>m</u> yc)                                                                                                                                                 |
| MYCN             | onkogen odvozený z neuroblastomu, příbuzný s v-myc genem izolovaným z viru ptačí myelocytomatózy                                                                                                                    |
| NBL              | <u>n</u> euro <u>b</u> lastom                                                                                                                                                                                       |
| NSAID            | nesteroidní protizánětlivé léky ( <u>n</u> onsteroidal <u>a</u> nti- <u>i</u> nflammatory <u>d</u> rugs)                                                                                                            |
| PGE <sub>2</sub> | prostaglandin E <sub>2</sub> ( <u>p</u> rosta <u>g</u> landin <u>E</u> <u>2</u> )                                                                                                                                   |
| PI3K             | fosfatidylinositol-3-kináza (phosphoinositide 3-kinase)                                                                                                                                                             |
| PML/RAR          | fúzní gen ( <u>p</u> romyelocytoc <u>l</u> eukemia protein – <u>r</u> etinoic <u>a</u> cid <u>r</u> eceptor)                                                                                                        |
| RA               | kyselina retinová ( <u>r</u> etinoic <u>a</u> cid)                                                                                                                                                                  |
| RAMBAs           | látky blokující metabolismus kyseliny retinové ( <u>r</u> etinoic <u>a</u> cid <u>m</u> etabolism <u>b</u> locking <u>a</u> gents)                                                                                  |
| RAR              | receptor kyseliny retinové ( <u>r</u> etinoic <u>a</u> cid <u>r</u> eceptor)                                                                                                                                        |
| RARE             | responzivní elementy kyseliny retinové ( <u>r</u> etinoic <u>a</u> cid <u>r</u> esponsive <u>e</u> lements)                                                                                                         |
| RPMI             | <u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute medium                                                                                                                                              |
| RT-PCR           | reverzně-transkripční polymerázová řetězová reakce (reverse transcription polymerase chain reaction)                                                                                                                |
| RXR              | receptor retinoidu X ( <u>r</u> etinoid <u>X</u> <u>r</u> eceptor)                                                                                                                                                  |
| SDS              | <u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfát                                                                                                                                                                       |
| SSC              | solný roztok citrátu sodného ( <u>s</u> aline- <u>s</u> odium <u>c</u> itrate)                                                                                                                                      |
| STRA6            | RBP receptor ( <u>s</u> timulated by <u>r</u> etinoic <u>a</u> cid 6)                                                                                                                                               |
| TTR              | <u>t</u> rans <u>t</u> hy <u>r</u> etin                                                                                                                                                                             |
| WST              | <u>w</u> ater <u>s</u> oluble <u>t</u> etrazolium salts 4-[3-(4-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonát (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) |
| XTT              | 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl]-2H- tetrazolium-5-karboxanilid (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)                                                                   |



# Obsah

|          |                                                                                      |           |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>Úvod .....</b>                                                                    | <b>11</b> |
| <b>2</b> | <b>Přehled problematiky .....</b>                                                    | <b>13</b> |
| 2.1      | Retinoidy .....                                                                      | 13        |
| 2.1.1    | Metabolismus retinoidů .....                                                         | 14        |
| 2.1.2    | Molekulární mechanismy působení retinoidů .....                                      | 18        |
| 2.2      | Možnosti modulace působení retinoidů.....                                            | 20        |
| 2.2.1    | Kyselina kávová .....                                                                | 22        |
| 2.2.2    | Celecoxib .....                                                                      | 23        |
| 2.3      | Metody hodnocení biologického účinku retinoidů na molekulární a buněčné úrovni ..... | 25        |
| 2.3.1    | Metody hodnocení buněčné diferenciaci .....                                          | 25        |
| 2.3.2    | Metody hodnocení proliferace.....                                                    | 26        |
| 2.3.3    | Metody hodnocení apoptózy .....                                                      | 27        |
| 2.3.4    | Metody hodnocení genové exprese .....                                                | 28        |
| 2.4      | Solidní nádory dětského věku.....                                                    | 31        |
| 2.4.1    | Neuroblastom .....                                                                   | 31        |
| 2.4.2    | Meduloblastom .....                                                                  | 34        |
| <b>3</b> | <b>Cíle práce .....</b>                                                              | <b>37</b> |
| <b>4</b> | <b>Materiál a metody .....</b>                                                       | <b>39</b> |
| 4.1      | Buněčné linie a kultivační podmínky .....                                            | 39        |
| 4.2      | Chemikálie a uspořádání experimentů .....                                            | 42        |
| 4.3      | Izolace a kontrola kvality RNA .....                                                 | 43        |
| 4.4      | Zpracování oligonukleotidových čipů (Oligo GEArrays) .....                           | 43        |
| 4.5      | Analýza obrazu a zpracování dat.....                                                 | 44        |
| 4.6      | RT-PCR .....                                                                         | 46        |
| 4.7      | Scratch assay.....                                                                   | 47        |
| 4.8      | Analýza zapojení genů se změnou exprese do signálních drah.....                      | 48        |
| <b>5</b> | <b>Výsledky.....</b>                                                                 | <b>49</b> |
| 5.1      | Expresní profily neuroblastomových a meduloblastomových buněčných linií ..           | 50        |
| 5.1.1    | Neuroblastomové buněčné linie .....                                                  | 50        |

|          |                                                                                                  |            |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.1.2    | Meduloblastomové buněčné linie .....                                                             | 56         |
| 5.1.3    | Pacientské meduloblastomové linie .....                                                          | 61         |
| 5.2      | Porovnání exprese vybraných genů u sbírkových neuroblastomových a meduloblastomových linií ..... | 63         |
| 5.2.1    | Provozní gen <i>HSPB90AB1</i> .....                                                              | 67         |
| 5.2.2    | Změny exprese genu <i>CDKN1A</i> .....                                                           | 68         |
| 5.2.3    | Změny exprese genu <i>GDF15</i> .....                                                            | 70         |
| 5.2.4    | Změny exprese genu <i>HLA-C</i> .....                                                            | 72         |
| 5.2.5    | Změny exprese genu <i>HMGA1</i> .....                                                            | 74         |
| 5.2.6    | Změny exprese genu <i>TIMP1</i> .....                                                            | 76         |
| 5.3      | Vliv kombinované aplikace ATRA s CA, resp. CX na hladinu transkriptu TAp73 a <i>TP53</i> .....   | 79         |
| <b>6</b> | <b>Diskuse</b> .....                                                                             | <b>83</b>  |
| 6.1      | Změny expresních profilů v důsledku kombinovaného působení ATRA s CA, resp. CX.....              | 84         |
| 6.1.1    | Geny, které se podílejí na regulaci buněčného cyklu, apoptózy a indukované diferenciaci.....     | 84         |
| 6.1.2    | Reorganizace cytoskeletu během indukované diferenciaci .....                                     | 87         |
| 6.1.3    | Vliv retinoidů na extracelulární prostor.....                                                    | 89         |
| 6.1.4    | Poškození buněčných struktur působením ATRA s LOX, resp. COX inhibitory .....                    | 90         |
| 6.2      | Srovnání neuroblastomových a meduloblastomových linií.....                                       | 95         |
| 6.3      | Vliv kombinované aplikace ATRA a CA, resp. CX na expresi izoformy TAp73 .. .....                 | 97         |
| <b>7</b> | <b>Závěr</b> .....                                                                               | <b>99</b>  |
| <b>8</b> | <b>Literatura</b> .....                                                                          | <b>101</b> |
| <b>9</b> | <b>Seznam publikací</b> .....                                                                    | <b>118</b> |

# 1 Úvod

Skoro 100 let uplynulo od doby, kdy McCollum a Davis (1913) identifikovali vitamín A. Vitamín A je nutriční doplněk, který má esenciální význam jak v normální embryogenezi jako tzv. morfogen, tak ve fyziologii dospělého savčího organismu. Základním metabolickým derivátem vitamínu A je kyselina retinová, malá lipofilní molekula, která se jako ligand váže na jaderné receptory RAR, resp. RXR patřící do nadrodiny steroidních receptorů. Receptory RAR a RXR se vážou na specifická místa v genomu (RAREs – retinoic acid responsive elements) a tam fungují jako transkripční aktivátory nebo represory v závislosti na tom, zda je na nich navázána kyselina retinová (Lewandoski and Mackem 2009).

Již před deseti lety bylo známo přes 500 genů, jejichž hladinu exprese kyselina retinová ovlivňuje (Balmer and Blomhoff 2002). Má se za to, že právě schopnost regulovat takové množství různých genů je příčinou toho, že retinoidy hrají důležitou roli v procesech, jako je normální růst a vývoj organismu, vidění, buněčný růst, diferenciace či apoptóza (Stephensen 2001; Blomhoff and Blomhoff 2006; D'Ambrosio et al. 2011).

Právě pro schopnost regulovat širokou škálu zásadních biologických procesů jsou retinoidy často využívány jako terapeutická agens v onkologii a dermatologii. Vzhledem ke skutečnosti, že v onkologii se retinoidy nejčastěji využívají při terapii akutní promyelocytární leukémie, i výzkum biologických účinků retinoidů na buněčné i molekulární úrovni se obecně zaměřuje zejména na leukemické buňky (Avvisati and Tallman 2003; Lengfelder et al. 2005; Gregory and Feusner 2009).

Ovšem i u nejčastějšího solidního nádoru dětského věku, neuroblastomu, bylo zaznamenáno zlepšení léčebných výsledků při aplikaci retinoidů u pacientů s nádory vysokého rizika. Obecně pak byla u neurogenních tumorů popsána významná odpověď na podání retinoidů, hlavně díky diferenciačnímu efektu (Reynolds and Lemons 2001; Sterba 2002; Reynolds et al. 2003; Sterba et al. 2006; Zapletalova et al. 2012). Popsán byl ale také inhibiční vliv retinoidů na angiogenezi (Ribatti et al. 2003).

Kyselina retinová a její izomery však vykazují při perorálním podávání celou řadu vedlejších účinků souvisejících s její toxicitou - jde např. o bolesti hlavy, nevolnosti a zvracení, bolesti žaludku či hepatotoxicitu. Tyto vedlejší efekty a navíc možný rozvoj rezistence jsou limitujícími faktory při klinické aplikaci retinoidů (Gomaa et al. 2008).

Snahy překonat tyto limitující faktory se ubírají různými cestami - např. podávání kyseliny all-trans retinové (ATRA) v biodegradabilních mikrokapslích (Choi *et al.* 2006) nebo přímá konjugace ATRA s antioxidanty (Hadjipavlou-Litina *et al.* 2010).

Pravděpodobně nejčastěji se však jedná o kombinované terapie, při nichž je efekt jednoho terapeutika modulován, resp. zesilován jeho společnou aplikací s další sloučeninou, ať už formou podávání obou terapeutik současně, nebo v sekvenčním režimu.

V případě retinoidů se nejčastěji používají jejich kombinace s vitamínem D (Haselberger *et al.* 2011; Stefanska *et al.* 2011), inhibitory histondeacetylázy (Spiller *et al.* 2006; De los Santos *et al.* 2007; Spiller *et al.* 2008), interferony (DiPaola *et al.* 1999; Todesco *et al.* 2000; Shin *et al.* 2002) a také s činidly, jež zasahují do metabolismu retinoidů - takovými činidly jsou zejména inhibitory cytochromu P-450 (Njar 2002; Njar *et al.* 2006; Ahmad 2011) a inhibitory lipooxygenáz (LOX) (Hofmanova *et al.* 1998; Veselska *et al.* 2004) a cyklooxygenáz (COX) (Simeone *et al.* 2004; Schroeder *et al.* 2006).

Navzdory značným pokrokům v terapii solidních nádorů dětského věku během posledních dekád jsou výsledky léčby pacientů s některými konkrétními diagnózami stále neuspokojivé. Jedná se především o metastatické sarkomy, relabující mozkové nádory a některé další malignity vysokého rizika. Zintenzivnění terapie zvýšením dávek jednotlivých léčiv nad hranici standardní maximálně tolerované dávky již nevede k zlepšení terapeutické odpovědi. Ani zavádění nových druhů terapií, jako jsou monoklonální protilátky nebo inhibitory tyrosinkináz, případně další cílená biologická léčba, zatím stále ještě nedosahuje očekávaných přínosů.

Proto se v dětské onkologii v posledních letech obrací pozornost k tzv. metronomické léčbě, při níž se pacientům podávají v pravidelných malých dávkách jednotlivá terapeutická agens nebo jejich kombinace (Andre *et al.* 2010; Pasquier *et al.* 2010; Pasquier *et al.* 2011). Právě takovým přístupem je i protokol COMBAT (Combined Oral Maintenance Biodifferentiating and Antiangiogenic Therapy) (Fontana and Rishi 2002; Sterba *et al.* 2006), z něhož tato disertační práce tematicky vychází. Tento protokol je určen pro děti s relabujícími solidními nádory, případně s dalšími solidními nádory vysokého rizika, u nichž byly klasické léčebné postupy již vyčerpány, a neexistuje jiná léčba s vyšší prioritou. O úspěšnosti tohoto přístupu svědčí i skutečnost, že protokol COMBAT se v praxi osvědčil (Sterba *et al.* 2006; Sterba *et al.* 2010) a v současné době se používá již třetí modifikace původního protokolu (Zapletalova *et al.* 2012).

## 2 Přehled problematiky

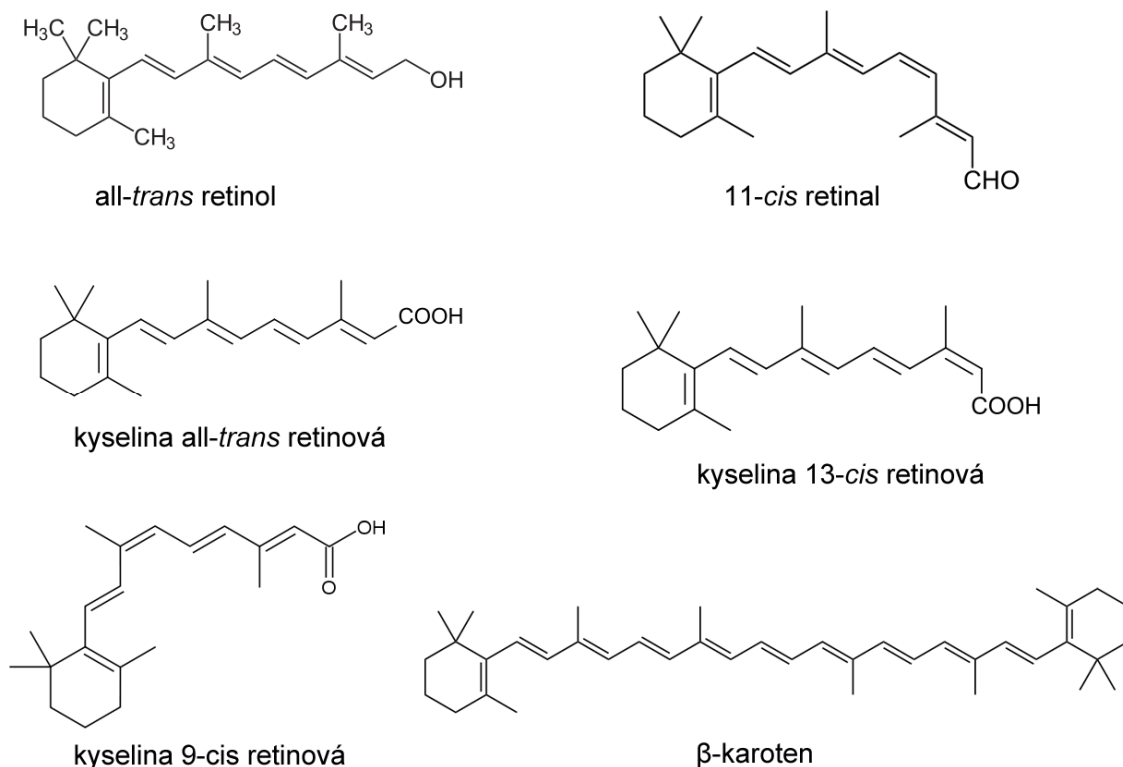
### 2.1 Retinoidy

Vitamín A je termín užívaný pro pojmenování sloučenin, které vykazují stejnou biologickou aktivitu jako retinol. Retinoidy jsou pak klasifikovány jako sloučeniny obsahující čtyři isoprenové jednotky spojené způsobem „head-to-tail“. Všechny retinoidy jsou odvozeny od monocyklické základní sloučeniny, která obsahuje pět dvojných vazeb mezi uhlíky a s funkční skupinou na acyklické části (*IUPAC-IUB 1983*).

Podle této definice tedy může označení „retinoidy“ zahrnovat jak přirozeně se vyskytující formy vitamínu A, tak syntetické analogy retinolu - ať již s biologickou funkcí, nebo bez ní. Vzhledem k postupnému vývoji značného množství syntetických analogů retinoidů, jež původní definici plně neodpovídají (např. acyklické retinoidy), jsou dnes k retinoidům často řazeny také sloučeniny, které nejsou blízce odvozené od retinolu, ale vykazují obdobnou biologickou aktivitu.

All-*trans* retinol jakožto mateřská sloučenina retinoidů je primární alkohol o molekulární hmotnosti 286 g/mol. Ve většině živočišných tkání se však nejčastěji vyskytuje retinyl palmitát a další estery mastných kyselin, jako jsou retinyl oleát nebo retinyl stearát. Většina těchto metabolitů se vyskytuje v konfiguraci all-*trans*. V sítnici oka lze detekovat aldehydickou formu 11-*cis* retinalu a v mnoha tkáních je přítomna kyselina retinová, která se vyskytuje se v několika stereoizomerických formách. Z nich nejvíce abundantní a termodynamicky nejstabilnější je kyselina all-*trans* retinová (ATRA), dále pak kyselina 13-*cis* retinová (13-*cis* RA) vykazující výhodnější farmakokinetické vlastnosti, a kyselina 9-*cis* retinová (9-*cis* RA) (Obr. 1) (*Blomhoff and Blomhoff 2006; Bushue and Wan 2010; D'Ambrosio et al. 2011*).

Ačkoliv existuje řada izoform, hlavní aktivní buněčnou izoformou je ATRA, přičemž bylo prokázáno, že ostatní izomery, jako je například 13-*cis* RA, jsou v buňce izomerizovány právě na ATRA (*Veal et al. 2002; Armstrong et al. 2005*).



**Obr. 1** Strukturní vzorce některých přirozeně se vyskytujících retinoidů a β-karotenu.

---

### 2.1.1 Metabolismus retinoidů

Žádný živoch nemá schopnost syntetizovat vitamín A *de novo*. Nejčastěji je proto tento vitamín v tělech živočichů získáván konverzí z karotenoidů. Karotenoidy představují velkou skupinu v přírodě rozšířených pigmentů, které zodpovídají za žluté, oranžové, červené a purpurové zbarvení mnoha plodů a květů. Mnohé karotenoidy mohou být požřeny živočichy a skladovány ve specifických tkáních, které jsou díky tomu také charakteristicky zbarvené, např. žlutá skvrna v oku, vaječný žloutek či svalovina lososa (Fraser and Bramley 2004).

Kromě samotných karotenoidů mohou všežraví a masožraví živočichové získávat již přeměněné karotenoidy, nejčastěji ve formě retinolu a retinyl esterů. Karotenoidy jsou již v tenkém střevě živočichů štěpeny na retinal a ten je dále redukován na retinol. Stejně tak retinyl estery jsou hydrolyzovány na retinol. Do enterocytů tenkého střeva se retinol dostává jak zprostředkovaným přenosem, tak prostou difuzí.

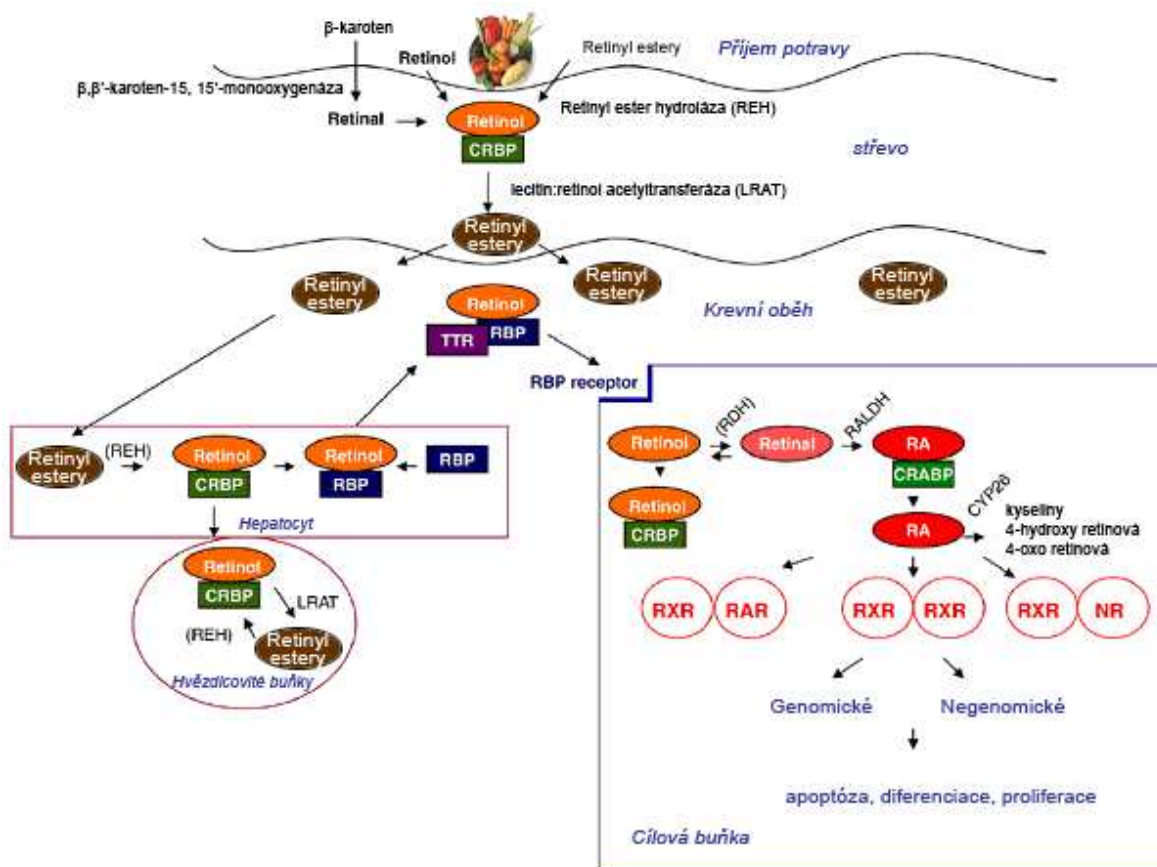
Protože retinoidy jsou ve vodě nerozpustné, ve vodném prostředí organismu jsou obvykle vázány na specifické proteiny. Retinol vázající protein (RBP) je protein, který

s navázaným retinolem cirkuluje v plazmě, zatímco pro proteiny vázající retinol v buňkách se používá označení CRBP (cellular retinol-binding protein). Uvnitř buněk se pak ještě nacházejí proteiny vázající kyselinu retinovou - CRABP (cellular retinoic acid-binding protein).

V enterocytech je tak retinol specificky vázán na protein CRBP-II. Tento protein napomáhá esterifikaci, při které je většina retinolu spojena s dlouhými řetězci mastných kyselin, zejména kyseliny palmitové. Esterifikaci provádí enzym lecitin:retinol acyltransferáza (LRAT). Většina takto vzniklých retinyl esterů je následně formována do chylomikronů (lipoproteinové komplexy) a transportována do lymfy (*Blomhoff and Blomhoff 2006; D'Ambrosio et al. 2011*).

Retinyl estery jsou tak lymfou transportovány do jater. V hepatocytech je část retinyl esterů hydrolyzována a takto uvolněný retinol je po navázání na RBP secernován do plazmy. Významná část retinyl esterů je z hepatocytů postoupena do hvězdicovitých buněk (perisinusoidální, nebo též Itoovy buňky), kde dochází k jejich ukládání. U savců je za normálního stavu uloženo 50-80% celkového retinolu (retinyl estery plus retinol) převážně právě ve formě retinyl esterů. Díky jaterním hvězdicovitým buňkám je hladina retinolu v plazmě stabilně udržována na koncentraci 1-2  $\mu\text{M}$  navzdory normální fluktuaci v denním příjmu vitamínu A.

Retinol navázaný na RBP tvoří v krevním řečišti komplex s proteinem známým jako transthyretin (TTR), který zabraňuje vyfiltrování relativně malé molekuly RBP v ledvinách. Absorpce komplexu retinol-RBP se děje s pomocí RBP receptorů na povrchu cílových buněk, jako je např. STRA6 (stimulated by retinoic acid 6). V plazmě jsou kromě retinolu a retinyl esterů přítomny i nanomolární koncentrace dalších retinoidů, jako jsou například kyselina all-*trans* retinová, 13-*cis* retinová, či 13-*cis*-4-oxo retinová (*Blomhoff and Blomhoff 2006; Bushue and Wan 2010; D'Ambrosio et al. 2011; Gutierrez-Mazariegos et al. 2011*).



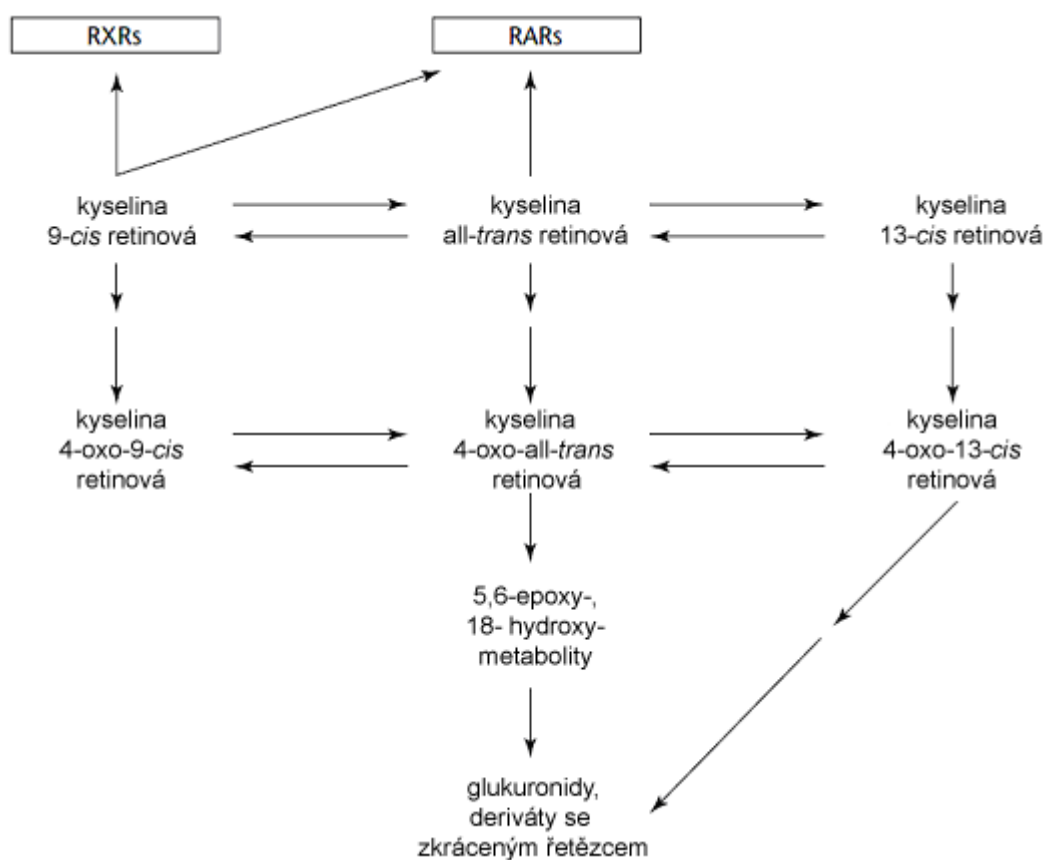
**Obr. 2 Signální dráha retinoidů.** Retinoidy absorbované z potravy jsou konvertovány na retinol a vázány na CRBP ve střevech. Retinol je dále metabolizován v krevním řečišti na retinyl estery. V játrech jsou retinyl estery vychytávány a v hepatocytech měněny na komplexy retinolu s RBP. Tyto komplexy, které jsou navázané na TTR z důvodu ochrany před eliminací v ledvinách, slouží k dopravě retinolu k cílovým buňkám. Transport do buněk je zprostředkován transmembránovými RBP receptory. V cílových buňkách je retinol buď vázán na CRBP, nebo oxidován na retinaldehyd a dále na kyselinu retinovou. Kyselina retinová může být navázána na CRABP, nebo směřuje do jádra, kde se váže na receptory a reguluje tak genovou transkripci, případně nengenomickými mechanismy reguluje buněčné funkce. Hepatocyty samozřejmě neslouží pouze ke zpracování retinoidů, ale samy mohou být i cílovými buňkami, navíc sousedí s hvězdčovitými buňkami, které jsou specializovány na ukládání retinoidů. (Bushue and Wan 2010)

V současné době je již obecně akceptována hypotéza, že aktivní metabolity retinoidů se syntetizují přímo v cílové buňce. Hlavním zdrojem této syntézy je u vyšších obratlovců *all-trans* retinol získávaný z plazmy. Nicméně buněčná absorpce lipoproteinů obsahujících retinyl estery, retinol a karotenoidy, stejně tak jako přímá absorpce kyseliny *all-trans* retinové a jejích derivátů z plazmy může hrát v metabolismu retinoidů důležitou roli. Právě kyselina *all-trans* retinová je hlavní aktivní buněčný metabolit retinoidů, který funguje v buňce jako aktivátor transkripčních faktorů (Blomhoff and Blomhoff 2006).

Všechny izomery kyseliny retinové používané jako terapeutika, tedy kyselina *all-trans* retinová, 13-*cis* retinová, a 9-*cis* retinová, jsou metabolizovány podobnou cestou, ačkoliv existují některé odlišnosti v jednotlivých zúčastněných enzymech. Všechny tyto



stereoizomery jsou metabolizovány oxidativní reakcí zprostředkovanou cytochromem P450. Oxidace probíhá nejprve na 4-hydroxy-deriváty a pak na 4-oxo-deriváty (Obr. 3). Na obou stupních tohoto metabolismu je možná vzájemná změna geometrické izomerie. Nicméně oxidace na čtvrté pozici je již nevratná. Bylo rovněž identifikováno množství méně významných metabolitů jako jsou 5,6-epoxy-tretinon a 18-hydroxy-tretinon, ale hlavními metabolity jsou 4-oxo deriváty, které mohou být dále transformovány na ve vodě rozpustné glukuronidy, jež se vylučují močí (Bryce and Cunningham 2004; Thatcher and Isoherranen 2009).

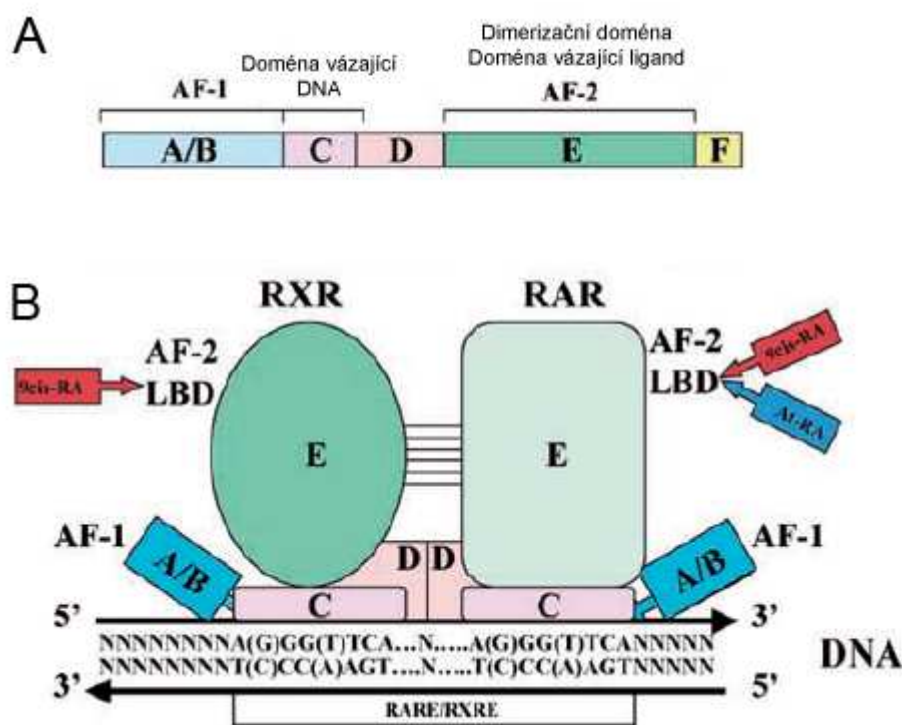


**Obr. 3 Metabolismus kyseliny retinové.** Oxidace probíhá nejprve na 4-hydroxy deriváty a dále na 4-oxo deriváty, přičemž na obou stupních tohoto metabolismu je možná vzájemná změna geometrické izomerie. Oxidace na čtvrté pozici je již nevratná. Metabolismus směřuje ke sloučeninám rozpustným ve vodě, které mohou být vyloučeny močí. (Bryce and Cunningham 2004)

## 2.1.2 Molekulární mechanismy působení retinoidů

### RAR a RXR receptory

Široká škála signálních drah, na jejichž regulaci se podílí kyselina retinová, je dána množstvím jaderných receptorů pro retinoidy. Tyto receptory patří do rodiny receptorů steroidních, resp. thyroidních hormonů a jsou dvojího typu: RAR (retinoic acid receptor) a RXR (retinoid X receptor). Každý z uvedených typů receptorů má tři subtypy ( $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ ) a každý subtyp se vyskytuje v několika různých izoformách. Receptory RAR mohou být aktivovány jak ATRA, tak 9-cis RA, oproti tomu RXR mohou být aktivovány pouze 9-cis RA (Xu 2007; Bushue and Wan 2010; Brtko and Dvorak 2011) (Obr. 4).



**Obr. 4** Receptory pro retinoidy – modulární struktura receptoru (A) a navázání dimeru na cílovou sekvenci RARE/RXRE (B). Receptory pro retinoidy mají 6 konzervativních domén A-F, přičemž hlavní funkční domény jsou doména C vázající DNA a doména E vázající ligand (LBD). Subdomény A a B jsou důležité pro transaktivaci. (Fontana and Rishi 2002)

Ačkoliv receptory RAR mohou dimerizovat pouze s RXR, receptory RXR tvoří nejen heterodimery s rozličnými receptory, ale mohou vytvářet i homodimery. RXR tvoří heterodimery s receptory pro mastné kyseliny (PPAR - peroxizomal proliferator activated

receptor), žlučové kyseliny (FXR - farnesoid x receptor), oxysteroly (LXR – liver x receptor), xenobiotika (PXR – pregnane x receptor, CAR – constitutive androstane receptor) a vitamín D (VDR – vitamine D receptor) (*Fontana and Rishi 2002; Bushue and Wan 2010*).

Receptorové dimery se mohou vázat na cílové geny obsahující specifické nukleotidové sekvence, známé jako responzivní elementy pro retinoidy (retinoic acid responsive elements = RAREs, resp. retinoid responsive elements = RXREs). Na komplex DNA s receptorovým dimerem se váže ligand, který je schopen vyvolat změnu konformace tohoto komplexu a tím spustit nebo zastavit transkripci cílového genu (*Fontana and Rishi 2002*).

Ve výše popsaných heterodimerech mohou receptory RXR hrát buď roli pasivního, nebo aktivního partnera. Pokud RXR slouží jako aktivní partner, k aktivaci heterodimeru a následné indukci genové exprese může posloužit jak 9-cis RA, tak ligand heterodimerního partnera. Díky těmto heterodimerům se kyselina retinová může podílet na regulaci různých drah v buňce. Pokud RXR slouží jako pasivní partner, heterodimer na RA nereaguje. Bez ohledu na aktivní či pasivní roli, pro správnou signalizaci skrze rozličné receptory musí být receptor RXR přítomen. Díky této pomocné roli mohou receptory RXR fungovat jako nadřazený regulátor různých signálních drah (*Bushue and Wan 2010*).

Receptory retinoidů ovšem mohou proces transkripce modulovat i nepřímo, obvykle prostřednictvím interakcí s ostatními transkripčními faktory a modifikací jejich aktivity. Například vazba komplexu kyseliny all-*trans* retinové s RAR na aktivační protein 1 (AP1) může vést k jeho represi. AP1 je heterodimerní transkripční faktor, složený z proteinů odvozených od Fos a Jun a navázání komplexu RA s RAR na AP1 vede k inhibici schopnosti c-Jun se vázat k DNA (*Schule et al. 1991; Benkoussa et al. 2002; Dedieu and Lefebvre 2006*).

V souvislosti s některými retinoidy byla také zaznamenána jejich schopnost inhibovat aktivitu transkripčního faktoru NFκB, a to jak prostřednictvím receptoru RXR (Na et al. 1999), tak nezávisle na receptorech (*Bayon et al. 2003*). Další popsanou interakcí, jež ilustruje širší působení retinoidů, je schopnost kyseliny retinové aktivovat signální dráhy PI3K/Akt a také MEK/ERK díky interakci receptoru RARα a proteinu p85, který slouží jako regulační podjednotka fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K) (*Masia et al. 2007*).

## 2.2 Možnosti modulace působení retinoidů

Vzhledem ke značné toxicitě retinoidů, která limituje jejich terapeutické využití, se pozornost zaměřuje na možnosti zvýšení biologického efektu retinoidů jejich kombinovanou aplikací s dalšími sloučeninami.

Jednou skupinou takových sloučenin mohou být interferony. Bylo prokázáno, že součinnost signálních drah interferonů a retinoidů vede k zesílení jejich antineoplastických účinků (Kalvakolanu 2004; Kalvakolanu et al. 2010b). Modulace retinoidů interferonem alfa (INF $\alpha$ ) byla prokázána při léčbě dlaždicobuněčného karcinomu kůže (Shin et al. 2002), rezistentního metastatického osteosarkomu (Todesco et al. 2000), či karcinomu prostaty (DiPaola et al. 1999). Indukce diferenciaci a apoptózy v důsledku kombinované aplikace ATRA s interferonem gama (INF $\gamma$ ) byla prokázána *in vitro* u buněk glioblastomu (Haque et al. 2007).

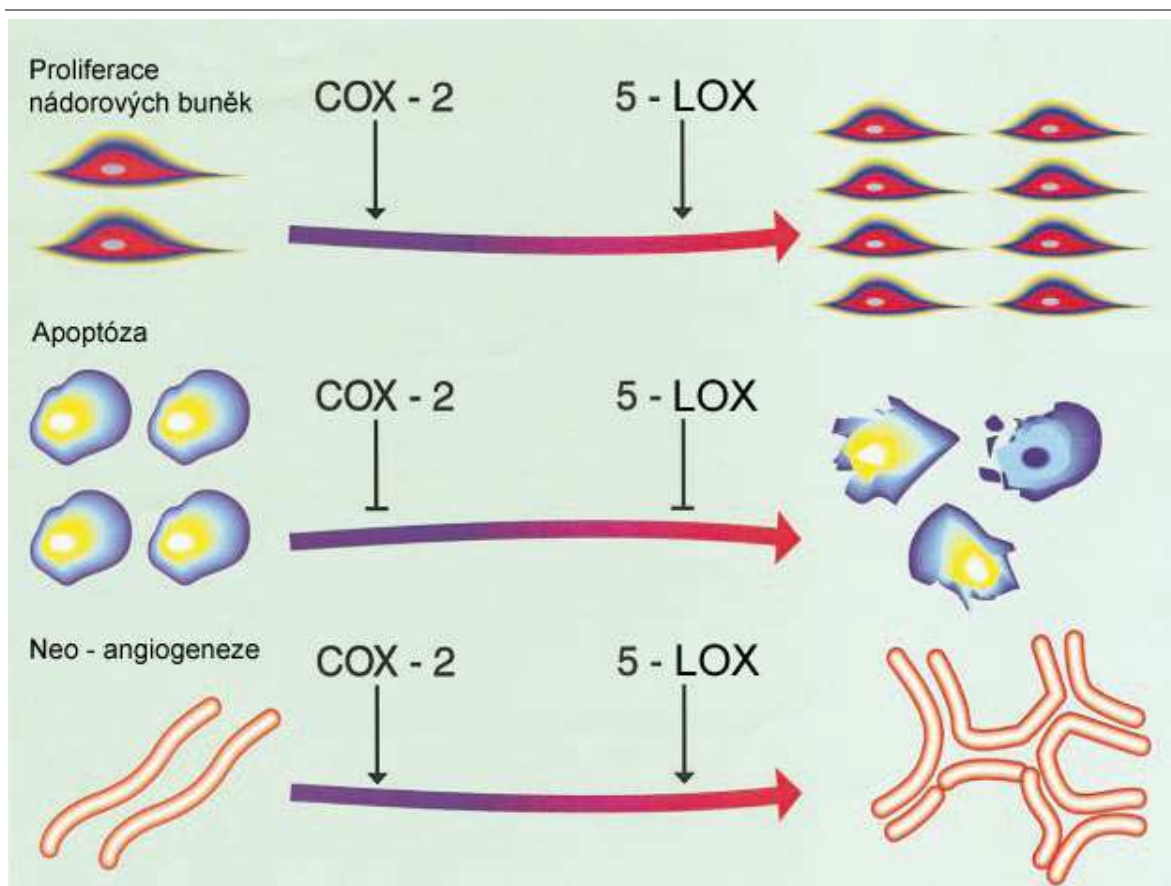
Popsáno bylo také použití kombinací retinoidů s analogy vitamínu D<sub>3</sub>, které fungují jako modulátory funkce jaderných receptorů (Barsony and Prufer 2002; Choi et al. 2011). Zvýšení indukované diferenciaci po aplikaci těchto kombinací bylo zaznamenáno u buněčných linií derivovaných z karcinomu prsu a nádoru endometria (Haselberger et al. 2011; Stefanska et al. 2011) a myelomonocytické leukémie (Defacque et al. 1997; Marti et al. 1997).

Kombinování retinoidů s inhibitory histonových deacetyláz (HDACi) se zdá být další slibnou strategií k potlačení rezistence vzniklé snížením počtu funkčních jaderných receptorů pro RA. Inhibice histonových deacetyláz má za následek rozvolnění DNA řetězce a usnadňuje tak přístup transkripčního aparátu k promotorovým oblastem (Spiller et al. 2006; De los Santos et al. 2007; Spiller et al. 2008). Příznivý efekt kombinací HDACi a retinoidů byl prokázán u hematologických malignit (Kuendgen et al. 2005; Trus et al. 2005; Cimino et al. 2006) a v současné době probíhají klinické studie i u solidních nádorů (David et al. 2010; Pili et al. 2012).

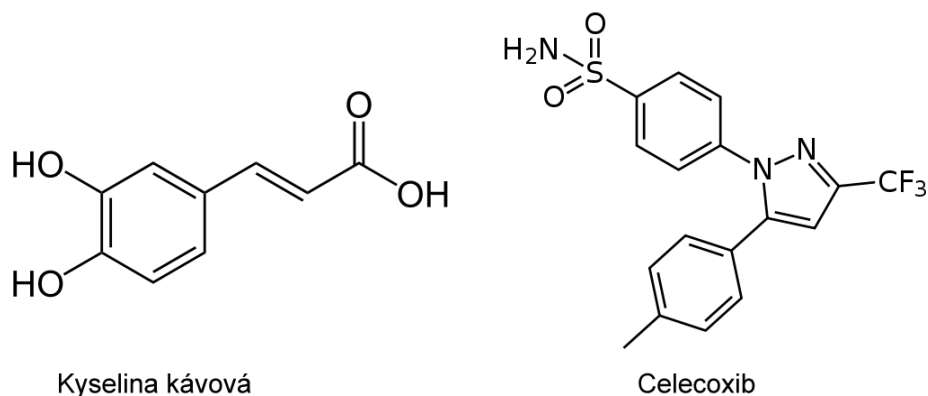
Sloučeniny, které jsou použity v této disertační práci, lze zařadit mezi tzv. RAMBAs (Retinoic Acid Metabolism Agents). Jedná se o sloučeniny, které se přímo nebo nepřímo účastní degradace retinoidů. Mezi tyto RAMBAs patří hlavně inhibitory cytochromu P-450, např. liarozol (Njar 2002; Njar et al. 2006; Ahmad 2011). Vzhledem k popisovaným účinkům by se k RAMBAs mohly řadit i inhibitory 5-lipoxygenázy (5-LOX) (Hofmanova et al. 1998; Veselska et al. 2004) a inhibitory cyklooxygenázy-2 (Simeone et al. 2004; Schroeder et al. 2006). Výhodou těchto inhibitorů je, že potlačují

známé biologické účinky LOX a COX, jako jsou stimulace proliferace, inhibice apoptózy a indukce neo-angiogeneze (Romano and Claria 2003) (Obr. 5).

Synergický efekt s retinoidy byl popsán také u arseniku ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) (Hu et al. 2000; Zhang et al. 2001; Geng et al. 2011), žlučových kyselin (Zimber et al. 1994; Zimber et al. 2000), kurkuminu a vitamínu E (Sokoloski and Sartorelli 1998).



**Obr. 5 Biologické účinky 5-LOX a COX-2.** Obě sloučeniny jsou schopny stimulovat proliferaci, inhibovat apoptózu a indukovat neo-angiogenezi (Romano and Claria 2003).



**Obr. 6 Strukturní vzorce inhibitorů metabolismu kyseliny retinové.** Kyselina kávová - inhibitor 5-lipoxygenázy; celecoxib - inhibitor cyklooxygenázy-2.

### 2.2.1 Kyselina kávová

Kyselina kávová (CA) je redoxní inhibitor 5-LOX (Obr. 6). 5-LOX je dioxygenáza, která se podílí na syntéze leukotrienů z kyseliny arachidonové (Dixon *et al.* 1988). Leukotrieny jsou biologicky aktivní při zánětlivých procesech, při alergických onemocněních, ale také při kardiovaskulárních a onemocněních (Noguchi and Okubo 2011; Burnett and Levy 2012).

CA je zástupcem skupiny rostlinných fenolických sloučenin. V mnoha druzích vyšších rostlin je syntetizována z L-fenylalaninu, případně L-tyrosinu jako sekundární metabolit šikimátové dráhy. V různých druzích plodů (jablka, hrušky, bobulové ovoce, vinné hrozny, artyčoky, lilek aj.) se CA vyskytuje ve formě kyseliny chlorogenové, což je ester kyseliny kávové s kyselinou chinonovou. CA i kyselina chlorogenová jsou z potravy u člověka dobře absorbovány, ovšem přesné stanovení této absorpční frakce komplikuje jejich degradace střevní mikroflórou (Olthof *et al.* 2001a). CA je v mikromolárních koncentracích postprandiálně přítomna také v krevní plazmě (Nardini *et al.* 2000; Olthof *et al.* 2001b) a její specifické metabolity mohou být detekovány v moči (Rechner *et al.* 2001).

Kromě již zmíněné schopnosti fungovat jako specifický inhibitor 5-LOX byl u CA a jejích derivátů detekován bohatý repertoár biologicky důležitých vlastností, například antioxidační vlastnosti, schopnost inhibice různých enzymů (LOX, COX, glutathion S-transferázy a xanthin-oxidázy), protizánětlivé, antivirové a imunostimulační účinky atd. Díky těmto biologickým účinkům, ale také díky schopnosti CA a jejích derivátů inhibovat procesy metastazování (Kang *et al.* 2011) a angiogeneze (Kim *et al.* 2009; El-Refaei and El-Naa 2010) nacházejí tyto sloučeniny uplatnění i jako chemoterapeutická agens (Michaluart *et al.* 1999; Koltuksuz *et al.* 2001; Borrelli *et al.* 2002; Son and Lewis 2002).

Rovněž u inhibitorů LOX byly popsány synergické efekty s retinoidy. Inhibice 5-LOX pomocí dvou strukturně odlišných inhibitorů, MK-886 a eskulentinu, je schopná potencovat diferenciaci indukovanou pomocí ATRA u leukemické buněčné line HL-60 (Hofmanova *et al.* 1998). V zmíněné práci byly jako inhibitory použity esculentin a MK-886, nicméně k podobné výsledky byly na stejné buněčné linii dosaženy i s CA (Veselska *et al.* 2004) s fenetyl-esterem kyseliny kávové (caffeic acid phenethyl ester - CAPE), což je významná složka propolisu (Kuo *et al.* 2006).

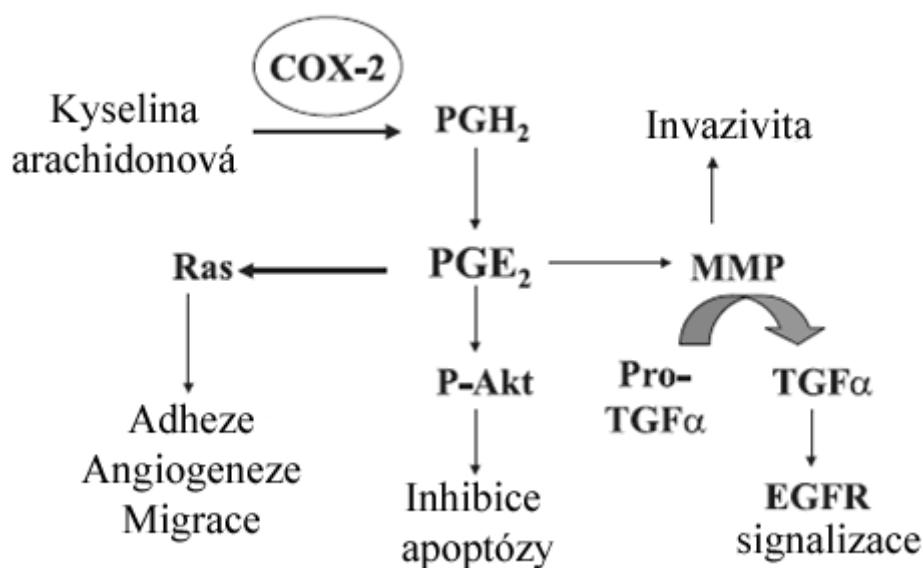
Molekulární mechanismus, jehož prostřednictvím inhibice LOX může zesilovat biologické působení retinoidů, stále ještě nejsou přesně známy. Nicméně metabolická dráha retinoidů zahrnuje množství redoxních kroků, při kterých se angažují různé enzymy

(Crosas *et al.* 2003). Některé práce zmiňují možnou inhibici těchto enzymů. Byla například popsána inhibice epoxidace kyseliny retinové pomocí kyseliny chlorogenové (Iwahashi *et al.* 1986), nebo inhibice některých aldo-keto reduktáz, které se podílejí na metabolismu retinoidů, právě v důsledku aplikace CAPE (Soda *et al.* 2012)

### 2.2.2 Celecoxib

V této práci je jako specifický inhibitor cyklooxygenázy-2 (COX-2) používán celecoxib (CX) (Obr. 6). Jde o látku patřící mezi nesteroidní protizánětlivá léčiva (-non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs), která jsou primárně používána k léčbě zánětlivých onemocnění.

NSAIDs jsou inhibitory cyklooxygenáz, což jsou enzymy katalyzující přeměnu kyseliny arachidonové na prostanoidy (prostaglandiny, prostacykliny a tromboxany). Izoforma COX-1 je exprimována běžně v různých tkáních a uplatňuje se při modulaci rozličných fyziologických procesů. Oproti tomu exprese izoformy COX-2 je indukována cytokiny a růstovými faktory při procesech spojených se zánětem a také při vývoji nádorů (Lynch 2001; Baek and Eling 2006). Aktivita COX-2 je spojována s procesy karcinogeneze, inhibicí apoptózy, podporou angiogeneze a také s metastázováním (Dannenberga *et al.* 2001; Ghosh *et al.* 2010) (Obr. 7).



**Obr. 7 Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) jako hlavní efektor COX2.** PGE<sub>2</sub> inhibuje apoptózu, podporuje buněčnou adhezi, motilitu, invazivitu a angiogenezi (Ghosh *et al.* 2010).

S rozšiřujícím se množstvím poznatků o interakcích a vazbách mezi metabolismem lipidů a nádorovou progresí se tak COX-2 stále častěji stává cílem protinádorové terapie. Růstová inhibice nebo indukce apoptózy působením celecoxibu byly prokázána u buněk karcinomu prostaty (*Dandekar et al. 2005*) i u buněk hepatocelulárního karcinomu (*Kern et al. 2004*). Byla také popsána schopnost CX opětovně nastolit správné fungování proteinu p53 u buněk neuroblastomu (*Lau et al. 2007*) a byl také prokázán jeho antiangiogenní vliv (*Klenke et al. 2006; Conde et al. 2011*).

Na základě některých prací lze předpokládat, že inhibice COX-2 by mohla nejen ovlivňovat procesy spojené s nádorovou progresí, ale že je také schopná potencovat biologický efekt některých retinoidů. Bylo zjištěno, že inhibice COX-2 vedla ke zvýšení proapoptotického efektu syntetického retinoidu N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR) u buněk karcinomu prsu (*Simeone et al. 2004*).

Přeměna kyseliny arachidonové pomocí COX na prostanoidy je jen jednou ze tří metabolických drah kyseliny arachidonové. Jak se ukazuje, aplikace specifických NSAIDs, které blokují pouze COX, může vyvolat zvýšenou aktivitu transformace kyseliny arachidonové na leukotrieny; tato transformace je katalyzována LOX. To může být příčinou nepříznivých vedlejších efektů používaných léčiv, neboť přebytek leukotrienů je schopen způsobit vykazovat orgánovou toxicitu (*Burnett and Levy 2012*). Jako možné řešení tohoto problému jsou vyvíjeny látky, které fungují zároveň jako inhibitory COX i LOX (*Burnett and Levy 2012*), navíc při společném působení vykazují výrazně lepší výsledky (*Ishii et al. 1994*).

Dalším známým mechanismem, jak mohou COX-2 inhibitory potencovat působení retinoidů, je ovlivnění signální dráhy PI3K/Akt. U premaligních lidských bronchiálních buněk byla pomocí syntetického retinoidu 4-HRP v kombinaci s celecoxibem potlačena fosforylace serin/threoninové kinázy Akt - a to s větší efektivitou, než po použití obou činidel samostatně. V důsledku snížené fosforylace kinázy Akt byla pozorována inhibice růstu buněk a indukce apoptózy, což bylo následně potvrzeno tím, že buňky s vysokou konstitutivní expresí aktivní kinázy Akt vykazovaly rezistenci vůči působení celecoxibu v kombinaci s 4-HRP (*Schroeder et al. 2006*).

U buněk karcinomu prsu bylo popsáno, že nadměrná aktivace receptoru ErbB2 (HER2/Neu) indukuje prostřednictvím Akt kinázy expresi COX-2 a tím redukuje senzitivitu buněk k 4-HRP. Inhibice COX-2 v kombinaci s 4-HRP vedla ke zvýšení citlivosti buněk k indukci apoptózy. Naopak apoptotický efekt 4-HRP a COX-2 inhibitoru byl redukován exogenním přidáním prostaglandinu E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), což naznačuje, že zvýšená



exprese PGE<sub>2</sub> je jedním z mechanismů, které jsou příčinou rezistence buněk k retinoidům (Simeone *et al.* 2004). PGE<sub>2</sub> je navíc znám také svou rolí negativního regulátoru tvorby kyseliny retinové z retinalu prostřednictvím retinal dehydrogenázy (Stock *et al.* 2011). Nicméně podle práce Liu J. P. *et al.* (2009) celecoxib může zesilovat efekt ATRA i mechanismem nezávislým na COX-2, jak bylo prokázáno na buněčných liniích derivovaných z nádorů tlustého střeva.

Působení retinoidů ovšem může také vést k indukci exprese COX-2 a následné zvýšené tvorbě prostanoidů. Schopnost indukovat COX-2 byla prokázána nejen na myších buňkách (Alique *et al.* 2007b; Kim *et al.* 2008), ale také u lidských endoteliálních buněk (Camacho *et al.* 2008) a u buněk lidské neuroblastomové linie SH-SY5Y (Alique *et al.* 2007a).

Je tedy možné, že zvýšení hladiny ATRA se projeví i zpětnovazebně zvýšenou expresí prostanoidů, které se podílí na inhibici působení retinoidů. Narušení této zpětné vazby inhibicí COX-2 tak může vést ke zvýšení efektivity retinoidů.

## **2.3 Metody hodnocení biologického účinku retinoidů na molekulární a buněčné úrovni**

Moderní experimentální biologie nabízí velké množství metod, jakými lze sledovat různé aspekty antineoplastického působení retinoidů na buněčné i molekulární úrovni – pomocí různých technik je možné u ovlivněných buněčných populací hodnotit průběh buněčné diferenciaci, indukci apoptózy, změny buněčného cyklu a proliferací aktivity, interakci retinoidů s intracelulárními proteiny i změny genové exprese. Následuje proto krátký přehled metod, které se při studiu retinoidů s využitím buněčných linií v podmínkách *in vitro* používají nejčastěji.

### **2.3.1 Metody hodnocení buněčné diferenciaci**

Mezi základní metody sledování průběhu diferenciaci patří přímé mikroskopické pozorování buněčné morfologie. Je známo, že během diferenciaci některé typy buněk výrazně mění svůj tvar, případně lze pozorovat další morfologické změny. Například u buněk neuroblastomu lze následkem působení retinoidů sledovat zvýšení počtu protruzí a diferencované buňky tak svou morfologií připomínají neurony (Ponzoni *et al.* 1995; Lovat

*et al. 1997; Redova et al. 2010*). V případě studia buněk akutní promyelocytární leukémie linie HL-60 byla pozorována změna promyelocytů na buňky morfologicky odpovídající granulocytům, v nichž byla patrná segmentace buněčného jádra (*Huang et al. 1988; Zitterbart and Veselska 2001*).

Sofistikovanější metody detekce změn spojených s buněčnou diferenciací indukovanou retinoidy se opírají o specifické markery diferenciace. Markerem se zde rozumí molekula, nejčastěji protein, jenž se specificky vyskytuje v diferencovaném stádiu příslušného buněčného typu. Pro semikvantitativní hodnocení exprese markeru se využívá metoda westernového přenosu, za pomoci níž lze stanovit množství proteinu v buněčném lyzátu (*Redova et al. 2010; Marzinke and Clagett-Dame 2012*), je možné použít také metodu ELISA (*Liu et al. 2009*), nebo imunologické značení s následnou detekcí množství přítomného proteinu pomocí průtokové cytometrie (*Hofmanova et al. 1998; Veselska et al. 2004; Konopka et al. 2008; Neumann et al. 2010*). Mnohdy může být také důležité sledovat diferenciační marker *in situ* s využitím imunocytochemického nebo imunofluorescenčního značení (*Ponzoni et al. 1995; Fabricius et al. 2011*). Při pozorování preparátu fluorescenčním mikroskopem je sice problematické kvantifikovat množství přítomného proteinu, výhodou ovšem je možnost sledovat distribuci proteinu v buňce, vytváření specifických struktur a v případně vícenásobného značení i možné interakce s dalšími proteiny.

### 2.3.2 Metody hodnocení proliferace

Je obecně známo, že proliferační aktivita u diferencovaných buněk je snížena oproti buňkám nediferencovaným. Ostatně právě potenciál omezit proliferaci neoplastických buněk je jedním z důvodů zájmu o diferenciační terapii retinoidy v onkologii. Nejčastěji používané proliferační testy fungují nejčastěji na principu detekce metabolické přeměny určité sloučeniny na jiný, snadno detekovatelný produkt. Používá se tak například žlutá tetrazoliová sůl MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid), která se díky aktivitě mitochondriálních dehydrogenáz mění na tmavě modrý krystalický formazan, který se následně rozpouští v dimetylsulfoxidu (DMSO). Test se standardně provádí na mikrotitračních destičkách. Na spektrofotometru snadno měřitelná intenzita zabarvení tak odpovídá množství přítomných metabolizujících mitochondrií, potažmo živých buněk a umožňuje stanovit rozdíly v proliferaci mezi různými experimentálními

variantami (*Faderl et al. 2003; Veselska et al. 2004; Redova et al. 2010; Fabricius et al. 2011*). Existují i modifikace této metody, založené např. na solích WST nebo XTT, jejichž metabolické produkty nejsou krystalické a odpadá tak krok s rozpouštěním v DMSO (*Redova et al. 2010; Fabricius et al. 2011*).

I při hodnocení buněčné proliferace lze využít možností průtokové cytometrie. Jednoduchou, ačkoliv pro hodnocení proliferace spíše orientační metodou může být sledování buněčného cyklu za pomoci interkalačních barviv, například propidium jodidu (*Lovat et al. 1997; Faderl et al. 2003; Redova et al. 2010*).

Existují rovněž protokoly zaměřené přímo na sledování proliferace, jako například inkorporace 5-bromo-2'-deoxyuridinu (BrdU) do buněčné DNA během S-fáze buněčného cyklu s následnou detekcí pomocí anti-BrdU protilátky (*Marzinke and Clagett-Dame 2012*).

### 2.3.3 Metody hodnocení apoptózy

Dalším důležitým parametrem, který je při ovlivňování buněk retinoidy obvykle sledován, je frekvence apoptózy (*Hail et al. 2006*). Pro její hodnocení může orientačně napomoci výše zmíněná analýza buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie. Jsou-li v buněčné populaci přítomny apoptotické buňky jejichž obsah DNA je nižší než u buněk neapoptotických na histogramu DNA je lze detekovat jako tzv. subdiploidní pík. Na druhou stranu nelze touto metodou zachytit buňky v iniciační fázi apoptózy, u kterých ještě nedošlo k fragmentaci DNA a rozpadu na apoptotická tělíška. Průtoková cytometrie se rovněž využívá v rámci dalších specifických detekčních postupů - např. značení annexinem V, detekce aktivovaných kaspáz nebo produktů proteolytického štěpení, detekce změn membránového potenciálu mitochondrií, prostup barviv přes poškozenou plazmatickou membránu a další (*Faderl et al. 2003; Neumann et al. 2010; Gupta et al. 2012*).

Mezi další možnosti detekce apoptózy patří izolace DNA a sledování její internukleosomální fragmentace při elektroforéze v agarózovém gelu, kdy se vytváří tzv. žebříček (*Ponzoni et al. 1995; Maurer et al. 1999*). Pro hodnocení fragmentace DNA při apoptóze lze využít také průtokovou cytometrii, nebo metodu TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) s pomocí specificky značených 3'OH konců DNA (*Osone et al. 2004*).

### 2.3.4 Metody hodnocení genové exprese

Jakýkoliv zásah do buněčných procesů se pochopitelně odráží i ve změnách exprese rozličných genů. Sledování změny exprese jednotlivých vybraných genů se provádí pomocí RT-PCR (Neumann *et al.* 2010; Sun *et al.* 2010), případně pomocí přesnější kvantitativní RT-PCR v reálném čase (Knutson and Clagett-Dame 2008). Pro paralelní analýzu exprese velkého počtu genů se pak využívají metody funkční genomiky, jako např. DNA mikročipy (Kim *et al.* 2006; Garzon *et al.* 2007; Cheepala *et al.* 2009; Das *et al.* 2010; Neumann *et al.* 2010). Vzhledem k tématu předkládané práce je technologie DNA mikročipů stručně shrnuta v následující podkapitole.

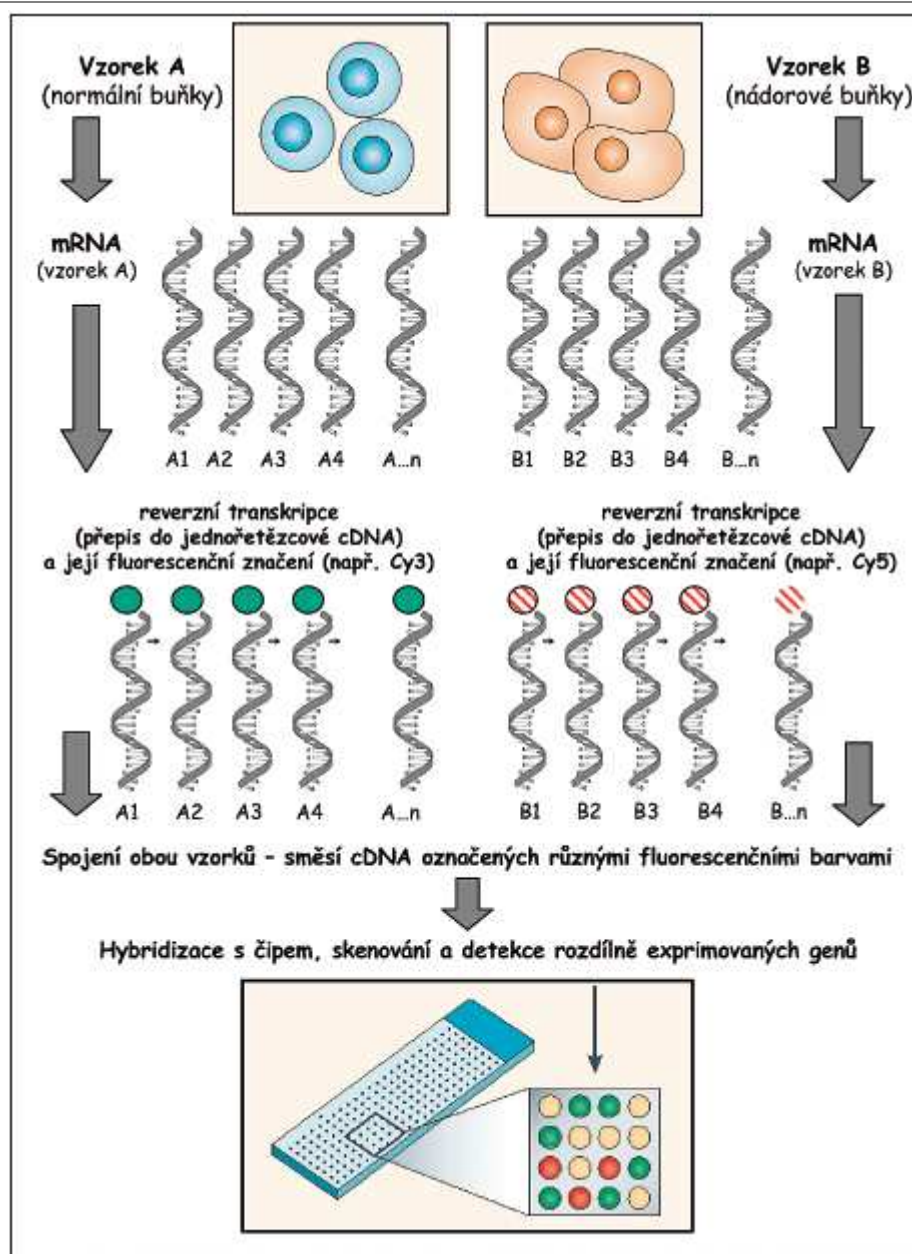
#### Technologie DNA mikročipů

DNA mikročipy představují metodu založenou na paralelní hybridizaci značeného vzorku DNA se specifickými DNA sondami imobilizovanými na pevném podkladu. Nejčastěji se jedná o sklíčka, případně membrány, na jejichž povrchu jsou upevněny jednořetězcové sekvence DNA v tzv. spotech. Tyto sekvence díky své jedinečnosti reprezentují jednotlivé geny. V současnosti používané technologie se v mnohém vzájemně liší a lze je rozdělit podle různých hledisek:

- Podle počtu sond se lze setkat s nízkohustotními čipy, které nesou desítky až stovky sond, nebo s čipy vysokohustotními, které jich nesou tisíce až miliony.
- Nejčastějším druhem sond jsou oligonukleotidy, méně často je však možné se setkat i s fragmenty cDNA, nebo BAC (bakteriální arteficiální chromozomy) a PAC (P1-odvozené arteficiální chromozomy), jež jsou užívány pro komparativní genomovou hybridizaci.
- Značení vzorku je nejčastěji fluorescenční, méně často pak chemiluminiscenční či radionuklidové. Fluorescenční značení umožňuje označit více vzorků různými fluorofory a následně je analyzovat společně. Nejčastěji se používají jednokanálové a dvoukanálové technologie, neboť vícekanálové metody komplikuje spektrální překryv fluoroforů a nedostatek prověřených statistických metod pro analýzy výsledků.
- DNA čipy mohou být konstruovány jak na detekci RNA a tedy výzkum transkriptomu, tak na detekci DNA a tedy výzkum genomu. Čipy určené pro analýzu transkriptomu mohou detekovat expresi mRNA, expresi krátkých RNA (microRNA, snoRNA atd.)

a také expresi jednotlivých exonů, díky čemuž je možné sledovat alternativní sestřih exprimovaných genů. Čipy pro analýzu genomu pak zahrnují arrayCGH sledující změny v počtu kopií úseků DNA, SNP čipy pro genotypizaci, která je zajišťována sondami schopnými rozlišit jednotlivé známé jednonukleotidové polymorfismy (SNP - „single nucleotide polymorphism“), a dále pak čipy pro epigenetické analýzy.

Výchozím materiálem pro analýzu genové exprese je izolovaná mRNA, která je téměř vždy pomocí reverzní transkriptázy přepsána do komplementární DNA (cDNA). Tato cDNA může obsahovat značené nukleotidy a být přímo použita pro hybridizaci (Obr. 8). Přímé použití značené cDNA je sice jedním z nejjednodušších a nejméně finančně náročných řešení, ale vzhledem k tomu, že se neprovádí amplifikace vzorku, je zapotřebí poměrně velké množství materiálu. Proto se často používá přepis RNA do cDNA, která následně slouží jako templát pro přepis značené RNA. (*Ye and Day 2003; Svoboda and Michalek 2004; Pospisilova and Mayer 2005; Tichy 2010*).



**Obr. 8 Příklad dvoukanálového DNA čipu.** Výhodou je použití dvou vzorků, nejčastěji testovaného vzorku a vzorku referenčního. Vyizolovaná mRNA je přepsána do cDNA, která je značená odlišnou fluorescenční značkou (např. Cy3 a Cy5). Následuje smísení a hybridizace s čipem. Excitace hybridizačních jednotek probíhá pomocí dvou laserových paprsků. Intenzita záření emitovaného odlišnými fluorofory odpovídá obsahu testované (Cy5) a referenční (Cy3) cDNA na příslušné jednotce. Poměr Cy5/Cy3 je pak vyjádřen v pseudobarevném zobrazení. (Pospisilova and Mayer 2005)

## 2.4 Solidní nádory dětského věku

V rámci této disertační práce byly k experimentům používány buněčné linie derivované ze dvou typů neurogenních solidních nádorů dětského věku - neuroblastomu a meduloblastomu. Tyto histogenetické typy nádorů byly pro studii možností ovlivnění diferenciačního potenciálu retinoidů zvoleny zejména z důvodu četnosti jejich výskytu: neuroektodermální nádory jsou nejčastějšími solidními nádory u dětí vůbec. Dalším důvodem pro volbu uvedených typů nádoru jsou dříve publikované výzkumy, které potvrzují opodstatněnost terapeutického použití retinoidů právě pro léčbu těchto nádorů (*Reynolds and Lemons 2001; Reynolds et al. 2003*).

### 2.4.1 Neuroblastom

Neuroblastom (NBL) je embryonální nádor periferní nervové soustavy, který vzniká z nediferencovaných buněk sympatiku, a je nejčastějším extrakraniálním solidním nádorem dětského věku. U dětí do 15 let věku představuje asi 7 % ze všech nádorových onemocnění, ale celými 15 % se podílí na úmrtí na nádorové onemocnění. 90 % diagnostikovaných neuroblastomů se vyskytuje u dětí do 10 let věku a jedná se vůbec o nejčastější nádorové onemocnění dětí do jednoho roku věku. Naproti tomu u adolescentů a mladých dospělých je tento typ nádoru vzácný. Rozložení případů je rovnoměrné mezi muži a ženami (*Sterba et al. 2002; Mazánek et al. 2008*).

Neuroblastom je společně s rhabdomyosarkomem, Ewingovým sarkomem a lymfomem řazen do skupiny tzv. nádorů z malých modrých kulatých buněk (small round blue cell tumours) (*Gregorio et al. 2008*). Prekurzorovou buňkou neuroblastomu je nediferencovaný neuroblast pocházející z neurální lišty. V průběhu embryonálního vývoje buňky neurální lišty extenzivně migrují do celého těla a diferencují do řady buněčných typů. Tvoří nejen součásti periferního nervového systému, podílejí se i na stavbě žláz s vnitřní sekrecí, jako je dřeň nadledvin či kalcitonin secernující buňky. Primární nádor je tak buď adrenální, nebo extraadrenální ze sympatických ganglií v oblasti hlavy až pánve (*Gao et al. 2007; Mazánek et al. 2008*) (Obr. 9).



**Obr. 9 Lokalizace neuroblastomu.** Primární nádory jsou odvozeny z buněk neurální lišty a vznikají tak v periferním nervovém systému včetně dřeně nadledin, sympatických a parasympatických ganglií. Neuroblastom nejčastěji metastázuje v lymfatických uzlinách, kostech a kostní dřeni, u kojenců také v játrech a podkožní tkáni. (Johnsen et al. 2009)

S rozličným původem pravděpodobně souvisí i biologická variabilita neuroblastomu, která podmiňuje i různý klinický průběh onemocnění u jednotlivých pacientů. Některé nádory tak mohou spontánně regredovat nebo diferencovat do benigních ganglioneuromů. Na druhou stranu více než polovina pacientů má v době diagnózy detekovatelné metastázy nebo velký, agresivní, lokalizovaný nádor. Navzdory intenzivní terapii je šance pacientů s neuroblastomem vysokého rizika na trvalé vyléčení jen okolo 40 % (Weinstein et al. 2003; Wood and Lowis 2008).

Klinické příznaky onemocnění jsou jednak systémové, mezi něž patří zejména únava, celková slabost, nechutenství, neprospívání na váze, změny chování nebo anémie. Dále se pak mohou objevovat příznaky závislé na lokalizaci primárního nádoru či metastáz: mezi tyto příznaky často patří např. bolesti končetin při metastázách v kostech, problémy s vyprazdňováním moče a stolice, bolesti břicha, anorexie, zvracení apod.

Dědičnou predispozici k neuroblastomu má jen 1-2 % pacientů. V naprosté většině případů se jedná o sporadické onemocnění (Mazánek et al. 2008; Wood and Lowis 2008; Deyell and Attiyeh 2011). Stejně jako je neuroblastom variabilní v klinickém chování, je variabilní i v biologických charakteristikách. Některé z těchto biologických znaků jsou asociovány s agresivitou onemocnění a jsou tak využívány jako prognostické faktory. Nejčastěji používanými prognostickými faktory u neuroblastomu jsou:



- **Ploidie DNA:**

Triploidní a hyperdiploidní neuroblastomy, u kterých došlo ke změnám v počtu celých sad chromosomů, jsou méně agresivní a vykazují lepší odpověď na chemoterapii. Naproti tomu neuroblastomy s diploidním nebo téměř diploidním obsahem DNA, vykazující obecně genomickou nestabilitu s četnými chromosomálními přestavbami a translokacemi genetického materiálu jsou řazeny do skupiny nádorů s vysokým stupněm rizika (*Look et al. 1984; Wood and Lowis 2008*).

- **Amplifikace MYCN:**

Onkogen *MYCN* je normálně lokalizován na krátkém raménku chromozomu 2. Jeho amplifikace, která se vyskytuje u 20-25 % případů, je také nepříznivým prognostickým faktorem (*Mazánek et al. 2008; Wood and Lowis 2008*). N-myc je členem proteinové rodiny Myc: proteiny z této rodiny fungují jako transkripční faktory, které stimulují buněčný růst a proliferaci, působí proti diferenciaci a zástavě buněčného cyklu (*Grandori et al. 2000; Wood and Lowis 2008*).

- **Další chromosomální abnormality:**

Kromě amplifikace onkogenu *MYCN* bylo u neuroblastomu detekováno několik dalších chromosomálních abnormalit s prognostickým významem. Jedná se například o delecí krátkého raménka chromozomu 1 (del 1p), která se vyskytuje u 23 % pacientů a ačkoliv je často asociována s amplifikací *MYCN*, představuje nezávislý prediktivní faktor pro časnou progresi choroby, ale nemá vliv na délku celkového přežití. Delece dlouhého raménka chromozomu 11 (del 11q), která je detekována u 34 % pacientů, je sice také negativním prognostickým faktorem, jako del 1p a amplifikace *MYCN*, ale je zajímavé, že se nejčastěji nachází v buňkách, kde nedochází k amplifikaci *MYCN* (*Mazánek et al. 2008; Wood and Lowis 2008*).

Biologická variabilita neuroblastomu vedla k vývoji širokého spektra léčebných přístupů. Léčba neuroblastomu je koncipovaná dle individuálně stanoveného stupně rizika nepříznivého průběhu onemocnění. Stupeň rizika (nízký, střední nebo vysoký) se stanovuje na základě hodnocení klinických, biologických a genetických prognostických faktorů. Zatímco trvalé vyléčení dětí s neuroblastomem nízkého rizika je možné ve více než 95 % případů, u neuroblastomu středního rizika je vyléčeno již jen asi 85 % pacientů. U většiny dětí s neuroblastomem vysokého rizika však i intenzivní léčba selhává a na trvalé vyléčení má šanci jen přibližně 40 % pacientů. U dětí s amplifikací *MYCN* a nádorem 4. klinického stadia je vyléčení možné jen u 15 až 20 % z nich. Proto se v poslední době snahy soustředí

zejména na možnost zlepšení léčebných výsledků u dětí s neuroblastomem středního nebo vysokého rizika (*Mazánek et al. 2008*).

## 2.4.2 Meduloblastom

Meduloblastom (MBL) je nejčastějším embryonálním nádorem CNS u pacientů dětského věku. Ačkoliv se jedná o relativně vzácné onemocnění s incidencí 6,5 nových případů na milion dětí ve věkové skupině 0-14 let, je příčinou celých 10% úmrtí spojených s nádorovým onemocněním u dětí (*Massimino et al. 2011; Zitterbart et al. 2011*). Věk při diagnóze se nejčastěji pohybuje mezi 1 a 9 roky. Prokazatelně vyšší incidence (okolo 60 %) byla zjištěna u chlapců (*Massimino et al. 2011*).

Onemocnění meduloblastomem je řazeno mezi primitivní neuroektodermální nádory (PNET), a pravděpodobně zahrnuje několik biologicky odlišných nádorových podtypů pocházejících z kmenových, resp. progenitorových buněk mozečku. Obvyklou lokalizací tohoto nádoru je strop nebo spodina IV. mozkové komory. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) existuje alespoň pět rozličných histologických typů meduloblastomu: klasický, desmoplastický/nodulární, s extenzivní nodularitou, anaplastický a velkobuněčný. V poslední době byly s pomocí transkripčního profilování mRNA (*Kool et al. 2008*) a microRNA (*Thompson et al. 2006; Ferretti et al. 2008*) identifikovány čtyři podskupiny meduloblastomu s odlišným RNA profilem. Přitom se ukázalo, že na původu buněk a s tím spojené aktivitě signálních drah závisí prognóza onemocnění a potenciální odpověď na léčbu (*de Bont et al. 2008; Kim et al. 2011; Roussel and Hatten 2011*).

Vzhledem k popsané variabilitě tohoto onemocnění, je patrným trendem výzkumu meduloblastomu detekce biomarkerů, které by umožnily přesnější diverzifikaci pacientů a optimalizaci konvenčních léčebných postupů (*Ellison et al. 2011*).

Genetické a molekulárně genetické analýzy meduloblastomu identifikovaly změny v regulaci signálních drah, které jsou za fyziologických podmínek důležité pro růst a neurogenezi mozečkových progenitorových buněk. Patří mezi ně dráhy klíčové pro regulaci růstu, konkrétně Shh/Patched, Wnt, Notch, IGF/PTEN/mTOR a BMP (*Roussel and Hatten 2011*). Stejně jako u neuroblastomu i u meduloblastomu byl prokázán negativní prognostický význam zvýšeného počtu kopií onkogenů *MYCC* a *MYCN* (*Zitterbart et al. 2011*).



**Obr. 10 Lokalizace meduloblastomu.** Obvyklou lokalizací primárního nádoru meduloblastomu je IV.komora mozková a někdy prorůstá i do mozečkových hemisfér. Metastázy meduloblastomu se nejčastěji vyskytují v CNS (Neto *et al.* 2003).

Dalším z diskutovaných prognostických markerů u meduloblastomu je exprese a intracelulární lokalizace N-koncových izoform proteinu p73. Tento protein je znám svou nezastupitelnou rolí pro normální vývoj a funkce nervové tkáně (Hernandez-Acosta *et al.* 2011; Killick *et al.* 2011). Přesto doposud chybí ucelenější informace o expresi izoform p73 u nádorů mozku, a to včetně informací o prognostickém a prediktivním potenciálu. Nicméně první studie izoform p73 u meduloblastomu ukazují, že pomocí imunohistochemie detekované zvýšení exprese p73 $\alpha$  a  $\Delta$ Np73 je spojeno s agresivnějším průběhem nemoci (Zitterbart *et al.* 2007), zatímco exprese izoformy TAp73 je spojována s lepší prognózou (Castellino *et al.* 2007).

Současná terapie všech meduloblastomů nezávisle na podskupině zahrnuje kombinace chirurgické resekce nádoru, radioterapie a systémové chemoterapie. Ačkoliv pokroky v radiační terapii a chemoterapii vedly k významnému zvýšení hodnoty celkového přežití až na úroveň 80 % pro onemocnění standardního rizika, nynější léčebné postupy se stále potýkají s významnou morbiditou a nepříznivými vedlejšími účinky. Kromě akutních nežádoucích účinků, které se vyskytují většinou v důsledku podání chemoterapie a k nimž patří leukopenie, trombocytopenie, anemie, nauzea a zvracení, jsou pacienti vystaveni i pozdním následkům léčby, mezi něž lze zařadit neurokognitivní deficit (snížené IQ pod 85), dále pak neschopnost koncentrace, poruchy paměti a čtení, zvýšené riziko sociálních problémů a další (Massimino *et al.* 2011; Roussel and Hatten 2011).

Proto i v případě meduloblastomu je důležité snažit se hledat takové léčebné modality, které by umožnily minimalizovat toxicitu terapie a přitom zachovat nebo lépe ještě zvýšit účinnost terapie.

### 3 Cíle práce

Předkládaná disertační práce vznikla v rámci řešení grantového projektu IGA MZ ČR NR/9341-3 „Modulace antineoplastického efektu retinoidů LOX/COX inhibitory na modelu dětských solidních nádorů: *in vitro* studie“. Tento projekt byl zaměřen na analýzu možností modulace antineoplastického efektu kyseliny all-*trans* retinové (ATRA) její kombinovanou aplikací s inhibitory lipoxxygenáz a cyklooxygenáz. Modelovým objektem byly buněčné linie neurogenních solidních nádorů dětského věku (neuroblastom, meduloblastom). Tato studie se zabývala jednak hodnocením efektu kombinované aplikace ATRA s LOX, resp. COX inhibitory na buněčné úrovni (diferenciace, apoptóza, proliferace), což bylo předmětem další již obhájené disertační práce (Redova 2010). Druhou částí studie pak byla analýza změn genové exprese u ovlivněných buněčných populací – tato problematika tvoří hlavní náplň této disertační práce. V souladu s obsahem výše uvedeného výzkumného projektu a v návaznosti na předchozí výsledky na buněčné úrovni byly dílčí cíle předkládané disertační práce stanoveny takto:

1. U buněčných populací ovlivněných ATRA a inhibitory LOX, resp. COX (kyselina kávová jako inhibitor 5-lipoxxygenázy a celecoxib jako inhibitor cyklooxygenázy-2) nebo jejich kombinacemi provést čipovou analýzu s využitím nízkohustotních oligonukleotidových čipů testujících expresi 440 genů, které souvisejí s nádorovou invazivitou a metastázováním.
2. Na základě analýzy výsledků expresního profilování ověřit metodou RT-PCR změny v expresi vybraných genů.
3. Na základě analýzy výsledků expresního profilování identifikovat buněčné procesy, které kombinovaná aplikace ATRA s LOX, resp. s COX inhibitory ovlivňuje.

Zavedení metody expresního profilování s využitím nízkohustotních oligonukleotidových čipů na našem pracovišti bylo následně využito i v rámci řešení projektu IGA MZ\_ČR NS/10218-3 „Role izoform proteinu p73 v patogenezi meduloblastomu: imunocytochemická a microarray studie“. Vedlejší cíle této disertační práce proto byly v souladu s výše popsaným projektem stanoveny takto:

1. Provést analýzu genové exprese pomocí nízkohustotních oligonukleotidových čipů u čtyř patientských meduloblastomových linií a takto analyzovat vliv působení samotné ATRA na buňky těchto patientských linií.
2. Sledovat vliv kombinované aplikace ATRA s LOX, resp. s COX inhibitory na hladinu transkriptu izoformy TAp73 metodou RT-PCR.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Buněčné linie a kultivační podmínky

Jako experimentální model byly v této práci využity sbírkové linie neurogenních solidních nádorů dětského věku. Jednalo se dvě linie derivované z neuroblastomu a dvě linie derivované z meduloblastomu. Tyto linie byly totožné s liniemi použitými v přecházejících experimentech (*Redova et al. 2010*). V rámci propojení s probíhajícím projektem zaměřeným na výskyt a funkce N-terminálních izoform proteinu p73 bylo využito ještě čtyř nesbírkových primárních linií, které byly derivovány v naší laboratoři z nádorové tkáně pacientů s meduloblastomem.

#### Neuroblastomové buněčné linie

##### **Buněčná linie SK-N-BE(2)** (ECACC 95011815):

Linie byla derivována v roce 1972 z bioptického vzorku kostní dřeně pacienta ve věku 2 měsíců s diseminovaným neuroblastomem. Jedná se o adherentní linii, jejíž buňky se vyznačují neuroblastoidní i epiteloidní morfologií. U této buněčné linie byla detekována amplifikace *MYCN*.

##### **Buněčná linie SH-SY5Y** (ECACC 94030304):

Tato linie byla odvozena od linie SK-N-SH (ECACC 86012802), která byla derivována z biopsie kostní dřeně pacienta s neuroblastomem. U této adherentní linie s neuroblastoidní morfologií buněk nebyla popsána amplifikace *MYCN*. V dokumentaci (*URL1*) k této linii je uvedeno, že u vyšších pasáží byla detekována ztráta neuronálních charakteristik buněk SH-SY5Y.

## **Meduloblastomové buněčné linie**

### **Buněčná linie Daoy (ATCC HTB-186TM):**

Jedná se adherentní buněčnou linii derivovanou v roce 1985 z bioptického vzorku desmoplastického meduloblastomu, který byl lokalizován v zadní jámě lební čtyřletého chlapce. Ačkoli původní nádor vykazoval znaky jak neuronální, tak gliální diferenciace, tyto charakteristiky již nebyly prokázány v derivované buněčné linii. Buňky této linie mají polygonální morfolonii a jsou hypertetraploidní.

### **Buněčná linie D283 Med (ATCC HTB-185TM):**

Tato linie byla derivována v roce 1985 z maligních buněk ascitu a peritoneálních metastáz šestiletého chlapce s meduloblastomem. Buněčná linie je suspenzního charakteru s možným výskytem mnohobuněčných agregátů a určité frakce adherentních buněk. Morfologie adherentních buněk je epiteliální. Buněčná linie je hypodiploidní.

## **Pacientské buněčné linie derivované z meduloblastomu**

Tyto linie byly derivovány v Laboratoři nádorové biologie přímo ze vzorků nádorové tkáně, které byly odebrány pacientům Kliniky dětské onkologie LF MU a FN Brno v rámci indikovaného chirurgického zákroku. Vzorky byly odebírány s informovaným souhlasem pacienta, resp. jeho zákonného zástupce a v laboratoři byly zpracovány pod kódovým označením.

### **Buněčná linie MBL-02**

Jde o linii derivovanou z nádorové tkáně jedenáctileté dívky s diagnózou lokalizovaného desmoplastického meduloblastomu.

### **Buněčná linie MBL-12**

Tato linie je derivovaná z nádorové tkáně metastatického desmoplastického meduloblastomu ročního chlapce.



### **Buněčná linie MBL-13**

Linie je derivovaná z nádorové tkáně dvouletého chlapce s diagnózou metastatického klasického meduloblastomu.

### **Buněčná linie MED**

Jedná se o linii derivovanou z kostní dřeně, která byla infiltrována nádorovými buňkami. Primárním nádorem byl velkobuněčný meduloblastom, který byl u pacienta diagnostikován ve věku 15 let. Kostní dřeň, z níž byla derivována linie MED, byla pacientovi odebírána v průběhu relapsu onemocnění ve věku 22 let. U primárního nádoru byla prokázána amplifikace *MYCN*.

Buňky všech čtyř linií rostou ve formě adherentní kultury a vykazují polygonální morfolonii se známkami neuronální diferenciace.

### **Kultivační podmínky**

NBL buněčné linie a patientské MBL linie byly kultivovány ve směsi médií DMEM/Ham's F-12 (v poměru 1:1) s přidavkem 20 % fetálního telecího séra (FCS), 1% non-esenciálních aminokyselin, 2 mM L-glutaminu, 100 IU/ml penicilinu a 100 mg/ml streptomycinu (vše PAA Laboratories, Linz, Rakousko).

Ke kultivaci MBL linie Daoy bylo využito médium DMEM s přidavkem 10% FCS, 1 % non-esenciálních aminokyselin, 2 mM L-glutaminu, 100 IU/ml penicilinu a 100 mg/ml streptomycinu.

U MBL linie D283 pak šlo o kultivační médium RPMI 1640 s přidavkem 10% FCS, 2 mM L-glutaminu, 100 IU/ml penicilinu a 100 mg/ml streptomycinu.

Kultivace všech uvedených buněčných linií probíhala za standardních podmínek při teplotě 37 °C, v atmosféře obsahující 5% CO<sub>2</sub> a buňky byly pasážovány 1-2x týdně. Všechny použité buněčné linie byly rovněž úspěšně kryokonzervovány ve směsi DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) / FCS v poměru 1:9 při různých pasážích.

## 4.2 Chemikálie a uspořádání experimentů

Zásobní roztoky všech tří používaných činidel - ATRA v koncentraci 100 mM, CA v koncentraci 130 mM (vše Sigma) a CX v koncentraci 100 mM (LKT Laboratories, St. Paul, MN, USA) byly připraveny rozpuštěním v DMSO (Sigma). Takto připravené zásobní roztoky byly skladovány při teplotě -20 °C bez přístupu světla.

Zásobní roztoky reagensů byly pro dosažení pracovních koncentrací ředěny v čerstvém kultivačním médiu. Pracovní koncentrace jak ATRA, tak LOX a COX inhibitorů vycházely z již dříve publikovaných dat (*Nardini et al. 2000; Dandekar et al. 2005*) a rovněž z našich předchozích experimentů (*Redova et al. 2010*). Nižší uváděné koncentrace také odpovídají koncentracím naměřeným v plazmě.

Pracovní koncentrace byly tedy následující: 1 µM a 10 µM ATRA, 13 µM a 52 µM CA, 10 µM a 50 µM CX. V případě meduloblastomové linie D283 byla po řadě optimalizačních experimentů snížena koncentrace aplikované ATRA na 0,05 µM a 0,1 µM vzhledem ke skutečnosti, že výše uváděné pracovní koncentrace ATRA vykazovaly na buňky této linie již cytotoxické účinky. Aplicační schéma je znázorněno v Tab. 1.

**Tab. 1 Schéma zvolených kombinací induktoru diferenciaci a LOX, resp. COX inhibitorů.** RA - kyselina all-trans retinová, CA - kyselina kávová, CX - celecoxib; v tabulce jsou uvedeny µM koncentrace použitých činidel.

| Buněčné linie                 | Kontrola          | Induktor | Inhibitory | Kombinace |                 |                |
|-------------------------------|-------------------|----------|------------|-----------|-----------------|----------------|
| SK-N-BE(2)<br>SH-SY5Y<br>DAOY | Neovlivněné buňky | 1 RA     | 10 RA      | 13 CA     | 1 RA / 13 CA    | 10 RA / 13 CA  |
|                               |                   |          |            | 52 CA     | 1 RA / 52 CA    | 10 RA / 52 CA  |
|                               |                   |          |            | 10 CX     | 1 RA / 10 CX    | 10 RA / 10 CX  |
|                               |                   |          |            | 50 CX     | 1 RA / 50 CX    | 10 RA / 50 CX  |
| D283                          | Neovlivněné buňky | 0,05 RA  | 0,1 RA     | 13 CA     | 0,05 RA / 13 CA | 0,1 RA / 13 CA |
|                               |                   |          |            | 52 CA     | 0,05 RA / 52 CA | 0,1 RA / 52 CA |
|                               |                   |          |            | 10 CX     | 0,05 RA / 10 CX | 0,1 RA / 10 CX |
|                               |                   |          |            | 50 CX     | 0,05 RA / 50 CX | 0,1 RA / 50 CX |

Stejně jako pracovní koncentrace, i časové uspořádání experimentů bylo zvoleno v souladu s předcházející studií (*Redova et al. 2010*). Během všech experimentů byly buňky nasazeny vždy 24 h před aplikací induktoru diferenciaci s LOX, resp. COX inhibitoru. Jako kontrola byly použity buňky neovlivněné, kultivované pouze v kompletním médiu. Sklizení buněk a izolace RNA probíhaly vždy třetí den po aplikaci činidel.

### 4.3 Izolace a kontrola kvality RNA

Z buněčných linií byla celková RNA izolována pomocí kitu GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich). Její koncentrace byla změřena a čistota ověřena spektrofotometricky pomocí přístroje Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies) a nekontaminovaná RNA ( $A_{260}/A_{280} > 2$ ;  $A_{260}/A_{230} > 1,7$ ) byla dále zpracována.

### 4.4 Zpracování oligonukleotidových čipů (Oligo GEArrays)

Ke stanovení expresních profilů byly použity nízkohustotní oligonukleotidové čipy OHS-802 – Cancer Array (SABiosciences). Tyto čipy jsou určené k relativní kvantifikaci exprese 440 genů funkčně spojených s biologií nádorů. Pracovní postup byl následující (veškeré použité chemikálie a kity, není-li uvedeno jinak, byly od společnosti SABiosciences) :

#### 1. Ampifikace a značení RNA (TrueLabeling-AMP 2.0 Kit)

První fáze zahrnovala přepis mRNA do cDNA. Základem bylo navázání primeru, jenž zajišťoval přepis pouze mRNA z celkové RNA obsažené v buňce. Směs takto označené RNA, reverzní transkriptázy, pufru a inhibitorů RNáz byla inkubována 50 min při 42 °C, následně byla inkubována 5 min při 75 °C a nakonec zchlazena na 37 °C.

Druhým krokem byla syntéza, amplifikace a značení cRNA. Směs získané cDNA, RNA polymeráz, pufru a biotinem značený uraciltrifosfát (Enzo Life Sciences) byla při teplotě 37 °C ponechána přes noc. Purifikace získané cRNA probíhala metodou centrifugace kolonek.

#### 2. Hybridizace, vymývání a detekce (Oligo GEArray® HybTube Protocol)

Purifikovaná cRNA byla naředěna hybridizačním roztokem (GEAhyb Hybridization solution) a hybridizována při 60 °C přes noc na připravené membrány. Následovalo odmytí nenavázané a nespecificky navázané cRNA za pomoci roztoků 2 x SSC, 1 % SDS a 0,1 x SSC, 0,5 % SDS.

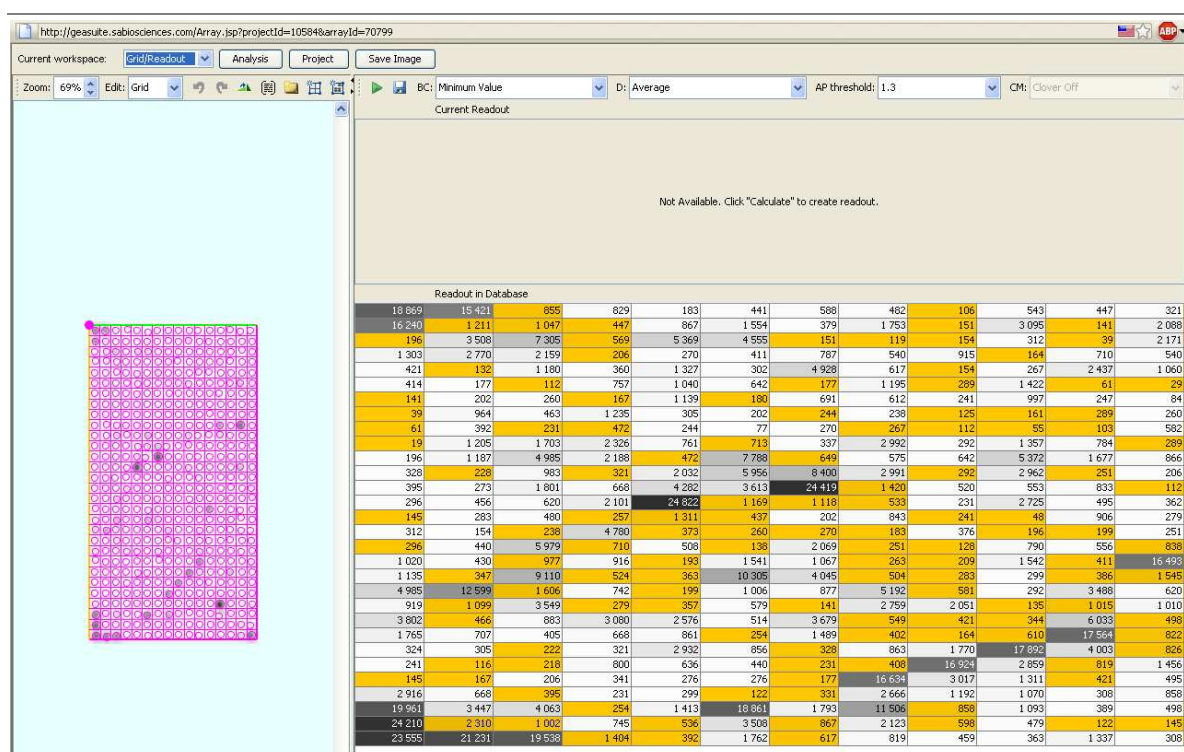
### 3. Chemiluminiscenční detekce (SuperArray Chemiluminescent Detection Kit)

Před samotnou detekcí proběhlo blokování (GEAblocking solution Q) a navázání konjugátu alkalické fosfatázy konjugované se streptavidinem na biotin. Po dalším promytí a krátké inkubaci s chemoluminiscenčním činidlem (CDP-Star ) byly membrány díky reakci alkalické fosfatázy s tímto činidlem připraveny k detekci. Samotná detekce byla prováděna pomocí dokumentační stanice FluorChem™ HD2 (Alpha Innotech).

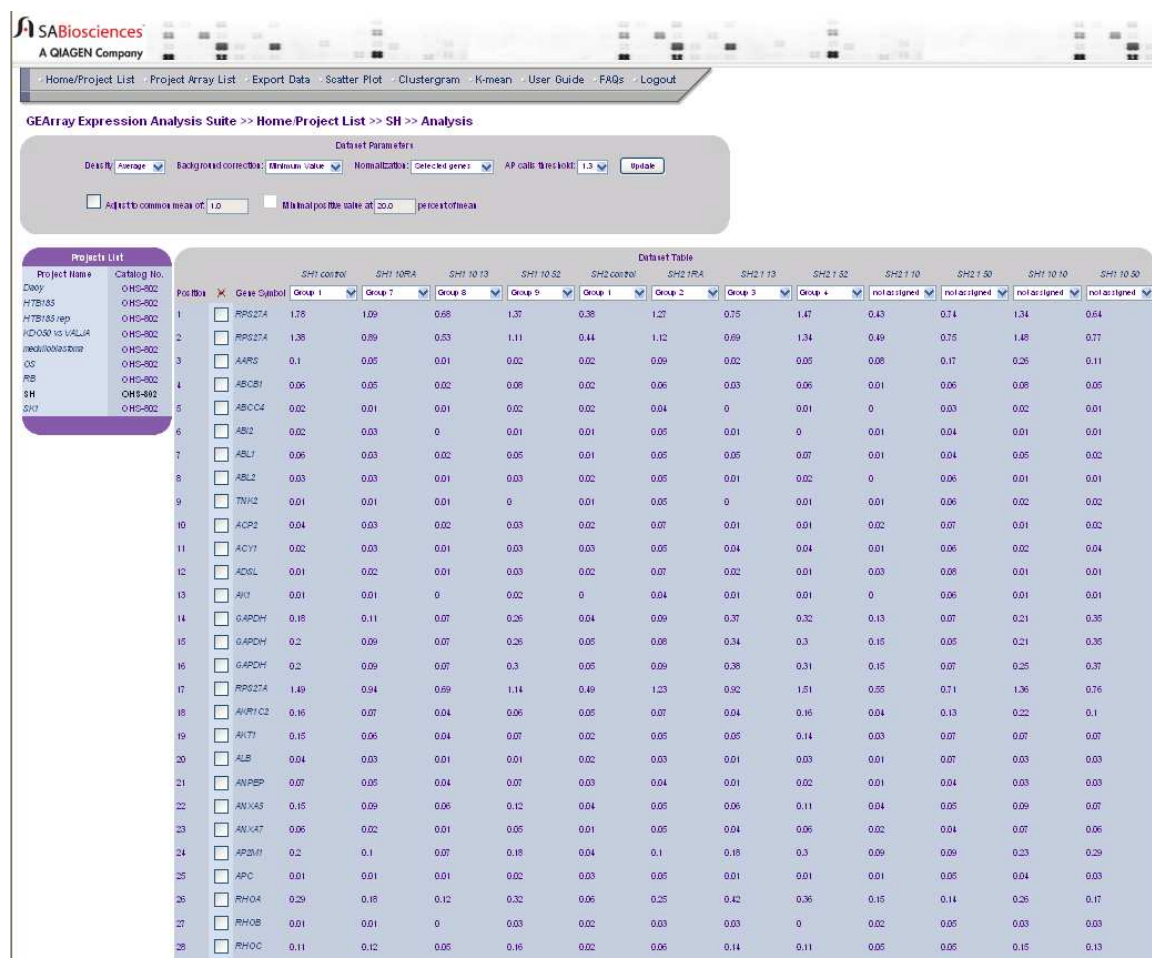
## 4.5 Analýza obrazu a zpracování dat

K převodu získaných obrazových dat na data numerická a k jejich následnému hodnocení byla použita webová aplikace GEArray Expression Analysis Suite (SABiosciences) (Obr. 11 a Obr. 12). Za pomoci tohoto softwarového nástroje bylo provedeno odečtení pozadí (spot s nejnižší intenzitou), a normalizace. Za exprimované byly považovány pouze ty geny, jejichž průměrná denzita spotu byla větší než 1,3-násobek průměrné hodnoty lokálního pozadí většiny (75. percentil) spotů. Intenzita signálu jednotlivých spotů byla normalizována pomocí provozního (housekeeping) genu *HSP90AB1*, jenž byl shodně vybrán za pomoci dvou nezávislých programů GeNorm (Vandesompele *et al.* 2002) a NormFinder (Andersen *et al.* 2004). Normalizovaná data jsou vyjádřena jako podíl naměřené optické denzity spotu odpovídajícího genu průměrnou optickou denzitou spotů genu *HSP90AB1*.

Výběr genů se změněnou expresí po aplikaci činidel byl prováděn pomocí shlukovacích nástrojů webové aplikace GEArray Expression Analysis Suite. Hodnotící kritéria zahrnovala celkový trend po aplikaci kombinace ATRA s CA, resp. s CX, maximální rozdíl v expresi mezi některou z kombinací a kontrolou (alespoň blížící se dvojnásobku) a v dalším kroku pak obdobnou změnu u ostatních zkoumaných linií.



Obr. 11 Analýza obrazu ve webové aplikaci GArray Expression Analysis Suite.



Obr. 12 Modul GArray Expression Analysis Suite, v němž bylo odečteno pozadí, označeny geny, u nichž nebyla prokazatelná exprese, a provedena normalizace pomocí provozního genu HSP90AB1.

## 4.6 RT-PCR

Pro ověření výsledků získaných pomocí oligonukleotidových čipů byla provedena RT-PCR sedmi vybraných genů. Metodou RT-PCR byla sledována i exprese transkriptu izoformy TAp73. Pomocí M-MLV reverzní transkriptázy (Top-Bio) a oligo-dT (Qiagen) jako primeru byla mRNA přepsána do cDNA, kdy koncentrace celkové RNA v reakci byla u všech vzorků konstantní (25 ng RNA / 1 µl). Vlastní PCR reakce byla prováděna v objemu 25 µl a obsahovala reakční pufr s MgCl<sub>2</sub> (0,75 mM), 100 µM dNTP, 1U Taq polymerázy (vše Top-Bio), 0,25 µM obou primerů a 10 µl cDNA. Sekvence primerů a velikosti produktů jsou uvedeny v Tab. 2, v Tab. 3 jsou pak použité teplotní profily PCR reakcí. PCR primery byly navrhovány pomocí programu P3 (*Untergasser et al. 2007*). PCR produkt byl separován gelovou elektroforézou na 1% agarózovém gelu a analyzován na dokumentační stanici pro fluorescenční a chemiluminiscenční detekci FluorChem™ HD2 (Alpha Innotech).

**Tab. 2 Sekvence primerů a velikosti produktů RT-PCR.**

| gen             | sekvence primerů (5' - 3')                     | velikost produktu |
|-----------------|------------------------------------------------|-------------------|
| <i>CDKN1A</i>   | TTAGCAGCGGAACAAGGAGT<br>GCCGAGAGAAAACAGTCCAG   | 225 bp            |
| <i>GDF15</i>    | CTCCAGATTCCGAGAGTTGC<br>AGAGATACGCAGGTGCAGGT   | 169 bp            |
| <i>HLA-C</i>    | TGGTCACCGCTATGATGTGT<br>GCAGAAAGAGATGCCAGAGG   | 207 bp            |
| <i>HMGA1</i>    | TCACTCTTCCACCTGCTCCT<br>TTGTTTTTGCTTCCCTTTGG   | 200 bp            |
| <i>HSP90AB1</i> | CGCATGAAGGAGACACAGAA<br>TCCCATCAAATTCCTTGAGC   | 169 bp            |
| <i>Tp53</i>     | GCACTGGTGTTTTGTTGTGG<br>GTGGTTTCAAGGCCAGATGT   | 300 bp            |
| TAp73           | GCAGATTGAACTGGGCCATGA<br>GCAGATTGAACTGGGCCATGA | 167 bp            |
| <i>TIMP1</i>    | AGTGGAAGTCAATTGCTTGTG<br>GAAAGATGGGAGTGGAACA   | 198 bp            |

**Tab. 3 Teplotní profil PCR reakce.**

|                      |             |
|----------------------|-------------|
| úvodní denaturace    | 94°C / 4min |
| denaturace           | 94°C / 30s  |
| annealingová teplota | 60°C / 30s  |
| elongační teplota    | 72°C / 60s  |
| závěrečná syntéza    | 72°C / 5min |
| celkový počet cyklů  | 35          |

Převod obrazových dat na data numerická, která byla následně použita pro semikvantitativní analýzu genové exprese, byl proveden s použitím programu ImageJ (*Rasband 1997-2011*). Normalizovaná data jsou vyjádřena jako podíl naměřené hodnoty denzity bandu zvoleného genu a hodnoty denzity bandu provozního genu *HSPB90AB1* stejného vzorku. Posledním krokem bylo vztažení jednotlivých hodnot k příslušné kontrole. Data jsou tak uváděna v násobcích denzity daného genu u činidly neovlivněné populace buněk.

## 4.7 Scratch assay

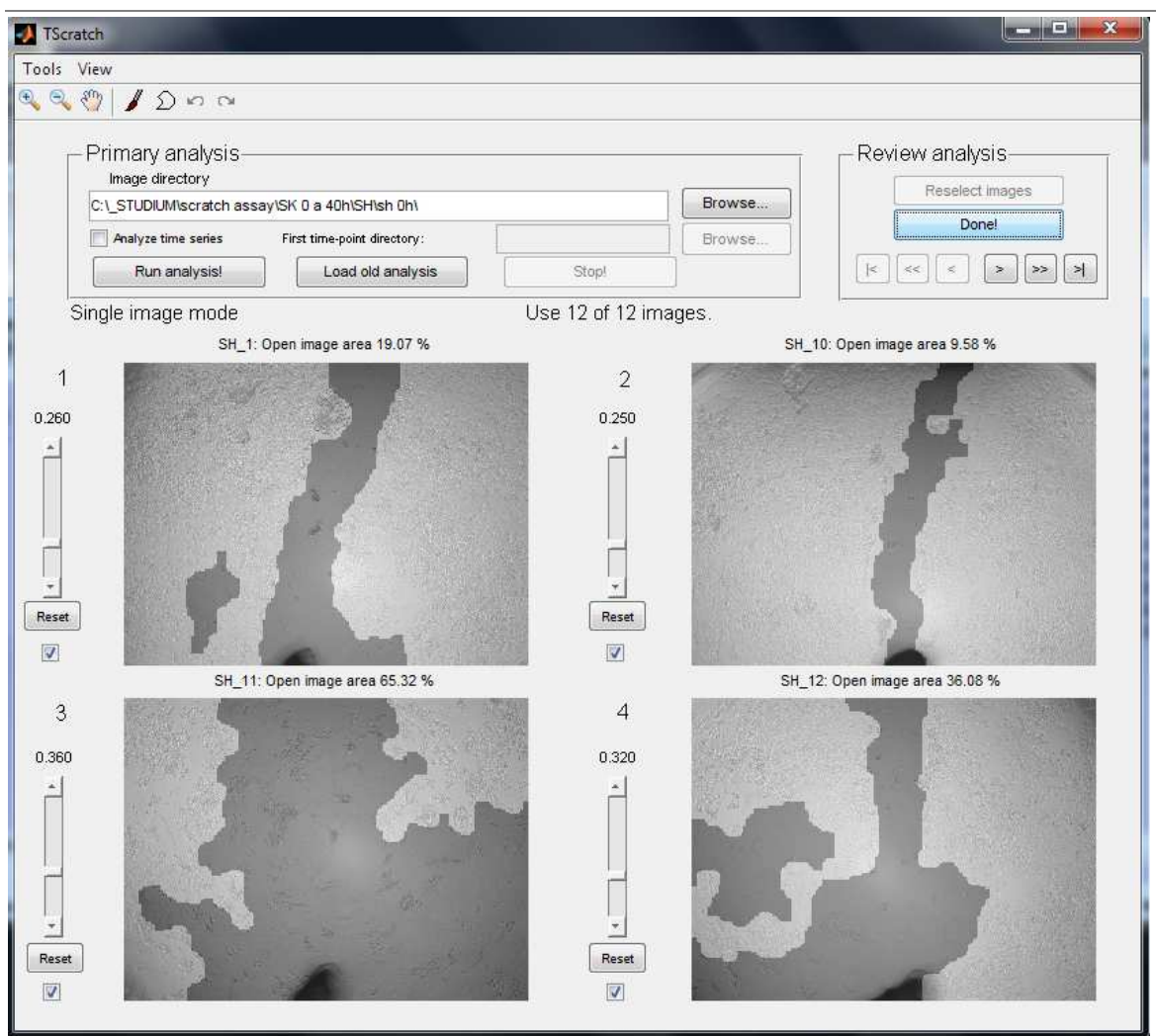
Buňky byly kultivovány v 96 jamkových destičkách v takové hustotě, aby v době seškrábnutí buňky pokrývaly okolo 90% plochy jamky. Ze spodní strany destičky byl u každé jamky popisovačem označen jeden bod, který napomáhal orientaci při focení. Časové uspořádání experimentu bylo následující:

- 1.den – nasazení suspenze buněk do kultivační desky
- 2.den – přidání činidel (ATRA s CA, resp. CX)
- 3.den – seškrábnutí pruhu buněk sterilní 200  $\mu$ l špičkou

Časové rozvržení bylo zvoleno tak, aby co nejlépe odpovídalo časovému rozložení ostatních experimentů. V intervalech 0h, 12h, 24h a 40h po seškrábnutí byly buněčné populace dokumentovány ve stejném zorném poli pomocí invertovaného mikroskopu Olympus CKX41 a fotoaparátu Olympus SP-350.

Kromě sledování neovlivněné buněčné populace a variant s činidly byl paralelně prováděn experiment, kde byl ke všem vzorkům přidán mitomycin C (Sigma Aldrich) o koncentraci 10  $\mu$ g/ml, aby se zabránilo proliferaci buněk a bylo tak možno sledovat pouze jejich migraci.

Získaná obrazová data byla následně zpracována a převedena na numerická v programu TScratch (CSElab) (Obr. 13).



**Obr. 13 Analýza obrazu v programu TScratch.** Program analyzuje poměr porostlé a neporostlé plochy.

## 4.8 Analýza zapojení genů se změnou exprese do signálních drah

Funkční analýza genů a jejich zapojení do signálních drah bylo analyzováno za pomoci programu Advanced Pathway Painter (GSA) a webových aplikací David 6.7 (Huang *et al.* 2009), a Entrez Genes (NCBI). Byly tak detekovány skupiny genů, jejichž změnná exprese naznačuje spojení se stejným nebo podobným procesem či signální dráhou. Výstupy těchto analýz jsou uvedeny v kontextu získaných experimentálních dat v kapitole Diskuse.



## 5 Výsledky

Retinoidy jsou součástí mnoha léčebných protokolů, které se používají v rámci terapie nejen solidních nádorů dětského věku, ale také při léčbě akutní promyelocytické leukémie, či některých kožních onemocnění (*Dragnev et al. 2003*). Jedná se o potenciální regulátory mnoha biologických procesů, mezi něž patří například buněčná proliferace, diferenciace, či morfogeneze.

V medicíně často užívané kombinované terapeutické režimy mají za cíl podpořit regulační potenciál retinoidů jejich společnou aplikací s dalšími látkami, které metabolismus retinoidů přímo či nepřímo ovlivňují, a případně - je-li to možné - omezit jejich toxicitu a s ní související nezanedbatelné vedlejší účinky. Cílem předkládané disertační práce bylo studium změn genové exprese u NBL a MBL buněčných linií po kombinované aplikaci ATRA a inhibitorů enzymů, které obecně participují na intracelulární degradaci retinoidů – 5-LOX a COX-2.

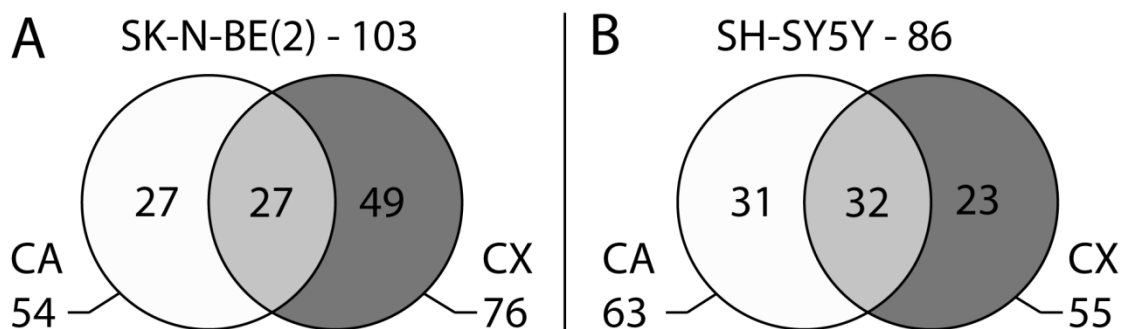
Pro monitorování změn v expresi 440 genů funkčně spojených s biologií nádoru byly použity nízkohustotní oligonukleotidové čipy (OHS-802 – Cancer Array, SABiosciences). Hodnocení genové exprese bylo prováděno jak na neovlivněných buněčných populacích, tak na buněčných populacích ovlivněných kombinacemi ATRA s CA, resp. s CX, a to třetí den po aplikaci (viz Tab. 1). Pro ověření výsledků získaných pomocí čipů byly změny exprese vybraných genů následně sledovány rovněž metodou RT-PCR.

V rámci probíhajícího projektu zaměřeného na sledování distribuce a funkce N-koncových izoform proteinu p73 byla expresní analýza provedena také u čtyř patientských MBL linií. Analyzovány byly jednak neovlivněné buněčné populace, jednak buněčné populace ovlivněné 1  $\mu$ M ATRA. U sbírkových linií Daoy a D283 byla navíc pomocí RT-PCR sledována hladina transkriptu TAp73.

## 5.1 Expresní profily neuroblastomových a meduloblastomových buněčných linií

### 5.1.1 Neuroblastomové buněčné linie

Na základě analýzy dat získaných z mikročipů bylo identifikováno u buněčné linie SK-N-BE(2) 103 genů, jejichž exprese se měnila (zvyšovala, nebo snižovala) po aplikaci ATRA s CA, resp. s CX; z toho po aplikaci ATRA s CA se jednalo o 54 genů a po společné aplikaci ATRA s CX o 76 genů (Obr. 14A). U linie SH-SY5Y to bylo celkově 86 genů, z toho u 63 docházelo ke změnám v expresi po aplikaci ATRA s CA a u 55 po kombinaci ATRA s CX (B).



**Obr. 14** Diagram znázorňující celkový počet genů, u kterých byla detekována změna exprese v důsledku aplikace ATRA s CA, resp. s CX u buněk NBL linií SK-N-BE(2) (A) a SH-SY5Y (B).

Celkově lze shrnout, že po kombinované aplikaci ATRA a zvolených inhibitorů obecně docházelo spíše ke zvýšení exprese genů a pouze několik genů vykazovalo snížení exprese. Přitom žádný z genů, u nichž došlo ke snížení exprese, nebyl detekován u obou linií současně.

Geny, u nichž byly identifikovány změny v expresi, byly následně uspořádány do skupin podle typu těchto změn (Obr. 15 a Obr. 16, detailnější popisy změn u jednotlivých skupin jsou uvedeny v Tab. 4). Při dalším zobecnění lze na základě klastrové analýzy sledovat tři nejčastější typy sledovaných změn v expresi:

- i. Geny, jejichž exprese se zvyšovala v závislosti na koncentraci aplikovaných činidel. Nejvíce patrné je to u skupin I.A, II.A, III.A, IV.A, částečně je tento trend viditelný i u skupin I.B, III.B, III.C, IV.B.

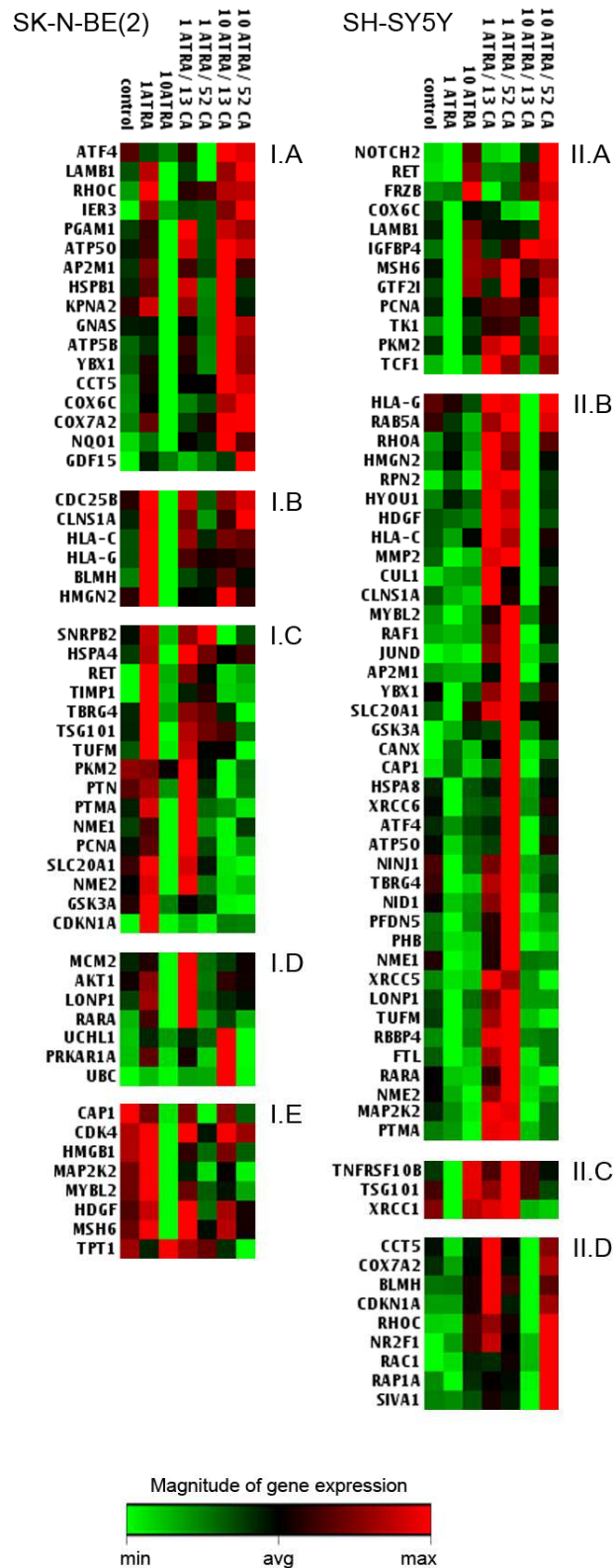
- ii. Geny, jejichž exprese se měnila pouze při vyšších koncentracích. Detekováno bylo jak zvýšení genové exprese (skupina IV.C), tak její snížení (skupiny I.D, I.E, IV.D).
- iii. Geny, jejichž exprese se zvýšila po aplikaci nižších koncentrací činidel, ale při vyšších koncentracích ke změně nedochází, nebo dokonce dochází k poklesu exprese. Patrné je to u skupin I.C, II.B, II.C, III.D.

Uvedená data pak byla dále analyzována ze dvou odlišných pohledů. Bylo sledováno jednak zastoupení genů, u kterých došlo ke změně exprese nezávisle na použitém inhibitoru u jednotlivých linií. Tak byly vybrány geny, u nichž došlo v rámci jedné linie ke stejnému typu změny exprese (snížení nebo zvýšení) v závislosti na působení kombinace ATRA s CA i ATRA s CX. U linie SK-N-BE(2) se jednalo o 25 genů a u linie SH-SY5Y o 29 genů (Tab. 5).

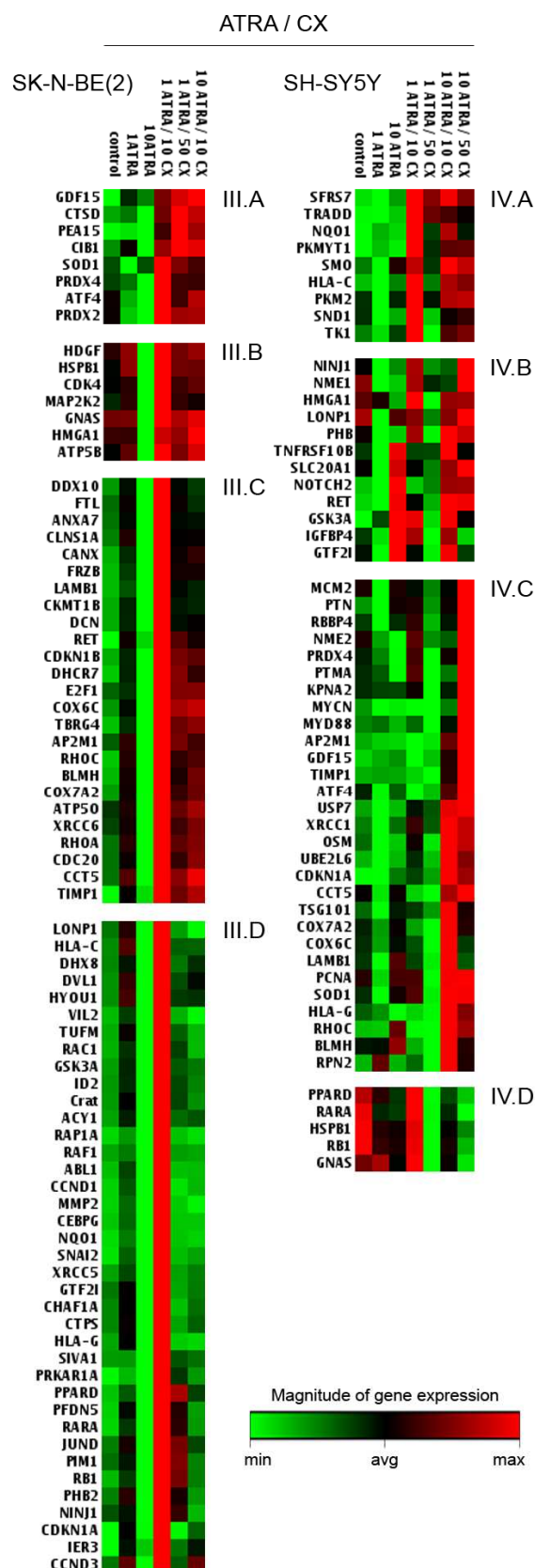
Dále byly ve snaze porovnat vliv jednotlivých inhibitorů vybrány geny, u nichž došlo ke stejnému typu změny exprese (snížení nebo zvýšení) u obou zkoumaných linií po ovlivnění buď kombinací ATRA s CA, nebo kombinací ATRA s CX. Po kombinované aplikaci ATRA s CA tak bylo detekováno 28 genů, jež vykazovaly stejnou změnu exprese. V případě kombinované aplikace ATRA s CX šlo o 21 genů (Tab. 6).

Porovnáním takto vybraných kategorií bylo detekováno 12 genů, jejichž exprese byla zvýšena u obou linií - a to jak po kombinaci ATRA s CA, tak po společné aplikaci ATRA s CX.

Ani z pohledu množství genů se změněnou expresí, ani z pohledu zastoupení jednotlivých genů, u nichž došlo ke změně exprese po aplikaci činidel, však nebyl pozorován výrazný rozdíl mezi kombinací ATRA s CA a kombinací ATRA s CX.



**Obr. 15** Vybrané geny se změnami exprese po aplikaci ATRA s CA u NBL linií. Geny byly uspořádané do skupin podle typu změn v expresi. Podrobnější popis změn je uveden v Tab. 4. Barevné značení odpovídající hladině exprese (zelená – nejnižší, černá průměrná, červená nejvyšší) je voleno zvlášť pro každý gen v jedné experimentální variantě (I, II) a nezávisle na ostatních genech.



**Obr. 16** Vybrané geny se změnami exprese po aplikaci ATRA s CX u NBL linií. Geny byly uspořádány do skupin podle typu změn v expresi. Podrobnější popis změn je uveden v Tab. 4. Barevné značení odpovídající hladině exprese (zelená – nejnižší, černá průměrná, červená nejvyšší) je voleno zvlášť pro každý gen v jedné experimentální variantě (III, IV) a nezávisle na ostatních genech.

**Tab. 4 Popis jednotlivých typů změn genové exprese po kombinované aplikaci ATRA s CA resp. CX na NBL buněčné linie SK-N-BE(2) a SH-SY5Y.**

| skupina                                                  | počet genů | typ změny v genové expresi                                                                                                                                                                                                |
|----------------------------------------------------------|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. Aplikace ATRA a CA, buněčná linie SK-N-BE(2)</b>   |            |                                                                                                                                                                                                                           |
| I.A                                                      | 17         | silné zvýšení obzvláště po aplikaci 10 $\mu$ M ATRA/13 $\mu$ M CA a 10 $\mu$ M ATRA/52 $\mu$ M CA; zvýšení zaznamenáno také po aplikaci 1 $\mu$ M ATRA ať již samotné, nebo v kombinacích s CA                            |
| I.B                                                      | 6          | znatelné zvýšení po aplikaci ATRA v kombinacích s CA; zvýšení zaznamenáno také po samotné aplikaci 1 $\mu$ M ATRA                                                                                                         |
| I.C                                                      | 16         | znatelné zvýšení obzvláště po aplikaci 1 $\mu$ M ATRA ať již samotné, nebo v kombinacích s CA; aplikace 10 $\mu$ M ATRA ať již samotné, nebo v kombinacích s CA expresi spíše snižuje                                     |
| I.D                                                      | 7          | mírné zvýšení po aplikaci 1 $\mu$ M ATRA, znatelné snížení po aplikaci 10 $\mu$ M ATRA samotné a v kombinaci s 52 $\mu$ M CA                                                                                              |
| I.E                                                      | 8          | snížení po aplikaci 10 $\mu$ M ATRA samotné i v obou kombinacích s CA                                                                                                                                                     |
| <b>II. Aplikace ATRA a CA, buněčná linie SH-SY5Y</b>     |            |                                                                                                                                                                                                                           |
| II.A                                                     | 12         | silné zvýšení obzvláště po aplikaci 10 $\mu$ M ATRA/52 $\mu$ M CA; nápadné zvýšení zaznamenáno také po aplikaci 10 $\mu$ M ATRA ať již samotné, nebo v kombinacích s CA v závislosti na koncentraci                       |
| II.B                                                     | 39         | znatelné zvýšení obzvláště po aplikaci 1 $\mu$ M ATRA v obou kombinacích a také po aplikaci 10 $\mu$ M ATRA/52 $\mu$ M CA; aplikace samotné ATRA nevykazuje vliv na expresi                                               |
| II.C                                                     | 3          | znatelné zvýšení po aplikaci 1 $\mu$ M ATRA v obou kombinacích                                                                                                                                                            |
| II.D                                                     | 9          | silné zvýšení exprese po aplikaci 10 $\mu$ M ATRA/52 $\mu$ M CA; znatelné zvýšení po aplikaci 1 $\mu$ M ATRA v obou kombinacích; aplikace samotné ATRA vykazuje jen malý, nebo žádný vliv na genovou expresi              |
| <b>III. Aplikace ATRA a CX, buněčná linie SK-N-BE(2)</b> |            |                                                                                                                                                                                                                           |
| III.A                                                    | 8          | silné zvýšení po aplikaci 10 $\mu$ M ATRA/10 $\mu$ M CX a 1 $\mu$ M ATRA/50 $\mu$ M CX; mírné zvýšení po aplikaci 1 $\mu$ M ATRA/10 $\mu$ M CX; aplikace samotné ATRA vykazovala malý, nebo žádný vliv na genovou expresi |
| III.B                                                    | 7          | znatelné zvýšení po aplikaci ATRA ve všech kombinacích s CX; aplikace samotné 1 $\mu$ M ATRA vykazuje jen nepatrný vliv                                                                                                   |
| III.C                                                    | 23         | silné zvýšení po aplikaci ATRA ve všech kombinacích s CX; lehké zvýšení po aplikaci samotné 1 $\mu$ M ATRA                                                                                                                |
| III.D                                                    | 38         | znatelné zvýšení po aplikaci ATRA ve všech kombinacích s CX; obzvláště po aplikaci 1 $\mu$ M ATRA/10 $\mu$ M CX                                                                                                           |
| <b>IV. Aplikace ATRA a CX, buněčná linie SH-SY5Y</b>     |            |                                                                                                                                                                                                                           |
| IV.A                                                     | 9          | znatelné zvýšení po aplikaci ATRA v kombinacích s CX; aplikace samotné ATRA vykazuje jen minimální, nebo žádný vliv na genovou expresi                                                                                    |
| IV.B                                                     | 12         | silné zvýšení po aplikaci 1 $\mu$ M ATRA/10 $\mu$ M CX; mírné zvýšení po aplikaci 10 $\mu$ M ATRA v obou kombinacích s CX                                                                                                 |
| IV.C                                                     | 29         | silné zvýšení po aplikaci 1 $\mu$ M i 10 $\mu$ M ATRA/50 $\mu$ M CX                                                                                                                                                       |
| IV.D                                                     | 5          | znatelné zvýšení po aplikaci 1 $\mu$ M ATRA/10 $\mu$ M CX; znatelné snížení po všech ostatních kombinacích                                                                                                                |

**Tab. 5 Geny, u nichž došlo ke změně exprese u jednotlivých NBL linií (SK-N-BE(2) a SH-SY5Y) po kombinované aplikaci ATRA s CA i po kombinaci ATRA s CX.** Geny, u nichž docházelo ke změnám v expresi u obou linií, jsou vyznačeny podtržením.

| <b>SK-N-BE(2)</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Zvýšení exprese   | <u>AP2M1</u> , <u>ATF4</u> , <u>ATP5B</u> , <u>ATP5O</u> , <u>BLMH</u> , <u>CDKN1A</u> , <u>CLNS1A</u> , <u>COX6C</u> , <u>COX7A2</u> , <u>GDF15</u> , <u>GNAS</u> , <u>GSK3A</u> , <u>HLA-C</u> , <u>HLA-G</u> , <u>HSPB1</u> , <u>IER3</u> , <u>LAMB1</u> , <u>LONP1</u> , <u>NQO1</u> , <u>PRKAR1A</u> , <u>RARA</u> , <u>RHOC</u> , <u>TBRG4</u> , <u>TIMP1</u> , <u>TUFM</u>                                                              |
| <b>SH-SY5Y</b>    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Zvýšení exprese:  | <u>AP2M1</u> , <u>ATF4</u> , <u>BLMH</u> , <u>CCT5</u> , <u>CDKN1A</u> , <u>COX6C</u> , <u>COX7A2</u> , <u>GSK3A</u> , <u>GTF2I</u> , <u>HLA-C</u> , <u>HLA-G</u> , <u>IGFBP4</u> , <u>LAMB1</u> , <u>LONP1</u> , <u>NINJ1</u> , <u>NME2</u> , <u>NOTCH2</u> , <u>PCNA</u> , <u>PHB</u> , <u>PKM2</u> , <u>PTMA</u> , <u>RBBP4</u> , <u>RHOC</u> , <u>RPN2</u> , <u>SLC20A1</u> , <u>TK1</u> , <u>TNFRSF10B</u> , <u>TSG101</u> , <u>XRCC1</u> |

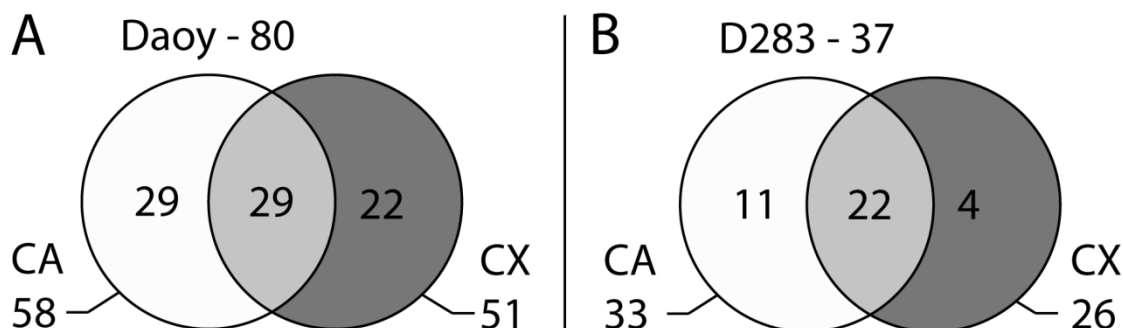
**Tab. 6 Geny, u nichž došlo ke změně exprese u obou NBL linií (SK-N-BE(2) a SH-SY5Y) po kombinované aplikaci ATRA s CA a po kombinaci ATRA s CX.** Stejně geny, u nichž docházelo ke změnám v expresi nezávisle na použitém inhibitoru, jsou vyznačeny podtržením.

| <b>ATRA/CA</b>   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| zvýšení exprese: | <u>AP2M1</u> , <u>ATF4</u> , <u>ATP5O</u> , <u>BLMH</u> , <u>CCT5</u> , <u>CDKN1A</u> , <u>CLNS1A</u> , <u>COX6C</u> , <u>COX7A2</u> , <u>GSK3A</u> , <u>HLA-C</u> , <u>HLA-G</u> , <u>HMG2</u> , <u>LAMB1</u> , <u>LONP1</u> , <u>NME1</u> , <u>NME2</u> , <u>PCNA</u> , <u>PKM2</u> , <u>PTMA</u> , <u>RARA</u> , <u>RET</u> , <u>RHOC</u> , <u>SLC20A1</u> , <u>TBRG4</u> , <u>TSG101</u> , <u>TUFM</u> , <u>YBX1</u> |
| <b>ATRA/CX</b>   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| zvýšení exprese: | <u>AP2M1</u> , <u>ATF4</u> , <u>BLMH</u> , <u>CDKN1A</u> , <u>COX6C</u> , <u>COX7A2</u> , <u>GDF15</u> , <u>GSK3A</u> , <u>GTF2I</u> , <u>HLA-C</u> , <u>HLA-G</u> , <u>HMGA1</u> , <u>LAMB1</u> , <u>LONP1</u> , <u>NINJ1</u> , <u>NQO1</u> , <u>PPAR</u> , <u>PRDX4</u> , <u>RHOC</u> , <u>SOD1</u> , <u>TIMP1</u>                                                                                                     |

### 5.1.2 Meduloblastomové buněčné linie

Na základě analýzy dat získaných z mikročipů bylo identifikováno u buněčné linie Daoy 80 genů, jejichž exprese se po použití činidel měnila, z toho docházelo ke změnám exprese 58 genů po kombinované aplikaci ATRA s CA a 51 genů po kombinaci ATRA s CX (Obr. 17A).

U linie D283 byla identifikována změna exprese jen u 37 genů, z toho u 33 genů po aplikaci ATRA s CA a u 26 genů po kombinaci ATRA s CX (Obr. 17B).



Obr. 17 Diagram znázorňující celkový počet genů, u kterých byla detekována změna exprese v důsledku aplikace ATRA s CA, resp. s CX u buněk MBL linií Daoy (A) a D283 (B).

U MBL linií byly detekovány jak geny, jejichž exprese se po aplikaci činidel zvýšila, tak geny, u kterých došlo ke snížení exprese. Geny, u nichž byly identifikovány změny v expresi, byly následně uspořádány do skupin podle typu těchto změn. Detailnější přehled těchto skupin je na Obr. 18, Obr. 19 a v Tab. 7. Při dalším zobecnění lze na základě klastrové analýzy sledovat tři nejčastější typy změn v expresi:

- Geny, jejichž exprese se měnila v přímé závislosti na koncentraci použitých činidel. Patrné je to u kategorií V.A, VI.A, VII.A, VIII.A a zčásti i u skupin genů u kterých bylo pozorováno snížení exprese (V.E, VI.D, VII.D, VIII.C).
- Geny, jejichž exprese byla ovlivněna převážně při nižších koncentracích činidel a vyšší koncentrace se již na změnách exprese příliš neprojevovala. Patrné je to u skupin V.B, VI.C a VII.C.
- Geny, jejichž hladina exprese se měnila až při vyšší koncentraci činidel. Nejzřetelnější je tato změna u skupin VI.B a VII.B, nicméně i u skupin V.A a VIII.A je patrný větší vliv vyšší koncentrace ATRA.



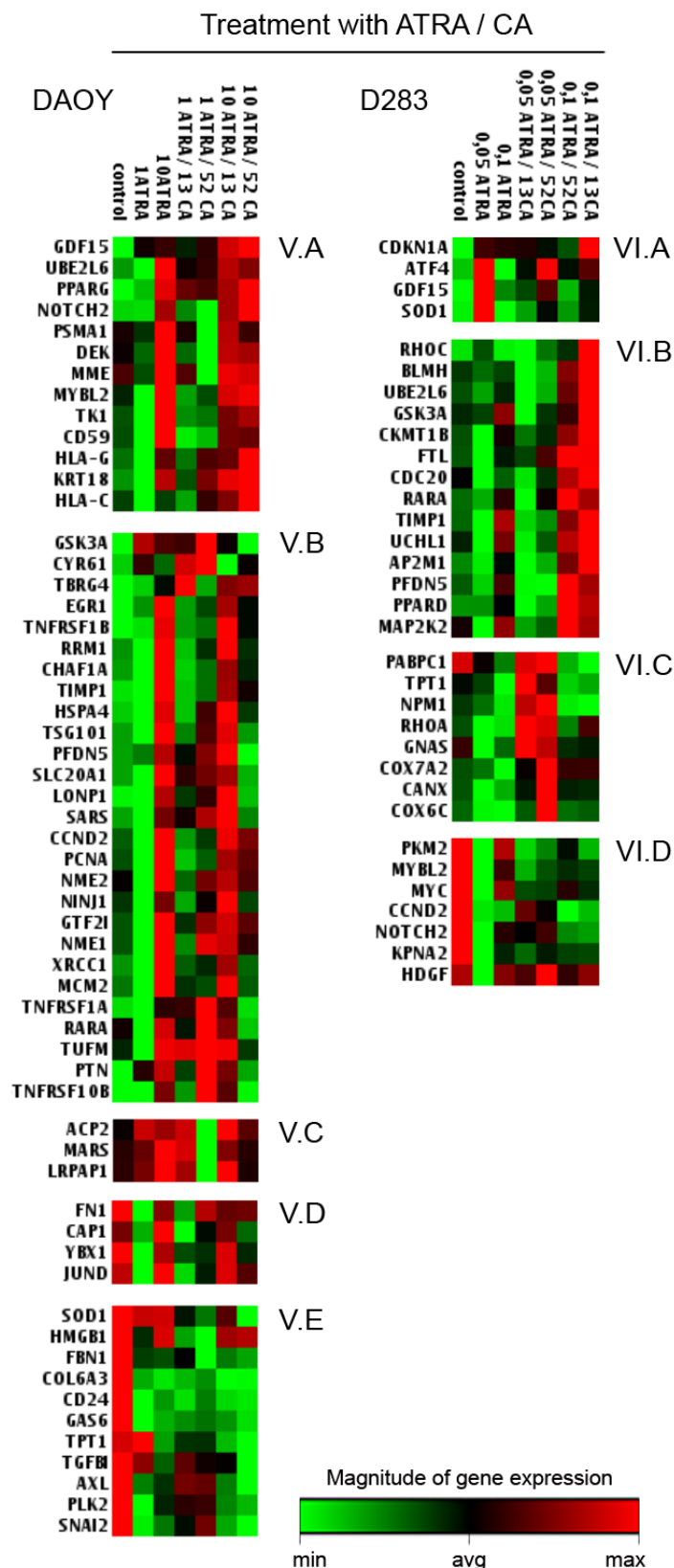
Počet genů, u nichž došlo k ovlivnění exprese, je u MBL linií menší ve srovnání s NBL liniemi. Je však třeba mít na zřeteli, že v souladu s předešlými optimalizačními experimenty (Redova 2010) byla u linie D283 snížena koncentrace ATRA na 0,05  $\mu\text{M}$  a 0,1  $\mu\text{M}$ , neboť koncentrace ATRA používané u všech předchozích linií (1  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$ ) byly pro buňky linie D283 již značně toxické. Na základě pozorované cytotoxicity a současně slabé odpovědi na kombinované působení činidel po snížení koncentrace se zdá, že rozmezí koncentrací, při nichž buňky linie D283 již reagují změnami na úrovni exprese genů, ale ještě nepodléhají toxicitě, je poměrně úzké.

I u MBL linií byla data získaná hodnocením mikročipů analyzována z pohledu jednotlivých linií i z pohledu jednotlivých inhibitorů. U linie Daoy tak bylo po aplikaci ATRA s CA i po aplikaci ATRA s CX detekováno 8 genů, jejichž exprese se zvyšovala, a 8 genů, u kterých došlo k poklesu exprese. U linie D283 pak bylo detekováno 18 genů, u kterých došlo nezávisle na použitém inhibitoru ke zvýšení exprese, a 3 geny, u nichž se exprese snížila (Tab. 8).

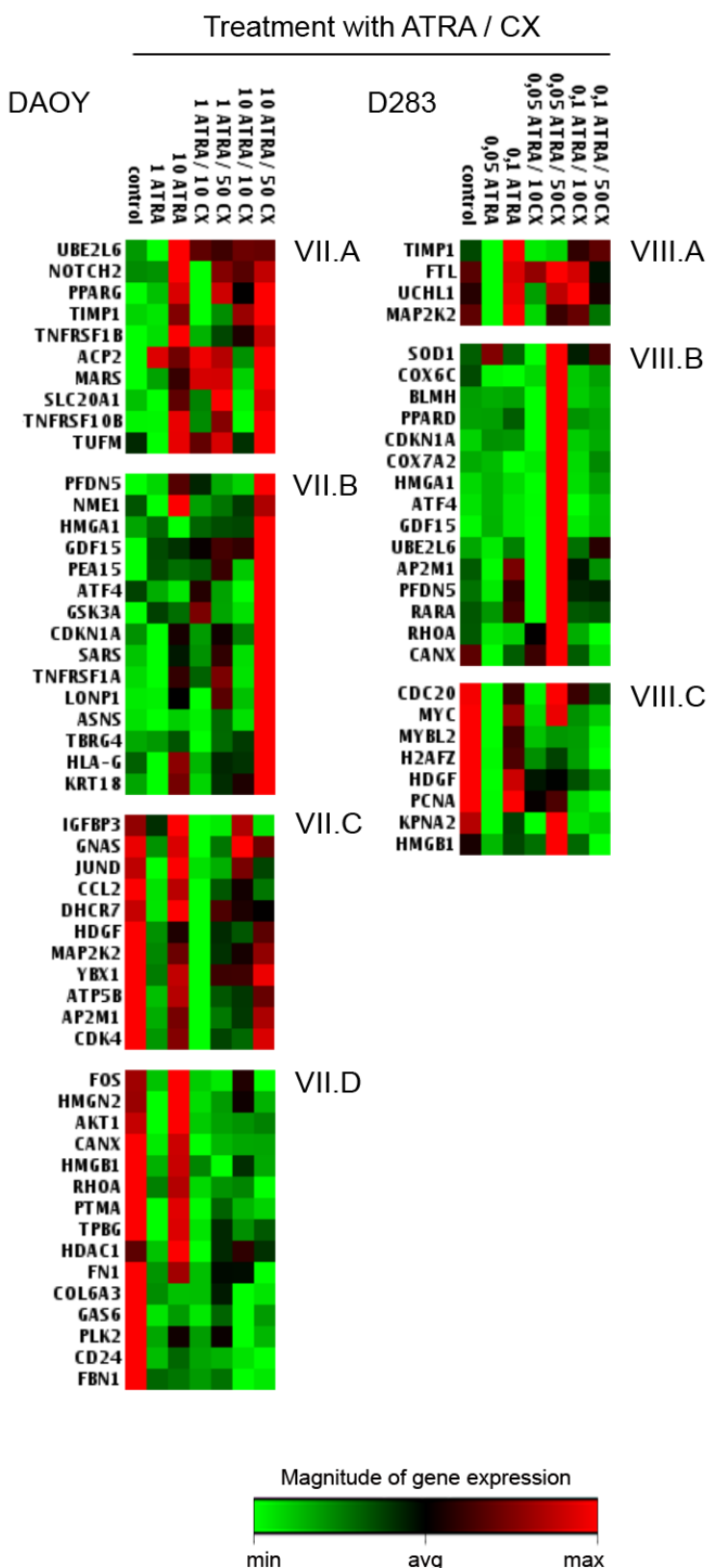
Nezávisle na linii pak byly po kombinované aplikaci ATRA s CA detekovány pouze 2 geny, u nichž docházelo ke zvýšení exprese, a 1 gen, u kterého byla exprese snížena.

V případě užití kombinace ATRA s CX pak bylo detekováno 8 genů se zvýšenou expresí a 1 gen, u kterého docházelo ke snížení (Tab. 9).

U obou MBL linií byly detekovány pouze dva geny (*GDF15* a *UBE2L6*), u kterých docházelo ke zvýšení exprese jak po kombinaci ATRA s CA, tak po společné aplikaci ATRA s CX.



**Obr. 18** Vybrané geny se změnami exprese po aplikaci ATRA s CA u MBL linií. Geny byly uspořádány do skupin podle typu změn v expresi. Podrobnější popis změn je uveden v Tab. 7. Barevné značení odpovídající hladině exprese (zelená – nejnižší, černá průměrná, červená nejvyšší) je voleno zvlášť pro každý gen v jedné experimentální variantě (V, VI) a nezávisle na ostatních genech.



**Obr. 19 Vybrané geny se změnami exprese po aplikaci ATRA s CX (vpravo) u MBL linií.** Geny byly uspořádány do skupin podle typu změn v expresi. Podrobnější popis změn je uveden v Tab. 7. Barevné značení odpovídající hladině exprese (zelená – nejnížší, černá průměrná, červená nejvyšší) je voleno zvlášť pro každý gen v jedné experimentální variantě (VII, VIII) a nezávisle na ostatních genech.

**Tab. 7 Popis jednotlivých typů změn genové exprese po kombinované aplikaci ATRA s CA, resp. s CX u MBL buněčných linií Daoy a D283.**

| skupina                                            | počet genů | typ změny v genové expresi                                                                                                                                                                                                             |
|----------------------------------------------------|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I. Aplikace ATRA a CA, buněčná linie Daoy</b>   |            |                                                                                                                                                                                                                                        |
| V.A                                                | 13         | silné zvýšení obzvláště po aplikaci 10 $\mu$ M ATRA ať již samotné nebo v obou kombinacích s CA                                                                                                                                        |
| V.B                                                | 27         | znatelné zvýšení po aplikaci 1 $\mu$ M ATRA v kombinacích s CA; zvýšení také po samotné aplikaci 10 $\mu$ M ATRA i 10 $\mu$ M ATRA/13 $\mu$ M CA; po kombinaci 10 $\mu$ M ATRA/52 $\mu$ M CA již k výraznému zvýšení exprese nedochází |
| V.C                                                | 3          | mírné zvýšení po aplikaci všech variant, kromě kombinací ATRA s 52 $\mu$ M CA                                                                                                                                                          |
| V.D                                                | 4          | snížení obzvláště po aplikaci 1 $\mu$ M ATRA, ať už samotné, nebo v kombinaci s 13 $\mu$ M CA; mírné snížení i po ostatních kombinacích kromě samotné 10 $\mu$ M ATRA                                                                  |
| V.E                                                | 11         | výrazné snížení po všech použitých kombinacích, včetně samotné ATRA                                                                                                                                                                    |
| <b>II. Aplikace ATRA a CA, buněčná linie D283</b>  |            |                                                                                                                                                                                                                                        |
| VI.A                                               | 4          | zvýšení po všech kombinacích i samotné ATRA, obzvláště po 0,1 $\mu$ M ATRA samotné i v kombinacích                                                                                                                                     |
| VI.B                                               | 14         | výrazné zvýšení po aplikaci 0,1 $\mu$ M ATRA/13 $\mu$ M CA a 0,1 $\mu$ M ATRA/52 $\mu$ M CA; aplikace 0,05 $\mu$ M ATRA samotná i v kombinaci vykazuje malý, nebo žádný vliv stejně jako samotná aplikace 0,1 $\mu$ M ATRA             |
| VI.C                                               | 8          | znatelné zvýšení po aplikaci 0,05 $\mu$ M ATRA/13 $\mu$ M CA a 0,05 $\mu$ M ATRA/52 $\mu$ M CA                                                                                                                                         |
| VI.D                                               | 7          | výrazné snížení po všech použitých kombinacích, včetně samotné ATRA                                                                                                                                                                    |
| <b>III. Aplikace ATRA a CX, buněčná linie Daoy</b> |            |                                                                                                                                                                                                                                        |
| VII.A                                              | 10         | silné zvýšení po aplikaci kombinací ATRA s 50 $\mu$ M CX a po aplikaci samotné 10 $\mu$ M ATRA                                                                                                                                         |
| VII.B                                              | 15         | výrazné zvýšení po aplikaci 10 $\mu$ M ATRA/50 $\mu$ M CX; mírné zvýšení i po všech ostatních kombinacích, včetně samotné ATRA                                                                                                         |
| VII.C                                              | 11         | snížení obzvláště po aplikaci 1 $\mu$ M ATRA, ať už samotné, nebo v kombinacích s CX; mírné snížení i po aplikaci 10 $\mu$ M ATRA samostatně i v kombinacích s CA                                                                      |
| VII.D                                              | 15         | výrazné snížení po všech použitých kombinacích, včetně samotné ATRA                                                                                                                                                                    |
| <b>IV. Aplikace ATRA a CX, buněčná linie D283</b>  |            |                                                                                                                                                                                                                                        |
| VIII.A                                             | 4          | znatelné zvýšení obzvláště po aplikaci 0,1 $\mu$ M ATRA samotné i v kombinacích                                                                                                                                                        |
| VIII.B                                             | 15         | mírné zvýšení po aplikaci všech variant obzvláště po aplikaci 0,05 $\mu$ M ATRA/50 $\mu$ M CX                                                                                                                                          |
| VIII.C                                             | 8          | výrazné snížení po všech použitých kombinacích, včetně samotné ATRA                                                                                                                                                                    |

**Tab. 8 Geny, u nichž došlo ke změně exprese, u jednotlivých MBL linií (Daoy a D283) po kombinované aplikaci ATRA s CA i po kombinaci ATRA s CX.** Geny, u nichž docházelo ke změnám v expresi u obou linií, jsou vyznačeny podtržením.

| <b>Daoy</b>      |                                                                                                                                               |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| zvýšení exprese: | <i>ACP2, <u>GDF15</u>, HLA-G, KRT18, MARS, NOTCH2, PPARG, <u>UBE2L6</u></i>                                                                   |
| snížení exprese: | <i>CD24, COL6A3, FBN1, GAS6, HMGB1, JUND, PLK2, YBX1</i>                                                                                      |
| <b>D283</b>      |                                                                                                                                               |
| zvýšení exprese: | <i>AP2M1, ATF4, BLMH, CANX, CDKN1A, COX6C, COX7A2, FTL, <u>GDF15</u>, MAP2K2, PFDN5, PPARD, RARA, RHOA, SOD1, TIMP1, <u>UBE2L6</u>, UCHL1</i> |
| snížení exprese: | <i>KPNA2, MYBL2, MYC</i>                                                                                                                      |

**Tab. 9 Geny, u nichž došlo ke změně exprese u obou MBL linií (Daoy i D283) po kombinované aplikaci ATRA s CA a po kombinaci ATRA s CX.** Stejně geny, u nichž docházelo ke změnám v expresi nezávisle na použitém inhibitoru, jsou vyznačeny podtržením.

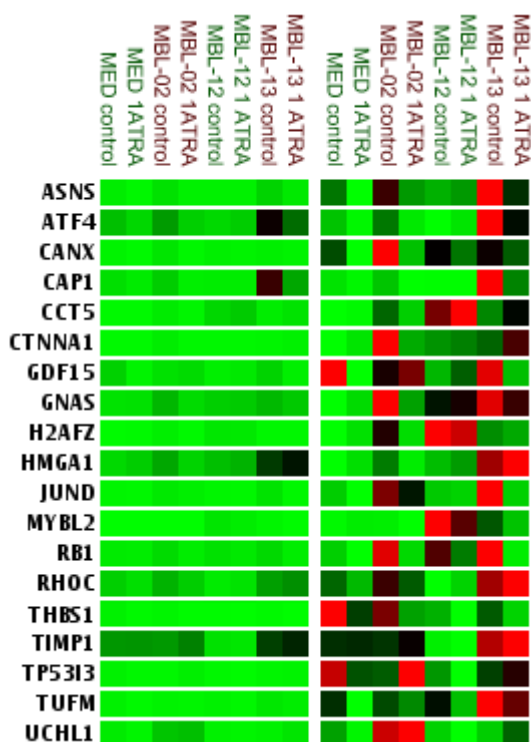
| <b>ATRA/CA</b>   |                                                                              |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| zvýšení exprese: | <i><u>GDF15</u>, <u>UBE2L6</u></i>                                           |
| snížení exprese: | <i>CCND2</i>                                                                 |
| <b>ATRA/CX</b>   |                                                                              |
| zvýšení exprese: | <i>ATF4, CDKN1A, <u>GDF15</u>, HMGA1, HMGB1, PFDN5, TIMP1, <u>UBE2L6</u></i> |
| snížení exprese: | <i>AP2M1</i>                                                                 |

### 5.1.3 Pacientské meduloblastomové linie

Rovněž u čtyř patientských MBL linií byly provedeny expresní analýzy - a to u neovlivněných buněčných populací a u buněčných populací ovlivněných 1  $\mu$ M ATRA. I v tomto případě bylo využito nízkohustotních oligonukleotidových čipů OHS-802 – Cancer Array (SABiosciences).

Na základě srovnání, do kterého byly zahrnuty i výsledky ze sbírkových MBL linií, vykazovalo celkem 16 genů změny v expresi po aplikaci ATRA u třech a více linií současně a zároveň u nich došlo ke stejné změně exprese (zvýšení, snížení) alespoň u třech linií ze šesti. K výběru pro další hodnocení byly přidány 3 geny (*CCT5*, *HMGA1*, *RHOC*), u nichž byly změny sice různého typu (zvýšení, snížení), ale jednalo se o tytéž geny, které byly vybrány na základě expresní analýzy sbírkových NBL a MBL linií (Tab. 12).

Grafické zobrazení změn exprese vybraných genů dle výsledků mikročipové analýzy je na Obr. 20. V Tab. 10 je pro zjednodušení uvedeno, zda a k jaké změně v expresi po aplikaci ATRA došlo. Obecně lze říci, že u zkoumaných linií byl detekován spíše pokles genové exprese. Ke zvýšení genové exprese nejméně u třech linií současně došlo pouze v případě genů *GDF15* a *TIMP1*.



**Obr. 20 Grafické zobrazení výsledků analýzy exprese vybraných genů pomocí mikročipů u buněk patientských MBL linií po ovlivnění ATRA.** ATRA byla aplikována v koncentraci 1  $\mu$ M. Barevné značení odpovídá hladině exprese (zelená nejnižší, černá průměrná, červená nejvyšší). Barevné značení v levém sloupci je voleno zvlášť pro každý gen v rámci experimentu a nezávisle na ostatních genech (v každém řádku je tak označena nejnižší exprese zeleně a nejvyšší červeně). V pravém sloupci je barevné značení voleno pro všechny geny v rámci experimentu.

**Tab. 10 Vybrané geny, u nichž byly po aplikaci 1  $\mu$ M ATRA detekovány změny v expresi alespoň u třech MBL linií z celkem šesti analyzovaných.** Legenda: + zvýšení exprese, - snížení exprese, šedé pole ~ bez vlivu na genovou expresi.

| gen    | MED | MBL-02 | MBL-12 | MBL-13 | Daoy | HTB185 |
|--------|-----|--------|--------|--------|------|--------|
| ASNS   | -   | -      | ~      | -      | ~    | -      |
| ATF4   | -   | -      | +      | -      | ~    | ~      |
| CANX   | -   | -      | -      | ~      | -    | -      |
| CAP1   | -   | -      | ~      | -      | ~    | ~      |
| CCT5   | ~   | -      | +      | +      | ~    | ~      |
| CTNNA1 | ~   | -      | ~      | ~      | -    | -      |
| GDF15  | -   | +      | +      | -      | +    | ~      |
| GNAS   | ~   | -      | ~      | -      | ~    | -      |
| H2AFZ  | ~   | -      | ~      | ~      | -    | -      |
| HMGA1  | +   | -      | ~      | ~      | +    | ~      |
| JUND   | -   | -      | ~      | -      | -    | -      |
| MYBL2  | ~   | ~      | -      | -      | -    | ~      |
| RB1    | ~   | -      | -      | -      | -    | ~      |
| RHOC   | -   | -      | +      | +      | ~    | ~      |
| THBS1  | -   | -      | ~      | ~      | -    | ~      |
| TIMP1  | ~   | +      | ~      | +      | ~    | +      |
| TP53I3 | -   | +      | -      | ~      | -    | +      |
| TUFM   | -   | ~      | -      | ~      | -    | ~      |
| UCHL1  | -   | ~      | -      | +      | -    | ~      |

## 5.2 Porovnání exprese vybraných genů u sbírkových neuroblastomových a meduloblastomových linií

Po provedení analýzy genové exprese pomocí mikročipů bylo identifikováno celkem 160 genů, které vykazovaly po kombinované aplikaci ATRA s alespoň jedním inhibitorem změnu minimálně u jedné linie. Z těchto 160 genů vykazovalo 42 genů stejný typ změny (zvýšení, resp. snížení) alespoň ve třech z osmi možných experimentálních variant kombinací ATRA s inhibitorem (Tab. 12).

Ve snaze ověřit výsledky z oligonukleotidových čipů bylo z výše uvedených 42 genů vybráno 6, u kterých byla následně exprese analyzována za pomoci RT-PCR. Tyto geny byly zvoleny tak, aby mechanismy, jichž se účastní, pokrývaly co nejširší oblast buněčných procesů. Jednalo se o

- provozní gen, který byl použit pro normalizaci dat (*HSPB90AB1*),
- gen, jehož působení je spojeno s inhibicí buněčného cyklu (*CDKN1A*),
- gen, o němž je známo, že se podílí na kontrole diferenciaci (*GDF15*),
- gen, jenž je funkčně spojen s imunitním systémem (*HLA-C*),

- v. gen, který kóduje inhibitor metaloproteináz a tak je funkčně spojený s pohybem buněk (*TIMP1*) a
- vi. gen, který kóduje protein, jenž díky schopnosti vázat DNA vystupuje jako regulátor transkripce v rozličných buněčných procesech, navíc jako jediný vykazoval zvýšení exprese výhradně po aplikaci kombinace ATRA a CX (*HMGA1*).

V rámci analýzy zapojení vybraných genů do signálních drah bylo z původního souboru 160 genů vybráno dalších 5 genů. Tyto geny sice neprošly zvoleným kritériem (shodné změny alespoň ve třech z osmi možných experimentálních variant kombinací ATRA s inhibítorem), nicméně se jedná o geny, jejichž exprese vykazuje zvýšení u NBL linií po aplikaci ATRA s CA, resp. CX a pravděpodobně se podílí na opravách DNA (*PCNA*, *XRCC1*, *XRCC5*, *XRCC6*), a gen *RAC1* který je společně s geny *RHOA* a *RHOC* klíčovým genem při přestavbách cytoskeletu. Neboť jsou tyto geny zmíněny v následující kapitole, je na tomto místě umístěn jejich přehled (Tab. 11).

**Tab. 11 Vybrané geny, u nichž byla detekována změna v expresi, a jejichž možné působení v buňce je v textu dále diskutováno. Legenda: + zvýšení exprese, - snížení exprese, šedé pole ~ bez vlivu na expresi.**

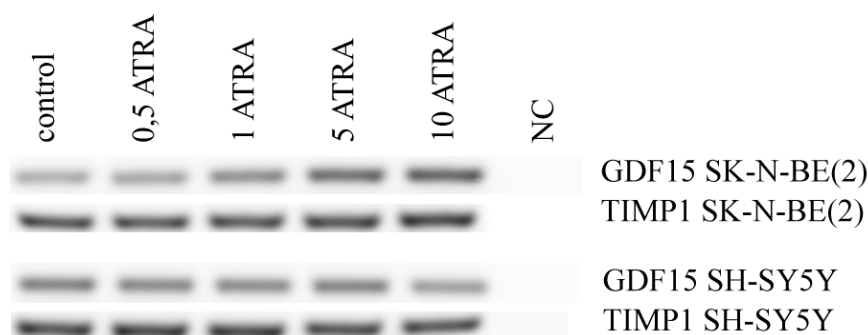
| gen          | CA                |                |             |             | CX                |                |             |             |
|--------------|-------------------|----------------|-------------|-------------|-------------------|----------------|-------------|-------------|
|              | <i>SK-N-BE(2)</i> | <i>SH-SY5Y</i> | <i>Daoy</i> | <i>D283</i> | <i>SK-N-BE(2)</i> | <i>SH-SY5Y</i> | <i>Daoy</i> | <i>D283</i> |
| <i>PCNA</i>  | +                 | +              | -           |             |                   | +              |             | -           |
| <i>RAC1</i>  |                   | +              |             |             | +                 |                |             |             |
| <i>XRCC1</i> |                   | +              | -           |             |                   | +              |             |             |
| <i>XRCC5</i> |                   | +              |             |             | +                 |                |             |             |
| <i>XRCC6</i> |                   | +              |             |             | +                 |                |             |             |



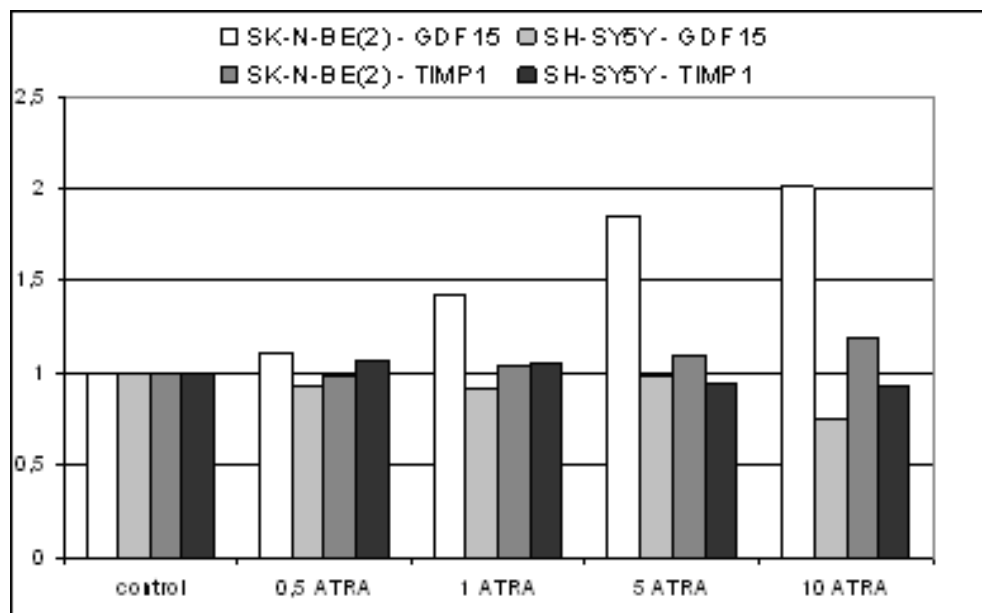
Tab. 12 Vybrané geny, u nichž byla detekována stejná změna alespoň ve třech z osmi možných experimentálních variant kombinací ATRA s inhibitorem. V tabulce jsou pro srovnání uvedeny i výsledky z RT-PCR (tmavě označené řádky). Legenda: + zvýšení exprese, - snížení exprese, šedé pole ~ bez vlivu na expresi.

| gen       | CA         |         |      |      | CX         |         |      |      |
|-----------|------------|---------|------|------|------------|---------|------|------|
|           | SK-N-BE(2) | SH-SY5Y | Daoy | D283 | SK-N-BE(2) | SH-SY5Y | Daoy | D283 |
| AP2M1     | +          | +       |      | +    | +          | +       | -    | +    |
| ATF4      | +          | +       |      | +    | +          | +       | +    | +    |
| BLMH      | +          | +       |      | +    | +          | +       |      | +    |
| CANX      |            | +       |      |      | +          |         |      | +    |
| CCT5      | +          | +       |      |      |            | +       |      |      |
| CDKN1A    | +          | +       |      | +    | +          | +       | +    | +    |
| CDKN1A    | +          | +       |      | +    | +          | +       | +    | +    |
| CLNS1A    | +          | +       |      |      | +          |         |      |      |
| COX6C     | +          | +       |      | +    | +          | +       |      | +    |
| COX7A2    | +          | +       |      | +    | +          | +       |      | +    |
| FTL       |            | +       |      | +    | +          |         |      | +    |
| GDF15     | +          |         | +    | +    | +          | +       | +    | +    |
| GDF15     | +          |         | +    | +    | +          | +       | +    | +    |
| GSK3A     | +          | +       | -    | +    | +          | +       | +    |      |
| GTF2I     |            | +       | -    |      | +          | +       |      |      |
| HLA-C     | +          | +       | +    |      | +          | +       |      |      |
| HLA-C     | +          | +       |      | +    | +          | +       |      |      |
| HLA-G     | +          | +       | +    |      | +          | +       | +    |      |
| HMGA1     |            |         |      |      | +          | +       | +    | +    |
| HMGA1     |            |         |      |      |            | +       |      | +    |
| HMGB1     | -          |         | -    |      |            |         | -    | -    |
| LAMB1     | +          | +       |      |      | +          | +       |      |      |
| LONP1     | +          | +       | +    |      | +          | +       | -    |      |
| MAP2K2    | -          | +       |      | +    | +          |         | -    | +    |
| NINJ1     |            | +       | -    |      | +          | +       |      |      |
| NME1      | +          | +       | -    |      |            | +       | +    |      |
| NME2      | +          | +       | -    |      |            | +       |      |      |
| NOTCH2    |            | +       | +    | -    |            | +       | +    |      |
| NQO1      | +          |         |      |      | +          | +       |      |      |
| PFDN5     |            | +       | -    | +    | +          |         | +    | +    |
| PKM2      | +          | +       |      | -    |            | +       |      |      |
| PPARD     |            |         |      | +    | +          | -       |      | +    |
| RARA      | +          | +       | -    | +    | +          | -       |      | +    |
| RET       | +          | +       |      |      |            | +       |      |      |
| RHOA      |            | +       |      | +    | +          |         | -    | +    |
| RHOC      | +          | +       |      | +    | +          | +       |      |      |
| SLC20A1   | +          | +       | -    |      |            | +       | +    |      |
| SOD1      |            |         | -    | +    | +          | +       |      | +    |
| TBRG4     | +          | +       | -    |      | +          |         | +    |      |
| TIMP1     | +          |         |      | +    | +          | +       | +    | +    |
| TIMP1     | +          | +       |      | +    | +          | +       | +    | +    |
| TK1       |            | +       | +    |      |            | +       |      |      |
| TNFRSF10B |            | +       | +    |      |            | +       | +    |      |
| TSG101    | +          | +       | +    |      |            | +       |      |      |
| TUFM      | +          | +       | -    |      | +          |         | +    |      |
| UBE2L6    |            |         | +    | +    |            | +       | +    | +    |
| UCHL1     | +          |         |      | +    |            |         |      | +    |

Při analýze dat z mikročipů bylo v některých případech pozorováno snížení genové exprese po aplikaci samotné 1  $\mu\text{M}$  ATRA oproti kontrole, ačkoliv kombinace ATRA s CA, resp. CX genovou expresi zvyšovaly. V několika případech byl podobný trend pozorován i při analýze dat z RT-PCR, a proto byla provedena kontrolní RT-PCR na buňkách NBL linií po aplikaci koncentrační řady samotné ATRA (0,5; 1; 5; 10  $\mu\text{M}$  ATRA). Při tomto ověření byla sledována exprese genů *GDF15* a *TIMP1* (Obr. 21, Obr. 22). Nicméně žádné snížení exprese těchto genů při ovlivnění nižšími koncentracemi ATRA vůči kontrole nebylo metodou RT-PCR potvrzeno. Tento experiment pouze potvrdil zvýšení exprese genu *GDF15* u linie SK-N-BE(2) v závislosti na koncentraci samotné ATRA.



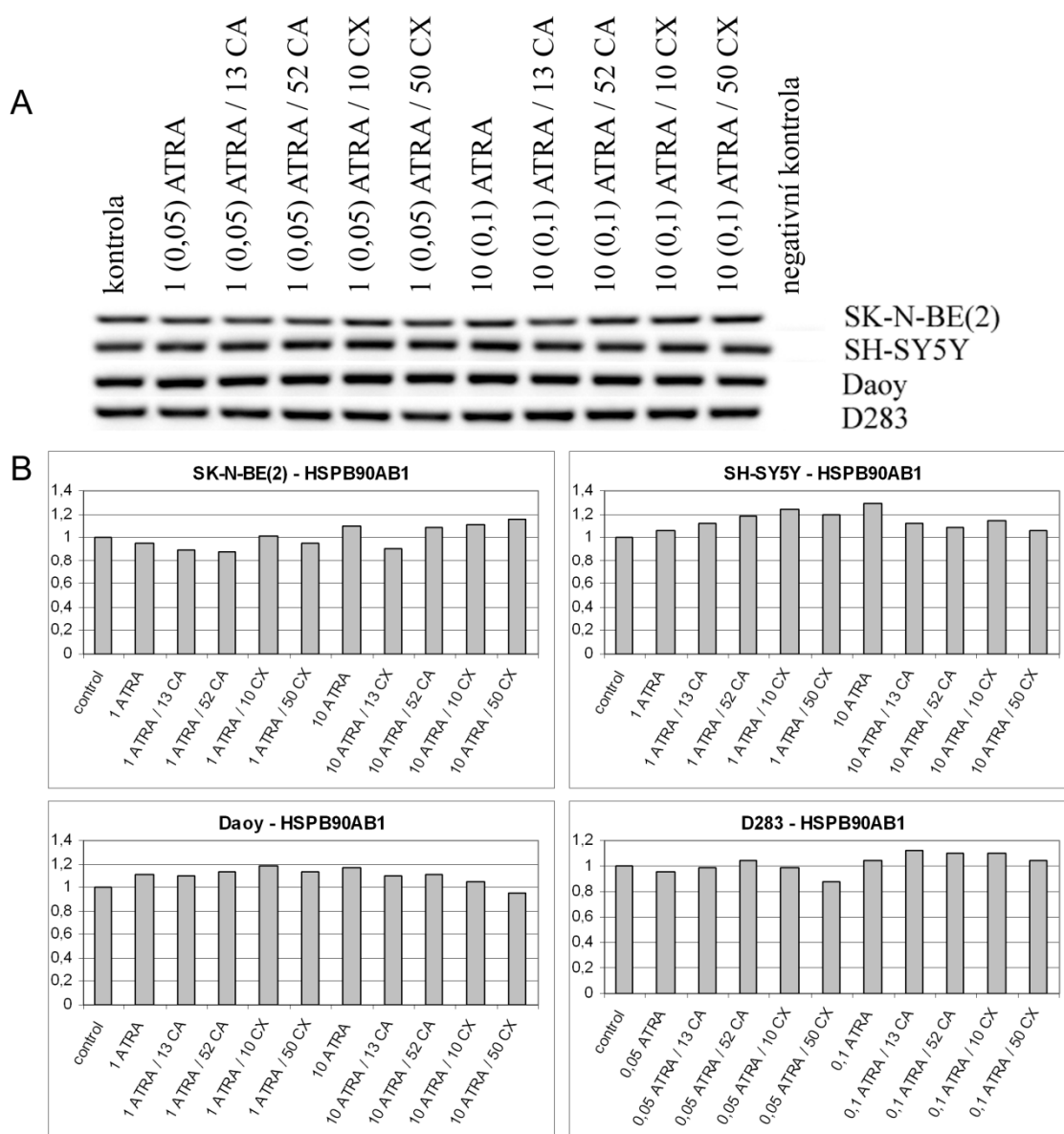
**Obr. 21** Exprese genů *GDF15* a *TIMP1* detekovaná metodou RT-PCR u buněk NBL linií v závislosti na koncentraci samotné ATRA. Vliv na snížení exprese při nižších koncentracích oproti kontrole nebyl prokázán. Koncentrace jsou uváděny v  $\mu\text{M}$ .



**Obr. 22** Exprese genů *GDF15* a *TIMP1* detekovaná metodou RT-PCR u buněk NBL linií v závislosti na koncentraci samotné ATRA. Vliv na snížení exprese při nižších koncentracích oproti kontrole nebyl prokázán. Graf zobrazuje numerická data získaná po použití denzitometrie; tato data jsou vztažena ke kontrole. Koncentrace jsou uváděny v  $\mu\text{M}$ .

### 5.2.1 Provozní gen *HSPB90AB1*

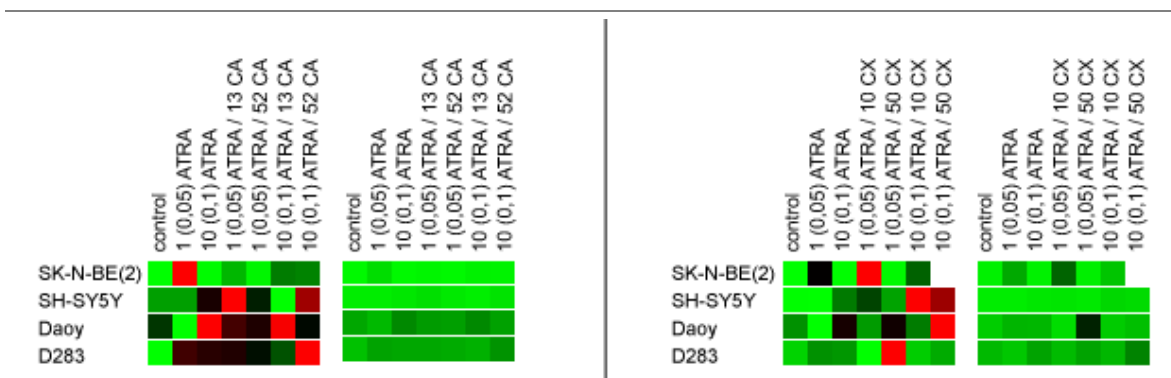
Jako provozní gen byl zvolen *HSPB90AB1*. Tento gen byl vybrán pomocí programů NormFinder a GeNorm na základě dat z mikročipů jako gen s nejstabilnější expresí. Žádná změna exprese způsobená vlivem kombinované aplikace činidel u tohoto genu nebyla detekována ani za pomoci RT-PCR (Obr. 23).



**Obr. 23** Exprese genu *HSPB90AB1* detekovaná metodou RT-PCR u buněk NBL (SK-N-BE(2), SH-SY5Y) a MBL (Daoy, D283) linií po ovlivnění ATRA s CA, resp. CX. **A** – Dokumentace výsledku RT-PCR. V případě linie D283 byly koncentrace ATRA sníženy na 0,05 a 0,1  $\mu$ M. **B** - Graf zobrazující numerická data získaná po použití denzitometrie. Data byla nejprve normalizována a potom vztažena ke kontrole. Koncentrace jsou uváděny v  $\mu$ M.

### 5.2.2 Změny exprese genu *CDKN1A*

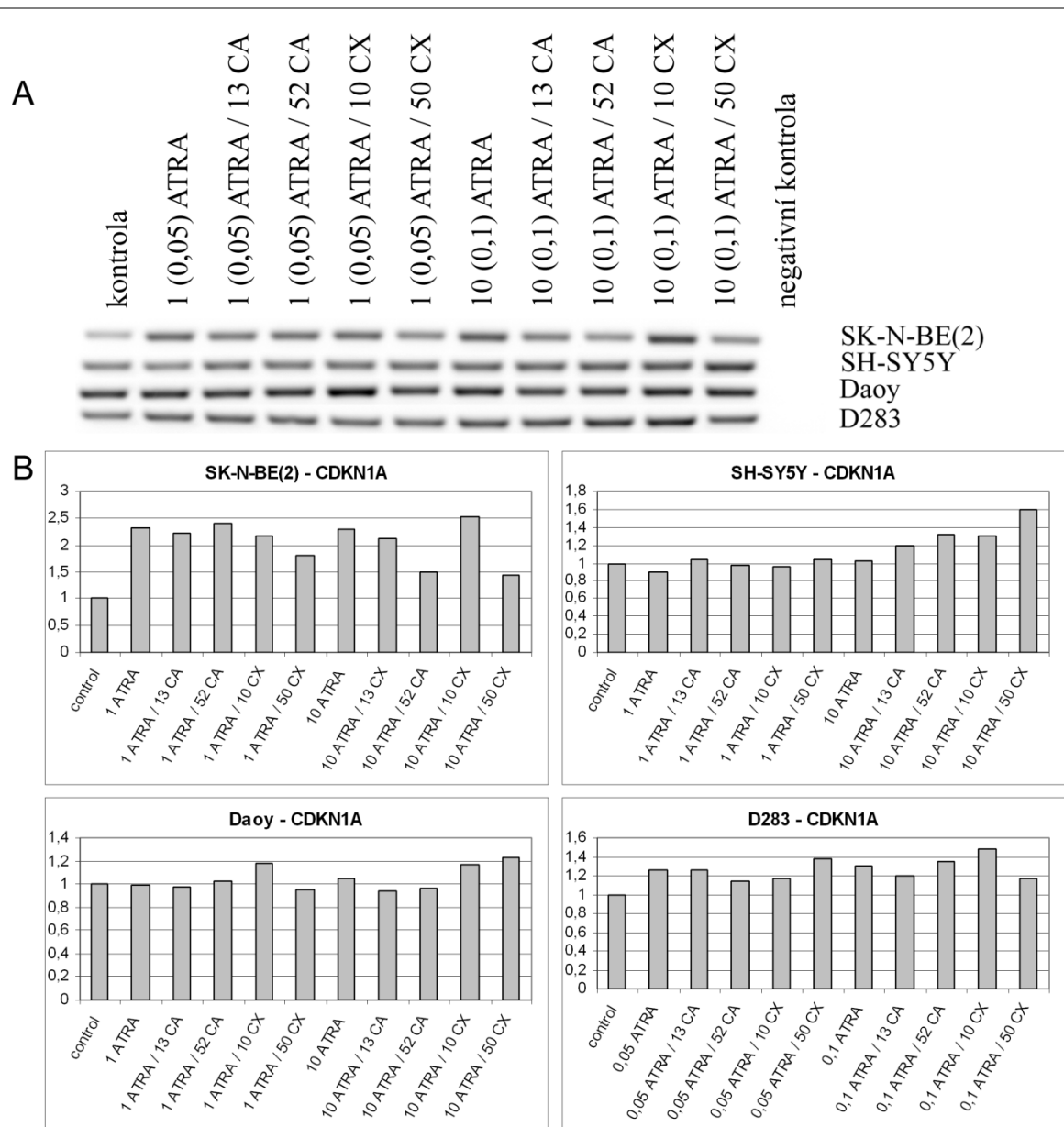
Protein p21 kódovaný genem *CDKN1A* je známý jako regulátor buněčného cyklu (Jung *et al.* 2010). Exprese tohoto genu byla sledována jak pomocí mikročipů (Obr. 24), tak metodou RT-PCR (Obr. 25).



**Obr. 24 Grafické zobrazení výsledků mikročipové analýzy exprese genu *CDKN1A* u buněk NBL (SK-N-BE(2), SH-SY5Y) a MBL (Daoy, D283) linií po ovlivnění ATRA s CA, resp. CX.** ATRA byla aplikována v koncentracích 1  $\mu$ M a 10  $\mu$ M (1 ATRA, 10 ATRA); CA v koncentracích 13  $\mu$ M a 52  $\mu$ M (13 CA, 52 CA), a CX v koncentracích 10  $\mu$ M a 50  $\mu$ M (10 CX, 50 CX). V případě linie D283 byly koncentrace ATRA sníženy na 0,05 a 0,1  $\mu$ M. Barevné značení odpovídá hladině exprese (zelená nejnížší, černá průměrná, červená nejvyšší). Barevné značení v levých sloupcích je zvoleno zvlášť pro každý gen v rámci experimentu a nezávisle na ostatních genech (v každém řádku je tak označena nejnížší exprese zeleně a nejvyšší červeně). V pravých sloupcích je barevné značení voleno pro všechny geny v rámci experimentu.

Dle výsledků z mikročipů u linie SK-N-BE(2) dochází ke zvýšení exprese genu *CDKN1A* převážně při nižších koncentracích. To alespoň rámcově odpovídá výsledkům získaným pomocí RT-PCR, dle kterých byla zvýšená exprese detekována při všech experimentálních zásazích, ačkoliv při ovlivnění nejvyššími koncentracemi (10  $\mu$ M ATRA s 52  $\mu$ M CA a 10  $\mu$ M ATRA s 50  $\mu$ M CX) již zvýšení bylo jen slabé. U linie SH-SY5Y bylo na základě výsledků z mikročipů detekováno zvýšení při aplikaci nižších koncentrací ATRA s CA, ale RT-PCR toto zjištění nepotvrdila. Naopak detekce zvýšené exprese po vyšších koncentracích kombinací ATRA s CX byla u této linie detekována jak za pomoci mikročipů, tak za pomoci RT-PCR.

U buněk linie Daoy bylo detekované zvýšení exprese za pomoci mikročipů i RT-PCR jen mírné. V případě linie D283 bylo detekováno mírné zvýšení exprese takřka po všech testovaných kombinacích činidel a to pomocí obou metod.



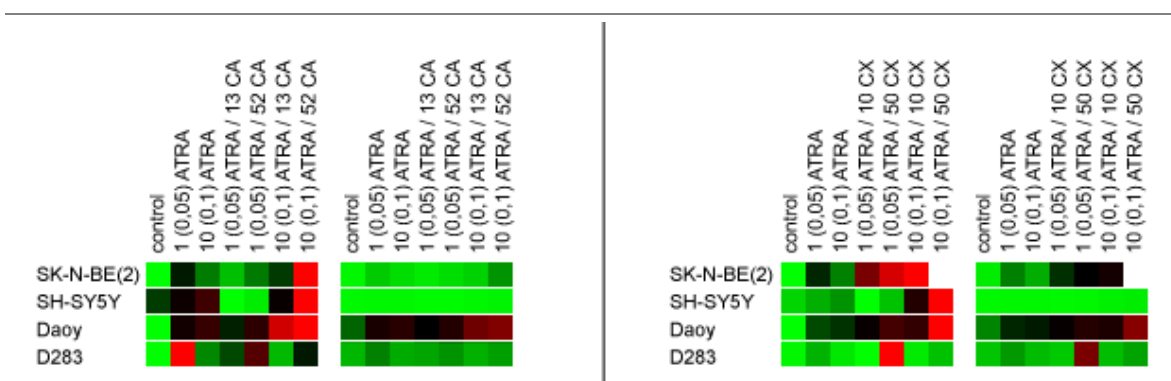
**Obr. 25** Expres genu *CDKN1A* detekovaná metodou RT-PCR u buněk NBL (SK-N-BE(2), SH-SY5Y) a MBL (Daoy, D283) linií po ovlivnění ATRA s CA, resp. CX. **A** – Dokumentace výsledku RT-PCR. V případě linie D283 byly koncentrace ATRA sníženy na 0,05 a 0,1  $\mu$ M. **B** - Graf zobrazující numerická data získaná po použití denzitometrie. Data byla nejprve normalizována a potom vztažena ke kontrole. Koncentrace jsou uváděny v  $\mu$ M.

Nejvíce patrné je zvýšení exprese u linie SK-N-BE(2). U linie SH-SY5Y je zvýšení exprese patrné jen po nejvyšších koncentracích činidel (10  $\mu$ M ATRA s 52  $\mu$ M CA a 10  $\mu$ M ATRA s 50  $\mu$ M CX). Expres u buněk MBL linií je zvýšena jen lehce.

U linie SK-N-BE(2) tedy docházelo ke zvýšení exprese genu *CDKN1A* po aplikaci nižší koncentrace činidel, u linie SH-SY5Y po vyšších koncentracích kombinací ATRA s CX a u MBL linií bylo po aplikaci ATRA s CA, resp. s CX patrné zvýšení exprese jen lehce.

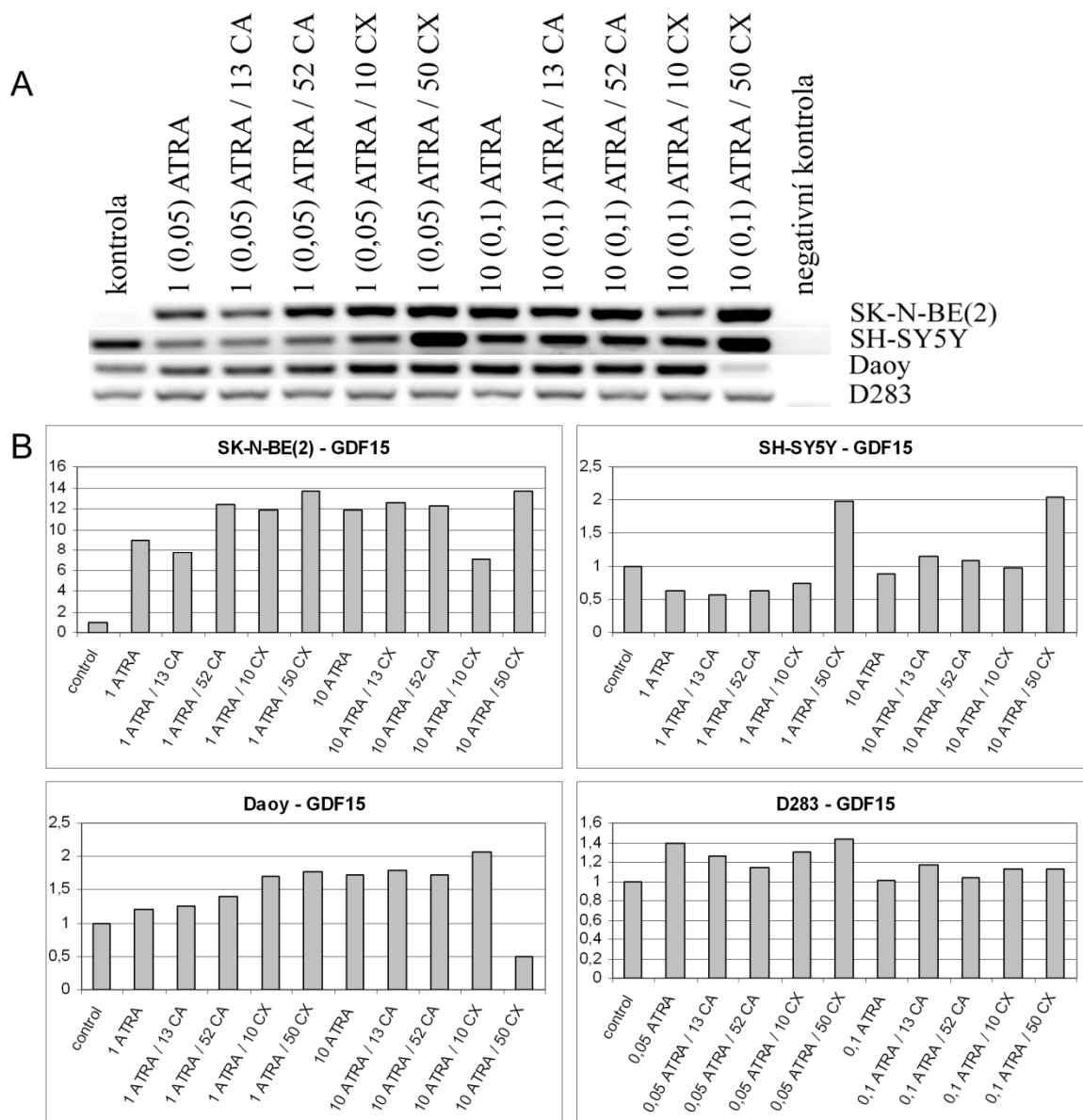
### 5.2.3 Změny exprese genu *GDF15*

Protein kódovaný genem *GDF15* patří do rodiny růstových faktorů TGF $\beta$  a je spojován s neuronální diferenciací (Mimeault and Batra 2010). Změny exprese, v závislosti na koncentraci použitých činidel, se u tohoto genu projevovaly asi nejvýrazněji ze všech zkoumaných genů, již na základě dat z mikročipů (Obr. 26). Tato senzitivita byla potvrzena i pomocí RT-PCR (Obr. 27).



**Obr. 26** Grafické zobrazení výsledků mikročipové analýzy exprese genu *GDF15* u buněk NBL (SK-N-BE(2), SH-SY5Y) a MBL (Daoy, D283) linií po ovlivnění ATRA s CA, resp. CX. ATRA byla aplikována v koncentracích 1  $\mu$ M a 10  $\mu$ M (1 ATRA, 10 ATRA); CA v koncentracích 13  $\mu$ M a 52  $\mu$ M (13 CA, 52 CA), a CX v koncentracích 10  $\mu$ M a 50  $\mu$ M (10 CX, 50 CX). V případě linie D283 byly koncentrace ATRA sníženy na 0,05 a 0,1  $\mu$ M. Barevné značení odpovídá hladině exprese (zelená nejnižší, černá průměrná, červená nejvyšší). Barevné značení v levých sloupcích je zvoleno zvlášť pro každý gen v rámci experimentu a nezávisle na ostatních genech (v každém řádku je tak označena nejnižší exprese zeleně a nejvyšší červeně). V pravých sloupcích je barevné značení voleno pro všechny geny v rámci experimentu.

U kontrolního vzoru buněk linie SK-N-BE(2) nebyla exprese genu *GDF15* prokázána ani za pomoci mikročipů, ani s pomocí RT-PCR, a tak je pozorované zvýšení razantní. Kromě takto výrazného zvýšení bylo navíc pozorováno zvyšování exprese v závislosti na koncentraci, a to shodně za pomoci obou metod. Ačkoliv při experimentech sledujících vliv kombinace činidel nebyla v kontrolní buněčné populaci této linie prokazatelná exprese genu *GDF15*, při opakovaném rozmražení buňky této linie vykazovaly nízkou expresi tohoto genu. Bylo tomu tak v doplňujícím experimentu zaměřeném na samotné působení různých koncentrací ATRA (Obr. 21, Obr. 22).



**Obr. 27** Expres genu *GDF15* detekovaná metodou RT-PCR u buněk NBL (SK-N-BE(2), SH-SY5Y) a MBL (Daoy, D283) linií po ovlivnění ATRA s CA, resp. CX. **A** – Dokumentace výsledku RT-PCR. V případě linie D283 byly koncentrace ATRA sníženy na 0,05 a 0,1  $\mu$ M. **B** - Graf zobrazující numerická data získaná po použití denzitometrie. Data byla nejprve normalizována a potom vztažena ke kontrole. Koncentrace jsou uváděny v  $\mu$ M.

K nejvýraznějšímu zvýšení exprese došlo u linie SK-N-BE(2) a také u linie Daoy. U linie SH-SY5Y došlo ke zvýšení jen po kombinacích s 50  $\mu$ M CX.

U linie SH-SY5Y byla na základě dat z mikročipů pozorována exprese pouze u dvou buněčných populací ovlivněných 10  $\mu$ M ATRA v kombinaci s 10  $\mu$ M, resp. s 50  $\mu$ M CX. Dle RT-PCR byla exprese *GDF15* sice prokázána u všech vzorků, ale ke zvýšení došlo jen po aplikaci kombinací ATRA (1 i 10  $\mu$ M) s 50  $\mu$ M CX, což alespoň částečně odpovídá výsledkům z mikročipů.

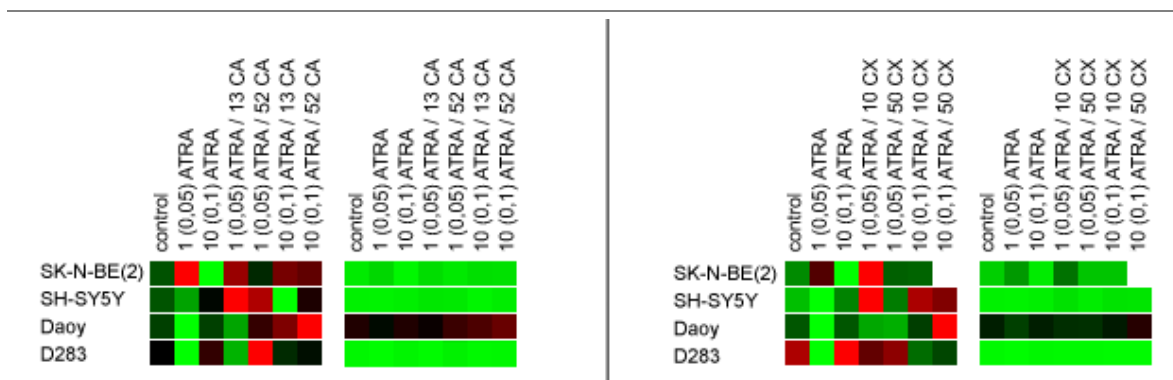


U linie Daoy pak byla detekována zvýšená exprese v závislosti na koncentraci, a to jak za použití mikročipů, tak s pomocí RT-PCR. Rozporným výsledkem ovšem je detekce snížené exprese po kombinované aplikaci 10  $\mu$ M ATRA s 50  $\mu$ M CX pomocí metody RT-PCR. U linie D283 bylo oběma metodami detekováno slabé zvýšení při nižších koncentracích použitých činidel.

Lze tedy shrnout, že exprese genu *GDF15* se zvyšovala v závislosti na použité koncentraci činidel u linií SK-N-BE(2) a Daoy (vyjma nejvyšší koncentrace), v případě linie SH-SY5Y docházelo ke zvýšení jen po kombinacích ATRA s CX a u linie D283 byla exprese zvýšena spíše po nižších koncentracích činidel.

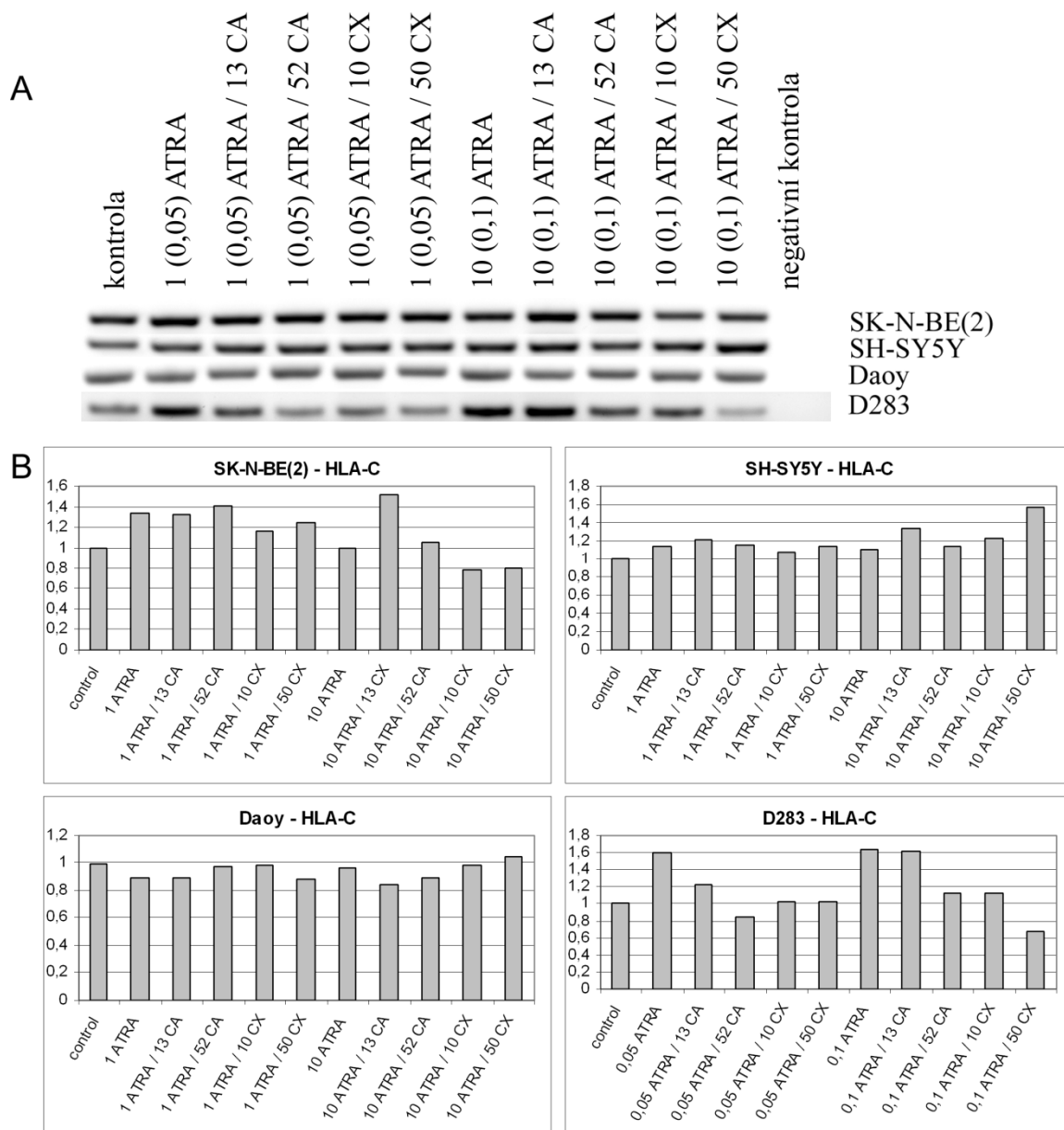
#### 5.2.4 Změny exprese genu *HLA-C*

Gen *HLA-C* kóduje molekulu HLA I. třídy, která je důležitou složkou imunitního systému, neboť skrze ni jsou na povrchu buněk prezentovány antigeny T lymfocytům (Davidson *et al.* 1985). Vliv ATRA s CA, resp. s CX na expresi genu *HLA-C* byl sledován jak pomocí mikročipů (Obr. 28), tak pomocí RT-PCR (Obr. 29).



**Obr. 28 Grafické zobrazení výsledků mikročipové analýzy exprese genu *HLA-C* u buněk NBL (SK-N-BE(2), SH-SY5Y) a MBL (Daoy, D283) linií po ovlivnění ATRA s CA, resp. CX.** ATRA byla aplikována v koncentracích 1  $\mu$ M a 10  $\mu$ M (1 ATRA, 10 ATRA); CA v koncentracích 13  $\mu$ M a 52  $\mu$ M (13 CA, 52 CA), a CX v koncentracích 10  $\mu$ M a 50  $\mu$ M (10 CX, 50 CX). V případě linie D283 byly koncentrace ATRA sníženy na 0,05 a 0,1  $\mu$ M. Barevné značení odpovídá hladině exprese (zelená nejnižší, černá průměrná, červená nejvyšší). Barevné značení v levých sloupcích je zvoleno zvlášť pro každý gen v rámci experimentu a nezávisle na ostatních genech (v každém řádku je tak označena nejnižší exprese zeleně a nejvyšší červeně). V pravých sloupcích je barevné značení voleno pro všechny geny v rámci experimentu.





**Obr. 29** Expres genu *HLA-C* detekovaná metodou RT-PCR u buněk NBL (SK-N-BE(2), SH-SY5Y) a MBL (Daoy, D283) linií po ovlivnění ATRA s CA, resp. CX. **A** – Dokumentace výsledku RT-PCR. V případě linie D283 byly koncentrace ATRA sníženy na 0,05 a 0,1  $\mu$ M. **B** - Graf zobrazující numerická data získaná po použití denzitometrie. Data byla nejprve normalizována a potom vztažena ke kontrole. Koncentrace jsou uváděny v  $\mu$ M.

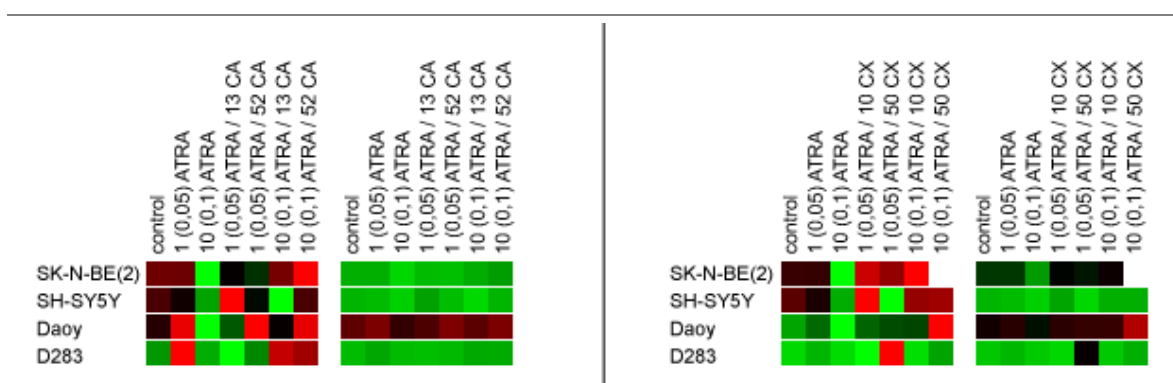
U obou neuroblastomových linií bylo detekováno mírné zvýšení exprese, u linie SK-N-BE(2) po aplikaci nižších koncentrací činidel, zatímco u linie SH-SY5Y spíše po vyšších koncentracích. U linie Daoy nebyly detekovány žádné významnější změny a zatímco u linie D283 je patrné zvýšení exprese po kombinacích ATRA s CA.

Obě NBL linie vykazovaly mírné zvýšení exprese genu *HLA-C*, a to jak při detekci za pomoci mikročipů, tak metodou RT-PCR. U linie SK-N-BE(2) po aplikaci nižších koncentrací činidel, zatímco u linie SH-SY5Y spíše po vyšších koncentracích. U linie Daoy sice výsledky z mikročipové analýzy naznačují nejen silnou expresi, ale i zvyšování exprese v reakci na aplikaci kombinace ATRA s CA, ovšem metoda RT-PCR takovéto zvýšení nepotvrdila. A naopak zatímco za pomoci čipů se nepodařilo detekovat žádné výrazné změny v expresi genu *HLA-C* u linie D283, tak pomocí RT-PCR se u této linie podařilo detekovat zvýšení exprese po aplikaci kombinací ATRA s CA.

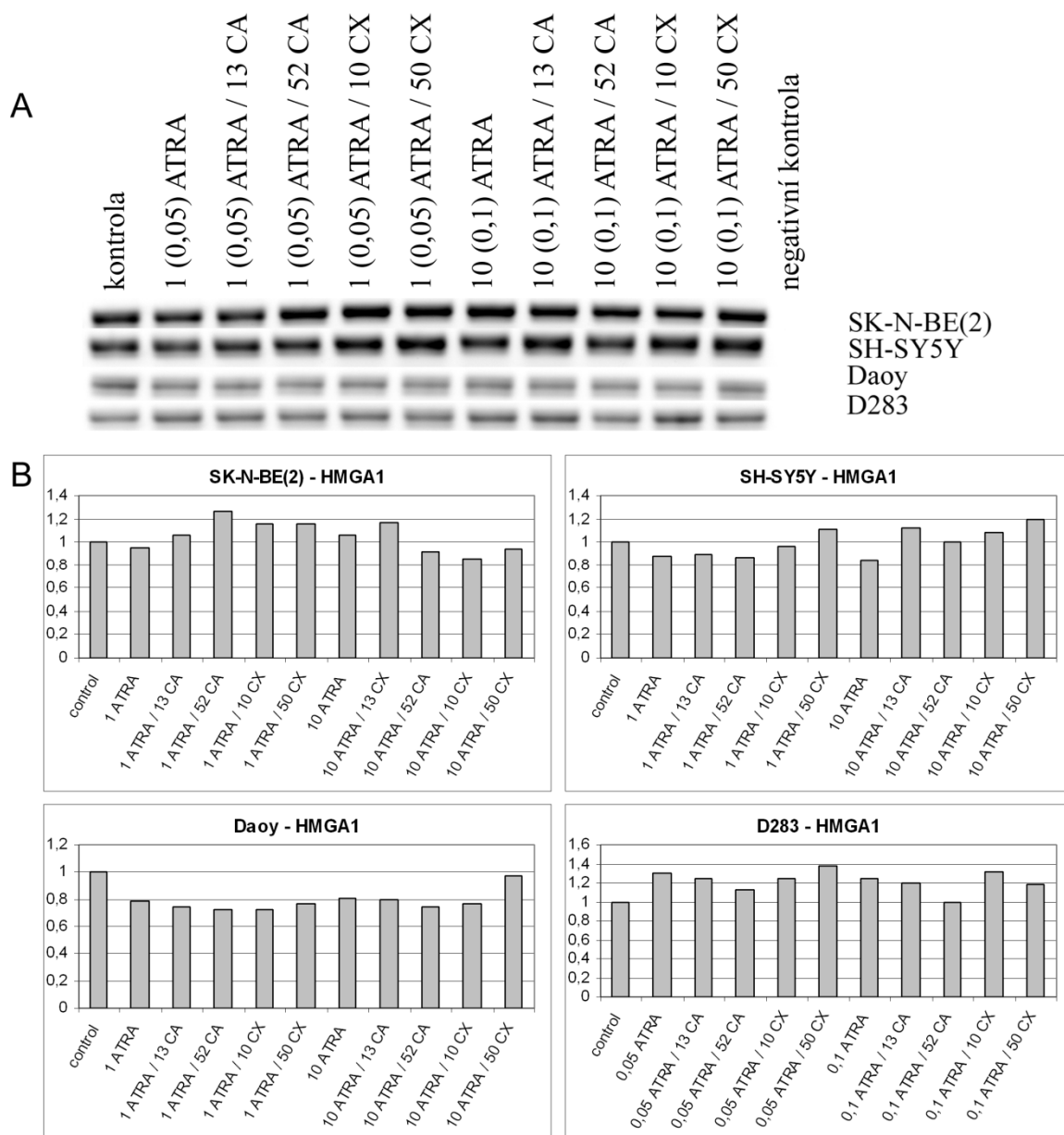
U obou NBL linií došlo k mírnému zvýšení exprese genu *HLA-C*. U MBL linií je ovšem detekované zvýšení sporné.

### 5.2.5 Změny exprese genu *HMGA1*

Gen *HMGA1* kóduje protein, který se váže do malého žlábků DNA v oblastech bohatých na A a T a podílí se na regulaci transkripce (Reeves and Beckerbauer 2001). Pro ověření za pomoci RT-PCR (Obr. 30) byl gen *HMGA1* vybrán jako jediný gen, na jehož expresi dle mikročipové analýzy (Obr. 31), působila kombinace ATRA s CX více než kombinace ATRA s CA.



**Obr. 30 Grafické zobrazení výsledků mikročipové analýzy exprese genu *HMGA1* u buněk NBL (SK-N-BE(2), SH-SY5Y) a MBL (Daoy, D283) linií po ovlivnění ATRA s CA, resp. CX.** ATRA byla aplikována v koncentracích 1  $\mu$ M a 10  $\mu$ M (1 ATRA, 10 ATRA); CA v koncentracích 13  $\mu$ M a 52  $\mu$ M (13 CA, 52 CA), a CX v koncentracích 10  $\mu$ M a 50  $\mu$ M (10 CX, 50 CX). V případě linie D283 byly koncentrace ATRA sníženy na 0,05 a 0,1  $\mu$ M. Barevné značení odpovídá hladině exprese (zelená nejnižší, černá průměrná, červená nejvyšší). Barevné značení v levých sloupcích je zvoleno zvlášť pro každý gen v rámci experimentu a nezávisle na ostatních genech (v každém řádku je tak označena nejnižší exprese zeleně a nejvyšší červeně). V pravých sloupcích je barevné značení voleno pro všechny geny v rámci experimentu.



**Obr. 31** Expres genu *HMGA1* detekovaná metodou RT-PCR u buněk NBL (SK-N-BE(2), SH-SY5Y) a MBL (Daoy, D283) linií po ovlivnění ATRA s CA, resp. CX. **A** – Dokumentace výsledku RT-PCR. V případě linie D283 byly koncentrace ATRA sníženy na 0,05 a 0,1  $\mu$ M. **B** - Graf zobrazující numerická data získaná po použití denzitometrie. Data byla nejprve normalizována a potom vztažena ke kontrole. Koncentrace jsou uváděny v  $\mu$ M.

Mírné zvýšení bylo detekováno u linií SH-SY5Y a D283 po kombinacích ATRA s CX. Slabé zvýšení bylo detekováno také u linie SK-N-BE(2) po kombinaci 1  $\mu$ M ATRA s 52  $\mu$ M CA. U linie Daoy pak bylo detekováno malé snížení exprese po většině kombinací.

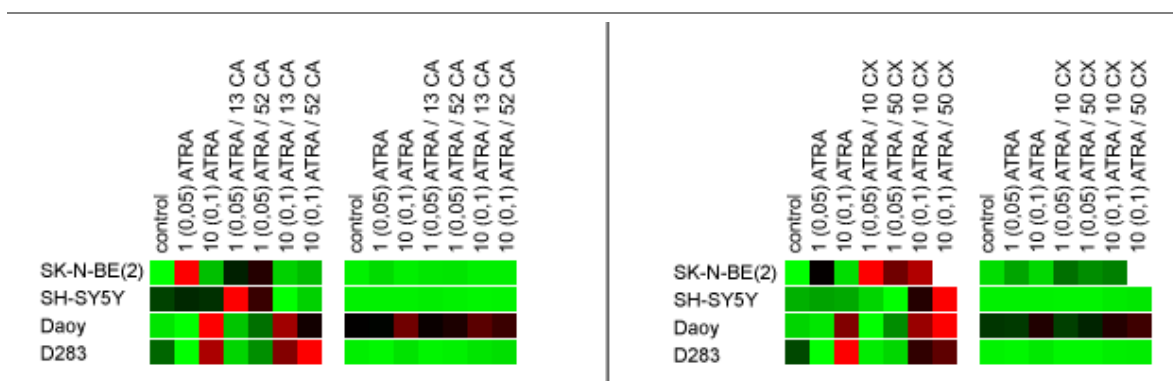
Změny exprese genu *HMGA1* byly na základě dat z mikročipů pozorovány pouze po aplikaci kombinace ATRA s CX a to u všech čtyř zkoumaných linií. Oproti očekávání nebylo pomocí RT-PCR u linií SK-N-BE(2) a Daoy potvrzeno zvýšení exprese výlučně po kombinacích ATRA s CX. U linie SK-N-BE(2) bylo detekováno slabé zvýšení jen po kombinaci 1  $\mu$ M ATRA s 52  $\mu$ M CA a u linie Daoy bylo dokonce pozorováno malé

snížení exprese po všech kombinacích kromě kombinace 10  $\mu$ M ATRA s 50  $\mu$ M CX. Linie SH-SY5Y a D283 pak v souladu s daty z čipů vykazovaly mírné zvýšení exprese genu *HMGA1* po kombinované aplikaci ATRA a CX.

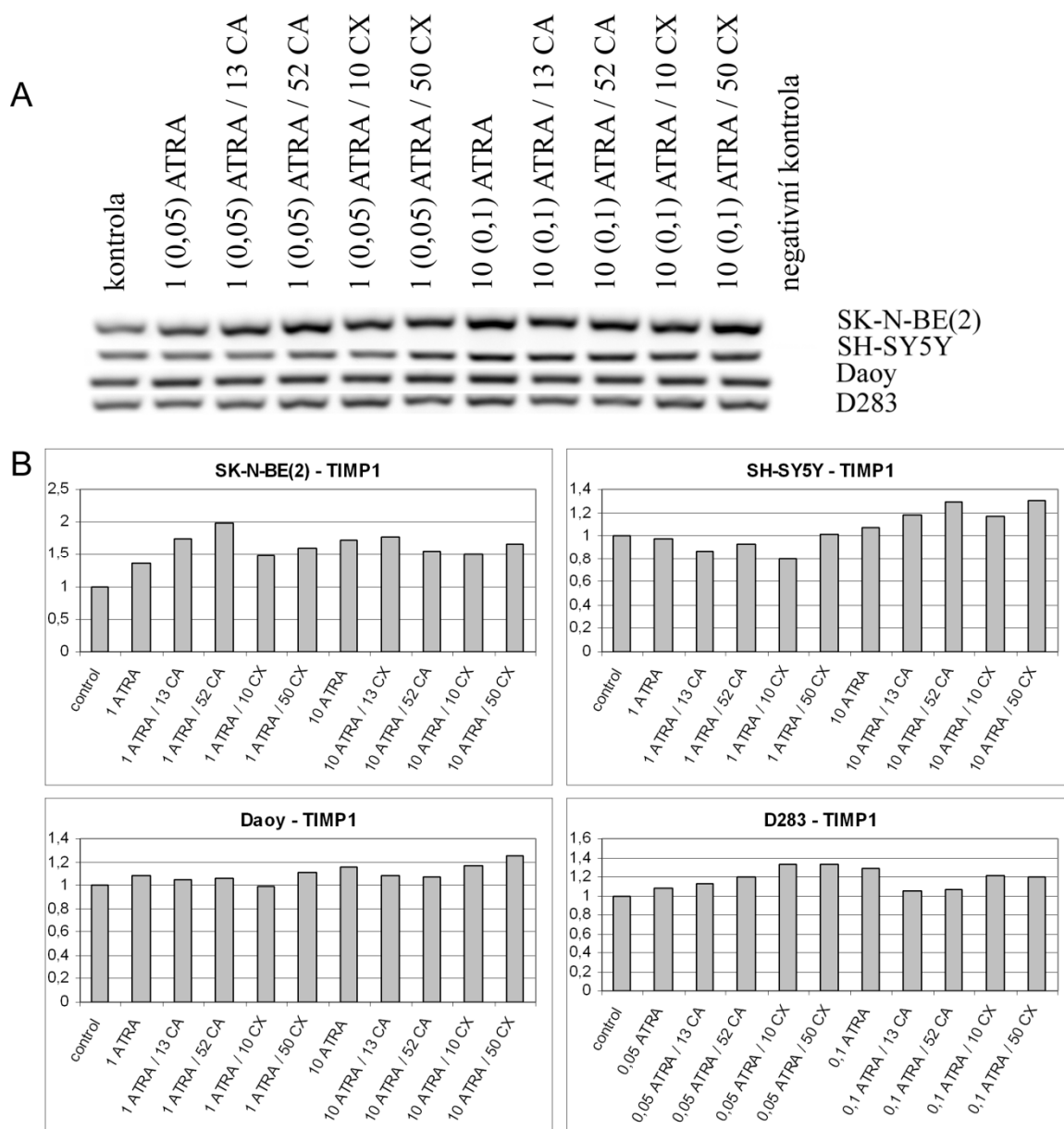
Zdá se tak, že kombinovanou aplikací ATRA s CA, resp. s CX lze expresi genu *HMGA1* ovlivnit, nicméně metoda RT-PCR nepotvrdila rozdílné působení kombinací ATRA s CA a ATRA s CX na expresi tohoto genu.

### 5.2.6 Změny exprese genu *TIMP1*

Inhibitory matrixových metaloproteináz, mezi které patří i protein *TIMP1* kódovaný stejnojmenným genem, se významně podílejí na regulaci pohybu buněk (Reed et al. 2003). I exprese tohoto genu byla sledována pomocí mikročipů (Obr. 32) a RT-PCR (Obr. 33).



**Obr. 32 Grafické zobrazení výsledků mikročipové analýzy exprese genu *TIMP1* u buněk NBL (SK-N-BE(2), SH-SY5Y) a MBL (Daoy, D283) linií po ovlivnění ATRA s CA, resp. CX.** ATRA byla aplikována v koncentracích 1  $\mu$ M a 10  $\mu$ M (1 ATRA, 10 ATRA); CA v koncentracích 13  $\mu$ M a 52  $\mu$ M (13 CA, 52 CA), a CX v koncentracích 10  $\mu$ M a 50  $\mu$ M (10 CX, 50 CX). V případě linie D283 byly koncentrace ATRA sníženy na 0,05 a 0,1  $\mu$ M. Barevné značení odpovídá hladině exprese (zelená nejnížší, černá průměrná, červená nejvyšší). Barevné značení v levých sloupcích je zvoleno zvlášť pro každý gen v rámci experimentu a nezávisle na ostatních genech (v každém řádku je tak označena nejnížší exprese zeleně a nejvyšší červeně). V pravých sloupcích je barevné značení voleno pro všechny geny v rámci experimentu.



**Obr. 33** Expres genu *TIMP1* detekovaná metodou RT-PCR u buněk NBL (SK-N-BE(2), SH-SY5Y) a MBL (Daoy, D283) linií po ovlivnění ATRA s CA, resp. CX. **A** – Dokumentace výsledku RT-PCR. V případě linie D283 byly koncentrace ATRA sníženy na 0,05 a 0,1  $\mu$ M. **B** - Graf zobrazující numerická data získaná po použití densitometrie. Data byla nejprve normalizována a potom vztažena ke kontrole. Koncentrace jsou uváděny v  $\mu$ M.

Nejvýraznější zvýšení exprese bylo detekováno u linie SK-N-BE(2) po aplikaci ATRA s CA i ATRA s CX. U linií SH-SY5Y a D283 bylo detekováno pouze lehké zvýšení exprese po aplikaci vyšších koncentrací ať již ATRA s CA, nebo ATRA s CX. Lehké zvýšení bylo zaznamenáno také u buněk linie Daoy po aplikaci vyšších koncentrací ATRA s CX.

U linie SK-N-BE(2) bylo po aplikaci ATRA samotné i v kombinaci s inhibitory detekováno výrazné zvýšení exprese genu *TIMP1* za pomoci mikročipů i za pomoci RT-PCR. U linie SH-SY5Y bylo pomoci mikročipů detekováno zvýšení exprese pouze po vyšších koncentracích kombinace ATRA s CX. Za pomoci RT-PCR bylo navíc detekováno

i zvýšení po vyšších koncentracích kombinace ATRA s CA. U linie D283 bylo za pomoci mikročipů detekováno zvýšení po aplikaci kombinací ATRA s CA i ATRA s CX, zvláště ve vyšších koncentracích. Pomocí RT-PCR bylo detekováno zvýšení exprese spíše po kombinacích ATRA s CX, zato však i při nižších koncentracích. V souladu s čipovou analýzou bylo za pomoci RT-PCR detekováno zvýšení exprese genu *TIMP1* u linie Daoy po aplikaci vyšších koncentrací ATRA s CX.

Lze tak tvrdit, že u linie SK-N-BE(2) docházelo ke zvýšení exprese *TIMP1* po všech kombinacích činidel, zatímco u MBL linií a linie SH-SY5Y spíše po kombinacích ATRA s CX.

## Scratch Assay

Zvýšená exprese inhibitoru matrixových metaloproteináz a změny v regulaci cytoskeletu (budou diskutovány v dalším textu - viz str. 87 a 94) vedly k otázce, zda jde pouze o morfologické změny související s neuronální diferenciací, tedy zejména s tvarem buněk a s tvorbou nových neuronálních výběžků apod., nebo zda je změnou exprese těchto genů ovlivněna také schopnost migrace buněk. Omezení schopnosti pohybu by mohlo být v souladu se zvýšenou expresí inhibitoru matrixových metaloproteináz *TIMP1*, která byla popsána v předchozí podkapitole.

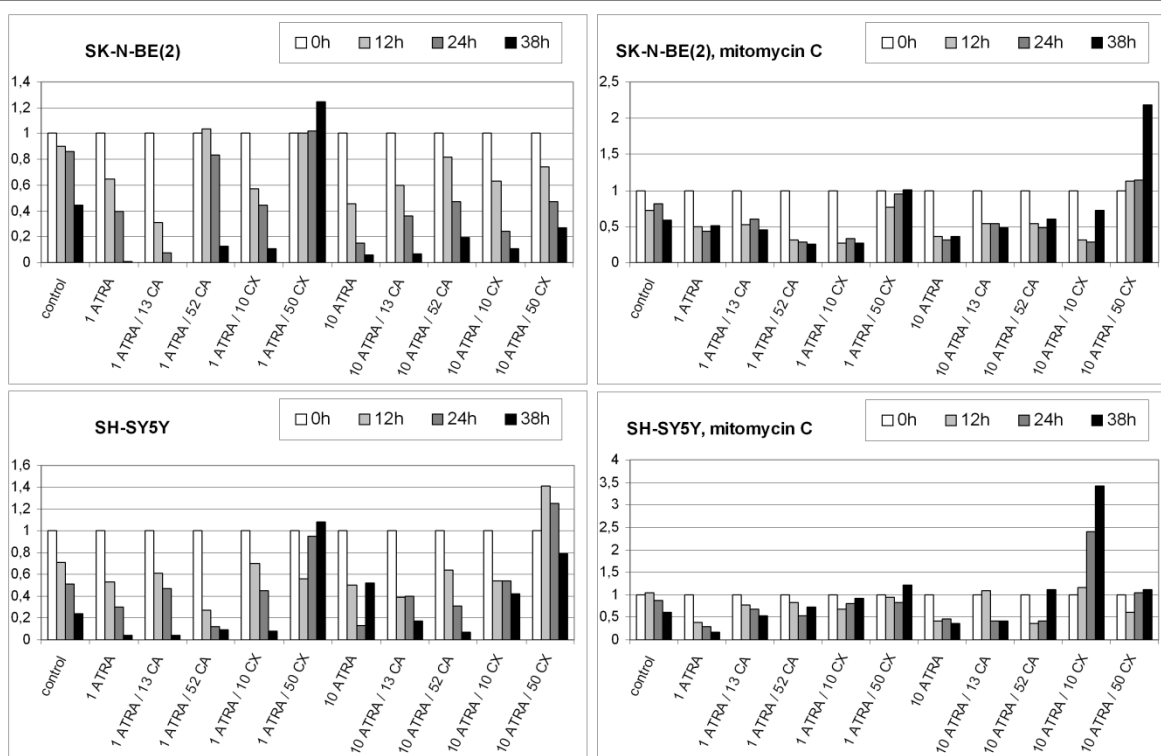
K ověření případných změn v pohyblivosti buněk byla zvolena tzv. Scratch Assay. Aby byly co nejlépe rozlišeny vlivy proliferace a migrace, pokus byl proveden jak ve standardním uspořádání, tak s přidavkem mitomycinu C, který zabraňuje proliferaci buněk. Scratch assay byla provedena pouze u NBL linií, neboť MBL linie D283 je polosuspenní a pro tento experiment tedy nevhodná. Navíc u MBL linií bylo oproti NBL liniím detekováno mnohem méně změn exprese u genů spoluzodpovědných za přestavby cytoskeletu.

Na základě získaných dat je nejvýraznějším výsledkem potvrzení toxického působení 50  $\mu\text{M}$  CX, a to jak v kombinaci s 1  $\mu\text{M}$  ATRA, tak v kombinaci s 10  $\mu\text{M}$  ATRA. Na rozdíl od ostatních kombinací se neporostlá plocha u buněčných populací ovlivněných ATRA s 50  $\mu\text{M}$  CX v průběhu experimentu vyrovnala, nebo dokonce rozšířila oproti času 0h.

Překvapivým výsledkem je sice nepříliš výrazné, ale přesto rychlejší zarůstání neporostlé plochy u buněčných populací ovlivněných kombinacemi činidel kromě

kombinací ATRA s 50  $\mu$ M CX. Tento výsledek je výraznější u buněčných populací bez přídavku mitomycinu C, což naznačuje zvýšení proliferační aktivity po aplikaci ATRA s CA, resp. CX.

Lze shrnout, že na základě získaných dat se potvrdilo toxické působení 50  $\mu$ M CX. Výsledky také naznačují schopnost kombinací ATRA s CA, resp. CX zvýšit buněčnou proliferaci. Ovšem nebyl detekován žádný trend, který by naznačoval změnu mobility buněk po aplikaci ATRA s CA, resp. CX (Obr. 34).



**Obr. 34 Výsledky Scratch Assay na buňkách NBL linií.** V grafech jsou zaznamenány hodnoty odpovídající podílu procenta neporostlé plochy ve zkoumaném čase k procentu neporostlé plochy v čase 0h. Obrazová data byla převedena na numerická data pomocí programu TScratch. Koncentrace jsou uváděny v  $\mu$ M.

Vliv ATRA s CA, resp. S CX na migraci *in vitro* nebyl prokázán. Potvrdilo se pouze cytotoxické působení CX.

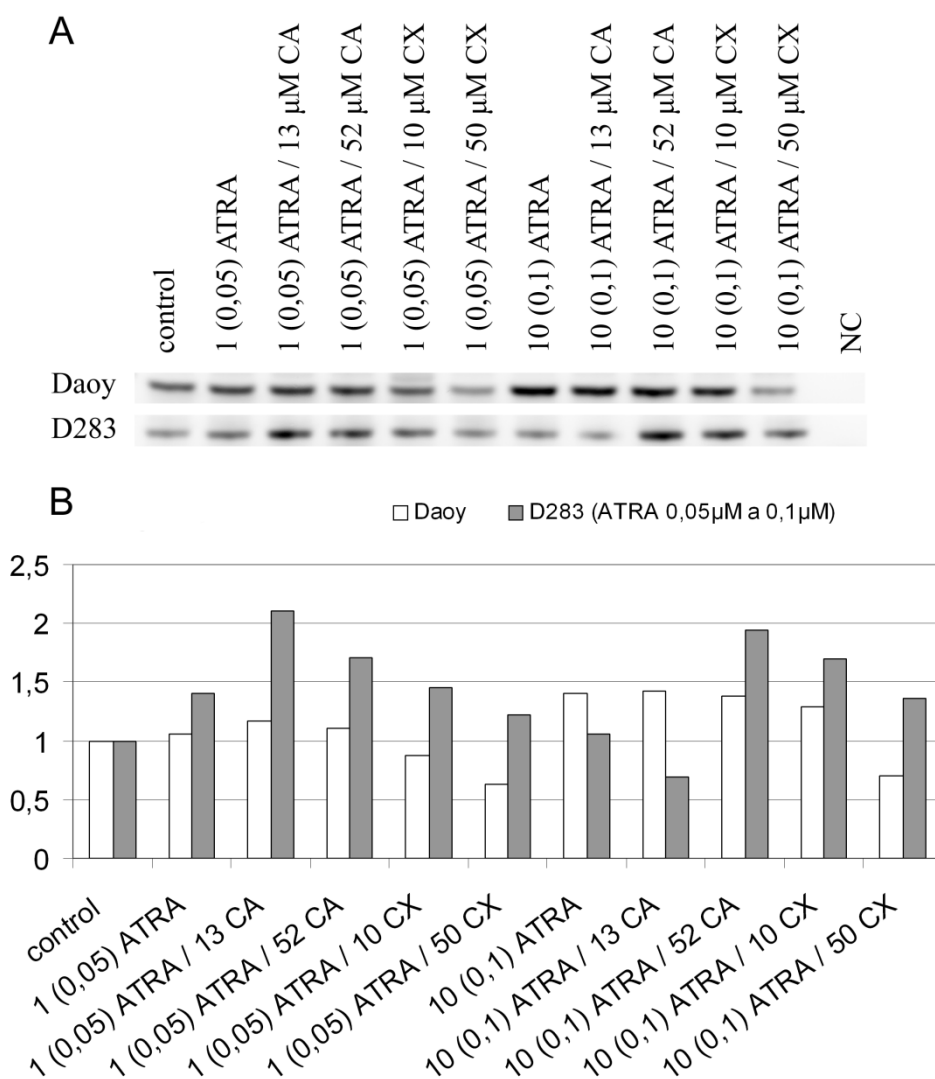
### 5.3 Vliv kombinované aplikace ATRA s CA, resp. CX na hladinu transkriptu TAp73 a TP53

Protein p73 se významně podílí na procesech probíhajících během vývoje a diferenciaci různých buněk a tkání. V rámci práce na projektu zaměřeném na expresi a intracelulární distribuci N-terminálních izoform proteinu p73 u buněk MBL byla u sbírkových linií (Daoy, D283) pomocí RT-PCR sledována hladina transkriptu TAp73. Isoforma TAp73 je v literatuře zmiňována v souvislosti s tumor supresivními funkcemi



(Tomasini et al. 2008) a bylo též prokázáno, že hladina této izoformy roste během neurogeneze (Saifudeen et al. 2005).

Ačkoliv na základě mikročipových analýz nebyla detekována exprese genu *TP73* u ovlivněných buněčných populací, překvapivě byl pozorován nárůst hladiny transkriptu TAp73 po aplikaci samotné ATRA, ale i po kombinovaném působení ATRA s LOX, resp. COX inhibitory (Obr. 35). Vzhledem k možnému funkčnímu propojení byla provedena i analýza exprese genu *TP53* metodou RT-PCR, ale u tohoto genu žádné zvýšení exprese zaznamenáno nebylo (Obr. 36).

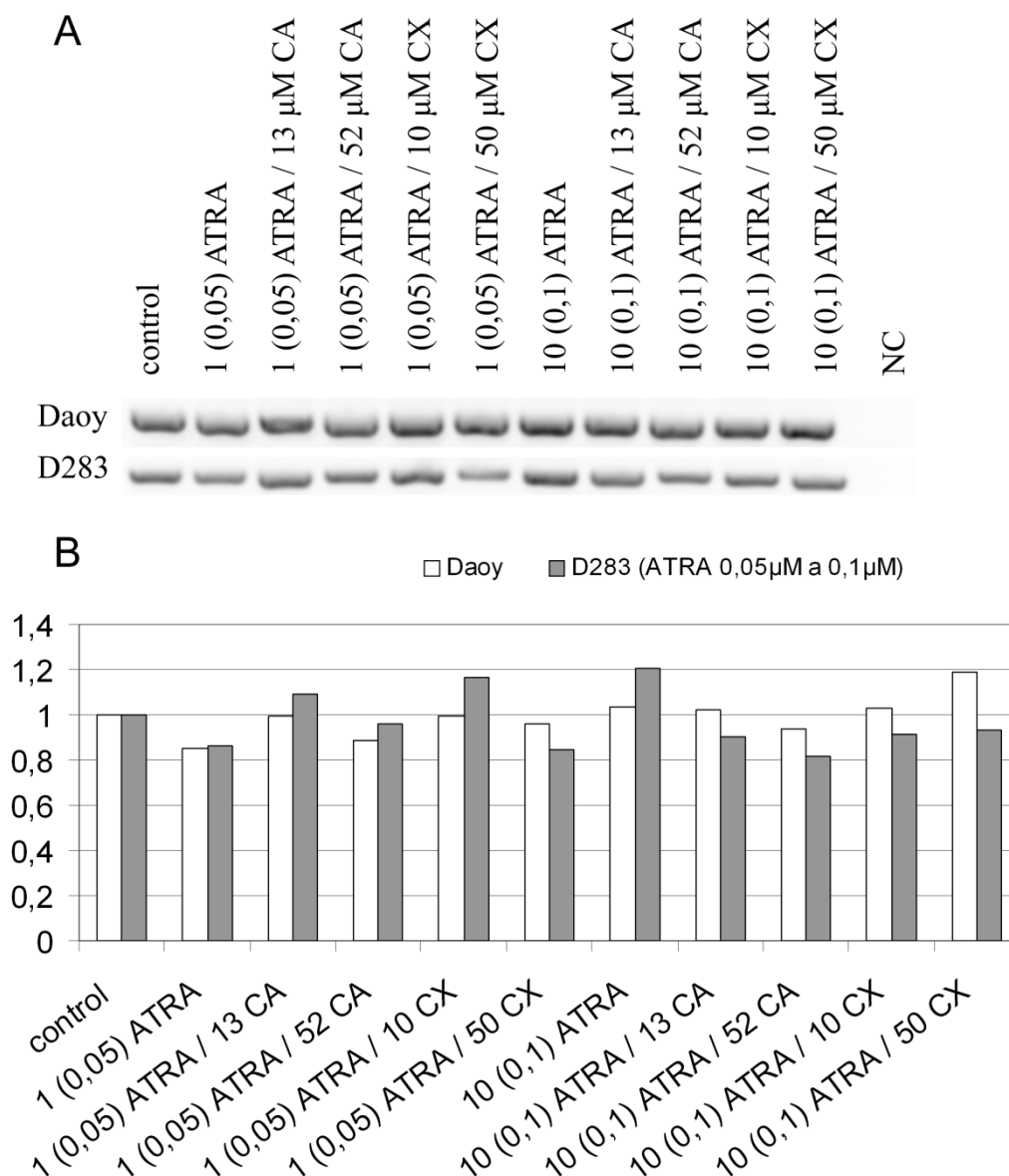


**Obr. 35 Hladina transkriptu TAp73 detekovaná metodou RT-PCR u buněk sbírkových MBL linií po ovlivnění ATRA s CA, resp. CX. A – Dokumentace výsledku RT-PCR.**

**B** - Graf zobrazující numerická data získaná po použití denzitometrie. Data byla nejprve normalizována a potom vztažena ke kontrole. Koncentrace jsou uváděny v  $\mu$ M.

U obou zkoumaných linií je patrný nárůst exprese po aplikaci činidel. Po použití vyšších koncentrací zvláště CX již k dalšímu nárůstu exprese nedochází.

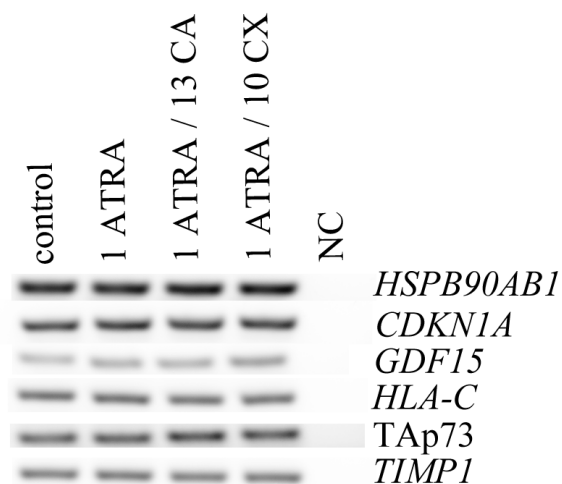




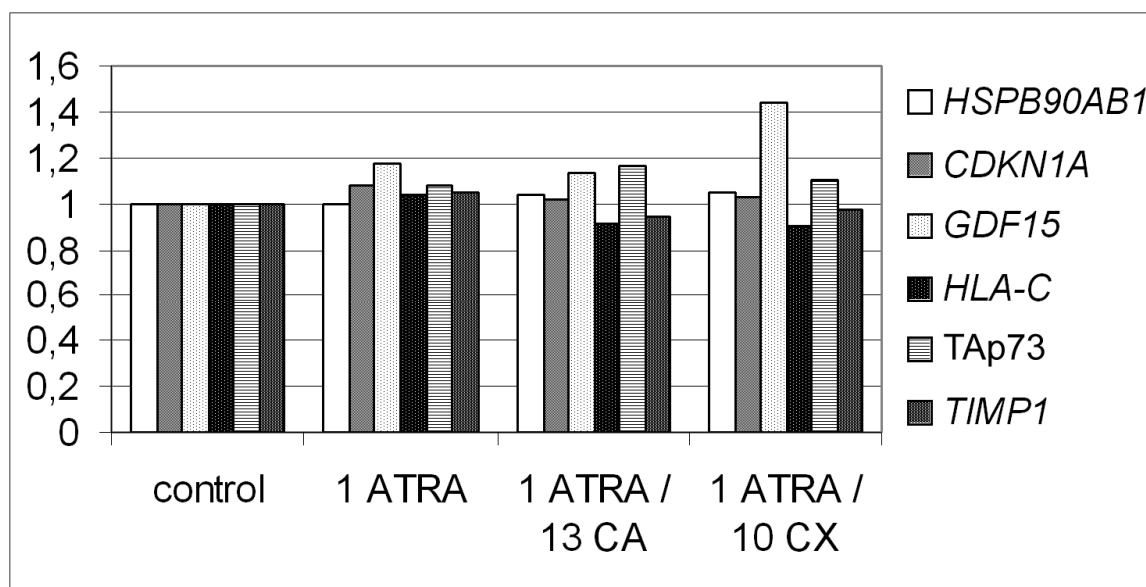
**Obr. 36** Expresse genu *TP53* detekovaná metodou RT-PCR u buněk sbírkových MBL linií po ovlivnění ATRA s CA, resp. CX. **A** – Dokumentace výsledku RT-PCR. **B** - Graf zobrazující numerická data získaná po použití denzitometrie. Data byla nejprve normalizována a potom vztažena ke kontrole. Koncentrace jsou uváděny v  $\mu\text{M}$ .

Ačkoliv jsou patrné drobné změny v expresi sledovaného genu, nepodařilo se detekovat souvislost s koncentrací činidel.

Vzhledem ke komplikacím při kultivaci patientských linií byla pro srovnávací experiment s kombinovanou aplikací použitelná pouze linie MBL-13. U této linie byla na buněčných populacích ovlivněných nižšími koncentracemi ATRA v kombinaci s CA, resp. s CX provedena RT PCR vybraných genů a transkriptu TAp73 (Obr. 37, Obr. 38). Výraznější zvýšení exprese bylo detekováno pouze u genu *GDF15* a slabé zvýšení exprese bylo detekováno i u transkriptu TAp73.



**Obr. 37** Expres vybraných genů detekovaná metodou RT PCR u buněčné linie MBL-13 po ovlivnění ATRA s CA, resp. CX. Patrné zvýšení exprese bylo detekováno u genů *GDF15* a lehce i u transkriptu *TAp73*. Koncentrace jsou uváděny v  $\mu\text{M}$ .



**Obr. 38** Expres vybraných genů detekovaná metodou RT PCR u buněčné linie MBL-13 po ovlivnění ATRA s CA, resp. CX. Koncentrace jsou uváděny v  $\mu\text{M}$ . Graf zobrazuje numerická data získaná po použití denzitometrie. Data byla nejprve normalizována a potom vztažena ke kontrole. Patrné zvýšení exprese bylo detekováno u genů *GDF15* a slabě i u transkriptu *TAp73*.

## 6 Diskuse

Mezi typické vlastnosti nádorů patří porucha diferenciace. Proto terapie, jejímž cílem je indukce diferenciace transformovaných buněk do terminálních stádií společně s následnou indukcí apoptózy, představuje jednu ze slibných strategií při léčbě malignit.

Jedním z nejznámějších induktorů diferenciace jsou retinoidy. Tyto deriváty vitamínu A se v buňce podílejí na regulaci množství důležitých biologických procesů. Jejich působnost zasahuje od regulace procesů při embryonálním vývoji přes důležitou úlohu při procesu vidění, funkce v imunitním systému až po regulace procesů spojených s růstem a udržováním homeostázy (*Blomhoff and Blomhoff 2006*). Takto široká škála účinků retinoidů je ponejvíce založena na jaderných receptorech RAR a RXR, které se vážou na specifická místa v genomu a fungují jako transkripční aktivátory, resp. represory podle přítomnosti nebo nepřítomnosti navázaných retinoidů.

U řady malignit byl prokázán klinický přínos terapie pomocí retinoidů. ATRA je klinicky využívána při léčbě akutní promyelocytární leukémie, 13-*cis* RA u neuroblastomu a 9-*cis* RA u Kaposiho sarkomu. U premaligních stavů, jako jsou orální leukoplakie a xeroderma pigmentosum, byl zaznamenán klinický přínos použití 13-*cis* RA. Částečných úspěchů bylo dosaženo i s využitím syntetického retinoidu 4-HRP při chemoprevenci u sekundárního karcinomu prsu (*Freemantle et al. 2003*).

Kromě již klinicky ověřených přínosů retinoidů v léčbě malignit existuje množství prací na experimentálních modelech naznačujících další potenciální využití retinoidů. Jako příklad lze uvést studie na ovariálním karcinomu (*Purev et al. 2011*), synoviálním sarkomu (*Adwankar et al. 1991; Ishibe et al. 2008*) či osteosarkomu (*Dozza et al. 2011*). Úskalím použití retinoidů je však jejich toxicita a rovněž získaná či přirozená rezistence (*Ortiz et al. 2002*).

Možností, jak zcela potlačit nebo alespoň minimalizovat toxicitu retinoidů, případně jak překonat rezistenci k retinoidům, je využití kombinovaných terapeutických režimů. Je tak například popsána účinná kombinace retinoidů s interferony (*DiPaola et al. 1999; Todesco et al. 2000; Shin et al. 2002; Kalvakolanu et al. 2010a*), analogy vitamínu D (*Defacque et al. 1997; Marti et al. 1997; Choi et al. 2011; Stefanska et al. 2011*), HDACi (*Kuendgen et al. 2005; Trus et al. 2005; De los Santos et al. 2007*) a také se sloučeninami, které se přímo, nebo nepřímo podílí na degradaci retinoidů tzv. RAMBAs. Mezi tyto RAMBAs se řadí hlavně inhibitory cytochromu P-450, např. liazol (*Njar 2002; Njar et al.*

2006; Ahmad 2011), ale je možné k nim zařadit i sloučeniny, kterými se zabývá tato disertační práce, a to inhibitory 5-lipoxygenázy (5-LOX) (Hofmanova et al. 1998; Veselska et al. 2004) a inhibitory cyklooxygenázy-2 (Simeone et al. 2004; Schroeder et al. 2006).

Předkládaná disertační práce tematicky pokračuje ve snaze objasnit procesy probíhající při modulaci antineoplastického efektu ATRA na modelu solidních nádorů dětského věku – neuroblastomu a meduloblastomu. Práce vychází z experimentálního protokolu COMBAT, který byl navržen jako kombinovaná metronomická terapie pro dětské pacienty s relabujícími solidními nádory, příp. s nádory vysokého rizika (Sterba et al. 2006; Zapletalova et al. 2012). V návaznosti na předchozí experimenty orientované převážně na buněčnou úroveň indukované diferenciaci po kombinovaném působení ATRA s LOX, resp. COX inhibitory (Redova 2010) se tato disertační práce zaměřuje na sledování expresních profilů a jejich odlišností v závislosti na kombinované aplikaci ATRA s CA a CX.

## **6.1 Změny expresních profilů v důsledku kombinovaného působení ATRA s CA, resp. CX**

Kombinovaná aplikace ATRA s CA, resp. CX vedla u zkoumaných buněčných linií k řadě změn v expresi sledovaných genů, které jsou spojovány s progresí nádorových onemocnění. V případě genů, u nichž byla zaznamenána obdobná změna exprese u více linií současně, byl rovněž podrobněji studován jejich potenciální vliv na buněčné funkce. Bylo tak detekováno několik větších či menších funkčně propojených skupin genů.

### **6.1.1 Geny, které se podílejí na regulaci buněčného cyklu, apoptózy a indukované diferenciaci**

Očekávatelným výsledkem byla detekce změn v expresi u genů, které kódují proteiny zapojené v regulacích proliferace a diferenciaci. Z námi zkoumaných 440 genů se podařilo detekovat tři geny, jejichž exprese byla zvýšena u všech čtyř sbírkových linií - a to jak po aplikaci samotné ATRA, tak v koncentrační závislosti po kombinované aplikaci ATRA s CA, resp. CX. Jednalo se o geny *CDKN1A*, *ATF4* a *GDF15*.

## Gen *CDKN1A*

Gen *CDKN1A* kóduje inhibitor cyklin dependentní kinázy p21, který působí jako inhibitor buněčného cyklu v odpovědi na rozličné stimuly. Vazbou na komplexy cyklin-CDK2 nebo cyklin-CDK4 a inhibicí jejich aktivity pomáhá p21 zastavit přechod buňky z G<sub>1</sub> do S-fáze. Exprese tohoto genu je řízena nádorovým supresorem p53, ačkoliv některé práce naznačují i antiproliferační aktivitu p21, která je nezávislá na klasické signalizaci prostřednictvím p53. Protein p21 je také znám svou schopností interakce s proteinem PCNA a hraje tak roli při replikaci DNA v S-fázi a také při opravách DNA (Abbas and Dutta 2009).

Zvýšení exprese genu *CDKN1A*, resp. jím kódovaného proteinu p21 bylo v souvislosti s působením retinoidů popsáno jak v podmínkách *in vivo* u akutní myeloidní leukémie (Ryningen *et al.* 2008), tak v mnoha případech *in vitro*, jako např. u akutní T-lymfoblastické leukémie (Luo *et al.* 2009), u pre-B lymfomu (Bao *et al.* 2006), u hepatoblastomu (Lim *et al.* 2011; Park *et al.* 2011), a také u neuroblastomu a to jak po samotné aplikaci ATRA (Wainwright *et al.* 2001; Liu *et al.* 2004; Marzinke and Clagett-Dame 2012), tak při použití ATRA v kombinaci s HDACi (De los Santos *et al.* 2007).

S inhibitorem buněčného cyklu p21 je rovněž funkčně spojen gen *TSG101*, jehož zvýšená exprese byla detekována převážně pouze u NBL linií. Produkt genu *TSG101* se váže na p21 a stabilizuje ho, čímž podporuje inhibici buněčného růstu a případnou diferenciaci (Oh *et al.* 2002). Mutace a alternativní sestřih se s vysokou frekvencí vyskytují u karcinomu prsu a naznačují tím možnou roli genu *TSG101* v karcinogenezi (Gayther *et al.* 1997; Li *et al.* 1997).

Zvýšení exprese p21 a stejně tak i jeho případná stabilizace pomocí TSG101 po aplikaci ATRA s LOX, resp. COX inhibitory tak naznačuje alespoň dočasné pozastavení proliferační aktivity. Toto pozastavení může posloužit k opravám DNA, případně k nastartování diferenciaci nebo apoptózy. Toto zjištění je v souladu s naší předchozí prací (Redova *et al.* 2010), kde bylo za pomoci MTT a WST testu prokázáno snížení proliferační aktivity u buněk NBL i MBL linií po aplikaci ATRA s CA, resp. s CX.

## Gen *ATF4*

Gen *ATF4* kóduje transkripční faktor z rodiny ATF/CREB. Jedná se o rodinu transkripčních faktorů vázajících se na cAMP responzivní elementy (CRE). Protein *ATF4* formuje buď homodimery nebo heterodimery s rozličnými partnery. Místa v genomu, na které se *ATF4* váže, se tak mohou lišit podle aktuálního složení heterodimeru. Díky tomu se *ATF4* podílí na regulaci exprese genů zapojených v reakcích na oxidační stres, v syntéze aminokyselin, ale také v procesech diferenciaci, proliferaci, metastazování a angiogeneze (Ameri and Harris 2008).

Armstrong et al. (2010) demonstrovala souvislost mezi zvýšenou hladinou proteinu *ATF4* a apoptózou indukovanou retinoidy, kdy k indukci byl použit syntetický retinoid fenretinid. Fenretinid indukuje stres endoplazmatického retikula, který může vyvrcholit apoptózou u buněk linií derivovaných z neuroektodermálních nádorů, přičemž ve zmíněné práci byla využita i NBL linie SH-SY5Y.

V souvislosti s apoptózou byla u linií SH-SY5Y a Daoy detekována zvýšená exprese genu *TNFRSF10B* známého též jako *TRAILR2*. Protein kódovaný tímto genem je členem nadrodiny receptorů TNF (tumor necrosis factor receptor) a obsahuje intracelulární doménu smrti (death domain). Současné práce pak dokládají, že indukci apoptózy, kterou tento receptor může vyvolat, lze zesílit působením retinoidů (Chambaut-Guerin et al. 1995; Dhandapani et al. 2011). Zvýšení exprese genů, jež mohou být spojeny s apoptózou, také odpovídá výsledkům naší předchozí studie (Redova et al. 2010), kde u všech zkoumaných linií s výjimkou linie Daoy byla při analýze buněčného cyklu detekována zvýšená proporce sub-G1 fáze, což naznačuje určitý podíl apoptotických buněk v buněčné populaci.

## Gen *GDF15*

Pro zesílení indukce buněčné diferenciaci v důsledku působení kombinací zvolených činidel hovoří rovněž zvýšení exprese genu *GDF15*. Protein *GDF15* kódovaný stejnojmenným genem je též znám jako *PDF*; *MIC1*; *PLAB*; *MIC-1*; *NAG-1*, nebo *PTGFB* a patří do nadrodiny transformujících růstových faktorů- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Jak již napovídá množství rozličných jmen tohoto proteinu, sekrece *GDF15* zasahuje do kontroly velkého množství fyziologických i patologických procesů.

Funkce zprostředkované GDF15 zahrnují v první řadě procesy související s embryonálním vývojem, dále pak kontrolní funkce při imunitní odpovědi, odpovědi na buněčný stres atd. (Mimeault and Batra 2010). Především u myši byl zkoumán a prokázán vliv tohoto proteinu na vývoj a jeho spoluúčast při reparaci po poškození nervových tkání (Schober et al. 2001). Rozhodující roli při vývoji nervových tkání také dokládá práce využívající myši s „knock-outovaným“ genem *GDF15*. U takto geneticky modifikovaných myši byla detekována redukce některých senzorických neuronů a motoneuronů (Strelau et al. 2009).

Několik prací také uvádí spojitost GDF15 s nádorovým supresorem p53 (Li et al. 2000; Yang et al. 2003). Na základě pokusů *in vitro* (linie derivované z karcinomu prsu) i *in vivo* (na imunodeficientních myších) tyto práce dokládají, že GDF15 je parakrinním mediátorem signální dráhy p53 a indukuje zástavu buněčného růstu a apoptózu. V rámci těchto experimentů byla prokázána také pozitivní korelace mezi množstvím GDF15 a proteinu p21 po aplikaci doxorubicinu, který v závislosti na dávce hladinu těchto proteinů zvyšoval. Ke zvýšení ovšem docházelo pouze u linií s nemutovaným genem pro p53.

U námi testované linie Daoy byla popsána mutace v genu kódujícím p53, a přesto docházelo po aplikaci ATRA s CA, resp. s CX ke zvýšení exprese genů *GDF15* i *CDKN1A*, obdobně jako u ostatních linií. Nabízí se tak možná souvislost s izoformou TAp73 (patřící do rodiny p53), neboť hladina transkriptu této izoformy vykazovala také zvýšení.

### 6.1.2 Reorganizace cytoskeletu během indukované diferenciaci

Zvýšení exprese dalších genů, u nichž je známa klíčová role při přestavbách cytoskeletu během buněčné diferenciaci, bylo detekováno ve větší míře u NBL linií, zatímco u MBL linií bylo takovéto zvýšení jen sporadické. Geny, jejichž exprese byla alespoň v některých případech zvýšena i u MBL linií, byly *RHOA*, *RHOC* a *GSK3A*.

Geny *RHOA* a *RHOC* pocházejí z rodiny Rho GTPáz, jejíž členové jsou známi svou účastí v mnoha procesech, jako je dynamika cytoskeletu, buněčný cyklus, či regulace transkripce. Není tedy překvapivé, že byla popsána souvislost genů z této rodiny jak s onkogenními, tak antionkogenními procesy (Vega and Ridley 2008; Wenandy et al.

2008). Existují i studie dokumentující schopnost retinoidů aktivovat proteiny z rodiny Rho GTPáz. V souvislosti s působením ATRA tak byla prokázána schopnost aktivovat protein RhoA. Takto aktivovaný protein se pak podílí na regulaci přestaveb cytoskeletu při indukované neuronální diferenciaci (Singh et al. 2003; Pan et al. 2005). Kromě schopnosti aktivovat protein RhoA byla popsána i souvislost mezi působením ATRA a zvýšenou hladinou proteinu RhoA v prekursorových buňkách myšího nervového systému, ačkoliv zvýšení na úrovni mRNA se nepodařilo potvrdit (Sato and Heuckeroth 2008).

Protein kódovaný genem *GSK3A* je jedním typem kinázy glykogen syntázy 3 (GSK3). GSK3 jsou serin/treonin kinázy, které byly identifikovány jako klíčové regulátory enzymů zapojených do metabolismu glukózy (Woodgett and Cohen 1984). Existují dvě izoformy tohoto proteinu: GSK $\alpha$  a GSK $\beta$ , které jsou kódovány samostatnými geny, ačkoliv vykazují 85% homologii a jejich kinázové domény dokonce 95% homologii (Woodgett 1990). Současné studie dokládají významnou regulační roli, kterou GSK3 proteiny hrají při neuronálním vývoji - tyto procesy zahrnují neurogenezi, neuronální migraci, neuronální polarizaci a axonální růst. Schopnost GSK3 proteinů zasahovat do takového množství procesů je dána množstvím substrátů, které mohou fosforylovat a tím ovlivňovat množství daného proteinu v buňce, jeho schopnost vázat DNA a také jeho jadernou lokalizaci. Mezi tyto substráty patří CREB, Nfat, neurogenin2, SMAD, c-Jun a  $\beta$ -catenin a také několik proteinů asociovaných s mikrotubuly (MAPs) (Zhou and Snider 2005; Hur and Zhou 2010). Právě díky regulaci aktivity MAPs se mohou proteiny GSK3 podílet na reorganizaci cytoskeletu při buněčném dělení, migraci, růstu axonů apod. (Hur and Zhou 2010).

Expresí genů *CCT5* a *RAC1* byla zvýšena jen u NBL linií. Protein kódovaný genem *CCT5* je molekulární chaperon, který pomáhá rozličným proteinům zaujmout správnou prostorovou konformaci - a to i takovým proteinům, které patří mezi základní složky cytoskeletu, jako jsou aktin a tubulin (Liang and MacRae 1997; Lundin et al. 2010). Aktivita a změny v intracelulární lokalizaci proteinu *CCT5* byly detekovány při přestavbách cytoskeletu u neuritogeneze na myší NBL linii (Roobol et al. 1995). Účast na přestavbách cytoskeletu během diferenciací byla popsána také u genu *RAC1*, jehož produkt patří spolu s výše zmíněnými produkty genů *RHOA* a *RHOC* mezi Rho GTPázy (Hall 1998; Frantz et al. 2002). Popsána byla také role proteinu *RAC1* při procesu zvaném „neurite outgrowth“ - tento termín zahrnuje počáteční růst výběžků budoucí nervové buňky před rozdělením na axon a dendrity (Khodosevich and Monyer 2010).

Zvýšená exprese genů *NME1* a *NME2*, která byla v této práci prokázána u NBL linií, je obecně spojována s více diferencovaným fenotypem u lidských i myších buněčných linií



(Backer et al. 2000; Negroni et al. 2000; Amendola et al. 2001). Navíc je známa i schopnost proteinů NME1 a NME2 aktivovat členy rodiny Rho GTPáz, čímž se mohou podílet na regulaci přestaveb cytoskeletu a s tím spojených změnách buněčné morfologie, migrace buněk apod. (Boissan et al. 2007; Miyamoto et al. 2009).

Vliv samotné ATRA a stejně tak ATRA v kombinacích s CA, resp. CX vedl u buněk NBL linií ke změnám morfologie, jak bylo zaznamenáno již dříve ve studii na buněčné úrovni (Redova et al. 2010), proto průkaz zvýšené exprese genů, jež se účastní přestaveb cytoskeletu, je zcela v souladu s našimi předchozími výsledky. V jistém nesouladu je však sporadická detekce zvýšené exprese některých výše zmíněných genů u MBL linií, neboť u těchto linií nebyly žádné morfologické změny pozorovány a ani v literatuře nebyly žádné změny buněčné morfologie ve spojitosti s diferenciací u MBL linií popsány.

### 6.1.3 Vliv retinoidů na extracelulární prostor

U NBL linií zvýšená exprese dalších čtyřech genů (*NINJ1*, *LAMB1*, *RET*, *GTF2I*) spojovaných s diferenciací nervových buněk nejen dokazuje, že je možné retinoidy indukovanou diferenciací NBL buněk potencovat LOX, resp. COX inhibitory, ale také naznačuje, ve kterých dalších buněčných procesech a signálních drahách se diferenciace projevuje.

Protein ninjurin kódovaný genem *NINJ1* je adhezivní molekula, která podporuje růst cytoplazmatických protruzí nervových buněk a hraje tak důležitou roli ve vývoji nervových spojů (Araki et al. 1997).

Laminin  $\beta$ , produkt genu *LAMB1*, je složkou heterotrimerických proteinů extracelulární matrix, které regulují buněčnou viabilitu a funkce. Zvýšená exprese genu *LAMB1* byla popsána u myších embryonálních kmenových buněk během ATRA indukované neuronální diferenciace (Zhuang and Gudas 2008). Důležitou roli lamininů při vývoji neuronů dokládá také práce *in vivo* na myších s disfunkčním genem *LAMB2* ve Schwannových buňkách. Disrupce pomocí systému Cre-loxP vedla k redukci exprese i lamininů  $\alpha 2$  a  $\beta 1$  a takto mutantní myši vykazovaly motorické defekty vedoucí až k paralýze zadních končetin a neovladatelnému třesu (Chen and Strickland 2003).

Protoonkogen *RET*, který je členem nadrodiny kadherinů, kóduje transmembránovou receptorovou tyrosin kinázu, jež zprostředkovává signály pro buněčný růst a diferenciaci (Wells and Santoro 2009). Protoonkogen *RET* byl také popsán jako klíčová komponenta

při transkripčním programu spojeným s diferenciací indukovanou retinoidy u neuroblastomu. Experimenty vedoucí k tomuto zjištění byly prováděny i na stejných NBL liniích, jaké byly použity v této disertační práci (*Oppenheimer et al. 2007*). Kromě samotné spojitosti s neuronální diferenciací uvádí D'Alessio et al. (1995) současně korelaci exprese *RET* s expresí neurofilament NF-200, což je také plně v souladu s našimi předchozími výsledky (*Redova et al. 2010*).

Gen *GTF2I* kóduje multifunkční transkripční faktor, který může fungovat jako aktivátor i represor transkripce, ale účastní se také signální transdukce (*Lazebnik et al. 2009*). O jeho zapojení do neuronální diferenciace svědčí skutečnost, že porucha v tomto genu je jednou z možných příčin Williams-Beurenova syndromu. Jedná se o vývojovou poruchu s celou řadou příznaků, včetně poruch neurokognitivních funkcí projevujících se sníženým IQ, hypersociabilitou atd. (*Sakurai et al. 2010*). Přímá spojitost s vývojem nervové trubice pak byla prokázána na myších deficientních pro tento gen (*Enkhmandakh et al. 2009; Makeyev and Bayarsaihan 2009; Sakurai et al. 2010*).

#### **6.1.4 Poškození buněčných struktur působením ATRA s LOX, resp. COX inhibitory**

Kombinovaná aplikace ATRA spolu s inhibitory LOX, resp. COX vedla u námi zkoumaných linií ke zvýšení exprese genů, které kódují proteiny účastnící se reparace DNA, odstraňování poškozených proteinů a zvládání oxidačního stresu. Jedním z možných vysvětlení zvýšení exprese takovýchto genů může být nespecifický vliv spojený s toxicitou použitých činidel, jejímž výsledkem je poškození DNA i proteinů a jejich následná oprava či odstranění. Na druhou stranu se na základě publikovaných dat se nabízí i některá další vysvětlení.

#### **Poškození DNA**

Zvýšení exprese u genů *XRCC1*, *XRCC5* a *XRCC6*, jež se účastní reparace DNA, bylo detekováno u NBL linií SK-N-BE(2) po kombinacích ATRA s CX, zatímco u linie SH-SY5Y po kombinacích ATRA s CA. Dalším genem kódujícím protein, který se podílí na opravách DNA, je gen *PCNA*, jeho zvýšená exprese byla detekována u linie SH-SY5Y

po aplikaci obou kombinací a u linie SK-N-BE(2) po kombinovaném působení ATRA s CA. U MBL linií buď nebyla změna v expresi tohoto genu detekována, nebo bylo prokázáno snížení exprese. Ke snížení exprese genu *PCNA* došlo u linie Daoy po kombinaci ATRA s CA a u linie D283 po kombinaci ATRA s CX.

Na rozdíl od proteinů účastnících se proteolýzy není v současné literatuře popsána přímá souvislost působení retinoidů na expresi genů zapojených do oprav DNA. Tato skutečnost naznačuje, že se v našem případě pravděpodobně jedná o toxické působení vyvolané např. oxidačním stresem, který byl po aplikaci retinoidů popsán (*Castro-Obregon and Covarrubias 1996; Myung et al. 1998; Oh et al. 2010*). Právě pro opravy vzniklé oxidativním poškozením DNA jsou typické excizní reparace, jichž se účastní proteiny *XRCC1*, *XRCC5*, *XRCC6* a *PCNA* (*Travali et al. 1989; Thompson et al. 1990; Smider and Chu 1997; Myung et al. 1998*).

Do reparací DNA je zapojen i gen *HMGB1*, jehož exprese se u některých linií po kombinované aplikaci ATRA s CA (SK-N-BE(2), Daoy) i s CX (Daoy, D283) snižovala. Proteiny HMGB jsou široce rozšířené nehistonové proteiny fungující jako DNA chaperony, které se podílejí na množství procesů ovlivňujících strukturu chromatinu - transkripce, replikace, rekombinace, oprava DNA a zajišťování genomické stability (*Stros 2010*). Přesný mechanismus, kterým HMGB1 moduluje průběh oprav DNA, zatím není dokonale popsán, ale zdá se, že může docházet jak ke zvýšení účinnosti oprav díky lepší interakci mezi poškozenou DNA a reparačními proteiny, tak k inhibici oprav kvůli zablokování přístupu k poškozené DNA (*Malina et al. 2002; Liu et al. 2010*). Detekované snížení exprese genu *HMGB1* u námi zkoumaných linií tak sice nepomáhá osvětlit působení retinoidů s LOX, resp. COX inhibitory, ale není také v rozporu s pozorovanými změnami exprese ostatních genů. Vyšší citlivost NBL linií k nespecifickému poškození je v souladu s naší předchozí prací, stejně jako vyšší rezistence k působení ATRA u linie Daoy. Zdánlivá rezistence k poškození u linie D283 je pak vysvětlitelná nutností použít sníženou koncentraci ATRA.

## Indukce proteolýzy

U MBL linií bylo naopak detekováno ve větší míře než u NBL linií zvýšení exprese dvou genů, jejichž proteiny jsou zapojeny do označování proteinů ubiquitinem pro jejich následnou degradaci. Šlo o protein *UBE2L6*, jehož exprese byla zvýšena nezávisle

na použitém inhibitoru u obou linií, a gen *UCHL1*, jenž vykazoval zvýšení nezávisle na použitém inhibitoru pouze u linie D283. U NBL linií byla zvýšená exprese genu *UBE2L6* detekována jen u linie SH-SY5Y po kombinaci ATRA s CX a genu *UCHL1* u linie SK-N-BE(2) po kombinaci ATRA s CA.

Modifikace proteinů ubikvitinem je důležitý buněčný mechanismus sloužící k označení abnormálních nebo již nepotřebných proteinů určených k degradaci. Proces ubikvitinace je třístupňový a podle těchto stupňů se enzymy odlišují označením E1-3. Navíc existují další do systému zapojené tzv. deubikvitinační enzymy (mezi něž patří *UCHL1*), které jsou schopné navázaný ubikvitin ze substrátu odstranit, čímž přidávají tomuto komplexnímu systému další rozměr (Day and Thompson 2010).

Zvýšení množství enzymů podílejících se na ubikvitinaci proteinů bylo odhaleno jako jeden z nepřímých mechanismů, kterým se retinoidy účastní regulace procesů v buňce (Dragnev et al. 2003). Asi nejlépe prozkoumán je tento mechanismus u akutní promyelocytární leukemie, kde byla popsána schopnost ATRA indukovat proteolýzu za pomoci proteinu UBE1L (protein se skupiny E1), která vede k degradaci onkogenního produktu PML/RAR $\alpha$  a k následné indukci apoptózy, což dále podporuje antionkogenní efekt (Kitareewan et al. 2002). Navíc enzymem ze skupiny E2, jenž se účastní degradace fúzních proteinů u PLM, je dle Krämera (2008) právě námi detekovaný *UBE2L6* patřící do skupiny E2. Proteolýza může být také jedním z mechanismů zapříčiňujících indukovanou diferenciaci, jak dokládá *in vitro* studie demonstrující, že ATRA podporuje ubikvitinaci a degradaci cyklinu D1. Snížení hladiny cyklinu D1 je totiž úzce spojeno s akumulací hypofosforylované formy Rb proteinu a následně se zastavením buněčného cyklu v G<sub>1</sub>-fázi (Spinella et al. 1999). Detekce deubikvitinačního enzymu *UCHL1* je zajímavá s ohledem na jeho takřka specifický výskyt u nervových buněk a jeho popisovanou schopnost „uzamknout a držet“ neurony v diferencovaném stavu (Day and Thompson 2010). Na základě těchto poznatků lze u MBL linií uvažovat v souvislosti se zvýšením exprese genů podílejících se na proteolýze nejen jako o nespecificky vyvolané odpovědi na poškození proteinů, ale také o funkčním zapojení do indukované diferenciaci. Přičemž detekce zvýšené exprese genu *UCHL1* by u linie D283 mohla naznačovat neuronální diferenciaci.

## Zvýšení aktivity mitochondrií a s ní spojený oxidační stres

U genů *TUFM* a *LONP1* bylo zaznamenáno zvýšení exprese především u NBL linií.

Produktem genu *TUFM* je protein, který participuje na translaci proteinů v mitochondriích. Zvýšení mitochondriální aktivity díky zvýšené expresi genu *TUFM* se pravděpodobně podílí nejen na zesílení diferenciaci u myoblastomu (Rochard et al. 2000), ale může hrát důležitou roli i u diferenciaci NBL buněk (Cordeau-Lossouarn et al. 1991; Wrutniak et al. 1998). Účast genu *TUFM* při neuronální diferenciaci také potvrzuje detekce mutace tohoto genu v souvislosti s infantilní encefalopatií (Valente et al. 2007).

Gen *LONP1* kóduje protein mitochondriální matrix známý jako lon peptidáza 1. Tento protein se spolu s chaperony podílí na cílené degradaci polypeptidů. Pomáhá tak nejen odstraňovat toxické proteinové agregáty, ale cíleným odstraňováním určitých proteinů se podílí na regulaci replikace a transkripce (Wang et al. 1993; Voos 2009).

Na zvýšenou aktivitu mitochondrií poukazuje také zvýšení exprese genů *COX6C* a *COX7A2*, jež byly detekovány u všech námi používaných linií kromě linie Daoy. Tyto geny kódují podjednotky cytochrom c oxidázy, která tvoří komponent mitochondriálního respiračního řetězce, který katalyzuje transfer elektronu z redukováného cytochromu c na kyslík. Zvýšení respirační aktivity mitochondrií během diferenciaci neuronálních kmenových buněk dokládá Wang et al. (2010), v této práci se také zaměřuje na problematiku snazšího poškození mitochondriální DNA a důležitost udržení integrity mtDNA při mitochondriální maturaci během diferenciaci.

Zmíněné poškození DNA souvisí nejen s větší dostupností DNA, díky zvýšené transkripci, ale také s vyšší respirační aktivitou, při které vznikají vysoce reaktivní formy kyslíku (ROS – reactive oxygen species). Jak již bylo uvedeno výše, spojitost mezi působením retinoidů a oxidačním stresem již byla popsána, a i v našem případě byly prokázány dva geny spojované s oxidačním stresem, jejichž exprese po aplikaci ATRA s CA, resp. s CX vzrůstala. Jednalo se o geny *SOD1* a *NQO1*.

Expresi genu *SOD1* byla zvýšena u všech linií kromě linie Daoy po aplikaci ATRA s CX a u linie D283 také po kombinaci ATRA s CA. U linie Daoy po kombinaci ATRA s CA došlo dokonce ke snížení. Gen *SOD1* kóduje superoxid dismutázu, která v cytoplazmě a mitochondriích vylučuje kyslíkové radikály a tak se podílí na vyrovnávání se s oxidačním stresem (Mondola et al. 2004; Miao and St Clair 2009).

Gen *NQO1*, jehož zvýšenou expresi jsme pozorovali jen u NBL linií, je spojován nejen s oxidačním stresem, ale i s neuronální diferenciací. Produktem tohoto genu je

cytoplazmatická 2-elektron reduktáza, která předchází jedoelektronové redukci chinonu jejímž výsledkem je vznik reaktivního radikálu (Jaiswal *et al.* 1988; Siegel *et al.* 2004). Transkripčním faktorem, který spouští expresi genu *NQO1* je faktor Nrf2, přičemž Zhao *et al.* (2009) ve své práci na linii SH-SY5Y dokazuje jeho zvýšenou expresi i aktivitu (společně se zvýšenou expresí *NQO1*) při RA indukované diferenciaci.

Spojením těchto poznatků s našimi daty můžeme usuzovat na jeden z možných procesů během indukované diferenciaci. Zvýšením mitochondriální aktivity dochází nejen ke zvýšené respiraci, ale také k větší produkci vysoce reaktivních forem kyslíku (ROS – reactive oxygen species), které mohou a také poškozují DNA. Proto jsou v buňce ve zvýšené míře produkovány enzymy, jenž kyslíkové radikály pomáhají převádět na méně reaktivní formy (*SOD1*, *NQO1*), a proteiny, jež zajišťují opravy DNA (*XRCC1-6*). Zvýšení aktivity mitochondrií by také mohlo vysvětlit detekci zdánlivého zvýšení proliferační aktivity po aplikaci 1  $\mu$ M ATRA u buněk NBL linií v našich předcházejících výsledcích (Redova *et al.* 2010). Vzhledem k faktu, že přeměna tetrazoliových solí, jako jsou MTT a WST, na barevné produkty probíhá v mitochondriích, je možné, že při nižších koncentracích retinoidy zvýšená aktivita mitochondrií resp. jejich enzymů vyrovnala popř. převážila úbytek celkového počtu buněk způsobeného antiproliferativním účinkem použitých činidel. Podobné modifikace ovlivňující buněčný metabolismus a tím i výsledky kolorimetrických testů již byly v literatuře popsány (Sylvester 2011). Řešením by v takovém případě mohlo být využití testu nezávislého na mitochondriích, např. značení DNA za pomoci BrdU, nebo porovnáním výsledků s celkovým obsahem proteinů.

## Vliv na migraci

V biologii nádorů je schopnost migrace klíčová pro invazivitu nádorové tkáně a pro schopnost nádoru metastazovat. Inhibiční vliv na pohyblivost buněk má produkt genu *TIMP1*, který inhibuje matrixové metaloproteinázy, což jsou proteinázy zapojené do degradace extracelulární matrix (Loffler and Pridies 1998). Vzhledem k detekci zvýšené exprese tohoto genu po kombinované aplikaci ATRA s CA i CX u NBL i MBL linií byla pohyblivost buněk zkoumána pomocí Scratch assay, Nicméně touto metodou se žádný vliv na pohyblivost neprokázal.

Další oblastí, ve které se protein *TIMP1* uplatňuje, je ochrana před oxidačním stresem (Gonzalez *et al.* 2000; Sarang *et al.* 2002). S ohledem na detekci změn u dalších

genů spojených s ochranou před volnými radikály (viz výše) je tedy možné, že ke zvýšení exprese u námi zkoumaných linií došlo právě v souvislosti s oxidačním stresem. Nenáhodnost detekce zvýšení exprese genu *TIMP1* po aplikaci retinoidů potvrzuje i práce Dutta et al. (2010), který nárůst exprese *TIMP1* po aplikaci retinoidů pozoroval *in vitro* u karcinomu prsu, a také naše detekce zvýšené exprese u primárních MBL linií.

## Vliv na imunitní systém

Imunitní systém je další z oblastí, do které retinoidy svým působením také zasahují. U všech hodnocených linií bylo zaznamenáno zvýšení exprese dvou genů, jejichž proteiny jsou přímo zapojené do imunitní odpovědi a to *HLA-C* a *HLA-G*. Dále pak bylo prokázáno zvýšení exprese genu *CANX*, jímž kódovaný protein funguje jako chaperon, který se podílí na určení správné prostorové konformace molekul *HLA-I* (Zhang and Salter 1998). Molekuly *HLA* třídy I jsou přítomny na povrchu všech jaderných buněk a jejich účelem je prezentovat fragmenty proteinů vyskytujících se uvnitř buňky na povrch, který je monitorován imunitním systémem (Seliger 2008). Nejen prezentovaný fragment proteinu, ale i množství *HLA-I* molekul je klíčovým parametrem rozhodujícím mezi přežitím buňky a lyzí způsobenou CD8<sup>+</sup> cytotoxickými T lymfocyty (CTL) (Schodin et al. 1996).

Na buňkách NBL linií bylo detekováno nejen zvýšení exprese genů kódujících *HLA I* receptory (Gross et al. 1992; Voigt et al. 2000; Carlson et al. 2008), ale byla pozorována i větší senzitivita takto ovlivněných buněk k lyzi způsobené CTL (Vertuani et al. 2003). Tato zjištění naznačují, že by aplikace retinoidů v kombinaci s imunoterapií založené na T buňkách mohla být efektivní při léčbě neuroblastomu. Naše poznatky pak indikují další možnost, jak tuto léčbu dále modulovat pomocí CA, resp. CX, a poukazují také na potenciální využití při léčbě meduloblastomů.

## 6.2 Srovnání neuroblastomových a meduloblastomových linií

Prvním patrným výsledkem expresní analýzy bylo pozorování obecně zvýšené exprese genů, u nichž se po aplikaci ATRA s CA, resp. CX projevil nějaký trend ve změnách exprese. Nejčastěji detekovanou změnou bylo zvýšení genové exprese. Ke zvýšení docházelo nejen lineárně v závislosti na koncentraci, ale často také pouze při

nižších koncentracích, zatímco vyšší koncentrace exprese nezvyšovaly, nebo dokonce docházelo k jejímu snížení. Vyšší poměr genů se zvýšenou expresí oproti genům se sníženou expresí uvádějí i některé recentní práce zabývající se vlivem ATRA na diferenciaci buněk (Dai *et al.* 2011; Ying *et al.* 2011).

U NBL linií bylo detekováno 105 genů u linie SK-N-BE(2) a 85 genů u linie SH-SY5Y, u kterých byla sledována změněná exprese po aplikaci ATRA s CA, resp. CX. V reakci na použítá činidla nebyl prokázán žádný významný rozdíl mezi použitými inhibitory, ani mezi liniemi.

Na rozdíl od NBL linií, u MBL linií bylo detekováno větší množství genů se sníženou expresí, ovšem žádný gen, u kterého došlo působením ATRA s CA, resp. CX ke snížení exprese, nebyl detekován u více linií současně. MBL linie se od NBL linií lišily celkově menším počtem genů, u nichž docházelo ke změnám exprese. Zatímco linie D283 se ukázala jako vysoce citlivá k působení ATRA až do té míry, že bylo nutné snížit koncentrace použité k ovlivnění, buňky linie Daoy reagovaly nejvíce při vyšších koncentracích ATRA. Tento zjevný rozdíl v citlivosti použitých linií však znesnadňuje interpretaci získaných výsledků.

Dalším faktorem, který nepříznivě ovlivňuje výklad výsledků, je obecně nižší počet prací zabývajících se MBL. Tato situace je způsobena v první řadě relativní vzácností tohoto onemocnění a dále pak problematickou kultivací linií derivovaných z buněk MBL. Na druhou stranu detekce několika genů, jež shodně reagují na použítá činidla jak u obou zkoumaných MBL linií, tak u NBL linií naznačuje, že pozorované zvýšení exprese těchto genů by mohlo mít obecnou platnost.

U NBL i MBL linií byla detekována zvýšená exprese genů, které naznačují vliv použitých činidel na inhibici buněčného cyklu a případnou indukci apoptózy. Zatímco u NBL linií bylo po aplikaci ATRA s CA, resp. CX detekováno větší množství genů se zvýšenou expresí, které jsou spojovány se zvýšenou mitochondriální aktivitou, a genů, jež se podílejí na reorganizaci cytoskeletu, u MBL linií byla exprese těchto genů beze změn, nebo byla zvýšena jen sporadicky. Naopak u MBL linií byly detekovány změny v expresi genů podílejících se na ubikvitinaci proteinů, které mohou být nejen známkou degradace poškozených proteinů, ale také mohou souviset s indukovanou diferenciací.

Na základě pozorovaných změn genové exprese se tak lze domnívat, že u sledovaných NBL linií docházelo k zástavě buněčného cyklu a indukci diferenciaci, která se projevovala zvýšenou produkcí energie, jež byla spotřebovávána mimo jiné na přestavbu cytoskeletu. U sbírkových MBL linií pak sice docházelo také k zástavě



buněčného cyklu, ale k indukci diferenciaci buď nedošlo, nebo k ní došlo odlišným způsobem než u NBL linií.

### 6.3 Vliv kombinované aplikace ATRA a CA, resp. CX na expresi izoformy TAp73

Protein p73, člen genové rodiny p53, se významně podílí na embryogenezi a tumorigenezi nervové soustavy u vybraných typů embryonálních nádorů CNS. Klíčovou roli proteinu p73 na ontogenezi nervové soustavy dokládá výzkum *TP73*<sup>-/-</sup> myší, které vykazovaly vývojové abnormality NS, jako je dysgeneze hipokampu a gyrus dentatus, poruchy feromonové signalizace, hydrocefalus (Yang *et al.* 2000), redukce kortexu, objemu bílé hmoty mozkové a corpus callosum (Meyer *et al.* 2004) a úbytek neuronů sympatiku (Pozniak *et al.* 2000). Nárůst exprese p73, ovšem bez rozlišení izoform, po aplikaci retinoidů byl dokladován u buněk NBL (De Laurenzi *et al.* 2000) a k zvýšení exprese došlo i u buněk MBL a ependymoblastomu při diferenciaci indukované NGF (Antonelli *et al.* 2007). Indukce p73 působením syntetického retinoidu bexarotenu byla popsána také u buněk T-buněčného lymfomu (Nieto-Rementeria *et al.* 2009).

Pokud jde o izoformu TAp73, práce na TAp73<sup>-/-</sup> myších dokládá klíčovou roli této izoformy při normálním vývoji hipokampu, dále dokládá nádorově supresivní funkce a naznačuje také roli při udržení genomové stability (Tomasini *et al.* 2008). Saifudeen *et al.* (2005) také zmiňuje důležitou roli izoformy TAp73 při nefrogenезi. Během diferenciaci nefronů je exprese izoformy DeltaNp73 nahrazována izoformou TAp73.

Jako součást probíhajícího projektu, který se zabýval expresí N-terminálních isoform proteinu p73 v nádorové tkáni MBL, byla na sbírkových MBL liniích a jedné patientské MBL linii sledována hladina izoformy TAp73 za pomoci RT PCR.

U všech tří sledovaných linií došlo ke zvýšení exprese, po aplikaci ATRA s CA i s CX. Pro porovnání byla sledována i hladina exprese genu *TP53*, ale u tohoto genu k žádnému zvýšení nedošlo. U obou sbírkových linií také bylo detekováno zvýšení exprese genu *CDKN1A*, který bezprostředně s rodinou *TP53* souvisí a genu *GDF15*, který byl popsán jako parakrinní mediátor signální dráhy *TP53* (Osada *et al.* 2007). Zvýšení exprese genu *GDF15* po samotné ATRA bylo detekováno i u primárních MBL linií MBL-6 a MBL-12 a u linie MBL-13 byla zvýšená exprese detekována po kombinované aplikaci ATRA s CA i CX.

U linie Daoy byla dále detekována zvýšená exprese genu *TNFRSF10B*, jenž se účastní apoptotických procesů a může být aktivován skrze dráhu p53 (*Mahmood and Shukla 2010; Maldonado et al. 2010*). Na základě těchto zjištění se jeví, že ATRA v kombinaci s CA, resp. s CX je schopná aktivovat dráhu p53. Nicméně zjištění, že nedošlo ke změně exprese samotného genu *TP53*, a navíc popsána skutečnost, že gen *TP53* je u linie Daoy mutován, může vést k domněnce, že aktivace této dráhy probíhá prostřednictvím TAp73, jehož exprese se mění v závislosti na použité koncentraci činidel.

### **Změny v expresi genů u primárních MBL linií**

U patientských linií bylo detekováno několik genů, u nichž došlo k podobným změnám exprese následkem působení ATRA. Pomocí následné analýzy se ovšem nepodařilo zachytit žádný trend, který by poukazoval na nějaký určitý vliv ATRA na buněčné procesy u těchto linií. Jistým náznakem by snad mohla být podobnost odpovědi na aplikaci ATRA u linií MBL-12 a MBL-13 se sbírovými neuroblastomovými liniemi. U obou těchto linií byla detekována zvýšená exprese genů *CCT5* a *RHOC*, přičemž tyto geny vykazovaly zvýšení exprese převážně u neuroblastomových sbírkových linií a jsou spojovány s regulací přestaveb cytoskeletu během indukované diferenciaci.

Nejednotnou odpověď na aplikaci ATRA u jednotlivých linií lze vysvětlit jednak metodickými příčinami, které souvisí s obtížnou kultivací a případně také známou heterogenitou buněk meduloblastomu.

## 7 Závěr

Ačkoliv bylo při léčbě pediatrických malignit v posledních dekádách dosaženo významného pokroku, prognóza pacientů s metastatickými a vysoce rizikovými solidními nádory zůstává stále nepříznivá. Mezi intenzivně zkoumané terapeutické přístupy patří i diferenciační terapie, která je schopná zvrátit maligní fenotyp buněk zpět na fenotyp normální. Díky této schopnosti mají diferenciační činidla, mezi něž patří kyselina retinová, potenciál potlačovat růst a invazivitu různých typů malignit. Předkládaná disertační práce vychází z hypotézy, že antineoplastické účinky kyseliny retinové lze dále modulovat omezením intracelulárního metabolismu této sloučeniny a to za pomoci inhibitorů takových enzymů, jež se metabolických procesů účastní. V této práci byla využita kyselina kávová jako inhibitor 5-lipoxygenázy a celecoxib jako inhibitor cyklooxygenázy-2.

V předkládané práci byly sledovány změny v expresi 440 genů funkčně propojených s biologií nádorů, a to na sbírkových neuroblastomových a sbírkových i patientských meduloblastomových liniích. U vybraných genů byly změny exprese v průběhu indukované diferenciaci ověřovány pomocí RT-PCR. Na základě expresní analýzy byla u ovlivněných buněčných populací detekována převážně zvýšená exprese genů a v mnoha případech v závislosti na koncentraci použitých činidel (jak ATRA, tak inhibitorů).

Dílní část práce, která navazovala na projekt zaměřený na sledování exprese a intracelulární distribuci N-terminálních izoform proteinu p73, se u buněk meduloblastomových linií věnovala detekci hladiny transkriptu TAp73 během působení ATRA s CA, resp. CX. Přitom u obou sbírkových a u jedné patientské linie se podařilo prokázat schopnost těchto kombinací činidel zvýšit hladinu transkriptu TAp73. Potenciál zvýšit hladinu izoformy TAp73, která je známa svými tumor supresorovými účinky tak odhaluje další oblast, kterou jsou retinoidy schopny regulovat.

Analýza exprese sledovaných genů u neuroblastomových a meduloblastomových linií prokazuje schopnost ATRA v kombinaci s CA, resp. CX pozastavit buněčný cyklus, indukovat buněčnou diferenciaci, apoptózu a u neuroblastových linií také regulovat přestavby cytoskeletu. Právě schopnost regulovat přestavby cytoskeletu, které odpovídají pozorovaným morfologickým změnám, spolu se skutečností, že u neuroblastomových linií byl detekován větší počet genů se změněnou expresí, než u meduloblastomu, podporuje tvrzení, že neuroblastomové linie jsou citlivější k působení ATRA.

Výsledky předkládané disertační práce tedy nejen dokumentují potenciál ATRA indukovat buněčnou diferenciaci, ale podporují také původní hypotézu, že účinky ATRA je možné zesilovat kombinovanou aplikací s LOX, resp. COX inhibitory. Navíc výsledky expresní analýzy poukazují na další retinoidy ovlivňované procesy, jako je podpora imunitního systému zvýšením exprese HLA-I molekul či zvýšení aktivity mitochondrií které mohou také přispívat k protinádorovému působení.

## 8 Literatura

- Abbas, T. and A. Dutta. 2009. "p21 in cancer: intricate networks and multiple activities." *Nat Rev Cancer* 9(6): 400-14.
- Adwankar, M., A. Banerji, and S. Ghosh. 1991. "Differential response of retinoic acid pretreated human synovial sarcoma cell line to anticancer drugs." *Tumori* 77(5): 391-4.
- Ahmad, M. 2011. "Study on Cytochrome P-450 Dependent Retinoic Acid Metabolism and its Inhibitors as Potential Agents for Cancer Therapy." *Sci Pharm* 79(4): 921-35.
- Alique, M., J. F. Herrero, and F. J. Lucio-Cazana. 2007a. "All-trans retinoic acid induces COX-2 and prostaglandin E2 synthesis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells: involvement of retinoic acid receptors and extracellular-regulated kinase 1/2." *J Neuroinflammation* 4: 1.
- Alique, M., F. J. Lucio-Cazana, V. Moreno, Q. Xu, T. Konta, K. Nakayama, A. Furusu, J. C. Sepulveda, and M. Kitamura. 2007b. "Upregulation of cyclooxygenases by retinoic acid in rat mesangial cells." *Pharmacology* 79(1): 57-64.
- Amendola, R., R. Martinez, A. Negroni, D. Venturelli, B. Tanno, B. Calabretta, and G. Raschella. 2001. "DR-nm23 expression affects neuroblastoma cell differentiation, integrin expression, and adhesion characteristics." *Med Pediatr Oncol* 36(1): 93-6.
- Ameri, K. and A. L. Harris. 2008. "Activating transcription factor 4." *Int J Biochem Cell Biol* 40(1): 14-21.
- Andersen, C. L., J. L. Jensen, and T. F. Orntoft. 2004. "Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets." *Cancer Res* 64(15): 5245-50.
- Andre, N., L. Padovani, and A. Verschuur. 2010. "Metronomic chemotherapy: Back to the future!" *Drug News Perspect* 23(2): 143-51.
- Antonelli, A., L. Lenzi, A. Nakagawara, T. Osaki, A. Chiaretti, and L. Aloe. 2007. "Tumor suppressor proteins are differentially affected in human ependyoblastoma and medulloblastoma cells exposed to nerve growth factor." *Cancer Invest* 25(2): 94-101.
- Araki, T., D. B. Zimonjic, N. C. Popescu, and J. Milbrandt. 1997. "Mechanism of homophilic binding mediated by ninjurin, a novel widely expressed adhesion molecule." *J Biol Chem* 272(34): 21373-80.
- Armstrong, J. L., R. Flockhart, G. J. Veal, P. E. Lovat, and C. P. Redfern. 2010. "Regulation of endoplasmic reticulum stress-induced cell death by ATF4 in neuroectodermal tumor cells." *J Biol Chem* 285(9): 6091-100.
- Armstrong, J. L., C. P. Redfern, and G. J. Veal. 2005. "13-cis retinoic acid and isomerisation in paediatric oncology--is changing shape the key to success?" *Biochem Pharmacol* 69(9): 1299-306.
- Avvisati, G. and M. S. Tallman. 2003. "All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukaemia." *Best Pract Res Clin Haematol* 16(3): 419-32.
- Backer, M. V., N. Kamel, C. Sandoval, S. Jayabose, C. E. Mendola, and J. M. Backer. 2000. "Overexpression of NM23-1 enhances responsiveness of IMR-32 human neuroblastoma cells to differentiation stimuli." *Anticancer Res* 20(3A): 1743-9.
- Baek, S. J. and T. E. Eling. 2006. "Changes in gene expression contribute to cancer prevention by COX inhibitors." *Prog Lipid Res* 45(1): 1-16.
- Balmer, J. E. and R. Blomhoff. 2002. "Gene expression regulation by retinoic acid." *J Lipid Res* 43(11): 1773-808.

- Bao, G. C., J. G. Wang, and A. Jong. 2006. "Increased p21 expression and complex formation with cyclin E/CDK2 in retinoid-induced pre-B lymphoma cell apoptosis." *FEBS Lett* 580(15): 3687-93.
- Barsony, J. and K. Prufer. 2002. "Vitamin D receptor and retinoid X receptor interactions in motion." *Vitam Horm* 65: 345-76.
- Bayon, Y., M. A. Ortiz, F. J. Lopez-Hernandez, F. Gao, M. Karin, M. Pfahl, and F. J. Piedrafita. 2003. "Inhibition of IkappaB kinase by a new class of retinoid-related anticancer agents that induce apoptosis." *Mol Cell Biol* 23(3): 1061-74.
- Benkoussa, M., C. Brand, M. H. Delmotte, P. Formstecher, and P. Lefebvre. 2002. "Retinoic acid receptors inhibit AP1 activation by regulating extracellular signal-regulated kinase and CBP recruitment to an AP1-responsive promoter." *Mol Cell Biol* 22(13): 4522-34.
- Blomhoff, R. and H. K. Blomhoff. 2006. "Overview of retinoid metabolism and function." *J Neurobiol* 66(7): 606-30.
- Boissan, M., M. F. Poupon, and M. L. Lacombe. 2007. "[NM23 and metastasis suppressor genes: update]." *Med Sci (Paris)* 23(12): 1115-23.
- Borrelli, F., A. A. Izzo, G. Di Carlo, P. Maffia, A. Russo, F. M. Maiello, F. Capasso, and N. Mascolo. 2002. "Effect of a propolis extract and caffeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon." *Fitoterapia* 73 Suppl 1: S38-43.
- Brtko, J. and Z. Dvorak. 2011. "Role of retinoids, rexinoids and thyroid hormone in the expression of cytochrome p450 enzymes." *Curr Drug Metab* 12(2): 71-88.
- Bryce, G. F. and W. J. Cunningham. 2004. "Dermatotoxicology, Sixth Edition." H. Zhai and H. I. Maibach: Informa Healthcare.
- Burnett, B. P. and R. M. Levy. 2012. "5-Lipoxygenase Metabolic Contributions to NSAID-Induced Organ Toxicity." *Adv Ther* 29(2): 79-98.
- Bushue, N. and Y. J. Wan. 2010. "Retinoid pathway and cancer therapeutics." *Adv Drug Deliv Rev* 62(13): 1285-98.
- Camacho, M., C. Rodriguez, J. Salazar, J. Martinez-Gonzalez, J. Ribalta, J. R. Escudero, L. Masana, and L. Vila. 2008. "Retinoic acid induces PGI synthase expression in human endothelial cells." *J Lipid Res* 49(8): 1707-14.
- Castellino, R. C., M. De Bortoli, L. L. Lin, D. G. Skapura, J. A. Rajan, A. M. Adesina, L. Perlaky, M. S. Irwin, and J. Y. Kim. 2007. "Overexpressed TP73 induces apoptosis in medulloblastoma." *BMC Cancer* 7: 127.
- Castro-Obregon, S. and L. Covarrubias. 1996. "Role of retinoic acid and oxidative stress in embryonic stem cell death and neuronal differentiation." *FEBS Lett* 381(1-2): 93-7.
- Cimino, G., F. Lo-Coco, S. Fenu, L. Travaglini, E. Finolezzi, M. Mancini, M. Nanni, A. Careddu, F. Fazi, F. Padula, R. Fiorini, M. A. Spiriti, M. C. Petti, A. Venditti, S. Amadori, F. Mandelli, P. G. Pelicci, and C. Nervi. 2006. "Sequential valproic acid/all-trans retinoic acid treatment reprograms differentiation in refractory and high-risk acute myeloid leukemia." *Cancer Res* 66(17): 8903-11.
- Conde, N., O. Cruz, A. Albert, and J. Mora. 2011. "Antiangiogenic treatment as a pre-operative management of alveolar soft-part sarcoma." *Pediatr Blood Cancer* 57(6): 1071-3.
- Cordeau-Lossouarn, L., J. L. Vayssiere, J. C. Larcher, F. Gros, and B. Croizat. 1991. "Mitochondrial maturation during neuronal differentiation in vivo and in vitro." *Biol Cell* 71(1-2): 57-65.

- Crosas, B., D. J. Hyndman, O. Gallego, S. Martras, X. Pares, T. G. Flynn, and J. Farres. 2003. "Human aldose reductase and human small intestine aldose reductase are efficient retinal reductases: consequences for retinoid metabolism." *Biochem J* 373(Pt 3): 973-9.
- D'Alessio, A., G. De Vita, G. Cali, L. Nitsch, A. Fusco, G. Vecchio, G. Santelli, M. Santoro, and V. de Franciscis. 1995. "Expression of the RET oncogene induces differentiation of SK-N-BE neuroblastoma cells." *Cell Growth Differ* 6(11): 1387-94.
- D'Ambrosio, D. N., R. D. Clugston, and W. S. Blaner. 2011. "Vitamin A Metabolism: An Update." 3(1): 63-103.
- Dai, Y., J. Wang, J. Xia, Y. Hong, N. Chen, and B. Cheng. 2011. "Genome-wide transcriptional profiling analysis of all trans retinoic acid-treated tongue carcinoma SCC-9 cells." *J Surg Oncol* 104(7): 830-5.
- Dandekar, D. S., M. Lopez, R. I. Carey, and B. L. Lokeshwar. 2005. "Cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib augments chemotherapeutic drug-induced apoptosis by enhancing activation of caspase-3 and -9 in prostate cancer cells." *Int J Cancer* 115(3): 484-92.
- Dannenberg, A. J., N. K. Altorki, J. O. Boyle, C. Dang, L. R. Howe, B. B. Weksler, and K. Subbaramaiah. 2001. "Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer." *Lancet Oncol* 2(9): 544-51.
- Das, S., N. Foley, K. Bryan, K. M. Watters, I. Bray, D. M. Murphy, P. G. Buckley, and R. L. Stallings. 2010. "MicroRNA mediates DNA demethylation events triggered by retinoic acid during neuroblastoma cell differentiation." *Cancer Res* 70(20): 7874-81.
- David, K. A., N. P. Mongan, C. Smith, L. J. Gudas, and D. M. Nanus. 2010. "Phase I trial of ATRA-IV and Depakote in patients with advanced solid tumor malignancies." *Cancer Biol Ther* 9(9): 678-84.
- Davidson, W. F., M. Kress, G. Khoury, and G. Jay. 1985. "Comparison of HLA class I gene sequences. Derivation of locus-specific oligonucleotide probes specific for HLA-A, HLA-B, and HLA-C genes." *J Biol Chem* 260(25): 13414-23.
- Day, I. N. and R. J. Thompson. 2010. "UCHL1 (PGP 9.5): neuronal biomarker and ubiquitin system protein." *Prog Neurobiol* 90(3): 327-62.
- de Bont, J. M., R. J. Packer, E. M. Michiels, M. L. den Boer, and R. Pieters. 2008. "Biological background of pediatric medulloblastoma and ependymoma: a review from a translational research perspective." *Neuro Oncol* 10(6): 1040-60.
- De Laurenzi, V., G. Raschella, D. Barcaroli, M. Annicchiarico-Petruzzelli, M. Ranalli, M. V. Catani, B. Tanno, A. Costanzo, M. Levrero, and G. Melino. 2000. "Induction of neuronal differentiation by p73 in a neuroblastoma cell line." *J Biol Chem* 275(20): 15226-31.
- De los Santos, M., A. Zambrano, and A. Aranda. 2007. "Combined effects of retinoic acid and histone deacetylase inhibitors on human neuroblastoma SH-SY5Y cells." *Mol Cancer Ther* 6(4): 1425-32.
- Dedieu, S. and P. Lefebvre. 2006. "Retinoids interfere with the AP1 signalling pathway in human breast cancer cells." *Cell Signal* 18(6): 889-98.
- Defacque, H., C. Sevilla, D. Piquemal, C. Rochette-Egly, J. Marti, and T. Commes. 1997. "Potentiation of VD-induced monocytic leukemia cell differentiation by retinoids involves both RAR and RXR signaling pathways." *Leukemia* 11(2): 221-7.
- Deyell, R. J. and E. F. Attiyeh. 2011. "Advances in the understanding of constitutional and somatic genomic alterations in neuroblastoma." *Cancer Genet* 204(3): 113-21.

- Dhandapani, L., P. Yue, S. S. Ramalingam, F. R. Khuri, and S. Y. Sun. 2011. "Retinoic acid enhances TRAIL-induced apoptosis in cancer cells by upregulating TRAIL receptor 1 expression." *Cancer Res* 71(15): 5245-54.
- DiPaola, R. S., M. M. Rafi, V. Vyas, D. Toppmeyer, E. Rubin, J. Patel, S. Goodin, M. Medina, P. Medina, R. Zamek, C. Zhang, E. White, E. Gupta, and W. N. Hait. 1999. "Phase I clinical and pharmacologic study of 13-cis-retinoic acid, interferon alfa, and paclitaxel in patients with prostate cancer and other advanced malignancies." *J Clin Oncol* 17(7): 2213-8.
- Dixon, R. A., R. E. Jones, R. E. Diehl, C. D. Bennett, S. Kargman, and C. A. Rouzer. 1988. "Cloning of the cDNA for human 5-lipoxygenase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(2): 416-20.
- Dozza, B., A. Papi, E. Lucarelli, K. Scotlandi, M. Pierini, G. Tresca, D. Donati, and M. Orlandi. 2011. "Cell growth inhibition and apoptotic effect of the retinoid 6-OH-11-O-hydroxyphenanthrene on human osteosarcoma and mesenchymal stem cells." *Toxicol In Vitro*.
- Dragnev, K. H., W. J. Petty, and E. Dmitrovsky. 2003. "Retinoid targets in cancer therapy and chemoprevention." *Cancer Biol Ther* 2(4 Suppl 1): S150-6.
- Dutta, A., T. Sen, and A. Chatterjee. 2010. "All-trans retinoic acid (ATRA) downregulates MMP-9 by modulating its regulatory molecules." *Cell Adh Migr* 4(3): 409-18.
- El-Refaei, M. F. and M. M. El-Naa. 2010. "Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on mice bearing tumor involving angiostatic and apoptotic activities." *Chem Biol Interact* 186(2): 152-6.
- Ellison, D. W., M. Kocak, J. Dalton, H. Megahed, M. E. Lusher, S. L. Ryan, W. Zhao, S. L. Nicholson, R. E. Taylor, S. Bailey, and S. C. Clifford. 2011. "Definition of disease-risk stratification groups in childhood medulloblastoma using combined clinical, pathologic, and molecular variables." *J Clin Oncol* 29(11): 1400-7.
- Enkhmandakh, B., A. V. Makeyev, L. Erdenechimeg, F. H. Ruddle, N. O. Chimgé, M. I. Tussie-Luna, A. L. Roy, and D. Bayarsaihan. 2009. "Essential functions of the Williams-Beuren syndrome-associated TFII-I genes in embryonic development." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(1): 181-6.
- Fabricius, E. M., U. Kruse-Boitschenko, U. Schneeweiss, G. P. Wildner, B. Hoffmeister, and J. D. Raguse. 2011. "Model examination of chemoprevention with retinoids in squamous cell carcinomas of the head and neck region and suitable biomarkers for chemoprevention." *Int J Oncol* 39(5): 1083-97.
- Faderl, S., R. Lotan, H. M. Kantarjian, D. Harris, Q. Van, and Z. Estrov. 2003. "N-(4-Hydroxyphenyl)retinamide (fenretinide, 4-HPR), a retinoid compound with antileukemic and proapoptotic activity in acute lymphoblastic leukemia (ALL)." *Leuk Res* 27(3): 259-66.
- Ferretti, E., E. De Smaele, E. Miele, P. Laneve, A. Po, M. Pelloni, A. Paganelli, L. Di Marcotullio, E. Caffarelli, I. Screpanti, I. Bozzoni, and A. Gulino. 2008. "Concerted microRNA control of Hedgehog signalling in cerebellar neuronal progenitor and tumour cells." *EMBO J* 27(19): 2616-27.
- Fontana, J. A. and A. K. Rishi. 2002. "Classical and novel retinoids: their targets in cancer therapy." *Leukemia* 16(4): 463-72.
- Fraser, P. D. and P. M. Bramley. 2004. "The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids." *Prog Lipid Res* 43(3): 228-65.
- Freemantle, S. J., M. J. Spinella, and E. Dmitrovsky. 2003. "Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance." *Oncogene* 22(47): 7305-15.



- Gao, X. N., S. Q. Tang, and J. Lin. 2007. "[Clinical features and prognosis of advanced neuroblastoma in children]." *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 9(4): 351-4.
- Garzon, R., F. Pichiorri, T. Palumbo, M. Visentini, R. Aqeilan, A. Cimmino, H. Wang, H. Sun, S. Volinia, H. Alder, G. A. Calin, C. G. Liu, M. Andreeff, and C. M. Croce. 2007. "MicroRNA gene expression during retinoic acid-induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia." *Oncogene* 26(28): 4148-57.
- Gayther, S. A., P. Barski, S. J. Batley, L. Li, K. A. de Foy, S. N. Cohen, B. A. Ponder, and C. Caldas. 1997. "Aberrant splicing of the TSG101 and FHIT genes occurs frequently in multiple malignancies and in normal tissues and mimics alterations previously described in tumours." *Oncogene* 15(17): 2119-26.
- Geng, X. X., L. N. Quan, R. Ma, and L. P. Tang. 2011. "[Effects of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and all-trans retinoic acid on the growth of HeLa cell line and their relation with gene NDRG1]." *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 33(1): 8-12.
- Ghosh, N., R. Chaki, V. Mandal, and S. C. Mandal. 2010. "COX-2 as a target for cancer chemotherapy." *Pharmacol Rep* 62(2): 233-44.
- Gomaa, M. S., J. L. Armstrong, B. Bobillon, G. J. Veal, A. Brancale, C. P. Redfern, and C. Simons. 2008. "Novel azolyl-(phenylmethyl)]aryl/heteroarylamines: potent CYP26 inhibitors and enhancers of all-trans retinoic acid activity in neuroblastoma cells." *Bioorg Med Chem* 16(17): 8301-13.
- Gonzalez, W., V. Fontaine, M. E. Pueyo, N. Laquay, D. Messika-Zeitoun, M. Philippe, J. F. Arnal, M. P. Jacob, and J. B. Michel. 2000. "Molecular plasticity of vascular wall during N(G)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension: modulation of proinflammatory signals." *Hypertension* 36(1): 103-9.
- Grandori, C., S. M. Cowley, L. P. James, and R. N. Eisenman. 2000. "The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior." *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 653-99.
- Gregorio, A., M. V. Corrias, R. Castriconi, A. Dondero, M. Mosconi, C. Gambini, A. Moretta, L. Moretta, and C. Bottino. 2008. "Small round blue cell tumours: diagnostic and prognostic usefulness of the expression of B7-H3 surface molecule." *Histopathology* 53(1): 73-80.
- Gregory, J. and J. Feusner. 2009. "Acute promyelocytic leukemia in childhood." *Curr Oncol Rep* 11(6): 439-45.
- Gupta, S., D. Pramanik, R. Mukherjee, N. R. Campbell, S. Elumalai, R. F. de Wilde, S. M. Hong, M. G. Goggins, A. De Jesus-Acosta, D. Laheru, and A. Maitra. 2012. "Molecular determinants of retinoic acid sensitivity in pancreatic cancer." *Clin Cancer Res* 18(1): 280-9.
- Gutierrez-Mazariegos, J., M. Theodosiou, F. Campo-Paysaa, and M. Schubert. 2011. "Vitamin A: a multifunctional tool for development." *Semin Cell Dev Biol* 22(6): 603-10.
- Hadjipavlou-Litina, D., G. E. Magoulas, S. E. Bariamis, D. Drainas, K. Avgoustakis, and D. Papaioannou. 2010. "Does conjugation of antioxidants improve their antioxidative/anti-inflammatory potential?" *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18(23): 8204-17.
- Hail, N., Jr., H. J. Kim, and R. Lotan. 2006. "Mechanisms of fenretinide-induced apoptosis." *Apoptosis* 11(10): 1677-94.
- Haque, A., N. L. Banik, and S. K. Ray. 2007. "Emerging role of combination of all-trans retinoic acid and interferon-gamma as chemoinmunotherapy in the management of human glioblastoma." *Neurochem Res* 32(12): 2203-9.

- Haselberger, M., A. Springwald, A. Konwisorz, C. Latrich, R. Goerse, O. Ortmann, and O. Treeck. 2011. "Silencing of the icb-1 gene inhibits the induction of differentiation-associated genes by vitamin D3 and all-trans retinoic acid in gynecological cancer cells." *Int J Mol Med* 28(1): 121-7.
- Hernandez-Acosta, N. C., A. Cabrera-Socorro, M. P. Morlans, F. J. Delgado, M. L. Suarez-Sola, R. Sottocornola, X. Lu, M. Gonzalez-Gomez, and G. Meyer. 2011. "Dynamic expression of the p53 family members p63 and p73 in the mouse and human telencephalon during development and in adulthood." *Brain Res* 1372: 29-40.
- Hofmanova, J., A. Kozubik, L. Dusek, and J. Pachernik. 1998. "Inhibitors of lipoxygenase metabolism exert synergistic effects with retinoic acid on differentiation of human leukemia HL-60 cells." *Eur J Pharmacol* 350(2-3): 273-84.
- Hu, J., Z. Shen, H. Sun, W. Wu, X. Li, G. Sun, and Z. Wang. 2000. "Long-term survey of outcome in acute promyelocytic leukemia." *Chin Med J (Engl)* 113(2): 107-10.
- Huang, D. W., B. T. Sherman, and R. A. Lempicki. 2009. "Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources." *Nature Protocols* 4(1): 44-57.
- Huang, M. E., Y. C. Ye, S. R. Chen, J. R. Chai, J. X. Lu, L. Zhao, L. J. Gu, and Z. Y. Wang. 1988. "Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia." *Blood* 72(2): 567-72.
- Hur, E. M. and F. Q. Zhou. 2010. "GSK3 signalling in neural development." *Nat Rev Neurosci* 11(8): 539-51.
- Chambaut-Guerin, A. M., M. C. Martinez, C. Hamimi, X. Gauthereau, and J. Nunez. 1995. "Tumor necrosis factor receptors in neuroblastoma SKNBE cells and their regulation by retinoic acid." *J Neurochem* 65(2): 537-44.
- Cheepala, S. B., W. Yin, Z. Syed, J. N. Gill, A. McMillian, H. E. Kleiner, M. Lynch, R. Loganantharaj, M. Trutschl, U. Cvek, and J. L. Clifford. 2009. "Identification of the B-Raf/Mek/Erk MAP kinase pathway as a target for all-trans retinoic acid during skin cancer promotion." *Mol Cancer* 8: 27.
- Chen, Z. L. and S. Strickland. 2003. "Laminin gamma1 is critical for Schwann cell differentiation, axon myelination, and regeneration in the peripheral nerve." *J Cell Biol* 163(4): 889-99.
- Choi, M., S. Yamada, and M. Makishima. 2011. "Dynamic and ligand-selective interactions of vitamin d receptor with retinoid x receptor and cofactors in living cells." *Mol Pharmacol* 80(6): 1147-55.
- Choi, Y., S. Y. Kim, K. Park, J. Yang, K. J. Cho, H. J. Kwon, and Y. Byun. 2006. "Chemopreventive efficacy of all-trans-retinoic acid in biodegradable microspheres against epithelial cancers: results in a 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis model." *Int J Pharm* 320(1-2): 45-52.
- Ishibe, T., T. Nakayama, T. Aoyama, T. Nakamura, and J. Toguchida. 2008. "Neuronal differentiation of synovial sarcoma and its therapeutic application." *Clin Orthop Relat Res* 466(9): 2147-55.
- Ishii, K., S. Motoyoshi, J. Kawata, H. Nakagawa, and K. Takeyama. 1994. "A useful method for differential evaluation of anti-inflammatory effects due to cyclooxygenase and 5-lipoxygenase inhibitions in mice." *Jpn J Pharmacol* 65(4): 297-303.
- IUPAC-IUB, I. U. o. P. a. A. C.-I. U. o. B. 1983. "Nomenclature of retinoids." *Pure & Appl. Chem.* 55(4): 721-26.

- Iwahashi, H., Y. Negoro, A. Ikeda, H. Morishita, and R. Kido. 1986. "Inhibition by chlorogenic acid of haematin-catalysed retinoic acid 5,6-epoxidation." *Biochem J* 239(3): 641-6.
- Jaiswal, A. K., O. W. McBride, M. Adesnik, and D. W. Nebert. 1988. "Human dioxin-inducible cytosolic NAD(P)H:menadione oxidoreductase. cDNA sequence and localization of gene to chromosome 16." *J Biol Chem* 263(27): 13572-8.
- Johnsen, J. I., P. Kogner, A. Albiñ, and M. A. Henriksson. 2009. "Embryonal neural tumours and cell death." *Apoptosis* 14(4): 424-38.
- Jung, Y. S., Y. Qian, and X. Chen. 2010. "Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity." *Cell Signal* 22(7): 1003-12.
- Kalvakolanu, D. V. 2004. "The GRIMs: a new interface between cell death regulation and interferon/retinoid induced growth suppression." *Cytokine Growth Factor Rev* 15(2-3): 169-94.
- Kalvakolanu, D. V., S. C. Nallar, and S. Kalakonda. 2010a. "Cytokine-induced tumor suppressors: A GRIM story." *Cytokine* 52(1-2): 128-42.
- Kalvakolanu, D. V., S. C. Nallar, S. Kalakonda, and P. Sun. 2010b. "Interferon and cancer A GRIM road to and tumor suppression." *Cytokine* 52(1-2): 74-74.
- Kang, N. J., K. W. Lee, B. H. Kim, A. M. Bode, H. J. Lee, Y. S. Heo, L. Boardman, P. Limburg, and Z. Dong. 2011. "Coffee phenolic phytochemicals suppress colon cancer metastasis by targeting MEK and TOPK." *Carcinogenesis* 32(6): 921-8.
- Kern, M. A., M. M. Schoneweiss, D. Sahi, M. Bahlo, A. M. Haugg, H. U. Kasper, H. P. Dienes, H. Kaferstein, K. Breuhahn, and P. Schirmacher. 2004. "Cyclooxygenase-2 inhibitors suppress the growth of human hepatocellular carcinoma implants in nude mice." *Carcinogenesis* 25(7): 1193-9.
- Khodosevich, K. and H. Monyer. 2010. "Signaling involved in neurite outgrowth of postnatally born subventricular zone neurons in vitro." *BMC Neurosci* 11: 18.
- Killick, R., M. Niklison-Chirou, R. Tomasini, D. Bano, A. Rufini, F. Grespi, T. Velletri, P. Tucci, B. S. Sayan, F. Conforti, E. Gallagher, P. Nicotera, T. W. Mak, G. Melino, R. A. Knight, and M. Agostini. 2011. "p73: a multifunctional protein in neurobiology." *Mol Neurobiol* 43(2): 139-46.
- Kim, B., J. H. Lee, M. S. Yang, I. Jou, and E. H. Joe. 2008. "Retinoic acid enhances prostaglandin E2 production through increased expression of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase-1 in rat brain microglia." *J Neurosci Res* 86(6): 1353-60.
- Kim, H. T., G. Kong, D. Denardo, Y. Li, I. Uray, S. Pal, S. Mohsin, S. G. Hilsenbeck, R. Bissonnette, W. W. Lamph, K. Johnson, and P. H. Brown. 2006. "Identification of biomarkers modulated by the retinoid LGD1069 (bexarotene) in human breast cells using oligonucleotide arrays." *Cancer Res* 66(24): 12009-18.
- Kim, J. H., B. J. Lee, Y. S. Yu, and K. W. Kim. 2009. "Anti-angiogenic effect of caffeic acid on retinal neovascularization." *Vascul Pharmacol* 51(4): 262-7.
- Kim, W., W. Choy, J. Dye, D. Nagasawa, M. Safaee, B. Fong, and I. Yang. 2011. "The tumor biology and molecular characteristics of medulloblastoma identifying prognostic factors associated with survival outcomes and prognosis." *J Clin Neurosci* 18(7): 886-90.
- Kitareewan, S., I. Pitha-Rowe, D. Sekula, C. H. Lowrey, M. J. Nemeth, T. R. Golub, S. J. Freemantle, and E. Dmitrovsky. 2002. "UBE1L is a retinoid target that triggers PML/RARalpha degradation and apoptosis in acute promyelocytic leukemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(6): 3806-11.

- Klenke, F. M., M. M. Gebhard, V. Ewerbeck, A. Abdollahi, P. E. Huber, and A. Sckell. 2006. "The selective Cox-2 inhibitor Celecoxib suppresses angiogenesis and growth of secondary bone tumors: an intravital microscopy study in mice." *BMC Cancer* 6: 9.
- Koltuksuz, U., H. M. Mutus, R. Kutlu, H. Ozyurt, S. Cetin, A. Karaman, N. Gurbuz, O. Akyol, and N. E. Aydin. 2001. "Effects of caffeic acid phenethyl ester and epidermal growth factor on the development of caustic esophageal stricture in rats." *J Pediatr Surg* 36(10): 1504-9.
- Konopka, R., L. Kubala, A. Lojek, and J. Pachernik. 2008. "Alternation of retinoic acid induced neural differentiation of P19 embryonal carcinoma cells by reduction of reactive oxygen species intracellular production." *Neuro Endocrinol Lett* 29(5): 770-4.
- Kool, M., J. Koster, J. Bunt, N. E. Hasselt, A. Lakeman, P. van Sluis, D. Troost, N. S. Meeteren, H. N. Caron, J. Cloos, A. Mrcic, B. Ylstra, W. Grajkowska, W. Hartmann, T. Pietsch, D. Ellison, S. C. Clifford, and R. Versteeg. 2008. "Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features." *PLoS One* 3(8): e3088.
- Kramer, O. H., S. Muller, M. Buchwald, S. Reichardt, and T. Heinzel. 2008. "Mechanism for ubiquitylation of the leukemia fusion proteins AML1-ETO and PML-RARalpha." *FASEB J* 22(5): 1369-79.
- Kuendgen, A., S. Knipp, F. Fox, C. Strupp, B. Hildebrandt, C. Steidl, U. Germing, R. Haas, and N. Gattermann. 2005. "Results of a phase 2 study of valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid in 75 patients with myelodysplastic syndrome and relapsed or refractory acute myeloid leukemia." *Ann Hematol* 84 Suppl 1: 61-6.
- Kuo, H. C., W. H. Kuo, Y. J. Lee, C. J. Wang, and T. H. Tseng. 2006. "Enhancement of caffeic acid phenethyl ester on all-trans retinoic acid-induced differentiation in human leukemia HL-60 cells." *Toxicol Appl Pharmacol* 216(1): 80-8.
- Lau, L., L. M. Hansford, L. S. Cheng, M. Hang, S. Baruchel, D. R. Kaplan, and M. S. Irwin. 2007. "Cyclooxygenase inhibitors modulate the p53/HDM2 pathway and enhance chemotherapy-induced apoptosis in neuroblastoma." *Oncogene* 26(13): 1920-31.
- Lazebnik, M. B., M. I. Tussie-Luna, P. W. Hinds, and A. L. Roy. 2009. "Williams-Beuren syndrome-associated transcription factor TFII-I regulates osteogenic marker genes." *J Biol Chem* 284(52): 36234-9.
- Lengfelder, E., S. Saussele, A. Weissner, T. Buchner, and R. Hehlmann. 2005. "Treatment concepts of acute promyelocytic leukemia." *Crit Rev Oncol Hematol* 56(2): 261-74.
- Lewandoski, M. and S. Mackem. 2009. "Limb Development: The Rise and Fall of Retinoic Acid." *Current Biology* 19(14): R558-R61.
- Li, L., X. Li, U. Francke, and S. N. Cohen. 1997. "The TSG101 tumor susceptibility gene is located in chromosome 11 band p15 and is mutated in human breast cancer." *Cell* 88(1): 143-54.
- Li, P. X., J. Wong, A. Ayed, D. Ngo, A. M. Brade, C. Arrowsmith, R. C. Austin, and H. J. Klamut. 2000. "Placental transforming growth factor-beta is a downstream mediator of the growth arrest and apoptotic response of tumor cells to DNA damage and p53 overexpression." *J Biol Chem* 275(26): 20127-35.
- Liang, P. and T. H. MacRae. 1997. "Molecular chaperones and the cytoskeleton." *J Cell Sci* 110 ( Pt 13): 1431-40.
- Lim, J. S., S. H. Park, and K. L. Jang. 2011. "All-trans retinoic acid induces cellular senescence by up-regulating levels of p16 and p21 via promoter hypomethylation." *Biochem Biophys Res Commun* 412(3): 500-5.

- Liu, J. P., H. B. Wei, Z. H. Zheng, W. P. Guo, and J. F. Fang. 2009. "[Celecoxib increased cellular ATRA sensitivity of human colon cancer cell lines through COX-2-independent mechanisms]." *Yao Xue Xue Bao* 44(12): 1353-8.
- Liu, Y., M. Encinas, J. X. Comella, M. Aldea, and C. Gallego. 2004. "Basic helix-loop-helix proteins bind to TrkB and p21(Cip1) promoters linking differentiation and cell cycle arrest in neuroblastoma cells." *Mol Cell Biol* 24(7): 2662-72.
- Liu, Y., R. Prasad, and S. H. Wilson. 2010. "HMGB1: roles in base excision repair and related function." *Biochim Biophys Acta* 1799(1-2): 119-30.
- Löffler, G. and P. P. Trides. 1998. "Biochemie und Pathobiochemie." Berlin: Springer - Verlag.
- Look, A. T., F. A. Hayes, R. Nitschke, N. B. McWilliams, and A. A. Green. 1984. "Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma." *N Engl J Med* 311(4): 231-5.
- Lovat, P. E., H. Irving, M. Annicchiarico-Petruzzelli, F. Bernassola, A. J. Malcolm, A. D. Pearson, G. Melino, and C. P. Redfern. 1997. "Retinoids in neuroblastoma therapy: distinct biological properties of 9-cis- and all-trans-retinoic acid." *Eur J Cancer* 33(12): 2075-80.
- Lundin, V. F., M. R. Leroux, and P. C. Stirling. 2010. "Quality control of cytoskeletal proteins and human disease." *Trends Biochem Sci* 35(5): 288-97.
- Luo, P., M. Lin, Y. Chen, B. Yang, and Q. He. 2009. "Function of retinoid acid receptor alpha and p21 in all-trans-retinoic acid-induced acute T-lymphoblastic leukemia apoptosis." *Leuk Lymphoma* 50(7): 1183-9.
- Lynch, P. M. 2001. "COX-2 inhibition in clinical cancer prevention." *Oncology (Williston Park)* 15(3 Suppl 5): 21-6.
- Mahmood, Z. and Y. Shukla. 2010. "Death receptors: targets for cancer therapy." *Exp Cell Res* 316(6): 887-99.
- Makeyev, A. V. and D. Bayarsaihan. 2009. "New TFII-I family target genes involved in embryonic development." *Biochem Biophys Res Commun* 386(4): 554-8.
- Maldonado, M. E., S. Bousserouel, F. Gosse, A. Lobstein, and F. Raul. 2010. "Implication of NF-kappaB and p53 in the expression of TRAIL-death receptors and apoptosis by apple procyanidins in human metastatic SW620 cells." *Biomedica* 30(4): 577-86.
- Malina, J., J. Kasparkova, G. Natile, and V. Brabec. 2002. "Recognition of major DNA adducts of enantiomeric cisplatin analogs by HMG box proteins and nucleotide excision repair of these adducts." *Chem Biol* 9(5): 629-38.
- Marti, J., T. Commes, H. Defacque, and C. Sevilla. 1997. "Vitamin D and 9-cis retinoic acid: an efficient partnership for the induction of myelomonocytic cell growth inhibition and differentiation." *Leuk Res* 21(2): 173-6.
- Marzinke, M. A. and M. Clagett-Dame. 2012. "The all-trans retinoic acid (atRA)-regulated gene Calmin (Clmn) regulates cell cycle exit and neurite outgrowth in murine neuroblastoma (Neuro2a) cells." *Exp Cell Res* 318(1): 85-93.
- Masia, S., S. Alvarez, A. R. de Lera, and D. Baretino. 2007. "Rapid, nongenomic actions of retinoic acid on phosphatidylinositol-3-kinase signaling pathway mediated by the retinoic acid receptor." *Mol Endocrinol* 21(10): 2391-402.
- Massimino, M., F. Giangaspero, M. L. Garre, L. Gandola, G. Poggi, V. Biassoni, G. Gatta, and S. Rutkowski. 2011. "Childhood medulloblastoma." *Crit Rev Oncol Hematol* 79(1): 65-83.
- Maurer, B. J., L. S. Metelitsa, R. C. Seeger, M. C. Cabot, and C. P. Reynolds. 1999. "Increase of ceramide and induction of mixed apoptosis/necrosis by N-(4-

- hydroxyphenyl)- retinamide in neuroblastoma cell lines.” *J Natl Cancer Inst* 91(13): 1138-46.
- Mazánek, P., V. Bajčiová, J. Štěrbá, P. Kuglík, and R. Veselská. 2008. “Novinky v diagnostice a léčbě neuroblastomu.” *Onkolog* 3((4)): 1-5.
- McCollum, E. V., Marguerite Davis. 1913. “The necessity of certain lipids during growth.” *J Biol Chem*(15): 167-75.
- Meyer, G., A. Cabrera Socorro, C. G. Perez Garcia, L. Martinez Millan, N. Walker, and D. Caput. 2004. “Developmental roles of p73 in Cajal-Retzius cells and cortical patterning.” *J Neurosci* 24(44): 9878-87.
- Miao, L. and D. K. St Clair. 2009. “Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease.” *Free Radic Biol Med* 47(4): 344-56.
- Michaluart, P., J. L. Masferrer, A. M. Carothers, K. Subbaramaiah, B. S. Zweifel, C. Koboldt, J. R. Mestre, D. Grunberger, P. G. Sacks, T. Tanabe, and A. J. Dannenberg. 1999. “Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation.” *Cancer Res* 59(10): 2347-52.
- Mimeault, M. and S. K. Batra. 2010. “Divergent molecular mechanisms underlying the pleiotropic functions of macrophage inhibitory cytokine-1 in cancer.” *J Cell Physiol* 224(3): 626-35.
- Miyamoto, M., S. Iwashita, S. Yamaguchi, and Y. Ono. 2009. “Role of nm23 in the regulation of cell shape and migration via Rho family GTPase signals.” *Mol Cell Biochem* 329(1-2): 175-9.
- Mondola, P., M. Santillo, R. Seru, S. Damiano, C. Alvino, G. Ruggiero, P. Formisano, G. Terrazzano, A. Secondo, and L. Annunziato. 2004. “Cu,Zn superoxide dismutase increases intracellular calcium levels via a phospholipase C-protein kinase C pathway in SK-N-BE neuroblastoma cells.” *Biochem Biophys Res Commun* 324(2): 887-92.
- Myung, K., C. Braastad, D. M. He, and E. A. Hendrickson. 1998. “KARP-1 is induced by DNA damage in a p53- and ataxia telangiectasia mutated-dependent fashion.” *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(13): 7664-9.
- Nardini, M., C. Scaccini, L. Packer, and F. Virgili. 2000. “In vitro inhibition of the activity of phosphorylase kinase, protein kinase C and protein kinase A by caffeic acid and a procyanidin-rich pine bark (*Pinus maritima*) extract.” *Biochim Biophys Acta* 1474(2): 219-25.
- Negróni, A., D. Venturelli, B. Tanno, R. Amendola, S. Ransac, V. Cesi, B. Calabretta, and G. Raschella. 2000. “Neuroblastoma specific effects of DR-nm23 and its mutant forms on differentiation and apoptosis.” *Cell Death Differ* 7(9): 843-50.
- Neto, A. D., E. L. Gasparetto, S. E. Ono, G. A. Bertoldi, and A. F. Gomes. 2003. “Adult cerebellar medulloblastoma - CT and MRI findings in eight cases.” *Arquivos De Neuro-Psiquiatria* 61(2A): 199-203.
- Neumann, I., J. L. Foell, M. Bremer, I. Volkmer, D. Korholz, S. Burdach, and M. S. Staeger. 2010. “Retinoic acid enhances sensitivity of neuroblastoma cells for imatinib mesylate.” *Pediatr Blood Cancer* 55(3): 464-70.
- Nieto-Rementeria, N., G. Perez-Yarza, M. D. Boyano, A. Apraiz, R. Izu, J. L. Diaz-Perez, and A. Asumendi. 2009. “Bexarotene activates the p53/p73 pathway in human cutaneous T-cell lymphoma.” *Br J Dermatol* 160(3): 519-26.
- Njar, V. C. 2002. “Cytochrome p450 retinoic acid 4-hydroxylase inhibitors: potential agents for cancer therapy.” *Mini Rev Med Chem* 2(3): 261-9.

- Njar, V. C., L. Gediya, P. Purushottamachar, P. Chopra, T. S. Vasaitis, A. Khandelwal, J. Mehta, C. Huynh, A. Belosay, and J. Patel. 2006. "Retinoic acid metabolism blocking agents (RAMBAs) for treatment of cancer and dermatological diseases." *Bioorg Med Chem* 14(13): 4323-40.
- Noguchi, K. and M. Okubo. 2011. "Leukotrienes in nociceptive pathway and neuropathic/inflammatory pain." *Biol Pharm Bull* 34(8): 1163-9.
- Oh, H., C. Mammucari, A. Nenci, S. Cabodi, S. N. Cohen, and G. P. Dotto. 2002. "Negative regulation of cell growth and differentiation by TSG101 through association with p21(Cip1/WAF1)." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(8): 5430-5.
- Oh, Y. I., J. H. Kim, and C. W. Kang. 2010. "Oxidative stress in MCF-7 cells is involved in the effects of retinoic acid-induced activation of protein kinase C-delta on insulin-like growth factor-I secretion and synthesis." *Growth Horm IGF Res* 20(2): 101-9.
- Olthof, M. R., P. C. Hollman, and M. B. Katan. 2001a. "Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans." *J Nutr* 131(1): 66-71.
- Olthof, M. R., P. C. Hollman, P. L. Zock, and M. B. Katan. 2001b. "Consumption of high doses of chlorogenic acid, present in coffee, or of black tea increases plasma total homocysteine concentrations in humans." *Am J Clin Nutr* 73(3): 532-8.
- Oppenheimer, O., N. K. Cheung, and W. L. Gerald. 2007. "The RET oncogene is a critical component of transcriptional programs associated with retinoic acid-induced differentiation in neuroblastoma." *Mol Cancer Ther* 6(4): 1300-9.
- Ortiz, M. A., Y. Bayon, F. J. Lopez-Hernandez, and F. J. Piedrafita. 2002. "Retinoids in combination therapies for the treatment of cancer: mechanisms and perspectives." *Drug Resist Updat* 5(3-4): 162-75.
- Osada, M., H. L. Park, M. J. Park, J. W. Liu, G. Wu, B. Trink, and D. Sidransky. 2007. "A p53-type response element in the GDF15 promoter confers high specificity for p53 activation." *Biochem Biophys Res Commun* 354(4): 913-8.
- Osone, S., H. Hosoi, Y. Kuwahara, Y. Matsumoto, T. Iehara, and T. Sugimoto. 2004. "Fenretinide induces sustained-activation of JNK/p38 MAPK and apoptosis in a reactive oxygen species-dependent manner in neuroblastoma cells." *Int J Cancer* 112(2): 219-24.
- Pan, J., Y. L. Kao, S. Joshi, S. Jeetendran, D. Dipette, and U. S. Singh. 2005. "Activation of Rac1 by phosphatidylinositol 3-kinase in vivo: role in activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways and retinoic acid-induced neuronal differentiation of SH-SY5Y cells." *J Neurochem* 93(3): 571-83.
- Park, S. H., J. S. Lim, and K. L. Jang. 2011. "All-trans retinoic acid induces cellular senescence via upregulation of p16, p21, and p27." *Cancer Lett* 310(2): 232-9.
- Pasquier, E., M. Kavallaris, and N. Andre. 2010. "Metronomic chemotherapy: new rationale for new directions." *Nat Rev Clin Oncol* 7(8): 455-65.
- Pasquier, E., M. W. Kieran, J. Sterba, Y. Shaked, S. Baruchel, O. Oberlin, M. S. Kivivuori, A. Peyrl, M. Diawarra, M. Casanova, S. Zacharoulis, G. Vassal, F. Berthold, A. Verschuur, and N. Andre. 2011. "Moving forward with metronomic chemotherapy: meeting report of the 2nd International Workshop on Metronomic and Anti-Angiogenic Chemotherapy in Paediatric Oncology." *Transl Oncol* 4(4): 203-11.
- Pili, R., B. Salumbides, M. Zhao, S. Altioek, D. Qian, J. Zwiebel, M. A. Carducci, and M. A. Rudek. 2012. "Phase I study of the histone deacetylase inhibitor entinostat in combination with 13-cis retinoic acid in patients with solid tumours." *Br J Cancer* 106(1): 77-84.

- Ponzoni, M., P. Bocca, V. Chiesa, A. Decensi, V. Pistoia, L. Raffaghello, C. Rozzo, and P. G. Montaldo. 1995. "Differential effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and retinoic acid on neuroblastoma cells: apoptosis versus differentiation." *Cancer Res* 55(4): 853-61.
- Pospisilova, S. and J. Mayer. 2005. "[A modern method for differential gene expression analysis and its significance for cancer diagnostics and therapy]." *Cas Lek Cesk* 144(1): 11-7; discussion 18.
- Pozniak, C. D., S. Radinovic, A. Yang, F. McKeon, D. R. Kaplan, and F. D. Miller. 2000. "An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death." *Science* 289(5477): 304-6.
- Purev, E., D. R. Soprano, and K. J. Soprano. 2011. "PP2A interaction with Rb2/p130 mediates translocation of Rb2/p130 into the nucleus in all-trans retinoic acid-treated ovarian carcinoma cells." *J Cell Physiol* 226(4): 1027-34.
- Rasband, W. S. 1997-2011. "ImageJ" [accessed on 1997-2011]. Available at: <http://imagej.nih.gov/ij/>.
- Redova, M. 2010. "Zesilování účinku induktorů diferenciacie na modelu solidních nádorů in vitro." *Disertační práce*.
- Redova, M., P. Chlapek, T. Loja, K. Zitterbart, M. Hermanova, J. Sterba, and R. Veselska. 2010. "Influence of LOX/COX inhibitors on cell differentiation induced by all-trans retinoic acid in neuroblastoma cell lines." *Int J Mol Med* 25(2): 271-80.
- Reed, M. J., T. Koike, E. Sadoun, E. H. Sage, and P. Puolakkainen. 2003. "Inhibition of TIMP1 enhances angiogenesis in vivo and cell migration in vitro." *Microvasc Res* 65(1): 9-17.
- Reeves, R. and L. Beckerbauer. 2001. "HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure." *Biochim Biophys Acta* 1519(1-2): 13-29.
- Rechner, A. R., A. S. Pannala, and C. A. Rice-Evans. 2001. "Caffeic acid derivatives in artichoke extract are metabolised to phenolic acids in vivo." *Free Radic Res* 35(2): 195-202.
- Reynolds, C. P. and R. S. Lemons. 2001. "Retinoid therapy of childhood cancer." *Hematol Oncol Clin North Am* 15(5): 867-910.
- Reynolds, C. P., K. K. Matthay, J. G. Villablanca, and B. J. Maurer. 2003. "Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma." *Cancer Lett* 197(1-2): 185-92.
- Ribatti, D., L. Raffaghello, D. Marimpietri, E. Cosimo, P. G. Montaldo, B. Nico, A. Vacca, and M. Ponzoni. 2003. "Fenretinide as an anti-angiogenic agent in neuroblastoma." *Cancer Lett* 197(1-2): 181-4.
- Rochard, P., A. Rodier, F. Casas, I. Cassar-Malek, S. Marchal-Victorion, L. Daury, C. Wrutniak, and G. Cabello. 2000. "Mitochondrial activity is involved in the regulation of myoblast differentiation through myogenin expression and activity of myogenic factors." *J Biol Chem* 275(4): 2733-44.
- Romano, M. and J. Claria. 2003. "Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase converging functions on cell proliferation and tumor angiogenesis: implications for cancer therapy." *FASEB J* 17(14): 1986-95.
- Roobol, A., F. E. Holmes, N. V. Hayes, A. J. Baines, and M. J. Carden. 1995. "Cytoplasmic chaperonin complexes enter neurites developing in vitro and differ in subunit composition within single cells." *J Cell Sci* 108 ( Pt 4): 1477-88.
- Roussel, M. F. and M. E. Hatten. 2011. "Cerebellum development and medulloblastoma." *Curr Top Dev Biol* 94: 235-82.



- Ryningen, A., C. Stapnes, K. Paulsen, P. Lassalle, B. T. Gjertsen, and O. Bruserud. 2008. "In vivo biological effects of ATRA in the treatment of AML." *Expert Opin Investig Drugs* 17(11): 1623-33.
- Saifudeen, Z., V. Diavolitsis, J. Stefkova, S. Dipp, H. Fan, and S. S. El-Dahr. 2005. "Spatiotemporal switch from DeltaNp73 to TAp73 isoforms during nephrogenesis: impact on differentiation gene expression." *J Biol Chem* 280(24): 23094-102.
- Sakurai, T., N. P. Dorr, N. Takahashi, L. A. McInnes, G. A. Elder, and J. D. Buxbaum. 2010. "Haploinsufficiency of Gtf2i, a gene deleted in Williams Syndrome, leads to increases in social interactions." *Autism Res*.
- Sarang, S. S., T. Yoshida, R. Cadet, A. S. Valeras, R. V. Jensen, and S. R. Gullans. 2002. "Discovery of molecular mechanisms of neuroprotection using cell-based bioassays and oligonucleotide arrays." *Physiol Genomics* 11(2): 45-52.
- Sato, Y. and R. O. Heuckeroth. 2008. "Retinoic acid regulates murine enteric nervous system precursor proliferation, enhances neuronal precursor differentiation, and reduces neurite growth in vitro." *Dev Biol* 320(1): 185-98.
- Seliger, B. 2008. "Molecular mechanisms of MHC class I abnormalities and APM components in human tumors." *Cancer Immunol Immunother* 57(11): 1719-26.
- Shin, D. M., B. S. Glisson, F. R. Khuri, J. L. Clifford, G. Clayman, S. E. Benner, A. A. Forastiere, L. Ginsberg, D. Liu, J. J. Lee, J. Myers, H. Goepfert, R. Lotan, W. K. Hong, and S. M. Lippman. 2002. "Phase II and biologic study of interferon alfa, retinoic acid, and cisplatin in advanced squamous skin cancer." *J Clin Oncol* 20(2): 364-70.
- Schober, A., M. Bottner, J. Strelau, R. Kinscherf, G. A. Bonaterra, M. Barth, L. Schilling, W. D. Fairlie, S. N. Breit, and K. Unsicker. 2001. "Expression of growth differentiation factor-15/ macrophage inhibitory cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in the perinatal, adult, and injured rat brain." *J Comp Neurol* 439(1): 32-45.
- Schodin, B. A., T. J. Tsomides, and D. M. Kranz. 1996. "Correlation between the number of T cell receptors required for T cell activation and TCR-ligand affinity." *Immunity* 5(2): 137-46.
- Schroeder, C. P., H. Kadara, D. Lotan, J. K. Woo, H. Y. Lee, W. K. Hong, and R. Lotan. 2006. "Involvement of mitochondrial and Akt signaling pathways in augmented apoptosis induced by a combination of low doses of celecoxib and N-(4-hydroxyphenyl) retinamide in premalignant human bronchial epithelial cells." *Cancer Res* 66(19): 9762-70.
- Schule, R., P. Rangarajan, N. Yang, S. Kliewer, L. J. Ransone, J. Bolado, I. M. Verma, and R. M. Evans. 1991. "Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(14): 6092-6.
- Siegel, D., D. L. Gustafson, D. L. Dehn, J. Y. Han, P. Boonchoong, L. J. Berliner, and D. Ross. 2004. "NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger." *Mol Pharmacol* 65(5): 1238-47.
- Simeone, A. M., Y. J. Li, L. D. Broemeling, M. M. Johnson, M. Tuna, and A. M. Tari. 2004. "Cyclooxygenase-2 is essential for HER2/neu to suppress N-(4-hydroxyphenyl)retinamide apoptotic effects in breast cancer cells." *Cancer Res* 64(4): 1224-8.
- Singh, U. S., J. Pan, Y. L. Kao, S. Joshi, K. L. Young, and K. M. Baker. 2003. "Tissue transglutaminase mediates activation of RhoA and MAP kinase pathways during retinoic acid-induced neuronal differentiation of SH-SY5Y cells." *J Biol Chem* 278(1): 391-9.

- Smider, V. and G. Chu. 1997. "The end-joining reaction in V(D)J recombination." *Semin Immunol* 9(3): 189-97.
- Soda, M., D. Hu, S. Endo, M. Takemura, J. Li, R. Wada, S. Ifuku, H. T. Zhao, O. El-Kabbani, S. Ohta, K. Yamamura, N. Toyooka, A. Hara, and T. Matsunaga. 2012. "Design, synthesis and evaluation of caffeic acid phenethyl ester-based inhibitors targeting a selectivity pocket in the active site of human aldo-keto reductase 1B10." *Eur J Med Chem* 48: 321-9.
- Sokoloski, J. A. and A. C. Sartorelli. 1998. "Induction of the differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells by nonsteroidal anti-inflammatory agents in combination with low levels of vitamin D3." *Leuk Res* 22(2): 153-61.
- Son, S. and B. A. Lewis. 2002. "Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship." *J Agric Food Chem* 50(3): 468-72.
- Spiller, S. E., S. H. Ditzler, B. J. Pullar, and J. M. Olson. 2008. "Response of preclinical medulloblastoma models to combination therapy with 13-cis retinoic acid and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)." *J Neurooncol* 87(2): 133-41.
- Spiller, S. E., A. C. Ravanpay, A. W. Hahn, and J. M. Olson. 2006. "Suberoylanilide hydroxamic acid is effective in preclinical studies of medulloblastoma." *J Neurooncol* 79(3): 259-70.
- Spinella, M. J., S. J. Freemantle, D. Sekula, J. H. Chang, A. J. Christie, and E. Dmitrovsky. 1999. "Retinoic acid promotes ubiquitination and proteolysis of cyclin D1 during induced tumor cell differentiation." *J Biol Chem* 274(31): 22013-8.
- Stefanska, B., P. Salame, A. Bednarek, and K. Fabianowska-Majewska. 2011. "Comparative effects of retinoic acid, vitamin D and resveratrol alone and in combination with adenosine analogues on methylation and expression of phosphatase and tensin homologue tumour suppressor gene in breast cancer cells." *Br J Nutr*: 1-10.
- Stephensen, C. B. 2001. "Vitamin A, infection, and immune function." *Annu Rev Nutr* 21: 167-92.
- Sterba, J. 2002. "Contemporary therapeutic options for children with high risk neuroblastoma." *Neoplasma* 49(3): 133-40.
- Sterba, J., J. Skotáková, D. Dembická, O. Magnová, Z. Pavelka, P. Múdry, D. Valík, V. Gregorová, and J. Slaný. 2002. "Solidní nádory u dětí: neuroblastom, nádory CNS, germinální nádory, sarkomy měkkých tkání, nefroblastom." *Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob*. Z. Adam, J. Vorlíček, and V. J., pp. 329-41. Praha: Grada Publishing, spol. s r. o.
- Sterba, J., D. Valík, P. Mudry, T. Kepak, Z. Pavelka, V. Bajciová, K. Zitterbart, V. Kadlecová, and P. Mazanek. 2006. "Combined biodifferentiating and antiangiogenic oral metronomic therapy is feasible and effective in relapsed solid tumors in children: single-center pilot study." *Onkologie* 29(7): 308-13.
- Sterba, S. K., W. Copeland, H. L. Egger, E. Jane Costello, A. Erkanli, and A. Angold. 2010. "Longitudinal dimensionality of adolescent psychopathology: testing the differentiation hypothesis." *J Child Psychol Psychiatry* 51(8): 871-84.
- Stock, A., S. Booth, and V. Cerundolo. 2011. "Prostaglandin E2 suppresses the differentiation of retinoic acid-producing dendritic cells in mice and humans." *J Exp Med* 208(4): 761-73.
- Strelau, J., A. Strzelczyk, P. Rusu, G. Bendner, S. Wiese, F. Diella, A. L. Altick, C. S. von Bartheld, R. Klein, M. Sendtner, and K. Unsicker. 2009. "Progressive postnatal motoneuron loss in mice lacking GDF-15." *J Neurosci* 29(43): 13640-8.

- Stros, M. 2010. "HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin." *Biochim Biophys Acta* 1799(1-2): 101-13.
- Sun, L., G. Liao, J. Gao, T. T. Chen, L. L. Pan, and L. X. Yuan. 2010. "[Expression of mitochondrial ferritin in K562 leukemic cell during ATRA-induced cell differentiation]." *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 41(1): 77-80, 90.
- Svoboda, M. and J. Michalek. 2004. "Úvod do technologie DNA čipů." *Lék. a Techn.* 35: 67-75.
- Sylvester, P. W. 2011. "Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability." *Methods Mol Biol* 716: 157-68.
- Thatcher, J. E. and N. Isoherranen. 2009. "The role of CYP26 enzymes in retinoic acid clearance." *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5(8): 875-86.
- Thompson, L. H., K. W. Brookman, N. J. Jones, S. A. Allen, and A. V. Carrano. 1990. "Molecular cloning of the human XRCC1 gene, which corrects defective DNA strand break repair and sister chromatid exchange." *Mol Cell Biol* 10(12): 6160-71.
- Thompson, M. C., C. Fuller, T. L. Hogg, J. Dalton, D. Finkelstein, C. C. Lau, M. Chintagumpala, A. Adesina, D. M. Ashley, S. J. Kellie, M. D. Taylor, T. Curran, A. Gajjar, and R. J. Gilbertson. 2006. "Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations." *J Clin Oncol* 24(12): 1924-31.
- Tichý, B. 2010. "Možnosti využití DNA microarray v diagnostice a terapii nádorů." *Disertační práce*.
- Todesco, A., M. Carli, I. Iacona, E. Frascella, V. Ninfo, and A. Rosolen. 2000. "All-trans retinoic acid and interferon-alpha in the treatment of a patient with resistant metastatic osteosarcoma." *Cancer* 89(12): 2661-6.
- Tomasini, R., K. Tsuchihara, M. Wilhelm, M. Fujitani, A. Rufini, C. C. Cheung, F. Khan, A. Itie-Youten, A. Wakeham, M. S. Tsao, J. L. Iovanna, J. Squire, I. Jurisica, D. Kaplan, G. Melino, A. Jurisicova, and T. W. Mak. 2008. "TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions." *Genes Dev* 22(19): 2677-91.
- Travali, S., D. H. Ku, M. G. Rizzo, L. Ottavio, R. Baserga, and B. Calabretta. 1989. "Structure of the human gene for the proliferating cell nuclear antigen." *J Biol Chem* 264(13): 7466-72.
- Trus, M. R., L. Yang, F. Suarez Saiz, L. Bordeleau, I. Jurisica, and M. D. Minden. 2005. "The histone deacetylase inhibitor valproic acid alters sensitivity towards all trans retinoic acid in acute myeloblastic leukemia cells." *Leukemia* 19(7): 1161-8.
- Untergasser, A., H. Nijveen, X. Rao, T. Bisseling, R. Geurts, and J. A. Leunissen. 2007. "Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3." *Nucleic Acids Res* 35(Web Server issue): W71-4.
- URL1. "Health Protection Agency Culture Collections" [accessed on. Available at: [http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=94030304&collection=ecacc\\_gc](http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=94030304&collection=ecacc_gc).
- Valente, L., V. Tiranti, R. M. Marsano, E. Malfatti, E. Fernandez-Vizarra, C. Donnini, P. Mereghetti, L. De Gioia, A. Burlina, C. Castellani, G. P. Comi, S. Savasta, I. Ferrero, and M. Zeviani. 2007. "Infantile encephalopathy and defective mitochondrial DNA translation in patients with mutations of mitochondrial elongation factors EFG1 and EFTu." *Am J Hum Genet* 80(1): 44-58.
- Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman. 2002. "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by

- geometric averaging of multiple internal control genes.” *Genome Biol* 3(7): RESEARCH0034.
- Veal, G. J., J. Errington, C. P. Redfern, A. D. Pearson, and A. V. Boddy. 2002. “Influence of isomerisation on the growth inhibitory effects and cellular activity of 13-cis and all-trans retinoic acid in neuroblastoma cells.” *Biochem Pharmacol* 63(2): 207-15.
- Vega, F. M. and A. J. Ridley. 2008. “Rho GTPases in cancer cell biology.” *FEBS Lett* 582(14): 2093-101.
- Vertuani, S., A. De Geer, V. Levitsky, P. Kogner, R. Kiessling, and J. Levitskaya. 2003. “Retinoids act as multistep modulators of the major histocompatibility class I presentation pathway and sensitize neuroblastomas to cytotoxic lymphocytes.” *Cancer Res* 63(22): 8006-13.
- Veselska, R., K. Zitterbart, J. Auer, and J. Neradil. 2004. “Differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells induced by all-trans retinoic acid is enhanced in combination with caffeic acid.” *Int J Mol Med* 14(2): 305-10.
- Voos, W. 2009. “Mitochondrial protein homeostasis: the cooperative roles of chaperones and proteases.” *Res Microbiol* 160(9): 718-25.
- Wainwright, L. J., A. Lasorella, and A. Iavarone. 2001. “Distinct mechanisms of cell cycle arrest control the decision between differentiation and senescence in human neuroblastoma cells.” *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(16): 9396-400.
- Wang, N., S. Gottesman, M. C. Willingham, M. M. Gottesman, and M. R. Maurizi. 1993. “A human mitochondrial ATP-dependent protease that is highly homologous to bacterial Lon protease.” *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(23): 11247-51.
- Wang, W., P. Osenbroch, R. Skinnes, Y. Esbensen, M. Bjoras, and L. Eide. 2010. “Mitochondrial DNA integrity is essential for mitochondrial maturation during differentiation of neural stem cells.” *Stem Cells* 28(12): 2195-204.
- Weinstein, J. L., H. M. Katzenstein, and S. L. Cohn. 2003. “Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma.” *Oncologist* 8(3): 278-92.
- Wells, S. A., Jr. and M. Santoro. 2009. “Targeting the RET pathway in thyroid cancer.” *Clin Cancer Res* 15(23): 7119-23.
- Wenandy, L., R. B. Sorensen, I. M. Svane, P. Thor Straten, and M. H. Andersen. 2008. “RhoC a new target for therapeutic vaccination against metastatic cancer.” *Cancer Immunol Immunother* 57(12): 1871-8.
- Wood, L. and S. Lowis. 2008. “An update on neuroblastoma.” *Paediatrics and Child Health* 18(3): 123-28.
- Woodgett, J. R. 1990. “Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A.” *EMBO J* 9(8): 2431-8.
- Woodgett, J. R. and P. Cohen. 1984. “Multisite phosphorylation of glycogen synthase. Molecular basis for the substrate specificity of glycogen synthase kinase-3 and casein kinase-II (glycogen synthase kinase-5).” *Biochim Biophys Acta* 788(3): 339-47.
- Wrutniak, C., P. Rochard, F. Casas, A. Fraysse, J. Charrier, and G. Cabello. 1998. “Physiological importance of the T3 mitochondrial pathway.” *Ann N Y Acad Sci* 839: 93-100.
- Xu, X. C. 2007. “Tumor-suppressive activity of retinoic acid receptor-beta in cancer.” *Cancer Lett* 253(1): 14-24.
- Yang, A., N. Walker, R. Bronson, M. Kaghad, M. Oosterwegel, J. Bonnin, C. Vagner, H. Bonnet, P. Dikkes, A. Sharpe, F. McKeon, and D. Caput. 2000. “p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours.” *Nature* 404(6773): 99-103.

- Yang, H., Z. Filipovic, D. Brown, S. N. Breit, and L. T. Vassilev. 2003. "Macrophage inhibitory cytokine-1: a novel biomarker for p53 pathway activation." *Mol Cancer Ther* 2(10): 1023-9.
- Ye, S. and I. N. M. Day. 2003. "Microarrays and Microplates Applications in Biomedical Sciences." Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Ying, M., S. Wang, Y. Sang, P. Sun, B. Lal, C. R. Goodwin, H. Guerrero-Cazares, A. Quinones-Hinojosa, J. Laterra, and S. Xia. 2011. "Regulation of glioblastoma stem cells by retinoic acid: role for Notch pathway inhibition." *Oncogene* 30(31): 3454-67.
- Zapletalova, D., N. Andre, L. Deak, M. Kyr, V. Bajciová, P. Mudry, L. Dubska, R. Demlova, Z. Pavelka, K. Zitterbart, J. Skotakova, K. Husek, A. Martincekova, P. Mazanek, T. Kepak, M. Doubek, L. Kutnikova, D. Valik, and J. Sterba. 2012. "Metronomic Chemotherapy with the COMBAT Regimen in Advanced Pediatric Malignancies: A Multicenter Experience." *Oncology* in press.
- Zhang, Q. and R. D. Salter. 1998. "Distinct patterns of folding and interactions with calnexin and calreticulin in human class I MHC proteins with altered N-glycosylation." *J Immunol* 160(2): 831-7.
- Zhang, X., H. Zhou, S. Song, Z. Qiao, L. Yang, and Y. Hu. 2001. "[The impact of arsenic trioxide or all-trans retinoic acid treatment on coagulopathy in acute promyelocytic leukemia]." *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 40(12): 829-33.
- Zhao, F., T. Wu, A. Lau, T. Jiang, Z. Huang, X. J. Wang, W. Chen, P. K. Wong, and D. D. Zhang. 2009. "Nrf2 promotes neuronal cell differentiation." *Free Radic Biol Med* 47(6): 867-79.
- Zhou, F. Q. and W. D. Snider. 2005. "Cell biology. GSK-3beta and microtubule assembly in axons." *Science* 308(5719): 211-4.
- Zhuang, Y. and L. J. Gudas. 2008. "Overexpression of COUP-TF1 in murine embryonic stem cells reduces retinoic acid-associated growth arrest and increases extraembryonic endoderm gene expression." *Differentiation* 76(7): 760-71.
- Zimber, A., A. Chedeville, J. P. Abita, V. Barbu, and C. Gespach. 2000. "Functional interactions between bile acids, all-trans retinoic acid, and 1,25-dihydroxy-vitamin D3 on monocytic differentiation and myeloblastin gene down-regulation in HL60 and THP-1 human leukemia cells." *Cancer Res* 60(3): 672-8.
- Zimber, A., A. Chedeville, C. Gespach, and J. P. Abita. 1994. "Inhibition of proliferation and induction of monocytic differentiation on HL60 human promyelocytic leukemia cells treated with bile acids in vitro." *Int J Cancer* 59(1): 71-7.
- Zitterbart, K., H. Filkova, L. Tomasikova, E. Necesalova, I. Zambo, D. Kantorova, I. Slamova, V. Vranova, D. Zezulkova, M. Pesakova, Z. Pavelka, R. Veselska, P. Kuglik, and J. Sterba. 2011. "Low-level copy number changes of MYC genes have a prognostic impact in medulloblastoma." *J Neurooncol* 102(1): 25-33.
- Zitterbart, K. and R. Veselska. 2001. "Effect of retinoic acid on the actin cytoskeleton in HL-60 cells." *Neoplasma* 48(6): 456-61.
- Zitterbart, K., I. Zavrelva, J. Kadlecova, R. Spesna, A. Kratochvilova, Z. Pavelka, and J. Sterba. 2007. "p73 expression in medulloblastoma: TAp73/DeltaNp73 transcript detection and possible association of p73alpha/DeltaNp73 immunoreactivity with survival." *Acta Neuropathol* 114(6): 641-50.

## 9 Seznam publikací

### Odborné publikace, vztahující se k tématu disertační práce

**Chlapek, P.**, Redova, M., Zitterbart, K., Hermanova, M., Sterba, J., Veselska, R.: ENHANCEMENT OF ATRA-INDUCED DIFFERENTIATION OF NEUROBLASTOMA CELL LINES WITH LOX/COX INHIBITORS: AN EXPRESSION PROFILING STUDY. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 29, 45, 2010.

Redova, M., **Chlapek, P.**, Loja, T., Zitterbart, K., Hermanova, M., Sterba, J., Veselska, R.: INFLUENCE OF LOX/COX INHIBITORS ON CELL DIFFERENTIATION INDUCED BY ALL-TRANS RETINOIC ACID IN NEUROBLASTOMA CELL LINES. *International Journal of Molecular Medicine* 25, 271-280, 2010.

### Ostatní publikace

Sana, J., Zambo, I., Skoda, J., Neradil, J., **Chlapek, P.**, Hermanova, M., Mudry, P., Vasikova, A., Zitterbart, K., Hampl, A., Sterba, J., Veselska, R.: CD133 EXPRESSION AND IDENTIFICATION OF CD133/NESTIN POSITIVE CELLS IN RHABDOMYOSARCOMAS AND RHABDOMYOSARCOMA CELL LINES. *Analytical Cellular Pathology* 34, 303-318, 2011.

Loja, T., **Chlapek, P.**, Kuglik, P., Pesakova, M., Oltova, A., Cejpek, P., Veselska, R.: CHARACTERIZATION OF A GLIOBLASTOMA CELL LINE SHOWING CD133 POSITIVITY AND BOTH CYTOPLASMIC AND NUCLEAR LOCALIZATION OF NESTIN. *Oncology Reports* 21, 119-128, 2009.

Veselska, R., Hermanova, M., Loja, T., **Chlapek, P.**, Zambo, I., Vesely, K., Zitterbart, K., Sterba, J.: NESTIN EXPRESSION IN OSTEOSARCOMAS AND DERIVATION OF NESTIN/CD133 POSITIVE OSTEOSARCOMA CELL LINES. *BMC Cancer* 8, 300, 2008.

### Konferenční abstrakta

Veselska, R., Zitterbart, K., Nekulova, M., Dobrucka, L., Neradil, J., **Chlapek, P.**, Sterba, J.: Intracellular distribution of N-terminal isoforms of the p73 protein in medulloblastoma cell lines. *International Journal of Molecular Medicine* 28 (Suppl. 1) - the 16th World Congress on Advances in Oncology and the 14th International Symposium on Molecular Medicine, p. S50, 2011.

**Chlapek, P.**, Rádová, M., Neradil, J., Zitterbart, K., Hermanová, M., Štěrbá, J., Veselská, R.: Changes in gene expression in neuroblastoma and medulloblastoma cell lines during induced differentiation by combined treatment with all-trans retinoic acid and LOX/COX inhibitors. *International Journal of Molecular Medicine* 28 (Suppl. 1) - the 16th World

- Congress on Advances in Oncology and the 14th International Symposium on Molecular Medicine, p. S13, 2011.
- Hermanova, M., Zambo, I., Sana, J., Skoda, J., Neradil, J., **Chlapek, P.**, Mudry, P., Vasikova, A., Zitterbart, K., Sterba, J., Veselska, R. Identification of cells with cancer stem cell phenotype in rhabdomyosarcoma. In: Virchows Archive 459 (Suppl 1), p. S316, 2011. 23rd European Congress of Pathology, Helsinki, Finland.
- Zitterbart, K., Dobrucka, L., **Chlapek, P.**, Neradil, J., Skoda, J., Sterba, J., Veselska, R.: N-terminal p73 protein isoforms in medulloblastoma cells and their involvement in retinoic acid-induced differentiation. *Pediatric Blood & Cancer* 57 (5): p. 807, 2011.
- Chlapek, P.**, Rádová, M., Neradil, J., Zitterbart, K., Hermanová, M., Štěřba, J., Veselská, R.: Expresní profily buněčných linií derivovaných z neuroblastomu a medulloblastomu po kombinované aplikaci all-trans retinové kyseliny a LOX/COX inhibitorů. In: Genetická konference GSGM 2011 – Konferenční sborník, p. 78, 2011.
- Chlapek, P.**, Rádová, M., Neradil, J., Zitterbart, K., Hermanová, M., Štěřba, J., Veselská, R.: Changes in gene expression in neuroblastoma and medulloblastoma cell lines during induced differentiation by combined treatment with all-trans retinoic acid and LOX/COX inhibitors. VII. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie. *Onkologie* 5 (Suppl. B): p. B48, 2011.
- Chlapek, P.**, Rádová, M., Neradil, J., Zitterbart, K., Hermanová, M., Štěřba, J., Veselská, R.: Expression profiling of neuroblastoma and medulloblastoma cell lines after combined treatment by all-trans retinoic acid and LOX/COX inhibitors. In: The Student Scientific Conference on Cancer Research – Conference book, p. 74, 2011.
- Dobrucká, L., Neradil, J., **Chlapek, P.**, Štěřba, J., Veselská, R., Zitterbart, K.: Intracellular localization of p73 N-terminal isoforms in medulloblastoma cell lines and differences induced with retinoic acid. In: The Student Scientific Conference on Cancer Research – Conference book, p. 98, 2011.
- Veselska, R., Redova, M., **Chlapek, P.**, Loja, T., Zitterbart, K., Hermanova, M., Sterba, J.: Enhancement of retinoid-induced cell differentiation in cancer therapy. In: *International Journal of Molecular Medicine* 26 (Suppl. 1) - the 15th World Congress on Advances in Oncology and the 13th International Symposium on Molecular Medicine, p. S38, 2010.
- Chlapek, P.**, Redova, M., Zitterbart, K., Hermanova, M., Sterba, J., Veselska, R.: Expression profilig of neuroblastoma and medulloblastoma cell lines after combined treatment by all-trans retinoic acid and LOC/COX inhibitors. In: *International Journal of Molecular Medicine* 26 (Suppl. 1) - the 15th World Congress on Advances in Oncology and the 13th International Symposium on Molecular Medicine, p. S39, 2010.
- Dobrucká, L., Nekulová, M., Neradil, J., **Chlapek, P.**, Štěřba, J., Veselská, R., Zitterbart, K.: Expres N-koncových izoform proteinu p73 v buněčných liniích meduloblastomu. In: XX. konference dětských hematologů a onkologů České a Slovenské republiky – program konference a sborník abstrakt, s. 106, 2010.
- Šána, J., **Chlapek, P.**, Zitterbart, K., Štěřba, J., Veselská, R.: Expres CD133 a nestinu v buněčných liniích derivovaných z rhabdomyosarkomu. In: XXXIV. Brněnské onkologické dny - edukační sborník, pp. 287-289, 2010.
- Redova, M., **Chlapek, P.**, Loja, T., Zitterbart, K., Hermanova, M., Sterba, J., Veselska, R.: LOX/COX inhibitors may potentiate the antineoplastic effect of retinoids: in vitro study

- in neuroblastoma and medulloblastoma cell lines. In: Genes and Cancer - 26th Meeting, p. 75, 2009.
- Chlapek, P.**, Redova, M., Loja, T., Zitterbart, K., Hermanova, M., Sterba, J., Veselska, R.: Expression profiling of neuroblastoma cell lines after combined treatment with all-trans retinoic acid and LOX/COX inhibitors. In: Genes and Cancer - 26th Meeting, p. 42, 2009.
- Veselska, R., Hermanova, M., Sana, J., Loja, T., **Chlapek, P.**, Zambo, I., Vesely, K., Zitterbart, K., Sterba, J.: Cancer stem cell markers in selected childhood tumors of mesenchymal origin. In: International Journal of Mol. Medicine 24 (Suppl. 1) - the 14th World Congress on Advances in Oncology and the 12th International Symposium on Molecular Medicine, p. S37, 2009.
- Redova, M., **Chlapek, P.**, Loja, T., Zitterbart, K., Hermanova, M., Sterba, J., Veselska, R.: LOX/COX inhibitors: possible way to potentiate the antineoplastic effect of retinoids in neuroblastoma and medulloblastoma cell lines. In: International Journal of Molecular Medicine 24, Suppl. 1, p. S33, 2009.
- Redova, M., **Chlapek, P.**, Loja, T., Zitterbart, K., Hermanova, M., Sterba, J., Veselska, R.: Studie možností ovlivnění antineoplastického efektu retinoidů jejich kombinovanou aplikací s LOX/COX inhibitory na modelu neuroblastomových buněčných linií. In XIX. Konference dětských hematologů a onkologů České a Slovenské republiky - zborník abstraktov, s. 69, 2009.
- Veselska, R., Hermanova, M., Loja, T., Šána, J., **Chlapek, P.**, Zambo, I., Vesely, K., Zitterbart, K., Sterba, J.: Identifikace nestin/CD133 pozitivních buněk v solidních nádorech mesenchymálního původu. In: XXXIII. Brněnské onkologické dny - edukační sborník, p. 81, 2009.
- Rédová, M., **Chlapek, P.**, Loja, T., Zitterbart, K., Hermanová, M., Štěrbá, J., Veselská, R.: Možnosti modulace ATRA-indukované diferenciace neuroblastomových a meduloblastomových buněčných linií působením LOX/COX inhibitorů. In XXXIII. Brněnské onkologické dny - edukační sborník, pp. 30-31, 2009.
- Veselska, R., Hermanova, M., Loja, T., **Chlapek, P.**, Zambo, I., Vesely, K., Zitterbart, K., Sterba, J.: The identification of cells with cancer stem cell phenotype in osteosarcomas. In: International Journal of Molecular Medicine 22, Suppl. 1, p. S49, 2008.
- Veselska, R., Redova, M., **Chlapek, P.**, Loja, T., Hermanova, M., Sterba, J., Zitterbart, K.: The influence of LOX/COX inhibitors on the ATRA-induced differentiation in neuroblastoma cell lines. In: International Journal of Molecular Medicine 22, Suppl. 1, p. S55, 2008.
- Veselská, R., Hermanová, M., Loja, T., **Chlapek, P.**, Zambo, I., Veselý, K., Zitterbart, K., Štěrbá, J.: Identifikace markerů nádorových kmenových buněk v osteosarkomech. In: XVIII. konference dětských hematologů a onkologů České a Slovenské republiky, p. 47, Plzeň 2008.
- Veselská, R., Rédová, M., **Chlapek, P.**, Loja, T., Hermanová, M., Zitterbart, K., Štěrbá, J.: Vliv LOX/COX inhibitorů na ATRA-indukovanou diferenciaci na modelu neuroblastomových a meduloblastomových buněčných linií. In: XVIII. konference dětských hematologů a onkologů České a Slovenské republiky, p. 102, Plzeň 2008.
- Loja, T., **Chlapek, P.**, Hermanová, M., Zambo, I., Veselý, K., Zitterbart, K., Štěrbá, J., Veselská, R.: The identification of cells with cancer stem cell phenotype in pediatric



- solid tumors. In: XIX. Biologické dny - Biologický výzkum pro lidské zdraví, p. 49, 2008.
- Rédová, M., **Chlapek, P.**, Loja, T., Zitterbart, K., Hermanová, M., Štěrbá, J., Veselská, R.: Modulation of the antineoplastic effect of retinoids in neuroblastoma and medulloblastoma cell lines. In: XIX. Biologické dny - Biologický výzkum pro lidské zdraví, p. 21, 2008.
- Veselská, R., Hermanová, M., Loja, T., **Chlapek, P.**, Zambo, I., Zitterbart, K., Štěrbá J.: Detekce markerů nádorových kmenových buněk u osteosarkomu. In: Edukační sborník - XXXII. Brněnské onkologické dny, p. 91, Brno 2008.
- Veselská, R., Loja, T., **Chlapek, P.**, Hermanová, M., Zavřelová, I., Zitterbart, K., Štěrbá, J.: Nestin as a biomarker of transformed cells in solid tumors and tumor cell lines. European Biomarker Summit, Amsterdam 2007.
- Veselská, R., Loja, T., **Chlapek, P.**, Hermanová, M., Zavřelová, I., Zitterbart, K., Štěrbá, J.: Expres a intracelulární lokalizace nestinu v solidních nádorech a v nádorových buněčných liniích. In: XVII. konference dětských hematologů a onkologů České a Slovenské republiky, p.115, Špindlerův Mlýn 2007.
- Rédová, M., **Chlapek, P.**, Loja, T., Krupková, O., Zitterbart, K., Štěrbá, J., Veselská, R.: Nově derivované buněčné linie ze solidních nádorů: základní charakterizace a pilotní studie vlivu LOX/COX inhibitorů na proliferativní aktivitu. In: XVII. konference dětských hematologů a onkologů České a Slovenské republiky, pp.121-122, Špindlerův Mlýn 2007.
- Loja, T., **Chlapek, P.**, Zitterbart, K., Veselská, R.: Re-expres nestinu v nádorově transformovaných buňkách: in vitro studie na vybraných typech solidních nádorů. In: II. dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, p. 40, Olomouc 2006.