

## 46 Snížení počtu kopií a změny exprese genu N-myc u chemorezistentních neuroblastomových linií.

Procházka P., Hraběta J., Vícha A., Poljaková J., Eckschlager T.

Klinika dětské hematologie a onkologie UK, 2. LF a FN Motol, Praha

I přes úspěchy pediatrické onkologie zůstává neuroblastom vysokého rizika (HR NBL) jedním z nejhůře léčitelných dětských nádorových onemocnění. Pro diagnostiku HR NBL je nejdůležitějším prognostickým znakem amplifikace onkogenu **N-myc**. Ten je lokalizovaný na krátkém raménku 2. chromozómu v oblasti 2p24 a je složen se ze tří exonů. Jeho produktem je jaderný fosfoprotein s vazebnou afinitou k DNA ovlivňující transkripci a replikaci. Gen N-myc je nezbytný pro vývoj a diferenciaci neuroektodermu. Jeho nadměrná exprese výrazně přispívá k malignímu potenciálu buňky. N-myc amplifikuje v časném stádiu vývoje nádoru a v dalším průběhu onemocnění se amplifikace nemění. Vyskytuje se ve dvou formách: 1/ extrachromozomální acentrické fragmenty (Double minute Chromatin Bodies, dmin); 2/ intrachromozomální, homologně se barvící oblasti (Homogenously Staining Regions, HSRs). Amplifikovaný onkogen N-myc je v neuroblastomových buňkách přítomen zpravidla ve 3-300 kopiích. [1] Přesný počet není z klinického hlediska důležitý, neboť je jednoznačně ověřeno, že nádorové buňky obsahující více než 8 kopií při zachování diploidního stavu chromozómu, jsou vždy agresivní. Změny počtu kopií genu N-myc klasifikujeme do dvou skupin. Gain – zmožení kopií nejvýše o trojnásobek počtu 2. chromozómů. Amplifikace – zmožení o čtyřnásobek a větší oproti kontrolní centromerické proběh na témže chromozómu. Amplifikace N-myc u HR NBL koreluje s agresivním růstem a velmi nepříznivou prognózou bez ohledu na klinické stádium. S tím souvisí snaha o ovlivnění HR NBL novými léky. Jednou z hlavních příčin selhání chemoterapie je vznik rezistence na použítá cytostatika. Zaměřili jsme se na studium N-mycu u buněk HR NBL rezistentních k běžně používaným cytostatikům: doxorubicinu, vinkristinu, cisplatině a látkám, které vykazující protinádorové účinky: BS-RNáze a ellipticin.

**Ellipticin** má více mechanismů účinku, za hlavní je považována interkalace do DNA a tvorba aduktů, inhibice topoizomerázy II, narušení oxidativní fosforylace v mitochondriích, regulace exprese cyklinu B1 a Cdc2 a fosforylace Cdc2. Pro účinnost ellipticinu je nezbytná jeho aktivace oxidativními enzymy (cytochromy P450, cyklooxygenáza, myeloperoxidáza). Mechanismus protinádorového účinku **RNáz** není plně objasněn. Nedávno bylo zjištěno, že indukují autofagii nádorových buněk. [2] Dále se předpokládá inhibice proteosyntézy štěpením tRNA, uplatňuje se i štěpení rRNA, aktivace kaspáz a snížení exprese Bcl-2. Ani mechanismus cytotoxických a antiproliferativních účinků **doxorubicinu** nebyl dosud plně vysvětlen. Doxorubicin je cytostatikum ze skupiny antracyklinů. Jeho hlavním účinkem je interkalace DNA a dále inhibice topoizomerázy-II, což vede k poškození DNA, narušení replikace DNA, DNA-dependentní syntézy RNA a proteosyntézy. Doxorubicin je redukován na volné radikály semichinonu, které reagují s molekulárním kyslíkem za vzniku vysoce reaktivních sloučenin. Další místo působení doxorubicinu je na úrovni buněčné membrány, kde se váže na lipidy a ovlivňuje tak řadu buněčných funkcí. Protinádorový a cytotoxický účinek **vinkristinu** je dán několika mechanismy. Vinkristin interaguje s mikrotubulárním systémem, přičemž dochází ke zničení mikrotubulů a tím všech struktur je obsahující, jako např. dělicí vřeténko. Chromozómy se tak nedostanou do jádra dceřiných buněk. Selektivně inhibuje v nádorových buňkách opravné mechanismy DNA a blokuje účinek DNA-dependentní RNA polymerázy, což inhibuje syntézu RNA. **Cisplatin** je komplexní sloučenina těžkého kovu určená k terapii nádorů. Mechanismus působení platinových derivátů je podobný ostatním alkylačním cytostatikům. tj. poškození DNA a vznik interkalačních vazeb mezi řetězci a vznik aduktů, což zamezuje replikaci. [3] Uvnitř buněk je menší množství iontů chloru než mimo buňky. Proto v tomto prostředí dochází k uvolňování kovalentně vázaného chlórů z cisplatinu a vzniku nukleofilního radikálu. Ten reaguje s purinovými bázemi nukleových kyselin.

Primární i získaná rezistence nádorových buněk k cytostatikům je podmíněna řadou mechanismů. Nejčastěji se jedná o zvýšenou schopnost odstranit cytostatika z buňky (P-glykoprotein – produkt genu MDR1, MRP, LRP) [4-6], detoxifikovat je (glutathion-S-transferáza, metalothioneiny, monooxygenázy) [7, 8], zabránit vzniku apoptózy (zvýšená exprese Bcl-2) [9] nebo zvýšit opravu poškozené DNA (alkylguanin-DNA alkyltransferáza, O6-metylguanin-DNA transferáza) [10]. Jindy jsou v nádorové buňce neaktivní enzymy aktivující cytostatika nebo jsou modifikované cíle cytostatik (topoizomeráza I a II, dihydrofolátreduktáza) [11].

Cílem naší práce bylo pomocí komparativní genomové hybridizace (CGH) [12], umožňující zjistit nově vzniklé amplifikace, zmožení nebo ztráty konkrétních chromozomových oblastí, vyšetřit pět HR NBL buněčných linií s experimentálně navozenou chemorezistencí na BS-RNázu, ellipticin, vinkristin, doxorubicin nebo cisplatinu. Při CGH vyšetření jsme porovnali DNA parentální linie UKF-NB4 s DNA zdravého dobrovolníka a prokázali změny odpovídající HR NBL zahrnující amplifikaci N-myc (2p24), zmožení 17q a delecii 1p32.2-ter. Dále jsme porovnali DNA parentální linie s DNA rezistentních linií ke zjištění zmožení nebo ztráty DNA. Pomocí CGH jsme prokázali ztrátu 2p24 u všech pěti rezistentních linií odpovídající snížení počtu kopií amplifikovaného N-myc.

Tento úbytek kopií N-myc genu jsme ověřili metodou FISH, kterou bylo možné stanovit přesný počet kopií v každé buňce. Počet nadbytečných kopií byl počítán jako počet kopií N-myc snížený o počet centromer druhého chromozómu. Buňky parentální linie UKF-NB4 mají průměrně 62 kopií. U linie rezistentní k ellipticinu byl počet kopií snížen na 38 kopií, u linie rezistentní k BS-RNáze a k vinkristinu na 44 kopií, k doxorubicinu na 43 kopií a k cisplatině na 45 kopií. Rozdíly mezi počtem kopií v paren-

**MONITOROVÁNÍ A PREDIKCE V ONKOLOGII**

tální linii a v jednotlivých rezistentních liniích byly statisticky významné (t-test,  $p < 0,05$ ). Výsledek je zajímavý tím, že v průběhu léčby se nepopisují významné změny počtu kopií. Ale v našem experimentu u rezistentních linií, připravených kultivací v mediu s přidavkem protinádorové látky, se počet kopií snížil.

Metodou RT PCR v reálném čase jsme zjišťovali expresi mRNA N-myc. Parentální linie má ve srovnání se vzorkem leukocytů periferní krve zdravého dobrovolníka expresi o více než 3 řády vyšší. Všech pět rezistentních linií UKF-NB4 ve srovnání s parentální linií exprimovalo mRNA N-myc přibližně o jeden řád méně. Mezi počtem kopií genu a jeho expresí byla zjištěna korelace.

Nejasný zatím zůstává význam poklesu počtu kopií genu N-myc a snížení jeho exprese u chemorezistentních linií. Jednou z možností je význam při vzniku chemorezistence, kdy nižší amplifikace umožňuje být buňce rezistentní. Jinou možností by byla zvýšená citlivost vysoce amplifikujících buněk na cytostatika v důsledku, kterého se amplifikace u buněk nemění, ale snižuje se množství buněk s vysokou amplifikací.

*Práce vznikla za finanční podpory MŠMT, IGA a GAUK.*

*Literatura*

1. Vícha, A. and T. Eckschlager, Molekulární biologie neuroblastomu. *Klin. Onkol.*, 2005. 18(5): p. 159-165.
2. Michaelis, M., J. Cinatl, P. Anand, et al., Onconase induces caspase-independent cell death in chemoresistant neuroblastoma cells. *Cancer Lett*, 2006.
3. Adam, V., J. Petřelová, R. Mikelová, et al., Elektrochemické studium tvorby aduktu s nukleovými kyselinami. *Čas Lék Česk*, 2006. 145(3): p. 225-225.
4. Ambudkar, S.V., Z.E. Sauna, M.M. Gottesman, et al., A novel way to spread drug resistance in tumor cells: functional intercellular transfer of P-glycoprotein (ABCB1). *Trends Pharmacol Sci*, 2005. 26(8): p. 385-7.
5. Noskova, V., M. Hajdich, V. Mihal, et al., Mechanizmy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi. *Klin. Onkol.*, 2000. 2: p. 4-14.
6. Fukushima, K., Y. Okai, S. Matsuura, et al., Molecular cloning of feline lung resistance-related protein (LRP) cDNA and its expression in a feline lymphoma cell line and adriamycin-resistant subline. *J Vet Med Sci*, 2006. 68(8): p. 885-90.
7. Depeille, P., P. Cuq, S. Mary, et al., Glutathione S-transferase M1 and multidrug resistance protein 1 act in synergy to protect melanoma cells from vincristine effects. *Mol Pharmacol*, 2004. 65(4): p. 897-905.
8. Hraběta, J., K. Figová, T. Eckschlager, et al., Obsah metalothioneinu v buňkách neuroblastomu ve vztahu k rezistenci vůči platinovým cytostatikům. *Zborník abstraktov XVI. konferencie detských hematológov a onkológov SR a ČR.*, 2006 (ISBN 80-89057-14-4): p. 90.
9. Chun, E. and K.Y. Lee, Bcl-2 and Bcl-xL are important for the induction of paclitaxel resistance in human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 315(3): p. 771-9.
10. Kodydkova, K. and J. Krejsek, [Resistance of cells in hematopoietic malignancies to cytostatic agents. Part 1]. *Cas Lek Cesk*, 2000. 139(18): p. 553-6.
11. Rasheed, Z.A. and E.H. Rubin, Mechanisms of resistance to topoisomerase I-targeting drugs. *Oncogene*, 2003. 22(47): p. 7296-304.
12. Vícha, A. and T. Eckschlager, Metody molekulárně cytogenetického vyšetření v klinické onkologii. *Prakt.Lék.*, 2005. 85: p. 387-390.