

## Genetické změny high-risk neuroblastomové buněčné linie vyvolané kultivací s ellipticinem.

Procházková P.<sup>1</sup>, Poljaková J.2, Vícha A.<sup>1</sup>, Hraběta J.<sup>1</sup>, Stiborová M.<sup>2</sup>, Eckschlager T.<sup>1</sup>

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

2) *Katedra biochemie PŘF UK, Praha*

### Úvod

Neuroblastom vysokého rizika (HR NBL) zůstává jedním z nejhůře léčitelných dětských nádorových onemocnění. HR NBL je charakteristický 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 použitá cytostatika. Zaměřili jsme se na studium buněk HR NBL rezistentního na ne zcela běžně používanému cytostatikumu: ellipticin.

Ellipticin (5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]karbazol), rostlinný alkaloid s planární strukturou, byl poprvé izolován v roce 1959 z listů stromu *Ochrosia elliptica* čeledi *Apocyanaceae*. Od 70. let byly polárnější deriváty 9-methoxyellipticin a 2-methyl-9-hydroxyellipticin ve formě acetátu (NMHE) využívány k léčbě pokročilého karcinomu prsu s kostními metastázemi, akutní myeloblastické leukemie a karcinomu štítné žlázy [1,2]. Protinádorová aktivita ellipticinu a jeho derivátů je popsána [3] a v současné době je zkoumáno i použití ellipticinů při inhibici retrovirové integrázy při léčbě AIDS [4].

Za hlavní cytotoxický a protinádorový účinek ellipticinu a jeho derivátů je považována interkalace do DNA [5] a/nebo inhibice topoizomerázy II. [6]. Ellipticin a 9-hydroxyellipticin také selektivně inhibují fosforylaci proteinu p53 v několika lidských nádorových buněčných liniích [7]. Ellipticiny rovněž odpřahují oxidativní fosforylaci v mitochondriích [8], a tím narušují energetickou rovnováhu buněk. Bylo také popsáno, že ellipticin zabraňuje proliferaci buněk regulací exprese cyklinu B1 a Cdc2, stejně tak jako fosforylaci Cdc2 [9,10]. Zajímavá je také studie prováděná Haagem a spolupracovníky [11], z jejichž výsledků vyplývá, že ellipticinem zprostředkovaná apoptóza je indukovaná stresem endoplasmatického retikula.

Velmi důležitým aspektem pozorovaným při léčbě ellipticiny byla individuální variabilita v odpovědi pacientů na podané léčivo. Jedním z vysvětlení specifity chemoterapeutického účinku i selektivní odpovědi na podané léčivo může být rozdílná enzymová výbava lidského organismu enzymy, důležitými pro biotransformaci ellipticinu (cytochromy P450, cyklooxygenáza, myeloperoxidáza) [12] Tyto enzymy aktivují léčivo na terapeuticky účinnější derivát, který nádorové buňky poškozuje efektivněji, popřípadě vede až k jejich likvidaci [12].

### Výsledky

Lidská neuroblastomová linie UKF-NB-4 rezistentní na ellipticin (UKF-NB-4 ELLI) byla získána dlouhodobým kultivováním buněk linie UKF-NB-4 (linie získaná z relapsu vysoce rizikového neuroblastomu do kostní dřevě) v Iscove's modified Dulbecco's mediu doplněného 0,3 % w/v hydrogenuhličitanem sodným, 4 mM L-glutaminem, 10 % fetálním hovězím sérem (FBS) a 100 U/ml penicilinem a 100 µg/ml streptomycinem při 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> a 95 % vlhkosti vzduchu se zvyšující se koncentrací ellipticinu. „Pasážování“ buněk probíhalo podle potřeby, většinou v pětidenních intervalech. Počáteční koncentrace ellipticinu, které byly buňky vystaveny byla 1 µM (zásobní roztok 10 mM v DMSO). Finálně jsou buňky kultivovány s ellipticinem o koncentraci 2,5 µM. Viabilita buněk byla testována pomocí MTT testu, ve kterém živé buňky metabolizují 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 difenyltetrazolium bromid (MTT) na barevný produkt formazan. Po rozpuštění sraženiny formazanu byla měřena absorbance při vlnové délce 570 nm čtečkou mikrodestiček VERSA max a vyhodnocena softwarovým programem SOFT max PRO. Vynesením naměřených hodnot do grafu byly určeny IC<sub>50</sub>. IC<sub>50</sub> ve čtyřdenním MTT testu linie UKF-NB-4 byla 1,0 µM a linie UKF-NB-4 ELLI byla 2,8 µM.

Pomocí komparativní genomové hybridizace (CGH) [13] jsme vyšetřili HR NBL buněčnou linii UKF-NB-4 ELLI. Při CGH vyšetření jsme porovnali DNA parentální linie UKF-NB-4 s DNA zdravého dobrovolníka a prokázali změny odpovídající HR NBL zahrnující amplifikaci MYCN (2p24), zmnožení 17q a delecii 1p32.2-ter. Dále jsme porovnali DNA parentální linie s DNA rezistentní linie na ellipticin ke zjištění nových zmnožení nebo ztrát DNA u této rezistentní linie. Možné změny chromozómových oblastí jsme ověřovali metodou FISH, která nám umožňuje, při použití specifické sondy, zjistit přesný počet konkrétních genů a chromozómů. Linie UKF-NB-4 a UKF-NB-4 ELLI jsou obě triploidní.

U linie UKF-NB-4 ELLI jsme potvrdili na 1. chromozómu přetrvávající ztrátu v oblasti 1p32.2-ter, na 2. chromozómu amplifikaci onkogenu MYCN a tetrazomii 1. a 2. chromozómu. Zajímavá změna proběhla na 7. chromozómu. Parentální linie má trizomii 7. chromozómu se zmnožením oblasti 7q21 odpovídající lokalizací genů multidrug resistance 1 (gen MDR1, jehož produktem je P-glykoprotein) a cytochrom P450 3A4. U rezistentní linie došlo ke ztrátě zmnožených kopií a počet kopií genů nyní odpovídá trizomii 7. chromozómu. Další cytochromy P450, CYP1A1 a CYP1B1 lokalizované v oblasti 15q22-24 respektive 2p21 si zachovávají zmnožení shodné s parentální linií. Jedním z literárně uvedených mechanismů rezistence je eliminace aktivity enzymu topoizomerázy II alfa (TOP2A). Parentální linie má gen pro TOP2A, nacházející se v oblasti 17q21-22, zmnožený, rezistentní linie zmnožení ztrácí a počet kopií odpovídá trizomii 17. chromozómu. Dalším popsáním mechanismem mnohočetné lékové rezistence je zvýšená exprese „lung resistance-related protein“ (LRP), který je lokalizován v oblasti 12q13-14. Metodou CGH a následně FISH jsme potvrdili ztrátu oblasti 12q12-21.1. Jedním z enzymů aktivujících ellipticin je myeloperoxidáza (MPO) nacházející se v oblasti 17q23.1. Oproti parentální linii došlo ke ztrátě jedné kopie genu MPO, ale i přesto si rezistentní linie zachovává zmnožení. Dalším mechanismem lékové rezistence je zvýšená exprese Bcl-2, zabraňující vzniku apoptózy. Rezistentní linie má oblast 18q21.3, s lokalizací genu Bcl-2, zmnoženou.

### Diskuze a závěry

Z našich výsledků vyplývá, že rezistence na použité cytostatikum je jev složitý, spojený s mnohočetnými změnami chromozómů a podmíněný řadou mechanismů, které mohou, ale také nemusejí korelovat se změnami na chromozómech. Oblasti chromozómů, kde jsou lokalizovány geny MDR1 (7q21), MRP1 (16p13), LRP1 (12q13-14) bývá u chemorezistentních nádorů zmnožená nebo amplifikovaná. Linie UKF-NB-4 ELLI žádné takové změny nemá. U linie UKF-NB-4 rezistentní na doxorubicin (UKF-NB-4 DOXO), která má gen MDR1 amplifikovaný, byla průtokovým cytometrem potvrzena vysoká exprese P-glykoproteinu (P-gp). U linie UKF-NB-4 ELLI nebyla exprese P-gp prokázána. Z těchto skutečností vyplývá, že ač je mechanismus působení doxorubicinu a ellipticinu na buňky podobný (interkalace DNA), ellipticin není přes P-gp vypuzován, a tudíž mechanismus chemorezistence je u UKF-NB-4 ELLI a UKF-NB-4 DOXO rozdílný. Jedinou změnou, která odpovídá popsáním mechanismům je zmnožení genu Bcl-2, což pravděpodobně vyvolává zvýšenou expresi Bcl-2 na úrovni mRNA a proteinu zabraňující buňce vstoupit do apoptózy. Pro podrobnější posouzení vlivu zmnožení nebo ztrát chromozómových oblastí na vznik chemorezistence je nutné posoudit nejenom změny DNA ale zaměřit se i na změny exprese mRNA a proteinu.

### Literatura

1. Klener P: Protinádorová chemoterapie. Praha: Galén 1996.
2. Acton EM, Narayanan VL, Risbood PA, Shoemaker RH, Vistica DT, Boyd MR: Anticancer specificity of some ellipticin salts against human brain tumors in vitro. *J Med Chem* 1994, 37:2185-2189.
3. Kuo YC, Kuo PL, Hsu YL, Cho CY, Lin CC: Ellipticine induces apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Life Sci* 2006, 78:2550-2557.
4. Mathe G, Morette C, Hallard M, Pontiggia P, Blanquet D, Hage F: Viral and immunologic follow up of 4 to 9 years of AIDS treatments by quadruple combinations of virostatics including integrase inhibitors applied in short sequences differing by drug rotation. *Acta Pharmacol Sin* 2002, 23:1-15.
5. Chu Y, Hsu MT: Ellipticine increases the superhelical density of intracellular SV40 DNA by intercalation. *Nucleic Acids Res* 1992, 20:4033-4038.
6. Froelich-Ammon SJ, Patchan MW, Osheroff N, Thompson RB: Topoisomerase II binds to ellipticine in the absence or presence of DNA. Characterization of enzyme-drug interactions by fluorescence spectroscopy. *J Biol Chem* 1995, 270:14998-15004.
7. Ohashi M, Sugikawa E, Nakanishi N: Inhibition of p53 protein phosphorylation by 9-hydroxyellipticine: a possible anticancer mechanism. *Jpn J Cancer Res* 1995, 86:819-827.
8. Schwaller MA, Allard B, Lescot E, Moreau F: Protonophoric activity of ellipticine and isomers across the energy-transducing membrane of mitochondria. *J Biol Chem* 1995, 270:22709-22713.
9. Kuo PL, Hsu YL, Chang CH, Lin CC: The mechanism of ellipticine-induced apoptosis and cell cycle arrest in human breast MCF-7 cancer cells. *Cancer Lett* 2005, 223:293-301.
10. Kuo PL, Hsu YL, Kuo YC, Chang CH, Lin CC: The anti-proliferative inhibition of ellipticine in human breast mda-mb-231 cancer cells is through cell cycle arrest and apoptosis induction. *Anticancer Drugs* 2005, 16:789-795.
11. Hagg M, Berndtsson M, Mandic A, Zhou R, Shoshan MC, Linder S: Induction of endoplasmic reticulum stress by ellipticine plant alkaloids. *Mol Cancer Ther* 2004, 3:489-497.

12. Stiborova M, Bieler CA, Wiessler M, Frei E: The anticancer agent ellipticine on activation by cytochrome P450 forms covalent DNA adducts. *Biochem Pharmacol* 2001, 62:1675-1684.
13. Vícha A, Eckschlager T: Metody molekulárně cytogenetického vyšetření v klinické onkologii. *Prakt. Léč.* 2005, 85:387-390.
14. Rasheed ZA, Rubin EH: Mechanisms of resistance to topoisomerase I-targeting drugs. *Oncogene* 2003, 22:7296-7304.
15. Guan J, Chen XP, Zhu H, Luo SF, Cao B, Ding L: Involvement of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway in multidrug resistance induced by HBx in hepatoma cell line. *World J Gastroenterol* 2004, 10:3522-3527.
16. Chun E, Lee KY: Bcl-2 and Bcl-xL are important for the induction of paclitaxel resistance in human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 315:771-779.

*Práce vznikla za finanční podpory MŠMT VZ č. 0021620813 a GAUK 7926/2007.*