

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

# **Možnosti targetingu v oblasti nádorové imunoterapie**

Bakalářská práce

**Daniela Stachová**

Vedoucí práce: RNDr. Jan Ženka, CSc.

České Budějovice, 2017

Stachová, D., 2017: Možnosti targetingu v oblasti nádorové imunoterapie. [ The possibilities for targeting in tumor immunotherapy. Bc. Thesis, in Czech.] – 48 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

The aim of this thesis was to study the possibilities for targeting in tumor immunotherapy. We studied the expression of phosphatidylserine in melanoma B16-F10 *in vivo* and in cell culture B16-F10 *in vitro*. We analyzed conditions resulting in higher expression of phosphatidylserine on tumor cells surface.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 18. 3. 2017

.....  
Daniela Stachová

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli panu RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za jeho velkou trpělivost, ochotu a poskytování cenných rad pro vypracování této bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Veronice Caisové za pomoc s průtokovým cytometrem a se zpracováním výsledků.

V neposlední řadě patří poděkování mé rodině za velkou podporu při studiu.

## Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>1</b>
1.1. Nádorová onemocnění .....	1
1.2. Klasifikace nádorů .....	1
1.3. Léčba.....	2
1.3.1. Chirurgické odstranění nádoru .....	2
1.3.2. Radioterapie.....	2
1.3.3. Chemoterapie.....	2
1.3.4. Imunoterapie .....	3
1.3.5. Hormonální terapie .....	3
1.3.6. Cílená (targetová) terapie nádorů .....	3
1.4. Možnosti cílené terapie .....	4
1.4.1. Monoklonální protilátky (mAbs).....	4
1.4.1.1. Farmakologické mechanismy monoklonálních protilátek .....	5
1.4.2. Tyrosinkinázy .....	6
1.4.2.1. Struktura a funkce tyrosinkinázových receptorů.....	7
1.4.2.2. Nízkomolekulární inhibitory tyrosinkinázových receptorů .....	7
1.4.2.3. Přehled významných inhibitorů tyrosinkinázových receptorů.....	8
1.4.3. Inhibice sebeobnovy .....	9
1.4.4. Inhibice signálních kaskád ovlivňujících regulaci sebeobnovy .....	10
1.4.4.1. Signální dráha Wnt.....	10
1.4.4.2. Signální dráha Notch.....	10
1.4.4.3. Signální dráha Hedgehog (HH).....	11
1.4.4.4. Signální dráha TGF-β.....	11
1.4.5. Apoptóza.....	12
1.4.5.1. Defekty apoptózy a rakovina.....	12
1.4.5.2. Molekulární cílená terapie a apoptóza .....	13
1.4.6. Inhibice angiogeneze .....	13
1.5. Pasivní targeting .....	14
1.5.1. Pasivní targeting - EPR efekt (Efekt zvýšené permeability a retence).....	14
1.5.1.1. Zvýšená permeabilita .....	14
1.5.1.2. Zvýšená retence.....	15
1.5.1.3. Faktory ovlivňující EPR efekt.....	15

1.5.1.4. Blokace VEGF-R2 .....	15
1.6. Aktivní targeting .....	15
1.7. Fosfatidylserin (PS) .....	16
<b>2. Cíle práce.....</b>	<b>19</b>
<b>3. Materiál, metody.....</b>	<b>20</b>
3.1. Chemikálie .....	20
3.2. Laboratorní zvířata.....	20
3.3. Příprava nádorových buněk B16-F10 pro <i>in vivo</i> a <i>in vitro</i> pokusy .....	20
3.4. Transplantace nádorových buněk B16-F10 .....	21
3.5. Měření velikosti nádorů .....	21
3.6. Analýza dat .....	21
<b>4. Experimenty .....</b>	<b>22</b>
4.1. Studium otázky exprese fosfatidylserinu na povrchu nádorových buněk pomocí průtokové cytometrie .....	22
4.1.1. Porovnání míry exprese fosfatidylserinu ve středu a okraji nádoru a porovnání vhodnosti značení mrtvých/umírajících buněk pomocí propidium jodidu nebo kaspazy-3 v tomto typu analýzy .....	22
4.1.2. Vliv působení peroxidu vodíku na expresi fosfatidylserinu u nádorových buněk B16-F10.....	23
<b>5. Výsledky .....</b>	<b>26</b>
5.1. Studium otázky exprese fosfatidylserinu na povrchu nádorových buněk pomocí průtokové cytometrie .....	26
5.1.1. Porovnání míry exprese fosfatidylserinu ve středu a okraji nádoru .....	26
5.1.1.1. Porovnání vhodnosti značení mrtvých/umírajících buněk pomocí propidium jodidu nebo kaspazy-3 v analýze exprese PS .....	32
5.1.2. Porovnání míry exprese fosfatidylserinu u nádorových buněk B16F10 v závislosti na působení peroxidu vodíku .....	32
<b>6. Diskuze.....</b>	<b>34</b>
<b>7. Závěrečné shrnutí.....</b>	<b>36</b>
<b>8. Literatura .....</b>	<b>37</b>

# 1. Úvod

## 1.1. Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění jsou skupinou různorodých chorob, které mohou vzniknout z mnoha různých tkání.

Pro nádorové buňky je typické, že rostou neregulovaně, stimulují vlastní růst a neomezené dělení. Dochází k tomu proto, že tyto buňky nejsou schopny reagovat na chemické signály, inhibující buněčné dělení. Na rozdíl od jiných zdravých buněk, nádorové buňky nepřecházejí do stavu programované buněčné smrti – apoptózy, a nejsou tedy následně fagocytovány. Mají zmutované geny, podílející se na buněčném cyklu a jeho řízení (tzv. onkogeny).

Nádorová onemocnění se rozlišují na dva základní typy. Buňky benigního nádoru nenapadají tkáň v okolí. Naproti tomu jsou buňky maligního nádoru schopné se uvolňovat a následně napadat další okolní tkáň. Tím vytváří sekundární nádory, metastazují (Snustad a Simmons, 2009).

Nejstarší nálezy lidských nádorů jsou odhadovány na stáří 1,7 milionů let. Vyskytly se v kostech jihoafrických hominidů (skupina zahrnující lidi a lidoopy) z jižní Afriky (Odes a kol., 2016, Saber a kol., 2016).

Podle údajů z Eurostatu z roku 2012 jsou nádorová onemocnění nejčastější příčinou úmrtí v Evropské unii. Během posledních let byl zaznamenán velký pokrok ohledně diagnostiky a léčby těchto onemocnění. Přesto ale není veškerá terapie vždy účinná.

## 1.2. Klasifikace nádorů

Rakovina je klasifikována dle tkáně a typu buněk, ze kterých roste. Např. karcinom roste z epiteliálních buněk, sarkom z pojivové nebo svalové tkáně. Leukémie vychází z hematopoetických buněk. V neposlední řadě existují nádory odvozené od nervového systému. Nejčastějšími typy nádorů (kolem 90 %) jsou karcinomy. Je to proto, že v epiteliálních buňkách nejčastěji dochází k ovlivnění různými chemickými či fyzikálními vlivy, které způsobují rakovinu (Alberts, 2002).

## **1.3. Léčba**

### **1.3.1. Chirurgické odstranění nádoru**

Metoda chirurgického odstranění nádoru patří mezi nejstarší metody léčby (Eedy, 2003). Ještě ve dvacátých letech 20. století to byl jediný známý způsob léčby nádorů (Klener, 2013). Řadí se mezi metody komplexní terapie a zahrnuje několik typů. Jeden z nich je radikální typ operace, kdy je nádor kompletně odstraněn tak, aby v těle pacienta nezůstaly zbytky nádorové tkáně. Paliativní typ může být definitivním nebo jen dočasným řešením léčby. Při diagnostických operacích je získána tkáň pro biopsii. Mezi další typy se řadí rekonstrukční a preventivní operace. Za pomoci chirurgie se dají odstranit i některé metastázy (Koutecký, 1997).

### **1.3.2. Radioterapie**

Při radioterapii působí na nádor tok fotonů nebo elektronů, čímž dochází k zničení nádoru (Strojan, 2010). Problém radioterapie spočívá v působení záření nejen na nádorovou, ale také na zdravou tkáň, čímž vznikají sekundární zhoubné nádory (Bostrom a a Soloway, 2007). Proto se tato metoda často využívá v kombinaci s chirurgií nebo chemoterapií (Strojan, 2010). V posledních letech dochází k rychlému rozvoji protonové terapie, založené na použití protonů urychlených pomocí cyklotronu nebo sychrocyklotronu. Vedlejší účinky této terapie jsou nižší (Kubeš, 2013).

### **1.3.3. Chemoterapie**

Mezi další významné léčebné metody se řadí chemoterapie. Začala se používat ve čtyřicátých letech 20. století a v šedesátých letech patřila mezi hlavní léčebné metody (Klener, 2013). I přes veškerý pokrok této metody existuje řada omezení, především kvůli toxicitě chemoterapeutik. Momentálně je chemoterapie poskytována např. intraperitoneálně, tepennou infuzí a dalšími způsoby (Martins, 2009).

Problém chemoterapie spočívá ve správném zacílení léku. Chemoterapeutika totiž působí jak na dělicí se nádorové, tak i na zdravé buňky. Jak radioterapie, tak chemoterapie jsou využívány v závislosti na typu léčby – předoperační, pooperační a souběžné. Spojení odlišných typů léčby má v některých případech vyšší účinek. Nádor je tak méně odolný, než v případě, kdy se použije jeden samostatný léčebný postup. Komplexní léčebný přístup je tedy výhodnější.

Chemoterapeutika mají specifický účinek na některou z částí buněčného cyklu, nebo mohou ovlivnit celý buněčný cyklus (Baudino, 2015).

Chemoterapie působí proti mnoha malignitám, ale má také vedlejší účinky, jako je např. alopecie (vypadávání vlasů) nebo myelosuprese (Gerber, 2008).

#### **1.3.4. Imunoterapie**

Mezi další možnosti léčby patří imunoterapie. Tato metoda vznikla v průběhu sedmdesátých let minulého století. Imunoterapie využívá protinádorovou imunitu. Imunitní mechanismy se také dají využít k tomu, aby směřovaly léčiva cíleně do místa výskytu nádoru. Imunoterapie je často používána spolu s dalšími možnostmi léčby. Výhoda imunoterapie spočívá ve vysoce selektivním ničení nádorových buněk. Mnoho postupů, založených na imunoterapii, je prováděno v rámci klinických studií (Klener, 2013, Hořejší, 2013).

#### **1.3.5. Hormonální terapie**

Na vzniku a růstu některých nádorů se mohou podílet také steroidní hormony. V roce 1836 vznikly první domněnky v souvislosti menstruačního cyklu a růstem karcinomu prsu. Později se zjistilo, že některé hormony ovlivňují např. růst karcinomu štítné žlázy. Hormonální terapie pokročila především díky objevům v molekulární biologii. Kombinace hormonální léčby s chemoterapeutickou léčbou může výrazně zvýšit šanci na uzdravení (Klener, 2013).

#### **1.3.6. Cílená (targetová) terapie nádorů**

Cílená terapie představuje v posledním desetiletí výrazný pokrok v léčbě a mění mnoho onkologických postupů. Nevykazuje tolik hematologické toxicity jako tradiční chemoterapie. Může se využít proti mnoha typům rakoviny, jako je např. rakovina plic, slinivky břišní nebo leukémie (Gerber, 2008). Zvyšuje remisi a pomáhá zvýšit celkovou dobu života. Také má kladný vliv na účinky cytostatik. Nepoškozuje ovšem DNA a nesnižuje množství nádorové masy (Mladosičová, 2014).

V rámci této terapie se využívají léky, které inhibují růst, zvyšují buněčnou smrt a inhibují šíření nádoru (Baudino, 2015). Působí na tzv. „molekulové cíle“, pro které je typická např. jejich zvýšená exprese či mimořádné kvalitativní odlišnosti od zdravé tkáně (Mladosičová, 2014).



Při léčbě je nutný individuální přístup. Cílená terapie totiž může být efektivní u pacienta, který má dané molekulové cíle. Zatímco u pacienta, který konkrétní molekulové cíle nemá, určitá terapie nebude fungovat. Na tomto rozdílu má podíl mnoho faktorů, především pohlaví, etnicita a histologie nádoru (Gerber, 2008).

Tato terapie se neuplatňuje na široký nádorový základ, ale na konkrétní molekulární změny, specifické pro danou rakovinu. Mnoho cílených terapií je ve fázi preklinických a klinických studií (Baudino, 2015).

Mezi významný problém cílené terapie patří obrovský počet možných molekulových cílů, které jsou často uspořádané v komplikovaných a málo prozkoumaných strukturách. Dané cíle také musí být ovlivněné ve správnou dobu. Cílená protinádorová látka je totiž schopna působit na nádor různými účinky v odlišných fázích nádoru. Za pomoci této terapie se pacient může úplně vyléčit, mít prodlouženou dobu života, nebo je možné nádor stabilizovat a snížit symptomy onemocnění. Také ale může dojít i k navození toxicity různého stupně.

Cílená léčba se prolíná s mnoha celulárními procesy, mezi které se řadí např. inhibice sebeobnovy, zabránění neovaskularizace nádorů, indukce apoptózy, inhibice invazivity a metastazování či aktivace imunitního systému ke zničení nádoru (Mladosičová, 2014). Nevýhodou jsou možné vedlejší účinky, jako např. srdeční dysfunkce, trombóza, hypertenze atd. (Gerber, 2008).

## **1.4. Možnosti cílené terapie**

Cílená terapie působí jak na nádor samotný, tak i na metastázy. (Baudino, 2015). Mezi nejvýznamnější typy této terapie patří monoklonální protilátky, nízkomolekulární inhibitory kináz, blokátory angiogeneze, inhibitory proteazomu, interferony a interleukiny.

### **1.4.1. Monoklonální protilátky (mAbs)**

Vývoj monoklonálních protilátek během posledních 20 let významně pokročil, především díky výraznému pokroku biotechnologií. První mAbs se vyráběly imunizací myši cílovými antigeny. Vzniklé myší mAbs byly ovšem vysoce antigenní pro lidi. Pacienti léčení těmito protilátkami často vytvářeli protilátky proti myším imunoglobulinům, což mohlo neutralizovat efekt terapeutika (Gerber, 2008). Proto se dále vyvinuly různé typy protilátek, obsahující odlišný poměr myších a lidských komponent. Tyto protilátky se dělí na

chimérické (-ximab, humánní z 65 %), humanizované (-zumab, humánní z 95 %) a plně humánní (-mumab, humánní ze 100 %) (Carter, 2001).

Humanizované protilátky jsou bezpečnější a účinnější, dále je pro ně typické velmi nízké nebezpečí reakcí vztahujících se k alergii. Schopnost léčby pomocí monoklonálních protilátek je ovlivněna existencí a formou daných receptorů (v případě nefunkčnosti receptorů není protilátka schopná správně působit na nádor). U velkých protilátkových molekul nastává problém v případě průniku přes hematoencefalickou bariéru. (Mladosičová, 2014).

Pro monoklonální protilátky je typická molekulová hmotnost kolem 150 000 Da. Ovlivňují především extracelulární komponenty a receptor vazující domény. Protein těchto protilátek je rozkládán v gastrointestinálním traktu, proto musí být podávány intravenózně (Gerber, 2008).

#### **1.4.1.1. Farmakologické mechanismy monoklonálních protilátek**

Terapeutický efekt mAb je ovlivněn typem cíle v nádorovém růstu. Terapeutické odpovědi jsou umožněny Fab nebo Fc fragmenty protilátek. Mezi hlavní farmakodynamické mechanismy mAbs v onkologii se řadí inhibice buněčné signalizace, ADCC (na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita), ADCP (na protilátkách závislá buněčná fagocytóza), CDC (na komplementu závislá cytotoxicita) a využití imunokonjugátů.

- Inhibice buněčné signalizace

MAbs mají různé účinky na buněčné signální dráhy. Jedním z možných účinků je neutralizace rozpustných signálních faktorů (př. VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor, HGF - růstový faktor hepatocytů). Dalším účinkem je vazba na povrchové buněčné receptory a jejich následná blokace. Také může dojít ke snížení exprese povrchových buněčných receptorů (Glassman a Balthasar, 2014). K inhibici buněčné signalizace není většinou potřeba Fc dependentních efektorových mechanismů (Fan a kol., 1993).

- ADCC (na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita)

Při ADCC je monoklonální protilátka navázána na buňku nádoru, tím je nádorová buňka označena. Následně je rozpoznána zabíječskými buňkami – killer cells, ze které do nádorové buňky proniknou toxické látky a dojde k apoptóze – regulované buněčné smrti. Tento děj se nazývá ADCC (Mladosičová, 2014, Klener, 2013).

- ADCP (na protilátkách závislá buněčná fagocytóza)

Navázání protilátky stimuluje fagocytózu označených buněk. Hlavní roli v těchto procesech hrají makrofágy (Gul a van Egmond, 2015).

- CDC (na komplementu závislá cytotoxicita)

Průběh CDC probíhá následovně: protilátka se naváže na povrch cílových buněk. Fc doména protilátky se pak může vázat na rozpustný C1q (C1q je součástí proteinu C1 (Hořejší, 2013)), což vede stimulaci komplementárních drah a nakonec ke smrti buněk

- Imunokonjugáty

Imunokonjugáty jsou konjugáty účinných cytotoxických látek s protilátkami. Rozeznáváme tři typy: ADCs, imunotoxiny a radioimunotoxiny. (Glassman a Balthasar, 2014). Všechny 3 typy slouží k tomu, aby byl toxin dodán do nádorové buňky, a aby byla zajištěna vysoká účinnost léku spolu s nízkou toxicitou (Gerber a kol., 2013, Lin a Tibbitts, 2012).

ADCs využívají různé typy nízkomolekulárních chemoterapeutik jako toxických činidel. Jedná se o chemoterapeutika, která v nekonjugované formě vykazují nepříjemné farmakokinetické či toxické vlastnosti.

Imunotoxiny využívají velmi silné bakteriální a rostlinné toxiny proti nádorovým buňkám. V klinickém vývoji je imunotoxin anti-CD22. CD22 je antigen, exprimovaný v B-linii blastocytů akutní myeloidní leukémie (Wayne a kol., 2011). CD znamená „cluster of differentiation“, tedy diferenciační antigen (Hořejší, 2013).

Radioimunokonjugáty využívají mAbs pro dodání radionuklidů do nádorových buněk. Mezi schválená činidla se řadí  $^{90}\text{Y}$  (záření  $\beta$ ) a  $^{131}\text{I}$  (záření  $\gamma$ ) (Sharkey a kol., 2009).

Mnoho imunokonjugátů je testováno v klinických a preklinických studiích.

#### **1.4.2. Tyrosinkinázy**

Tyrosinkinázy se řadí mezi proteinkinázy a hrají důležitou roli ve fosforylaci, tedy v přenosu fosfátové skupiny z ATP na tyrozinové zbytky v proteinech. Díky tomuto procesu dochází ke konformačním změnám proteinu, které mají vliv na funkci proteinu, na lokalizaci proteinu v buňce nebo na interakci s dalšími proteiny. Tyrosinkinázy působí v signálních drahách. V těchto drahách jsou extracelulární signály transportovány skrz plazmatickou membránu a mohou vést až do jádra. V jádře se mohou tyto signály podílet na expresi

cílových genů (Radha a kol., 1996). Fosforylace proteinů patří mezi nejdůležitější procesy v buněčné regulaci. Existují dva typy tyrosinkináz, a to membránově vázané (tj. tyrosinkinázové receptory, RTKs) a volné v cytoplazmě (tj. nereceptorové tyrosinkinázy, nRTKs).

#### **1.4.2.1. Struktura a funkce tyrosinkinázových receptorů**

Tyrosinkinázové receptory (RTKs) jsou složeny z extracelulární domény interagující s ligandem, transmembránové domény a intracelulární kinázové domény (Hubbard a Till, 2000, Watson, 1984).

Regulace RTK aktivity patří mezi hlavní buněčné procesy. Pokud dojde k narušení této regulace, tak jsou nádorové buňky následně schopné nekontrolovatelného růstu. (Tsai a Nussinov, 2013). Abnormální RTK aktivace vede k vývoji různých typů rakoviny. Důvody této aktivace mohou být např. nadměrná exprese receptoru, chromosomální translokace, genová amplifikace, mutace nebo snížení exprese receptoru (Haglund a kol., 2007, Abella a Park, 2009). Byly identifikovány RTKs, které jsou nadměrně exprimovány v nádoru a regulují mnoho funkcí nádorových buněk (např. růst, komunikaci nádorových buněk s mikroprostředím nádoru).

RTKs mají důležitou úlohu v cílené léčbě rakoviny (Krause a Etten, 2005). Fosforylace RTKs je klíčová pro signální transdukcii, funkci a regulaci buněčné aktivity (Shah a kol., 2013). Je známo 58 RTKs, z toho jich je 30 potřebných pro onkogenezi v různých typech nádorů (Weinstein, 2000). Většina onkogenních RTKs se nevyskytuje v normálních tkáních. Mnoho RTKs je hyperaktivních v maligních buňkách (Robertson a kol., 2000).

#### **1.4.2.2. Nízkomolekulární inhibitory tyrosinkinázových receptorů**

Tyrosinkinázové inhibitory (TKIs) patří mezi nízkomolekulární organické látky a blokují životně důležité dráhy, které jsou nutné k přežití buněk. TKIs jsou schopny translokace skrz plazmatickou membránu. Poté inhibují katalytickou aktivitu intracelulární TK domény u tyrosinkinázového receptoru. Princip inhibice spočívá v zásahu do vazby ATP na substrát (Johnson, 2009).

### 1.4.2.3. Přehled významných inhibitorů tyrosinkinázových receptorů

- Receptory pro epiteliální růstové faktory (EGFRs) a specifické selektivní TKIs

Receptory pro epiteliální růstové faktory (EGFRs) jsou rodinou čtyř strukturálně podobných RTKs. Tato rodina hraje významnou roli v regulaci buněčné proliferace, diferenciaci a přežití. Při fyziologických podmínkách se specifický rozpustný ligand (epiteliální růstový faktor, EGF) váže na extracelulární oblast EGFR. Následná homo-/heterodimerizace s dalšími molekulami vede k fosforylaci specifických tyrosinových zbytků uvnitř intracelulární domény (Ono a Kuwano, 2006).

EGFRs jsou abnormálně aktivované různými mechanismy. Mezi tyto mechanismy patří zvýšená exprese receptoru, mutace, na ligandu závislá dimerizace receptoru nebo na ligandu nezávislá stimulace. EGFRs jsou asociovány s vývojem nádorů, např. s nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC) (Robinson a Sandler, 2013), nebo s rakovinou pankreatu (Burtness, 2007). Exprese EGFRs je typická pro většinu maligních onemocnění (Herbst, 2004).

Specifická/selektivní inhibice EGFRs je jeden z vhodných přístupů v léčbě rakoviny.

- Receptory pro vaskulární endotelové růstové faktory (VEGFRs) a anti-angiogenní TKIs

Pro VEGF rodinu je typická zvýšená exprese v různých solidních nádorech. VEGFs se váží na nádorové receptory vaskulárního endotelia (VEGFRs) a indukují angiogenezi (regulovaný proces novotvorby krevních cév). Vybrané inhibitory tyrosinkinázových receptorů VEGFRs (VEGFR-TKIs, např. vatalanib, tivozanib) se podílí na inhibici nádorové angiogeneze (Jones a kol., 2011, Eskens a kol., 2011).

- Receptory pro růstové faktory trombocytů (PDGFRs) a specifické selektivní TKIs

PDGFRs jsou exprimovány pouze ve fibroblastech, v buňkách hladké svaloviny, v plicích a v pericytech cévní stěny. Zvýšená exprese a aktivita PDGFR byla prokázána v mnoha maligních onemocněních, včetně NSCLC a gliomů (Heinrich a kol., 2012).

PDGFRs stimulují signální dráhy, které jsou zapojeny v mnoha buněčných a vývojových odpovědích (Andrae a kol., 2008). Všechny schválené inhibitory tyrosinkinázových receptorů PDGFR (PDGFR-TKIs) působí na více cílů. Nejznámější PDGFR-TKI je imatinib, který se používá od roku 2000 jakožto první látka v oblasti cílené nádorové terapie (Klener, 2013). Několik inhibitorů je v preklinickém a klinickém testování.

- Receptory pro růstové faktory fibroblastu (FGFRs)

FGFR rodina je tvořena čtyřmi členy (FGFR1-4). Po vazbě ligandu na FGFR dojde k aktivaci signálních kaskád, důležitých pro proliferaci, angiogenezi, migraci a přežití nádoru (Liang, 2012). Většina inhibitorů tyrosinkinázových receptorů FGFR (FGFR-TKIs) působí na více cílů. Část těchto inhibitorů je v preklinickém testování.

- FMS-like tyrosin-kinázy 3 (FLT3s)

FLT3s patří mezi cytokinové receptory a jsou exprimovány v mnoha hematopoetických progenitorových buňkách. Signalizace FLT3 je potřebná pro normální vývoj hematopoetických a progenitorových buněk (Naoe a Kiyoi, 2004). FLT3 genová mutace je nejčastější mutací v akutní myeloidní leukemii (AML) (Yamamoto a kol., 2001). Existuje několik FLT3-TKIs jakožto terapeutických léků. Tyto léky jsou především pro pacienty s AML, kteří mají zároveň mutaci ve FLT3.

### **1.4.3. Inhibice sebeobnovy**

V lidském těle se nachází mnoho typů buněk v nejrůznějším stupni diferenciaci. Diferenciace buněk je umožněna mnoha transkripčními faktory, které jsou závislé na signálech z mikroprostředí konkrétní tkáně. Tyto signály jsou přenášeny do buňky za pomoci receptorů a signálních kaskád. Čím častěji probíhá u buňky diferenciaci, tím více se snižuje její proliferační schopnost a dochází k buněčnému stárnutí. Následně jde buňka do apoptózy.

Proliferace je proces charakteristický omezeným množstvím dělení buněk, které se diferencují.

Sebeobnova je typická pro kmenové buňky. Pokud kmenová buňka přejde do stádia diferenciaci, tak se její schopnost sebeobnovy ztrácí.

Schopnost sebeobnovy spolu s proliferací a diferenciací jsou tedy úzce provázané biologické procesy.

Mezi základní charakteristiky nádorů patří patologická nekonečná sebeobnova kmenových buněk. Proto u nádorů dochází k různým abnormalitám v rámci diferenciaci a proliferace. Velké množství cytostatik a cílených léčiv působí především na proliferující buňky. Kmenové buňky, které se nachází většinou v klidové fázi (bez schopnosti proliferace), jsou rezistentní vůči chemoterapeutikům. Tato vlastnost kmenových buněk je pravděpodobně příčina relapsů nemoci u mnoha malignit. Jedním z možných typů léčby je zacílení na kmenové buňky a jejich sebeobnovu (Klener, 2013).

#### **1.4.4. Inhibice signálních kaskád ovlivňujících regulaci sebeobnovy**

Mezi významné signální dráhy, regulující sebeobnovu u kmenových buněk, patří např. Wnt, Hedgehog, Notch, TNF, TGF- $\beta$ , BMI-1 a další. Deregulace těchto drah je jednou z příčin vzniku nádoru u myšího modelu (Wicha a kol., 2006). Změna v těchto drahách má za následek vznik nádoru i u lidí (Karhadkar a kol., 2004).

##### **1.4.4.1. Signální dráha Wnt**

Signální dráha Wnt se podílí na řízení mnoha procesů v embryonálním vývoji. Mezi tyto procesy patří především dělení buněk, jejich růst, migrace a v neposlední řadě také sebeobnova kmenových buněk nádoru. Významnou složku Wnt dráhy tvoří rodina 19 sekretovaných glykoproteinů (Papkoff a kol., 1987). Díky těmto glykoproteinům dochází ke spuštění dvou typů drah – kanonické a nekanonické signální dráze. Kanonická dráha má vliv na buněčné dělení a nekanonická dráha se podílí na buněčném pohybu (Katoh a Katoh, 2007).

Regulace dráhy Wnt je řízena inhibitory Wnt. Tyto inhibitory chybí u nádorových buněk (Filipovich a kol., 2011). Proto se používají analogy Wnt inhibitorů, mající terapeutický vliv v léčbě nádorů. Jednou ze skupin známých inhibitorů je skupina proteinů sFRP (human secreted frizzled-related protein). Pokud se tyto proteiny navážou na receptor Frizzled (součást dráhy Wnt), tak dojde k utlumení kanonické a nekanonické dráhy (Dann a kol., 2001). Za pomoci sFRP lze léčit např. mnohočetný myelom (Bodine a kol., 2009).

Dělení buněk u některých nádorů lze potlačit za pomoci Wnt protilátek. Např. anti-Wnt-1 protilátka omezuje funkci dráhy Wnt-1 v buňkách nádoru a umožňuje apoptózu těchto buněk (He a kol., 2004).

##### **1.4.4.2. Signální dráha Notch**

Notch je signální dráha, která se podílí na embryogenezi, reguluje sebeobnovu kmenových buněk a má podíl na jejich diferenciaci. Notch signály jsou také důležité v mezibuněčné komunikaci. Pokud se na receptor Notch naváže ligand, tak se odštěpí intracelulární část receptoru (Notch-IC). Toto odštěpení probíhá za pomoci enzymu gama-sekretázy. Gama-sekretáza je tedy hlavní intracelulární faktor podílející se na aktivaci dráhy Notch. Notch-IC je translokován do jádra, kde se podílí na regulaci aktivity transkripčních faktorů včetně exprese cílových genů (Klener, 2013).

Změny v regulaci dráhy Notch vedou ke zvýšenému riziku vzniku nádorů. Tento fakt byl popsán u mnoha nádorů, např. u slinivky (Miyamoto a kol., 2003), svalového rhabdomyosarkomu (Raimondi a kol., 2012), prostaty (Santagata a kol., 2004) nebo u hematologických malignit, jako např. mnohočetný myelom (Houde a kol., 2004).

Jedním z možných způsobů inhibice Notch jsou inhibitory gama-sekretázy, např. inhibitor MK-0752. Dalším možným inhibitorem je látka PF-03084014 (Klener 2013).

#### **1.4.4.3. Signální dráha Hedgehog (HH)**

Signální dráha HH má podíl na embryogenezi a zároveň na buněčném dělení nebo diferenciaci. Porucha této dráhy vede např. ke vzniku kožního bazocelulárního karcinomu (Hutchin a kol., 2005).

Mezi první objevené inhibitory této dráhy se řadí cyklopamin, což je rostlinný alkaloid. Pokud se tato látka naváže na receptor Smoothened (tj. receptor dráhy HH), tak dojde k blokaci signalizace dráhy HH (Chen a kol., 2002).

Inhibice HH může být umožněna také protilátkami, což bylo prokázáno např. díky polyklonální protilátce anti-Patched1. Tato protilátka se podílí na inhibici dělení buněk nádoru slinivky (Nakamura a kol., 2007).

#### **1.4.4.4. Signální dráha TGF- $\beta$**

TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta) je cytokin, který se podílí na mnoha funkcích buněk. Mezi tyto funkce patří např. apoptóza, angiogeneze nebo regulace imunitního systému (Levy a Hill, 2006). Signalizace za pomoci TGF- $\beta$  má antiproliferační vliv na buňky v normálních tkáních. Ovšem u nádorů může být signální dráha TGF- $\beta$  patologicky změněna, čímž dojde k výraznému vývoji nádorových buněk (Klener, 2013).

Mezi možné způsoby inhibice signální dráhy TGF- $\beta$  patří protilátky, které snižují pravděpodobnost vzniku vazby mezi ligandem a receptorem. Např. protilátka 1D11 je schopna potlačit rakovinu plic v myším modelu (Nam a kol., 2006).

Jedním z dalších způsobů inhibice dráhy TGF- $\beta$  jsou nízkomolekulární inhibitory. Např. inhibitor SB-431542 je látka, která se podílí na blokaci proliferace buněk u nitrolebních nádorů – gliomů (Hjelmeland a kol., 2004) nebo u osteosarkomů (Matsuyama a kol., 2003).



### **1.4.5. Apoptóza**

Apoptóza je programovaná buněčná smrt, řízená různými biochemickými a genetickými dráhami. Tyto dráhy hrají důležitou roli ve vývoji a homeostáze u normálních tkání. Apoptóza přispívá k eliminaci nepotřebných buněk a je důležitá pro zachování rovnováhy mezi přežitím buněk a jejich smrtí (Cotter, 2009). Neschopnost apoptózy může vést k rakovině.

DNA obsahuje kontrolní body, které se podílí na správném buněčném cyklu. Pokud jsou tyto body poškozeny, tak buňky se zničenou DNA přejdou do apoptózy, díky čemuž se zablokuje karcinogeneze (Halazonetis a kol., 2008, Negrini a kol., 2010). Apoptopické signály pomáhají zajistit integritu genomu (Fulda, 2010). Pokud ovšem dojde k poruše regulace apoptopických drah, tak je zde větší riziko vzniku rakoviny a následně i větší rezistence rakoviny na léčbu. Únik od apoptózy tedy patří mezi významné znaky rakoviny (Hanahan a Weinberg, 2000).

#### **1.4.5.1. Defekty apoptózy a rakovina**

Defekty v apoptopických mechanismech jsou důležité v nádorové patogenezi. Umožňují nádorovým buňkám přežít déle než normální buňky, dále poskytují nádorovým buňkám ochranu před oxidačním stresem a hypoxií (nedostatek O<sub>2</sub>) během expanze nádorové masy. Tyto faktory poskytují čas pro akumulaci genetických alternativ, které deregulují buněčnou proliferaci, podporují angiogenezi a zvyšují invazivitu během nádorové progresi (Reed a kol., 1998).

Nenádorové buňky mají DNA reparační systém. Defekty v DNA reparaci a/nebo v chromosomální segregaci spustí smrt buněk jako obranný mechanismus. Následně jsou geneticky poškozené buňky odstraněny (Ionov a kol., 2000).

Existují různé mechanismy, jak nádorové buňky potlačují apoptózu. Mezi takové mechanismy patří exprese apoptopických proteinů, např. Bcl-2. Dalším mechanismem je snížená regulace nebo mutace proapoptopických proteinů (např. protein BAX). Exprese Bcl-2 a BAX je regulována tumor supresorovými geny (Miyashita a kol., 1994).

Apoptopické defekty umožňují epitelovým buňkám přežít v suspendovaném stavu bez spojení s extracelulární matrix. Tento fakt umožňuje vznik metastáz (Frisch a Sreaton, 2001). Apoptopické defekty podporují i rezistenci vůči imunitnímu systému včetně cytotoxických T-buněk (CTL) a NK buněk (natural killers) působících na nádor (Tschopp

a kol., 1999). Apoptopické defekty asociované s rakovinou mají roli v rezistenci na konvekční léčbu (chemoterapie a radioterapie), což vyžaduje vyšší dávky protinádorové terapie (Makin a Hickman, 2000).

Lepší pochopení apoptopických mechanismů a jejich deregulaci v nádorech umožňuje vývoj dalších cílených léčiv, které indukují apoptózu v nádorových buňkách.

#### **1.4.5.2. Molekulární cílená terapie a apoptóza**

V lidských nádorech je prokázána exprese inhibitorů apoptózy (Kaufmann a Vaux, 2003). Objev různých léčebných metod proti mnoha typům rakoviny významně pokročil. Některé nové terapeutické látky jsou schopné indukovat apoptózu. Díky těmto nadějným látkám by bylo možné řídit rezistenci nádoru na konvekční léčbu (Meiler a Schuler, 2006). Dané látky by se mohly používat samostatně nebo v kombinaci s konvekční léčbou.

Některé práce se zaměřují na Bcl-2 rodinu proteinů (potlačujících apoptózu) a modifikují jejich aktivitu, čímž dochází k ničení nádorových buněk (Patel a kol., 2009).

- Zacílení na smrtící receptory (death receptors)

Apoptopická dráha je spuštěna tzv. smrtícími ligandy, které se vážou na smrtící receptory. Mezi zmíněné ligandy patří TNF-  $\alpha$  (cytokin s proapoptopickou aktivitou) nebo FAS ligand (FASL, přes který se přenášejí signály, vedoucí ke vzniku kaskády reakcí a následně k apoptóze) (Klener, 2013).

- Inhibice Bcl2

Antiapoptopické Bcl2 proteiny mají významnou funkci v regulaci buněčné smrti. Bylo syntetizováno mnoho látek, napodobujících Bcl2 z BH-3 skupiny. Tyto syntetizované látky se nazývají BH-3 mimetika a vykazují protinádorové proapoptopické účinky. Některé z BH-3 mimetik jsou charakteristické vysokou afinitou k Bcl-2, nebo mají inhibiční účinek na Bcl-2 (Klener, 2013).

#### **1.4.6. Inhibice angiogeneze**

Angiogeneze je proces novotvorby krevních cév. Tento proces je velmi regulovaný. Mezi nejdůležitější angiogenní růstové faktory patří VEGF-A (vaskulární endoteliální růstový faktor A), který stimuluje endoteliální buňky. Stimulace probíhá přes receptor VEGFR-2 nebo přes VEGFR-1 (Pepper a kol., 1992). VEGF je zvýšeně exprimován ve většině solidních nádorů.

Mezi funkce VEGF patří také indukce endoteliálních netěsností, což vede ke zvýšené transdukci a k podpoře nádorové buněčné transendoteliální migrace in vitro. Tyto efekty mohou být potlačeny monoklonální protilátkou anti-VEGF bevacizumab, která patří mezi první schválené antiangiogenní látky (Prager a kol., 2010, Klener, 2013). Anti-VEGF terapie pomohla např. u pacientů s kolorektální rakovinou (Grothey a kol., 2008).

## **1.5. Pasivní targeting**

V prostředí nádoru se vyskytují abnormální anatomické a fyziologické principy. Díky nekontrolovatelnému růstu nádorových buněk a sekreci angiogenetických faktorů dochází ke vzniku vysoce dezorganizovaného cévního prostředí a k přetížení extravaskulárního prostředí.

Z nádorových buněk jsou uvolňovány angiogenní faktory, které řídí stavbu stěny a morfologii krevních cév (Bates a kol., 2002). Nádorové cévy jsou přerušované a velmi fenestrované (Carmeleit a Jain, 2011). Stupeň fenestrace a zvýšené permeability cév závisí na typu rakoviny, na její fázi a implantaci (Hobbs a kol., 1998, Hashizume a kol., 2000). Nepravidelnosti, které se vyskytují při stavbě nádorových cév, narušují proudění krve a hydrostatický tlak v cévách. (Carmeleit a Jain, 2011, Jain a Stylianopoulos, 2010). Další problém je proliferující masa nádorových buněk, která způsobuje tlak na jiné cévy a zhoršuje průtok krve (Padera a kol., 2004).

### **1.5.1. Pasivní targeting - EPR efekt (Efekt zvýšené permeability a retence)**

Cílená léčiva mohou využít tzv. EPR efektu. EPR efekt byl poprvé objeven v roce 1984 (Konno a kol., 1984). Základem EPR efektu je patologicky zvýšená permeabilita nádorového cévního systému, díky čemuž mohou velké částice (10-300 nm) proniknout do intersticia nádoru (Kobayashi a kol., 2013).

#### **1.5.1.1. Zvýšená permeabilita**

V nádorovém prostředí probíhá angiogeneze, při které vznikají cévy, tvořené nesouvislým epitelem. Cévy v nádoru jsou tedy fenestrované v rozsahu 200-2000 nm v závislosti na typu, lokalizaci a okolí nádoru (Hobbs a kol., 1998). Fenestrace cév tak poskytne možnost extravazace tekutin a molekul do intersticia nádoru.

### **1.5.1.2. Zvýšená retence**

V normálních tkáních je extracelulární tekutina konstantně vypouštěna do lymfatických cév. To umožňuje stálý odtok a obnovu intersticiální tekutiny, dále návrat extravazantních roztoků a koloidů zpět do oběhu.

V nádorech je lymfatická funkce defektivní, koloidy se nemůžou vrátit do oběhu a akumulují se v nádorovém intersticiu.

### **1.5.1.3. Faktory ovlivňující EPR efekt**

Mezi faktory ovlivňující EPR efekt patří zejména extravazace koloidů z krve a jejich difuze do tkáně. Dalším faktorem je interakce koloidů s extracelulárními či intracelulárními cíli v prostředí nádoru. Tyto faktory jsou ovlivněny především typem nádoru, složením nádorové tkáně a kompozice nádoru.

Na extravazaci koloidů z cirkulace se podílí především koncentrace koloidů v krvi a relativní propustnost cévní stěny pro makromolekuly.

### **1.5.1.4. Blokace VEGF-R2**

Alternativou vedoucí ke zlepšení EPR efektu může být také normalizace krevních cév. Např. v modelu karcinomu, ve kterém došlo k blokaci VEGF-R2, tak byla prokázána lepší penetrace některých léků (Chauhan a kol., 2012).

## **1.6. Aktivní targeting**

Aktivního targetingu se dá dosáhnout tak, že se vytvoří nanočástice, které EPR využívají a navíc na povrchu nesou specifické ligandy či protilátky (nebo proteiny, nukleové kyseliny, sacharidy...(Saha a kol., 2010)). Díky tomu dojde k dokonalejšímu zacílení na prezentované nádorové proteiny, lipidy či sacharidy (Yu a kol., 2010, des Rieuf a kol., 2013). Nanočástice pak v sobě mohou nést buď obecně cytotoxickou látku, nebo cytotoxicky působící sloučeninu s vyšším zacílením na mechanismy, které jsou pro nádor charakteristické a které se liší od zdravé tkáně.

Účinnost strategie aktivního targetingu je ovlivněna fyzikálně-chemickými vlastnostmi, jako hustota ligandu (Gu a kol., 2008) nebo velikost nanočástic (Jiang a kol., 2008).

## 1.7. Fosfatidylserin (PS)

Úkolem protinádorových léků je zničit nádorové buňky, ale neoslabit normální buňky. Proto je podstatné znát rozdíly mezi nádorovými a normálními buňkami.

Jednou z cest, jak zacílit protinádorovou léčbu, je fosfatidylserin (PS). PS je fosfolipid s negativním nábojem. Tento náboj je způsoben vazbou serinu na fosfátovou skupinu (Kay a Grinstein, 2011).

V 50. letech minulého století byla popsána jeho stavba (Baer a Maurukas, 1955). PS tvoří 2-10% z celkového množství fosfolipidů vyskytujících se v plasmatické membráně (Vance a Steenbergen, 2005). Dále se PS nachází také v endosomech a v endoplazmatickém retikulu.

PS má také důležitou roli ve vazbě a aktivaci mnoha signalizačních proteinů. Mezi další důležité funkce PS se řadí také jeho úloha v rámci srážení krve či v apoptóze (Buckland a Wilton, 2000).

U normálních buněk se PS vyskytuje na vnitřní straně cytoplazmatické membrány (Bevera a kol., 1996). Na této vnitřní vrstvě se nachází také další negativně nabitý fosfolipid fosfatidyletanolanin (PE). Fosfatidylcholin (PC) spolu se sfingomyelinem jsou součástí vnější vrstvy plasmatické membrány a oba mají neutrální náboj (Verkleij a kol. 1973). Daná asymetrie je zapříčiněna díky ATP-dependentní aminofosfolipidové translokáze. Tento enzym se podílí na specifickém transportu PE a PS přes dvojvrstvu fosfolipidů, která tvoří plasmatickou membránu (Seigneuret a Devaux, 1984). Inhibicí enzymu translokázy nebo aktivací enzymu scramblázy (tento enzym je schopen transportu fosfolipidů (Zhou a kol., 1997)) dojde k asymetrické změně fosfolipidů.

Při některých buněčných procesech (např. při apoptóze nebo při aktivaci trombocytů) je PS exprimován na vnější vrstvě cytoplazmatické membrány u normálních buněk. Expresí PS má tedy funkci „eat me“ signálu, který jsou schopné rozpoznat fagocyty. Fagocyty buňku nejprve rozpoznají a následně jí fagocytují.

V rámci nádorů se PS nejen nachází na vnější membráně nádorového endotelu, ale navíc je to celkový znak membrány nádorových buněk mnoha typů rakoviny. Stejně vlastnosti jsou typické i pro metastázy. U melanomu B16 byla nalezena samovolná exprese PS na buňkách endotelu. Tyto buňky endotelu však nepřecházely do apoptózy (Ran

a Thorpe, 2002) kvůli expresi „don't eat me“ signálů (Brown a Neher, 2012). Mezi tyto „don't eat me“ signály patří CD31 a CD47.

Za pomoci proteinu annexinu V se dá zjistit exprese PS. Annexin V se váže na PS při apoptóze (Lee a kol., 2013). Za pomoci fluorescenčního mikroskopu nebo průtokového cytometru je možné analyzovat detekci Annexinu V (Martin a kol., 1995).

Zvýšené množství PS na vnější vrstvě membrány normálních buněk bylo prokázáno při některých podmínkách, podobných těm v nádoru. Mezi tyto podmínky patří např. inkubace v prostředí s nízkým množstvím  $O_2$  (1%  $O_2$ , hypoxie) nebo  $H_2O_2$  – roztok o 100mM koncentraci, popř. některé zánětlivé cytokiny (Ran a Thorpe, 2002).

Tabulka I. uvádí podmínky, při kterých byla pozorována zvýšená exprese PS vyskytujícího se na vnější vrstvě plazmatické membrány. Nejvyšší expresi PS způsobil peroxid vodíku, nejnižší exprese byla dosažena za použití zánětlivých cytokinů (Ran a Thorpe, 2002).

**Tabulka I:** Vliv růstových faktorů, cytokinů, peroxidu vodíku a stresu na expresi PS v buňkách endotelu (bEnd.3, mouse brain endothelioma cells) *in vitro* (Ran a Thorpe, 2002).

Treatment	Concentration	<sup>125</sup> I–Annexin V (% of max binding)*	
		ABAE cells	bEnd.3 cells
Medium with 10% serum	N/A	0	0
Actinomycin D + TNF $\alpha$	50 ng/mL each	100	100
VEGF	20 ng/mL	0	0
bFGF	20 ng/mL	0	0
Scatter factor	40 ng/mL	0	0
TGF $\beta_1$	20 ng/mL	0	0
PDGF-BB	20 ng/mL	0	0
IL-10	20 ng/mL	0	0
IL-8	20 ng/mL	0	0
IL-6	20 ng/mL	0	0
IL-1 $\alpha$	10 ng/mL	6.4	7.5
IL-1 $\beta$	10 ng/mL	5.8	5.5
Interferon	40 ng/mL	8.6	2.8
TNF $\alpha$	20 ng/mL	7.4	13.7
Thrombin	50 nM	8.8	17.4
Hypoxia	1% O <sub>2</sub>	15.0	22.5
Hypoxia + IL-1 $\alpha$	Same as above	26.0	31.0
Hypoxia + TNF $\alpha$	Same as above	33.0	36.0
pH 6.6	N/A	20.2	18.9
Hydrogen peroxide	100 $\mu$ M	95.5	98.4

PS, nacházející se na endoteliálních buňkách nádoru, by mohl být vhodným cílem z několika důvodů: (1) lokalizace PS na vnější vrstvě plazmatické membrány je vhodná pro intravenózní podání léku. (2) PS byl nalezen u několika nádorů, např. melanom B16, karcinom plic nebo tlustého střeva. (3) PS se nenachází na vnější vrstvě plazmatické membrány normálních endoteliálních buněk (Ran a Thorpe, 2002).

PS je proto důležitým znakem nádorových buněk a je možné ho využít k diagnostice a léčbě nádorového onemocnění.

## **2. Cíle práce**

- Vypracování rešerše analyzující současné poznatky o možnostech nádorové imunoterapie
- Osvojení si metody detekce exprese fosfatidylserinu na povrchu nádorových buněk
- Studium vlivu nádorového prostředí na povrchovou expresi fosfatidylserinu



### 3. Materiál, metody

#### 3.1. Chemikálie

- RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA)
- DNáza I (Roche Diagnostic, Německo)
- Dual Apoptosis Assay with Nucview 488 Caspase-3 Substrate and CF640R Annexin V (Biotium, USA)
- Liberáza DL (Roche Diagnostic, Německo)
- PBS - fosfátový pufr s chloridem sodným (pH 7,3-7,4), (Sigma-Aldrich, USA)
- Trypanová modř (Sigma-Aldrich, USA)
- PI - propidium jodid (Invitrogen, USA)
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peroxid vodíku (Sigma-Aldrich, USA)
- Trypsin (0,25% trypsin, 0,02 EDTA v HBSS, Sigma-Aldrich, USA)

#### 3.2. Laboratorní zvířata

V pokusech byly využity samice myši kmene C57BL/6N, které pocházely z chovu Charles River Laboratories. Tyto myši přišly do laboratoře jako 8 týdenní s váhou 18-20g. Myši byly chovány jednotlivě ve sterilních boxech se stálým přístupem ke krmivu a k sterilní pitné vodě. Ve zvěřinci byla udržována konstantní teplota 22 °C, relativní vlhkost byla 65 % a fotoperioda byla seřizena na 12/12 hodin.

#### 3.3. Příprava nádorových buněk B16-F10 pro *in vivo* a *in vitro* pokusy

Použitá buněčná linie B16-F10 byla kultivována v médiu RPMI 1640 s obsahem 10% fetálního bovinního séra (BOFES), 1% glutaminu, 1% antibiotik a 0,1% merkaptoetanolu. Kultivace probíhala při 37 °C v termostatu za atmosféry s 5 % CO<sub>2</sub>. Poté, co buňky narostly, byly zbaveny kultivačního média a následně se třikrát promyly sterilním pufrovaným fyziologickým roztokem (PBS). Po promytí se k adherovaným buňkám přidala trypsinizační směs (0,25% trypsin, 0,02% EDTA v HBSS). Buňky spolu s trypsinizační směsí byly opět vloženy do termostatu (teplota 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) na jednu minutu. V termostatu došlo k uvolnění buněk. Přidáním RPMI 1640 s 10% BOFES byla trypsinizace zastavena. Následně se buňky centrifugovaly (5 min/4 °C/160 g) a vzniklý pelet rozsuspendován v RPMI 1640 bez séra. Posléze byla počítána buněčná koncentrace v 1 ml za pomoci

Bürkerovy komůrky. Po zjištění koncentrace se buněčná suspenze naředila na požadovanou koncentraci  $4 \times 10^6$  buněk/ml RPMI 1640 bez séra.

### **3.4. Transplantace nádorových buněk B16-F10**

Nádorové buňky B16-F10 byly subkutánně transplantovány do pravého oholeného boku myši. Bylo aplikováno 0,1 ml melanomové suspenze (B16-F10 s RPMI 1640 bez séra), která obsahovala 400 000 buněk.

### **3.5. Měření velikosti nádorů**

Za pomoci kaliperu byla změřena velikost nádorů. Pro získání výpočtu objemu nádorové masy byl použit vzorec  $V = \pi/6AB^2$ , kde A značí největší rozměr nádoru (délku), B značí nejmenší rozměr nádoru (výšku).

### **3.6. Analýza dat**

Výsledná data byla zpracována v programu STATISTICA 12. Statistická významnost byla určena za pomoci metod t-test a ANOVA. Chybové úsečky reprezentují standardní odchylku průměru (SEM).

## **4. Experimenty**

### **4.1. Studium otázky exprese fosfatidylserinu na povrchu nádorových buněk pomocí průtokové cytometrie**

#### **4.1.1. Porovnání míry exprese fosfatidylserinu ve středu a okraji nádoru a porovnání vhodnosti značení mrtvých/umírajících buněk pomocí propidium jodidu nebo kaspazy-3 v tomto typu analýzy**

Tento pokus měl dva hlavní cíle. (1) Prvním cílem tohoto pokusu bylo porovnat míru exprese fosfatidylserinu (PS) ve středu a okraji myšního melanomu (B16-F10). (2) Zároveň byly porovnávány dva způsoby analýzy exprese fosfatidylserinu a to kombinace značení annexin V (PS) + kaspáza 3 (značení apoptotických buněk) a kombinace značení annexin V (PS) + propidium jodid (značení nekrotických buněk).

V rámci tohoto pokusu byly analyzovány 3 nádory stejného stáří a podobné velikosti. Nádory byly změřeny kaliperem. Myši byly zabity stržením vazů, nádory vypitvány. Následně byly vypočítány objemy nádorů.

Nádory byly skalpelem rozděleny na středovou a okrajovou část. Takto připravené části nádorů byly rozstříhány na malé kousky do připravených 2 ml mikrozkušavek eppendorf s 1 ml RPMI obsahujícího enzymy DNase (výsledná koncentrace 0,2 mg/ml) a Liberase (výsledná koncentrace 0,33 mg/ml).

Mikrozkušavky eppendorf byly třepány 1 hod při 37 °C (400 kmitů/minutu). Poté byly centrifugovány (5 min/160 g /4 °C), supernatant odlit a pelet rozsuspendován v PBS. Nádorové suspenze byly přeneseny přes filtr (70 µm) do 50 ml centrifugačních zkumavek. Následně byla spočtena koncentrace buněk v Bürkerově komůrce. Bylo odebráno vždy 200 000 nádorových buněk ze suspenzí z okraje nádoru a ze středu nádoru pro jeden vzorek. Buňky byly přeneseny do zkumavek určených pro průtokovou cytometrii. Od každé buněčné suspenze (tři suspenze ze středu a tři suspenze z okraje nádoru) byly vždy připraveny dva identické vzorky (z důvodů dvojího značení pro analýzu na průtokovém cytometru) Buňky byly ještě jednou promyty centrifugací (5 min/160 g/4 °C), supernatant slit a pelet rozsuspendován v 200 µl 1X Annexin V Binding Bufferu V (předem ředěný 1:4 s H<sub>2</sub>O), který byl součástí kitu Dual Apoptosis Assay with Nucview 488 Caspase-3 Substrate and CF640R Annexin.

U vzorků bylo děláno značení dvojího typu:

- A) k první sadě vzorků byl přidán Annexin V v množství 5 µl/zkumavku a kaspáza 3 v množství 5 µl/zkumavku. Takto značené vzorky byly inkubovány 20 minut ve tmě při pokojové teplotě. Tato kombinace (Annexin V + kaspáza 3) umožňuje označit buňky exprimující PS (annexin V pozitivní buňky) a zároveň buňky apoptotické (kaspáza 3 pozitivní buňky)
- B) k druhé sadě vzorků byl přidán Annexin V v množství 5 µl/zkumavku a Propidium iodide (PI) v množství 5 µl/zkumavku. Zde byly vzorky nejprve inkubovány s Annexinem V po dobu 15 minut ve tmě při pokojové teplotě a poté byl ke vzorkům přidán PI a vzorky byly inkubovány dalších 5 minut. Tato kombinace (Annexin V + PI) umožňuje označit buňky exprimující PS (annexin V pozitivní buňky) a zároveň buňky nekrotické (PI pozitivní buňky).

Po uplynutí inkubace byly vzorky z obou typů značení doplněny 400 µl 1X Annexin V Binding Bufferu V a změřeny na průtokovém cytometru. Po nastavení průtokového cytometru BD FACS auto<sup>TM</sup> II (viz Tab. II) byly jednotlivé vzorky změřeny. Bylo zaznamenáno 20 000 událostí. Výsledky byly zpracovány a vyhodnoceny v programu BD FACSDiva verze 6.1.3.

**Tab. II:** Nastavení průtokového cytometru.

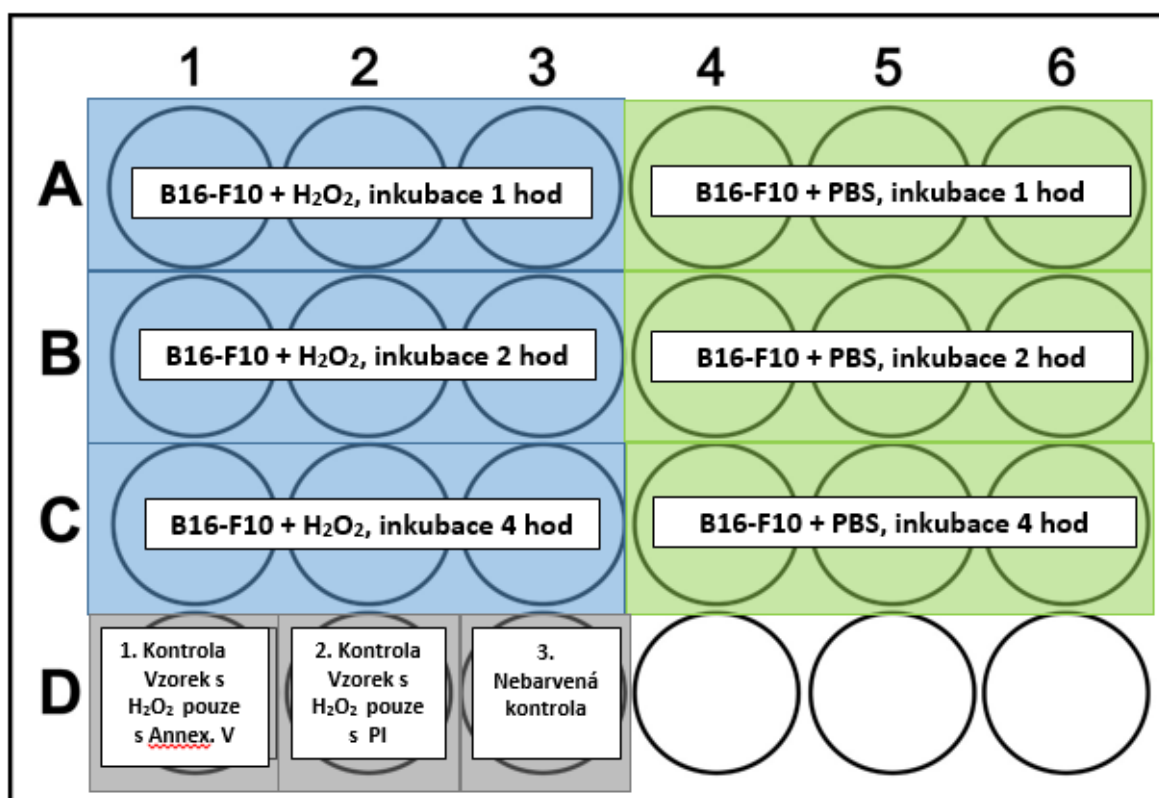
Nastavení laserů	
Window Extension	2
FSC Area Scaling	0,5
Laser Delay Blue	0
Laser Delay Red	30,69
Area Scaling Blue	0,5
Area Scaling Red	1,32

#### **4.1.2. Vliv působení peroxidu vodíku na expresi fosfatidylserinu u nádorových buněk B16-F10**

V následujícím in vitro pokusu byla zjišťována míra exprese fosfatidylserinu (PS) na nádorových buňkách B16-F10 v závislosti na působení peroxidu vodíku. Z namnožených nádorových buněk B16-F10 bylo slito médium. Buňky byly 3x promyty PBS (fosfátový pufr s chloridem sodným, pH 7,3-7,4). K buňkám byla přidána trypsinizační směs (0,25 % trypsin, 0,02 EDTA v HBSS), která je důležitá pro jejich uvolnění ze stěny kultivační lahve.

Buňky byly protřepány a inkubovány jednu minutu v termostatu při 37 °C. Poté byla trypsinizace zastavena přilítím media RPMI s 10% BOFES. Buňky byly přelity do centrifugační zkumavky, spočteny a naředěny na koncentraci 500 000 buněk/ml. Dále byly buňky rozpipetovány do 24 jamkové destičky po 400 µl (200 000 buněk) na jamku. Jamky byly dále doplněny 550 µl média RPMI s 10% BOFES.

Do 9 jamek bylo k buněčné suspenzi přidáno 50 µl 2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (finální koncentrace H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> byla 0,1 mM), do dalších 9 jamek bylo k buněčné suspenzi přidáno 50 µl PBS a ve třech dalších jamkách byly kontrolní skupiny (kontrola pro nastavení průtokového cytometru). 24 jamková destička je znázorněna na obr.1.



**Obr. 1:** Znázornění vzorků dle obsahu a dle doby inkubace

### **Analýza exprese PS v závislosti na působení H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Po každém inkubačním intervalu (1 hodina, 2 hodiny, 4 hodiny) byly analyzovány vždy 3 jamky s B16-F10 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3 jamky s B16-F10 + PBS.

Obsah jamek byl promíchán a přenesen do zkumavek určených pro průtokovou cytometrii. Dané zkumavky byly stočeny (5 min/160 g /4 °C) a supernatant slit. Buňky byly rozsuspendovány v 200 µl 1x Binding Bufferu (BB). Ke vzorkům bylo přidáno 5 µl Annexin

V. Vzorke byly inkubovány 25 minut ve tmě při pokojové teplotě, poté bylo ke vzorkům přidáno 5  $\mu$ l PI (propidium jodid, koncentrace 2,5 mg/ml). Vzorke byly opět inkubovány 5 minut ve tmě při pokojové teplotě. Po uplynutí inkubační doby bylo ke vzorkům přidáno 400  $\mu$ l BB. Vzorke byly promíchány a změřeny pomocí průtokového cytometru. Jako kontrola pro nastavení průtokového cytometru sloužil vzorek značený pouze Annexinem V, vzorek značený pouze PI a zcela neznačená kontrola.

Po nastavení průtokového cytometru BD FACS auto<sup>TM</sup> II (viz Tab. I) byly jednotlivé vzorke změřeny. Bylo zaznamenáno 20 000 událostí. Výsledky byly zpracovány a vyhodnoceny v programu BD FACSDiva verze 6.1.3.

## 5. Výsledky

### 5.1. Studium otázky exprese fosfatidylserinu na povrchu nádorových buněk pomocí průtokové cytometrie

Byly analyzovány tři nádory o objemu uvedeném v Tab. II.

Tab. II: Objemy nádorů.

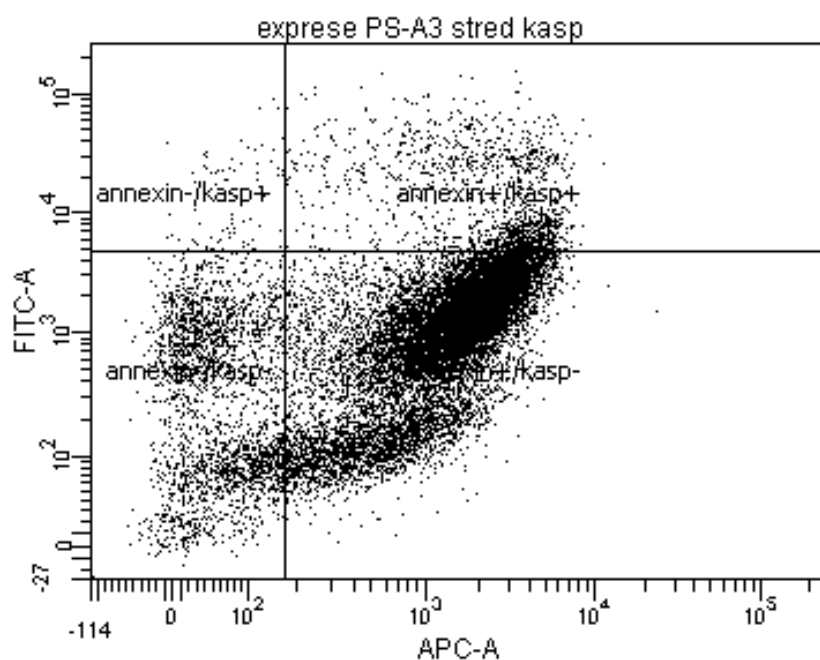
nádor	objem (cm <sup>3</sup> )
A1	0,99
A2	1,52
A3	1,8

#### 5.1.1. Porovnání míry exprese fosfatidylserinu ve středu a okraji nádoru

Buňky v jednotlivých vzorcích analyzované pomocí kitu (Dual Apoptosis Assay with Nucview 488 Caspase-3 Substrate and CF640R Annexin V) byly při analýze průtokového cytometru rozděleny na 4 populace buněk v závislosti na expresi fosfatidylserinu a přítomnosti kaspázy-3:

- (1) populace buněk annexin V-/kaspáza 3+,
- (2) populace buněk annexin V+/kaspáza 3+,
- (3) populace buněk annexin V-/kaspáza 3-,
- (4) populace buněk annexin V+/kaspáza 3-.

Na Obrázku 2 je uveden příklad výstupu z FACS analýzy u vzorku B16-F10 (střed nádoru) s přítomností kaspázy 3.

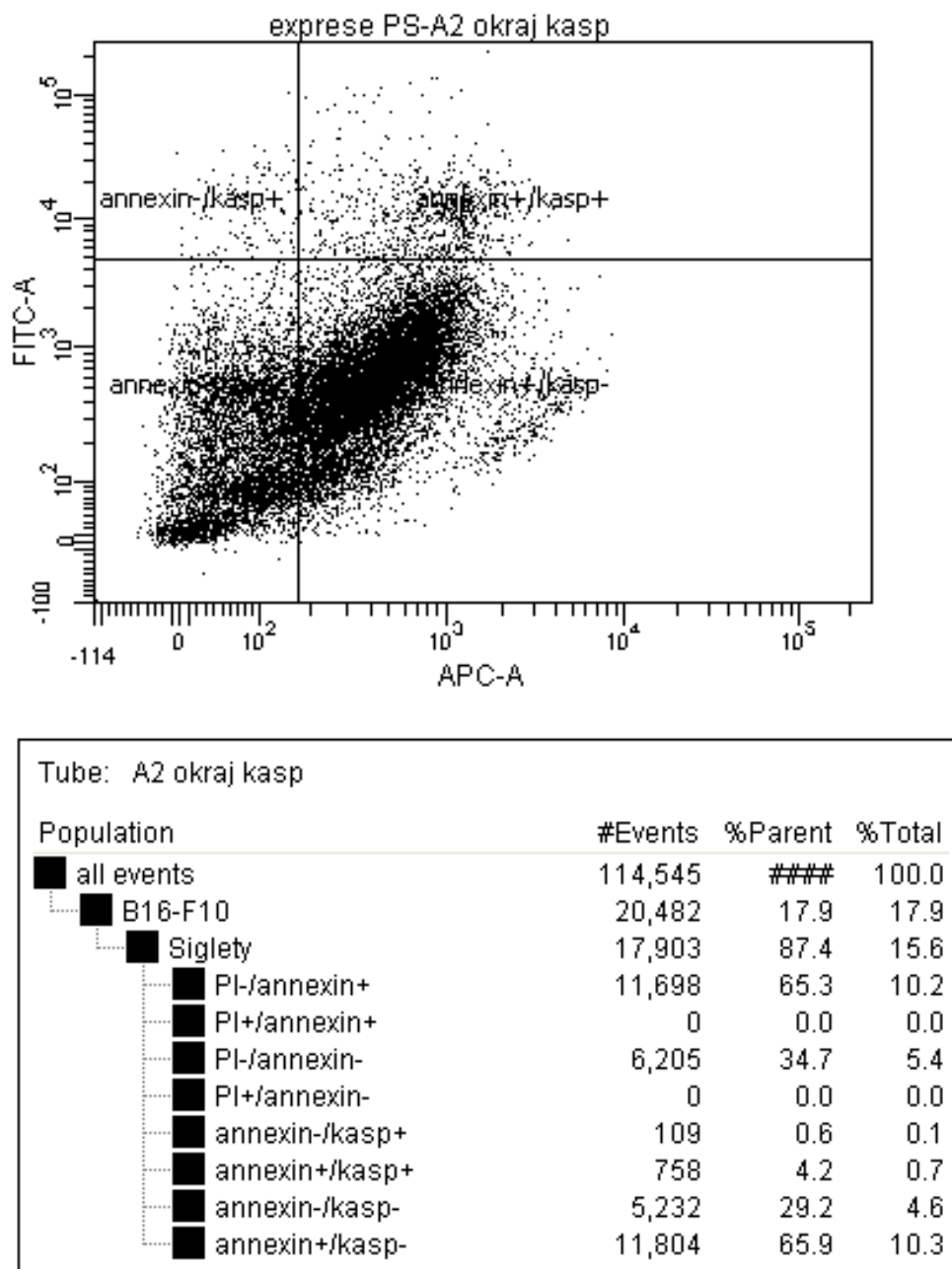


Tube: A3 stred kasp			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ all events	95,431	###	100.0
■ B16-F10	20,108	21.1	21.1
■ Siglety	18,345	91.2	19.2
■ PI-/annexin+	15,528	84.6	16.3
■ PI+/annexin+	0	0.0	0.0
■ PI-/annexin-	2,817	15.4	3.0
■ PI+/annexin-	0	0.0	0.0
■ annexin-/kasp+	73	0.4	0.1
■ annexin+/kasp+	1,269	6.9	1.3
■ annexin-/kasp-	2,451	13.4	2.6
■ annexin+/kasp-	14,552	79.3	15.2

**Obr. 2:** Příklad výstupu z FACS analýzy u vzorku B16-F10 (střed nádoru) s přítomností kaspázy 3.



Na Obrázku 3 je uveden příklad výstupu z FACS analýzy u vzorku B16-F10 (okraj nádoru) s přítomností kaspázy 3.

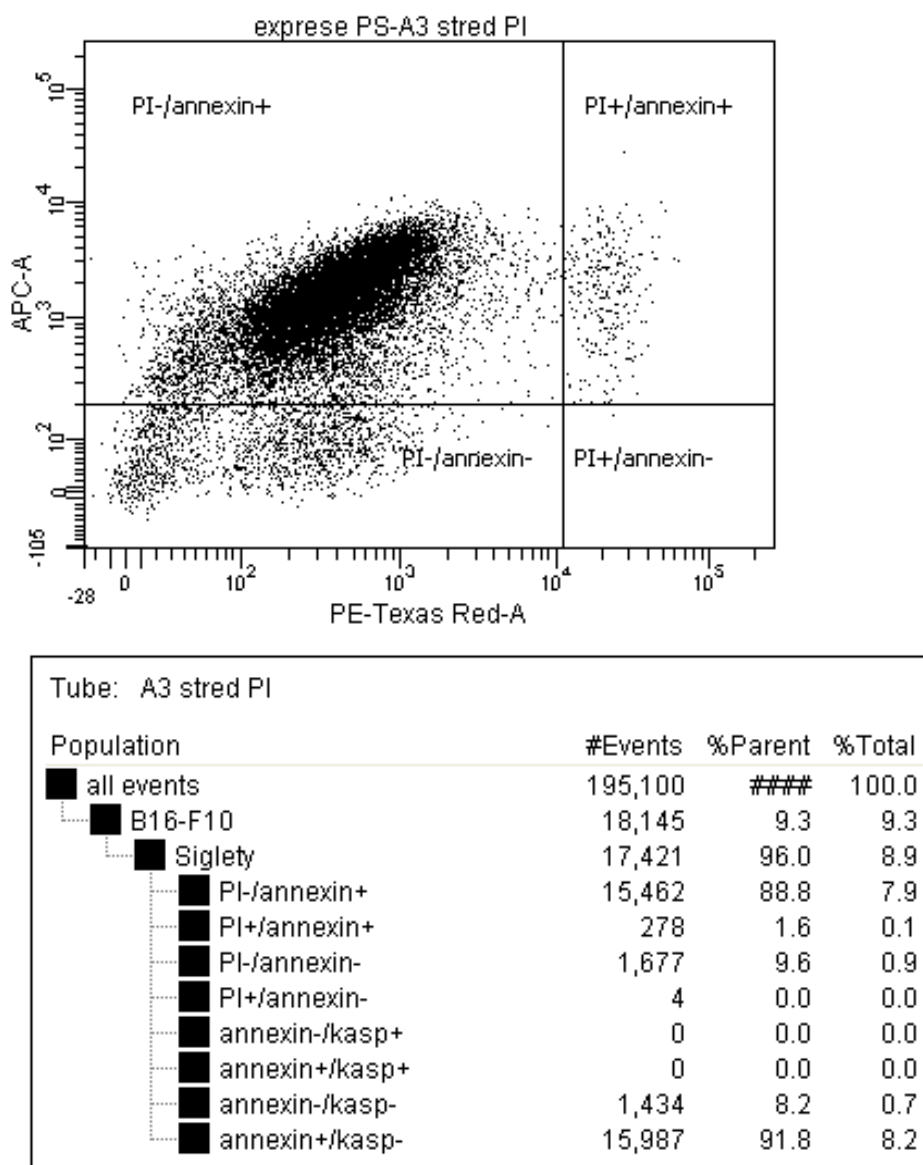


**Obr. 3:** Příklad výstupu z FACS analýzy u vzorku B16-F10 (okraj nádoru) s přítomností kaspázy 3.

Část buněk analyzovaných pomocí Annexinu V a propidium jodidu byla při analýze průtokovou cytometrií rozdělena na 4 populace buněk v závislosti na expresi fosfatidylserinu a průniku propidium jodidu do buněk.

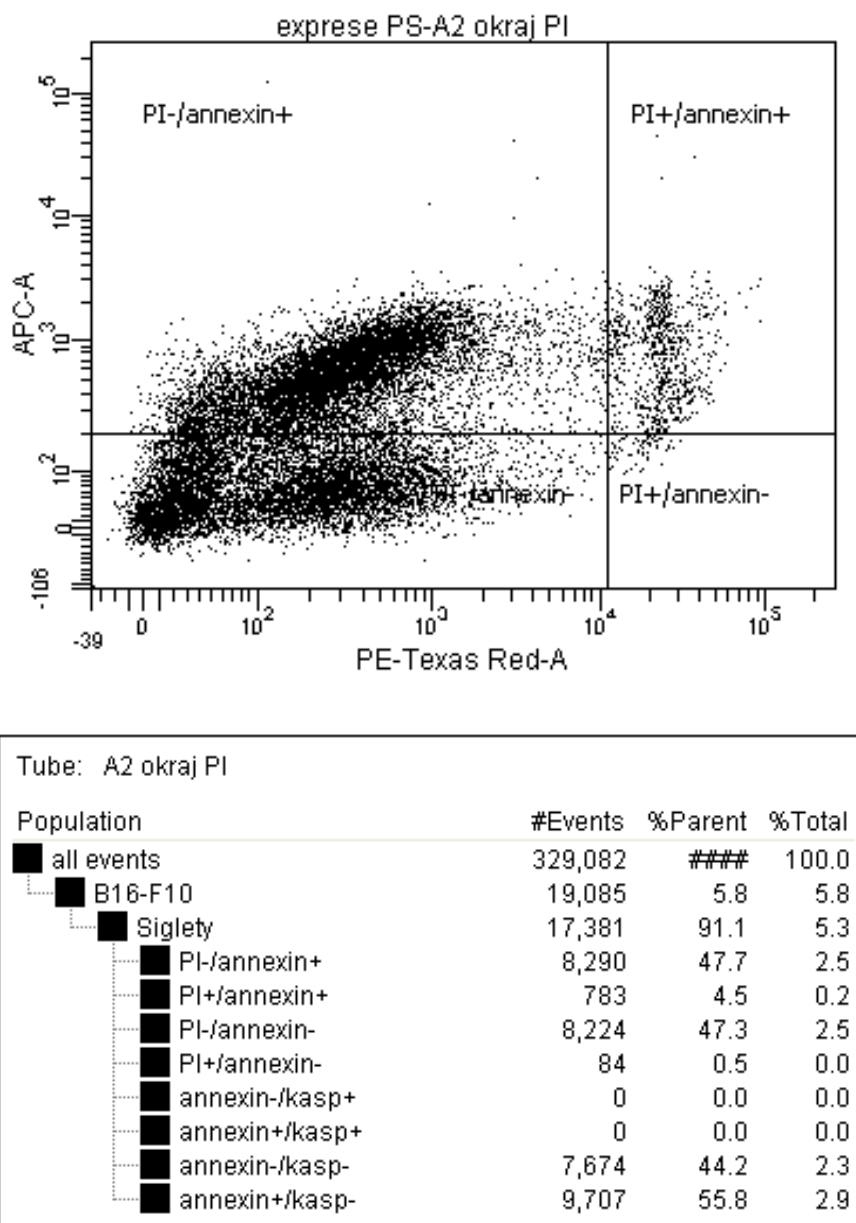
- (1) populace buněk annexin V-/ Propidium iodide+,
- (2) populace buněk annexin V+/ Propidium iodide+,
- (3) populace buněk annexin V-/ Propidium iodide-,
- (4) populace buněk annexin V+/ Propidium iodide-.

Na Obrázku 4 je uveden příklad výstupu z FACS analýzy u vzorku B16-F10 (střed nádoru) s přítomností propidium jodidu.



**Obr. 4:** Příklad výstupu z FACS analýzy u vzorku B16-F10 (střed nádoru) s přítomností propidium jodidu.

Na Obrázku 5 je uveden příklad výstupu z FACS analýzy u vzorku B16-F10 (okraj nádoru) s přítomností propidium jodidu.

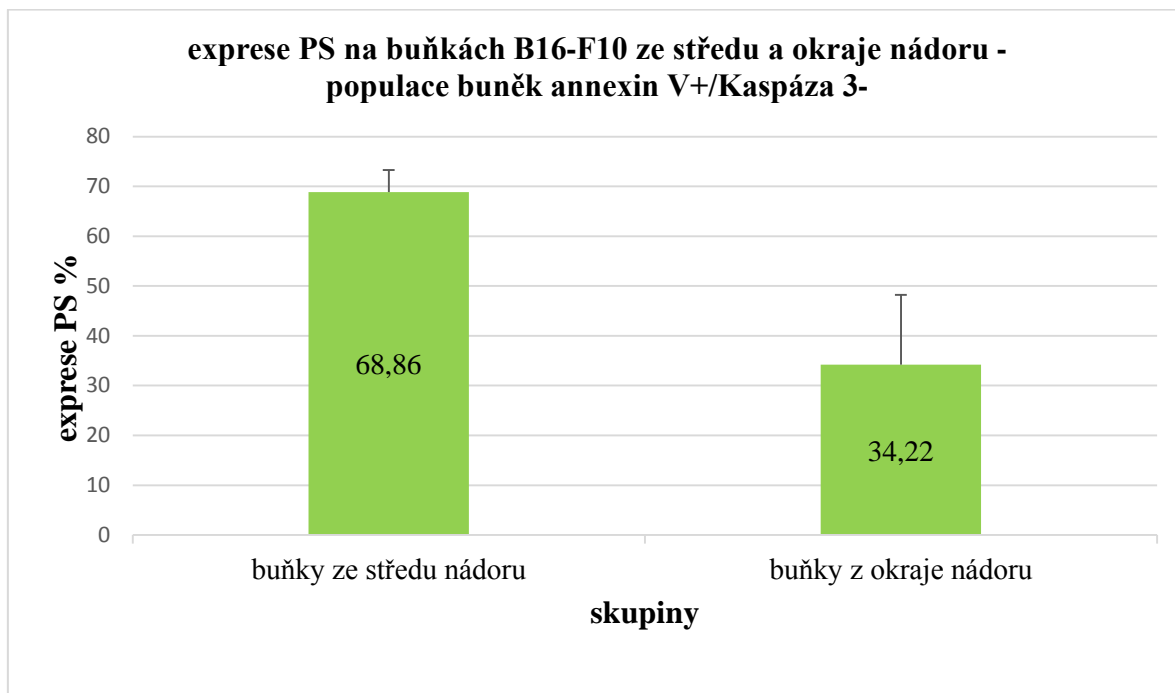


**Obr. 5:** Příklad výstupu z FACS analýzy u vzorku B16-F10 (okraj nádoru) s přítomností propidium jodidu.

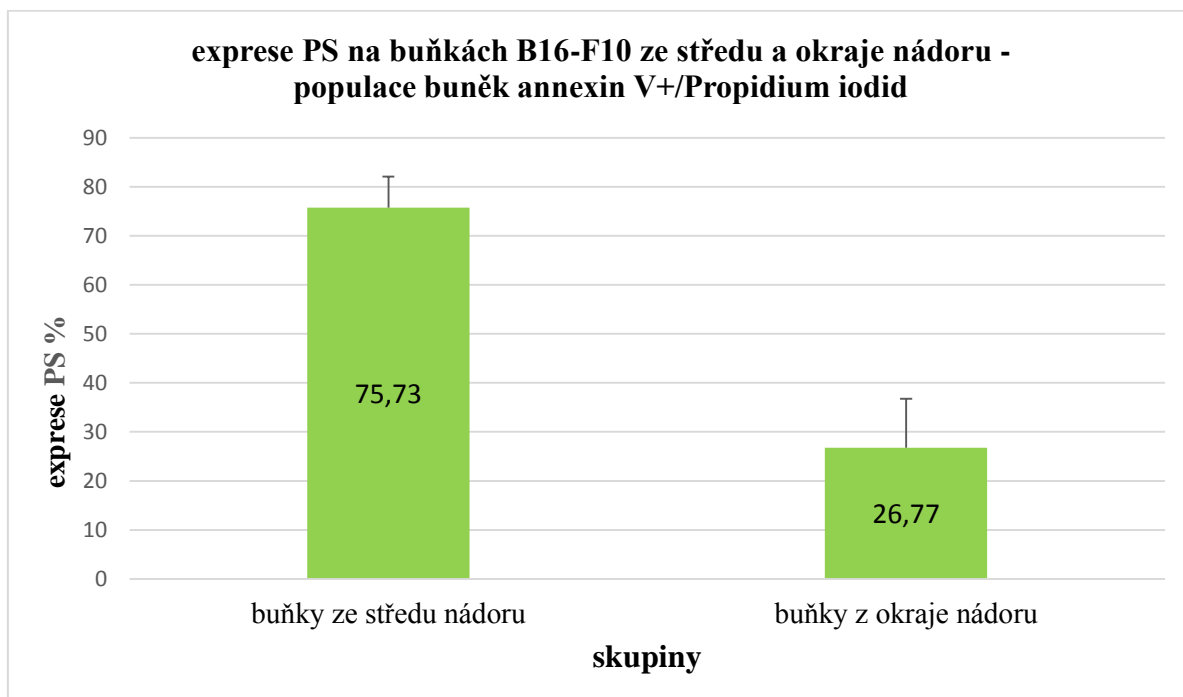
Z hlediska výsledků jsou cílovou populací buňky annexin V+/kaspáza 3-, respektive annexin V+/propidium iodide-. Tyto buňky exprimují PS a zároveň jsou živé.

Naměřené hodnoty živých PS exprimujících buněk i jejich procentuální zastoupení ve středu a okraji nádoru jsou zpracovány do grafu v Obr. 6 a Obr. 7 (na Obr. 6 byly mrtvé a umírající buňky eliminovány pomocí kaspázy 3 (apoptopické), na Obr. 7 pomocí PI (mrtvé)).

Z grafů vyplývá, že nezávisle na použití kaspázy 3 a PI exprimuje středová část nádoru více PS než okrajová část nádoru.



**Obr. 6:** Studium otázky exprese fosfatidylserinu na povrchu nádorových buněk odebraných ze středu a okraje nádoru - populace buněk annexin V+/kaspáza 3-.



**Obr. 7:** Studium otázky exprese fosfatidylserinu na povrchu nádorových buněk odebraných ze středu a okraje nádoru - populace buněk annexin V+/propidium jodid-.

### **5.1.1.1. Porovnání vhodnosti značení mrtvých/umírajících buněk pomocí propidium jodidu nebo kaspázy-3 v analýze exprese PS**

Při analýze exprese PS je podstatné odlišení živých a mrtvých buněk, proto byla v rámci tohoto pokusu zjišťována vhodnost značení mrtvých/umírajících buněk pomocí propidium jodidu nebo kaspázy-3.

Propidium iodide by měl být schopný označit buňky nekrotické, zatímco kaspáza 3 je přítomna v buňkách apoptotických. Podle výsledků se však zdá, že jak PI tak i substrát pro kaspázu – 3 značí téměř stejnou populaci buněk. Toto je zřejmé i z grafů Obr. 2 a Obr. 3, kdy bylo dosaženo velmi podobných hodnot živých buněk exprimujících PS jak za použití PI tak kaspázy-3 (rozdíly byly jen malé, pravděpodobně způsobené měřicí odchylkou).

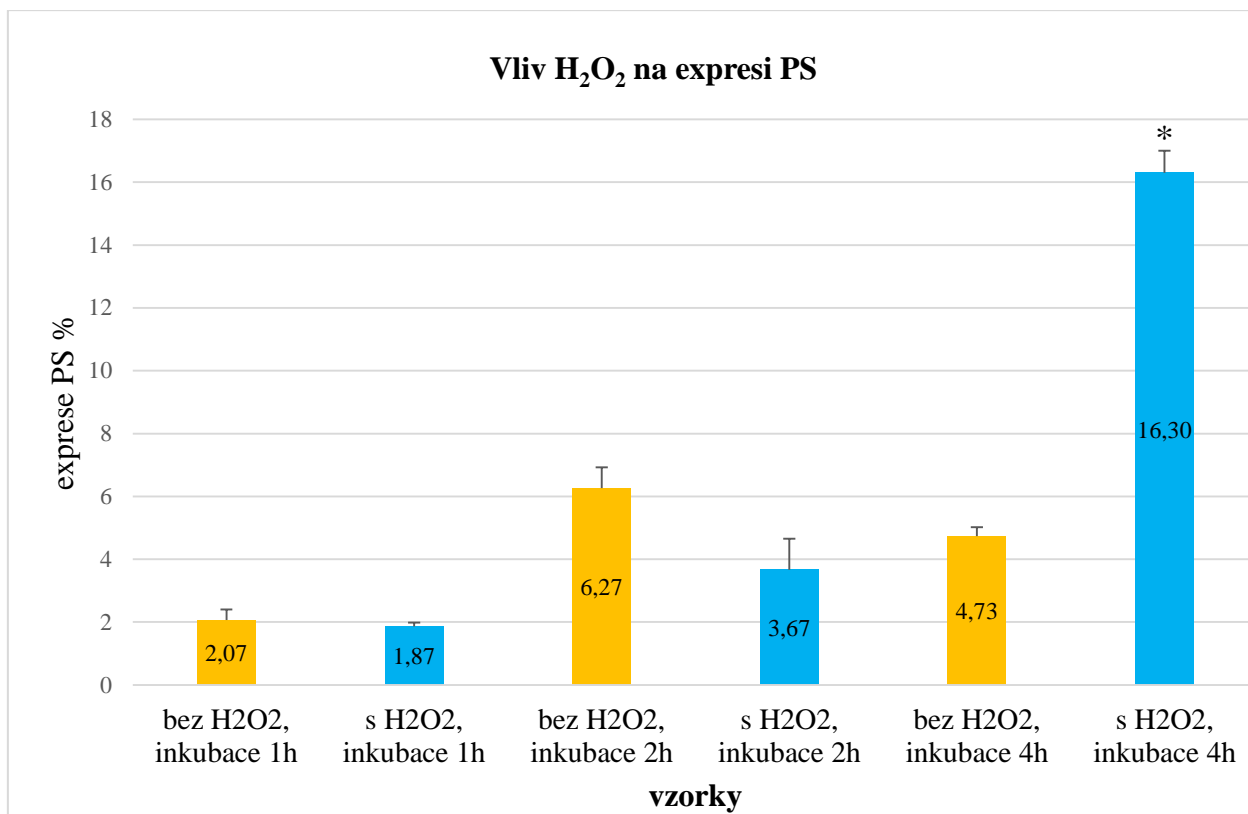
Eliminace mrtvých buněk pomocí PI umožnila lepší podmínky pro rozpoznání mrtvé a živých buněk (lépe rozlišitelná hranice pozitivita a negativita) nežli použití kaspázy-3. Z tohoto důvodu byl v následujícím experimentu použit PI pro eliminaci mrtvých/umírajících buněk.

### **5.1.2. Porovnání míry exprese fosfatidylserinu u nádorových buněk B16F10 v závislosti na působení peroxidu vodíku**

Pomocí Annexinu V a Propidium jodidu byly buňky opět rozděleny na 4 populace v závislosti na expresi fosfatidylserinu a průniku propidium jodidu do buněk.

Z hlediska výsledků byly opět cílovou populací buňky annexin V+/propidium jodid.

Na Obr. 8 je zobrazen graf, který vyjadřuje míru exprese fosfatidylserinu (PS) u buněk B16-F10 v závislosti na působení peroxidu vodíku. Z grafu vyplývá, že hodinová ani dvouhodinová inkubace buněk B16-F10 s peroxidem vodíku o dané koncentraci 0,1 mM nezpůsobuje zvýšení exprese PS. Po čtyřhodinové inkubaci můžeme vidět u skupiny s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zvýšení exprese PS na 16,3 %. Toto zvýšení exprese PS bylo však pravděpodobně způsobeno postupným umíráním buněk (buňky byly sice stále v průtokovém cytometru PI negativní - tedy „živé“, ale při bližším mikroskopickém zkoumání byly buňky neadherentní a jevíly známky umírání).



**Obr. 8:** Studium otázky exprese fosfatidylserinu na povrchu nádorových buněk z buněčné kultury B16-F10 v závislosti na působení peroxidu vodíku.

Hladiny statisticky významného rozdílu:

\* $p < 0,05$  vůči skupině bez H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

## 6. Diskuze

V rámci této práce bylo potvrzeno, že živé nádorové buňky melanomu B16-F10 exprimují PS a zároveň nepřecházejí do apoptózy. PS je tedy nádorový marker také u buněk, které nejsou apoptopické. Tento fakt je ve shodě s poznatkami Riedl a kol. z roku 2011. Tým Riedl a kol. navíc prokázal, že PS je exprimován nejen v nádorových buněčných liniích, ale také v metastázách. Použité nádorové linie v práci Riedl a kol. byly odvozeny z nenádorových buněk a maligních melanomů, z glioblastomu a z dalších typů nádorů. Shledaná exprese PS také nebyla znakem apoptózy, což se shoduje s naší prací.

Dále bylo v naší práci zjištěno, že exprese PS je větší u buněk, nacházejících se uvnitř nádoru než na jeho okraji. Tyto buňky také nejsou apoptopické ani nekrotické a exprese PS je jejich přirozená vlastnost. Tento fakt může souviset se sníženým množstvím O<sub>2</sub> a nižším pH ve středu nádoru, ale význam a mechanismus by bylo třeba objasnit.

Tato exprese dává předpoklad pro cílenou terapii. Je tedy možné uvažovat o komplexech annexinu V spolu s toxinem (Van Engeland a kol. 1998). Daná problematika byla řešena za pomoci látky bavituximab, což je protilátka proti PS. Léčebné efekty ale nebyly příliš silné (Gerber a kol. 2011). Protilátka má totiž velkou molekulovou hmotnost. Komplex protilátky s annexinem V bude tedy jen obtížně pronikat většinou velmi denzními nádory.

Vysoká koncentrace nádorově specifického PS umožňuje uvažovat o intratumorální aplikaci léčiva.

Buňky byly v této práci značeny kaspázou-3 (apoptopické buňky) a propidium jodidem (nekrotické buňky). Buněčné frakce označené kaspázou-3 odpovídaly buněčné frakci s PI, což umožnilo v dalším experimentu provádět značení mrtvých buněk PI. PI byl použit kvůli lepšímu rozlišení buněk v analýze z průtokového cytometru oproti rozlišení s kaspázou-3.

V rámci *in vitro* pokusu bylo zjištěno, že inkubace nádorových buněk B16-F10 s peroxidem vodíku vede po čtyřech hodinách ke zvýšené expresi PS. To odpovídá práci Ran a Thorpe z roku 2002, ve které byla měřena exprese PS na nádorových cévách. Ran a Thorpe zjistili, že PS se vyskytuje ve vysokém procentu na endoteliálních buňkách v různých solidních nádorech (40 % v B16 tumoru). Tyto buňky ve většině případů nevykazovaly známky apoptózy a PS pozitivní cévy nebyly morfologicky abnormální při pozorování ve světelném mikroskopu. Mírné oxidativní stresy, způsobené přímo (aplikací peroxidu vodíku)

či nepřímo (hypoxie/reoxygenace, acidita, thrombin, zánětlivé cytokiny – TNF, IL) možná hrají roli v indukci PS exprese na nádorovém endoteliu, ať již tyto stresy působí individuálně či kolektivně.

Z toho se dá usoudit, že pozorovaná exprese PS u nádorových buněk by mohla souviset s imunitními procesy probíhajícími v nádorech, kdy atak buněk vrozené imunity je spojen s oxidativním vzplanutím s produkcí peroxidu vodíku.

Bez ohledu na to, do jaké míry peroxid vodíku buňky poškodí, je exprese PS významná a použitelná. Buňky zabíjející látky (např. radiofarmaka), které by se vázaly na PS (např. prostřednictvím annexinu V) by přetrvávaly v nádoru déle a díky této imobilizaci by i déle působily.

Náš tým se zabývá nádorovou imunoterapií založenou na synergii TLR agonistů se stimulací fagocytózy (např. Janotová a kol. 2014, Caisová a kol. 2016, Waldmannová a kol. 2016). Pro stimulaci fagocytózy se používají ligandy vázající se na buňky nespecificky. Výrazný výskyt PS na nádorových buňkách vyskytujících se zejména uprostřed nádoru dává předpoklad pro konstrukci ligandů, vázajících se na nádorové buňky specificky. Imunitní atak je spojen s iniciací akutního zánětu, tudíž dochází i k produkci peroxidu vodíku. Ten, jak zjišťujeme, přispívá k zesílení exprese PS na povrchu nádorových buněk, a tedy zlepšuje dále podmínky pro vazbu ligandů.

K doposud používaným targetům je tedy možné uvažovat i o PS jakožto zajímavém cíli. Díky PS by mohl být umožněn targeting podporující atak vrozené imunity a navozující imunizaci organismus (Marabelle a kol., 2014).



## 7. Závěrečné shrnutí

- Byla provedena rešerše zaměřená na specifický targeting.
- Bylo zjištěno, že dochází k expresi PS jakožto markeru u nádoru B16-F10.
- Exprese PS u nádorových buněk B16-F10 je větší ve středu nádoru než na jeho okraji.
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> má vliv na expresi PS v buněčné linii B16-F10.

## 8. Literatura

Abella, J. V., & Park, M. (2009). Breakdown of endocytosis in the oncogenic activation of receptor tyrosine kinases. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 296(5), 973-984.

Alberts, B. (2002). *Molecular biology of the cell* (4th ed.). New York: Garland Science.

Andrae, J., Gallini, R., & Betsholtz, C. (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes & Development*, 22(10), 1276-1312.

Baer E., & Maurukas J. (1955). Phosphatidyl serine. *Journal of Biological Chemistry*, 212(1), 25-38.

Bates, D. O., Hillman, N. J., Williams, B., Neal, C. R., & Pocock, T. M. (2002). Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Journal of Anatomy*, 200(6), 581-597.

Baudino, T. (2015). Targeted cancer therapy: The next generation of cancer treatment. *Current Drug Discovery Technologies*, 12(1), 3-20.

Bevers, E. M., Comfurius, P., & Zwaal, R. F. A. (1996). Regulatory mechanisms in maintenance and modulation of transmembrane lipid asymmetry: pathophysiological implications. *Lupus*, 5(5), 480-487.

Bodine P. V. N., Stauffer B., Ponce-de-Leon H., Bhat R. A., Mangine A., Seestaller-Wehr L. M., Moran R. A., Billiard J., Fukayama S., Komm B. S., Pitts K., Krishnamurthy G., Gopalsamy A., Shi M. X., Kern J. C., Commons T. J., Woodworth R. P., Wilson M. A., Welmaker G. S., Trybulski E. J., & Moore W. J. (2009). A small molecule inhibitor of the Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 stimulates bone formation. *Bone*, 44(6), 1063-1068.

Bostrom, P. J., & Soloway, M. S. (2007). Secondary cancer after radiotherapy for prostate cancer: Should we be more aware of the risk? *European Urology*, 52(4), 973-982.

Brown, G. C., & Neher, J. J. (2012). Eaten alive! Cell death by primary phagocytosis: 'phagoptosis'. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(8), 325-332.

Buckland, A. G., & Wilton, D. C. (2000). Anionic phospholipids, interfacial binding and the regulation of cell functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1483(2), 199-216.

Burtness, B. (2007). Her signaling in pancreatic cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 7(6), 823-829.

Caisová, V., Vieru, A., Kumžáková, Z., Glaserová, S., Husníková, H., Vácová, N. Krejčová, G., Paďouková, L., Jochmanová, I., Wolf, K. I., Chmelař, J., Kopecký, J., & Ženka, J. (2016). Innate immunity based cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *BMC Cancer*, 16(1), 940.

Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011). Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(6), 417-427.

Carter, P. (2001). Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nature Reviews Cancer*, 1(2), 118-129.

Cotter, T. G. (2009). Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nature Reviews Cancer*, 9(7), 501-507.

Dann, C. E., Hsieh, J. C., Rattner, A., Sharma, D., Nathans, J., & Leahy, D. J. (2001). Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature*, 412(6842), 86-90.

des Rieux, A., Pourcelle, V., Cani, P. D., Marchand-Brynaert, J., & Prétat, V. (2013). Targeted nanoparticles with novel non-peptidic ligands for oral delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(6), 833-844.

Eedy, D. J. (2003). Surgical treatment of melanoma. *British Journal Of Dermatology*, 149(1), 2-12.

Eskens, F. A., de Jonge, M. J., Bhargava, P., Isoe, T., Cotreau, M. M., & Esteves, B. (2011). Biologic and clinical activity of tivozanib (AV-951, KRN-951), a selective inhibitor of VEGF receptor-1,-2, and-3 tyrosine kinases, in a 4-week-on, 2-week-off schedule in patients with advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research*, *17*(22), 7156-7163.

Fan, Z., Masui, H., Altas, I., & Mendelsohn, J. (1993). Blockade of epidermal growth factor receptor function by bivalent and monovalent fragments of 225 anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Research*, *53*(18), 4322-4328.

Filipovich, A., Gehrke, I., Poll-Wolbeck, S. J., & Kreuzer, K. A. (2011). Physiological inhibitors of Wnt signaling. *European Journal of Haematology*, *86*(6), 453-465.

Frisch, S. M., & Screaton, R. A. (2001). Anoikis mechanisms. *Current Opinion in Cell Biology*, *13*(5), 555-562.

Fulda, S. (2010). Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. *International Journal of Cell Biology*, *2010*(2010), 370835.

Gerber, D. E. (2008). Targeted therapies: A new generation of cancer treatments. *American Family Physician*, *77*(3), 311-319.

Gerber, D. E., Stopeck, A. T., Wong, L., Rosen, L. S., Thorpe, P. E., Shan, J. S., & Ibrahim, N. K. (2011). Phase I Safety and Pharmacokinetic Study of Baviximab, a Chimeric Phosphatidylserine-Targeting Monoclonal Antibody, in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*, *17*(21), 6888-6896.

Gerber, H. P., Koehn, F. E., & Abraham, R. T. (2013). The antibody-drug conjugate: an enabling modality for natural product-based cancer therapeutics. *Natural Product Reports*, *30*(5), 625-639.

Glassman, P. M., & Balthasar, J. P. (2014). Mechanistic considerations for the use of monoclonal antibodies for cancer therapy. *Cancer Biology & Medicine*, *11*(1), 20-33.

Grothey, A., Sugrue, M. M., Purdie, D. M., Dong, W., Sargent, D., Hedrick, E., & Kozloff, M. (2008). Bevacizumab beyond first progression is associated with prolonged overall

survival in metastatic colorectal cancer: results from a large observational cohort study (BRiTE). *Journal of Clinical Oncology*, 26(33), 5326-5334.

Gu, F., Zhang, L., Teply, B. A., Mann, N., Wang, A., Radovic-Moreno, A. F., Langer, R., & Farokhzad, O. C. (2008). Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(7), 2586-2591.

Gül, N., & van Egmond, M. (2015). Antibody-dependent phagocytosis of tumor cells by macrophages: a potent effector mechanism of monoclonal antibody therapy of cancer. *Cancer Research*, 75(23), 5008-5013.

Haglund, K., Rusten, T. E., & Stenmark, H. (2007). Aberrant receptor signaling and trafficking as mechanisms in oncogenesis. *Critical Reviews™ in Oncogenesis*, 13(1).

Halazonetis, T. D., Gorgoulis, V. G., & Bartek, J. (2008). An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science*, 319(5868), 1352-1355.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.

Hashizume, H., Baluk, P., Morikawa, S., McLean, J. W., Thurston, G., Roberge, S., Jain, R. K., & McDonald D. M. (2000). Openings between Defective Endothelial Cells Explain Tumor Vessel Leakiness. *The American Journal Of Pathology*, 156(4), 1363-1380.

He B., You L., Uematsu K., Xu Z. D., Lee A. Y., Matsangou M., McCormick F., & Jablons D. M. (2004). A monoclonal antibody against Wnt-1 induces apoptosis in human cancer cells. *Neoplasia*, 6(1), 7-14.

Heinrich, M. C., Griffith, D., McKinley, A., Patterson, J., Presnell, A., Ramachandran, A., & Debiec-Rychter, M. (2012). Crenolanib inhibits the drug-resistant PDGFRA D842V mutation associated with imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Clinical Cancer Research*, 18(16), 4375-4384.

Herbst, R. S. (2004). Review of epidermal growth factor receptor biology. *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*, 59(2), S21-S26.

Hjelmeland M., Hjelmeland A., Sathornsumetee S., Herbstreith M. H., Laping N. J., Bigner D. D., Wang X. F., & Rich J. N. (2004). SB-431542, a small molecule transforming growth factor-Breceptor antagonist, inhibits human glioma cell line proliferation and motility. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(6), 737-745.

Hobbs, S. K., Monsky, W. L., Yuan, F., Roberts, W. G., Griffith, L., Torchilin, V. P., & Jain, R. K. (1998). Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(8), 4607-4612.

Hořejší, V. (2013). *Základy imunologie* (5. vyd.). Praha: Triton.

Houde C., Li Y., Song L., Barton K., Zhang Q., Godwin J., Nand S., Toor A., Alkan S., Smadja N. V., Avet-Loiseau H., Lima C. S., Miele L., & Coignet L. J. (2004). Overexpression of the NOTCH ligand JAG2 in malignant plasma cells from multiple myeloma patients and cell lines. *Blood*, 104(12), 3697-3704.

Hubbard, S. R., & Till, J. H. (2000). Protein tyrosine kinase structure and function. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 373-398.

Hutchin M. E., Kariapper M. S. T., Grachtchouk M., Wang A. Q., Wei L. B., Cummings D., Liu J. H., Michael L. E., Glick A., & Dlugosz A. A. (2005). Sustained Hedgehog signaling is required for basal cell carcinoma proliferation and survival: conditional skin tumorigenesis recapitulates the hair growth cycle. *Genes & Development*, 19(2), 214-223.

Chauhan, V. P., Stylianopoulos, T., Martin, J. D., Popović, Z., Chen, O., Kamoun, W. S., Bawendi, M. G., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2012). Normalization of tumour blood vessels improves the delivery of nanomedicines in a size-dependent manner. *Nature Nanotechnology*, 7(6), 383-388.

Chen, J. K., Taipale, J., Cooper, M. K., & Beachy, P. A. (2002). Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes & Development*, 16(21), 2743-2748.

Ionov, Y., Yamamoto, H., Krajewski, S., Reed, J. C., & Perucho, M. (2000). Mutational inactivation of the proapoptotic gene BAX confers selective advantage during tumor clonal evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(20), 10872-10877.

Jain, R. K., & Stylianopoulos, T. (2010). Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 7(11), 653-664.

Janotová, T., Jalovecká, M., Auerová, M., Švecová, I., Bruzlová, P., Maierová, V., Kumžáková, Z., Čunátová, Š., Vlčková, Z., Caisová, V., & Rozsypalová, P. (2014). The use of anchored agonists of phagocytic receptors for cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *PloS One*, 9(1), e85222.

Jiang, W., Kim, B. Y., Rutka, J. T., & Chan, W. C. (2008). Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nature Nanotechnology*, 3(3), 145-150.

Johnson, L. N. (2009). Protein kinase inhibitors: contributions from structure to clinical compounds. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 42(01), 1-40.

Jones, S. F., Spigel, D. R., Yardley, D. A., Thompson, D. F., & Burris 3rd, H. A. (2011). A phase I trial of vatalanib (PTK/ZK) in combination with bevacizumab in patients with refractory and/or advanced malignancies. *Clinical Advances in Hematology & Oncology*, 9(11), 845-852.

Karhadkar S. S., Bova G. S., Abdallah N., Dhara S., Gardner D., Maitra A., Isaacs J. T., Berman D. M., & Beachy P. A. (2004). Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature*, 431(7009), 707-712.

Katoh, M., & Katoh, M. (2007). WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clinical Cancer Research*, 13(14), 4042-4045.

Kaufmann, S. H., & Vaux, D. L. (2003). Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance. *Oncogene*, 22(47), 7414-7430.

Kay, J. G., & Grinstein, S. (2011). Sensing phosphatidylserine in cellular membranes. *Sensors*, 11(2), 1744-1755.

- Klener, P. (2013). *Principy systémové protinádorové léčby*. Praha: Grada.
- Koutecký, J. (1997). *Nádorová onemocnění dětí a mladistvých*. Praha: Karolinum.
- Krause, D. S., & Van Etten, R. A. (2005). Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *New England Journal of Medicine*, *353*(2), 172-187.
- Kubeš, J. (2013). Protonová terapie v léčbě nádorových onemocnění. *Postgraduální Medicína*, *15*(3), 264-268.
- Lee, S. H., Meng, X. W., Flatten, K. S., Loegering, D. A., & Kaufmann, S. H. (2013). Phosphatidylserine exposure during apoptosis reflects bidirectional trafficking between plasma membrane and cytoplasm. *Cell Death & Differentiation*, *20*(1), 64-76.
- Levy, L., & Hill, C. S. (2006). Alterations in components of the TGF- $\beta$  superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *17*(1), 41-58.
- Liang, G., Liu, Z., Wu, J., Cai, Y., & Li, X. (2012). Anticancer molecules targeting fibroblast growth factor receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, *33*(10), 531-541.
- Lin, K., & Tibbitts, J. (2012). Pharmacokinetic considerations for antibody drug conjugates. *Pharmaceutical Research*, *29*(9), 2354-2366.
- Makin, G., & Hickman, J. A. (2000). Apoptosis and cancer chemotherapy. *Cell and Tissue Research*, *301*(1), 143-152.
- Marabelle, A., Kohrt, H., Caux, C., & Levy, R. (2014). Intratumoral immunization: a new paradigm for cancer therapy. *Clinical Cancer Research*, *20*(7), 1747-1756.
- Martin, S., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., Schie, R. C. V., LaFace, D. M., & Green, D. R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *Journal of Experimental Medicine*, *182*(5), 1545-1556.



Martins, F. & de Oliveira, C. (2009). Chemotherapy and the future: microdialysis as a local administration technique. *European Journal of Gynaecological Oncology*, 30(1), 5-8.

Matsuyama S., Iwadata M., Kondo M., Saitoh M., Hanyu A., Shimizu K., Aburatani H., Mishima H. K., Imamura T., Miyazono K., & Miyazawa K. (2003). SB-431542 and Gleevec inhibit transforming growth factor- $\beta$ -induced proliferation of human osteosarcoma cells. *Cancer Research*, 63(22), 7791-7798.

Meiler, J., & Schuler, M. (2006). Therapeutic targeting of apoptotic pathways in cancer. *Current Drug Targets*, 7(10), 1361-1369.

Miyamoto Y., Maitra A., Ghosh B., Zechner U., Argani P., Iacobuzio-Donahue C. A., Sriuranpong V., Iso T., Meszoely I. M., Wolfe M. S., Hruban R. H., Ball D. W., Schmid R. M., & Leach S. D. (2003). Notch mediates TGF  $\alpha$ -induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell*, 3(6), 565-576.

Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., Hoffman B., & Reed, J. C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*, 9(6), 1799-1805.

Mladosičová, B. (2014). Kardioonkologie: 2., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada.

Nakamura M., Kubo M., Yanai K., Mikami Y., Ikebe M., Nagai S., Yamaguchi K., Tanaka M., & Katano M. (2007). Anti-patched-1 antibodies suppress hedgehog signaling pathway and pancreatic cancer proliferation. *Anticancer Research*, 27(6A), 3743-3747.

Nam J. S., Suchar A. M., Kang M. J., Stuelten C. H., Tang B. W., Michalowska A. M., Fisher L. W., Fedarko N. S., Jain A., Pinkas J., Lonning S., & Wakefield L. M. (2006). Bone sialoprotein mediates the tumor cell-targeted prometastatic activity of transforming growth factor beta in a mouse model of breast cancer. *Cancer Research*, 66(12), 6327-6335.

Naoe, T., & Kiyoi, H. (2004). Normal and oncogenic FLT3. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 61(23), 2932-2938.

- Negrini, S., Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *11*(3), 220-228.
- Odes, E. J., Randolph-Quinney, P. S., Steyn, M., Throckmorton, Z., Smilg, J. S., Zipfel, B., Augustine, T. N., de Beer, F., Hoffman, J. W., Franklin, R. D., & Berger, L. R. (2016). Earliest hominin cancer: 1.7-million-year-old osteosarcoma from Swartkrans Cave, South Africa. *South African Journal Of Science*, *112*(7-8), 1-5.
- Ono, M., & Kuwano, M. (2006). Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and response to gefitinib and other EGFR-targeting drugs. *Clinical Cancer Research*, *12*(24), 7242-7251.
- Padera, T. P., Stoll, B. R., Rooredman, J. B., & Capen, D. (2004). Cancer cells compress intratumour vessels. *Nature*, *427*(6976), 695.
- Papkoff, J., Brown, A. M., & Varmus, H. E. (1987). The int-1 proto-oncogene products are glycoproteins that appear to enter the secretory pathway. *Molecular and Cellular Biology*, *7*(11), 3978-3984.
- Patel, M. P., Masood, A., Patel, P. S., & Chanan-Khan, A. A. (2009). Targeting the Bcl-2. *Current Opinion in Oncology*, *21*(6), 516-523.
- Pepper, M. S., Ferrara, N., Orci, L., & Montesano, R. (1992). Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *189*(2), 824-831.
- Prager, G. W., Lackner, E. -M., Krauth, M. -T., Unseld, M., Poettler, M., Laffer, S., Cerny-Reiterer, S., Lamm, W., Kornek, G. V., Binder, B. R., Zielinski, Ch. C., & Valent, P. (2010). Targeting of VEGF-dependent transendothelial migration of cancer cells by bevacizumab. *Molecular Oncology*, *4*(2), 150-160.
- Radha, V., Nambirajan, S., & Swarup, G. (1996). Association of lyn tyrosine kinase with the nuclear matrix and cell-cycle-dependent changes in matrix-associated tyrosine kinase activity. *European Journal of Biochemistry*, *236*(2), 352-359.

- Raimondi L., Ciarapica R., De Salvo M., Verginelli F., Gueguen M., Martini C., De Sio L., Cortese G., Locatelli M., Dang T. P., Carlesso N., Miele L., Stifani S., Limon I., Locatelli F., & Rota R. (2012). Inhibition of Notch3 signalling induces rhabdomyosarcoma cell differentiation promoting p38 phosphorylation and p21(Cip1) expression and hampers tumour cell growth in vitro and in vivo. *Cell Death Differ*, 19(5), 871-881.
- Ran, S., & Thorpe, P. E. (2002). Phosphatidylserine is a marker of tumor vasculature and a potential target for cancer imaging and therapy. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 54(5), 1479-1484.
- Reed, J., Jurgensmeier, J., & Matsuyama, S. (1998). Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1366(1), 127-137.
- Riedl S., Rinner B., Asslaber M., Schaidler H., Walzer S., Novak A., Lohner K., & Zweytick D. (2011). In search of a novel target—phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1808(11), 2638-2645.
- Robertson, S. C., Tynan, J. A., & Donoghue, D. J. (2000). RTK mutations and human syndromes: when good receptors turn bad. *Trends in Genetics*, 16(6), 265-271.
- Robinson, K. W., & Sandler, A. B. (2013). EGFR tyrosine kinase inhibitors: difference in efficacy and resistance. *Current Oncology Reports*, 15(4), 396-404.
- Saber, M. M., Adeyemi Babarinde, I., Hettiarachchi, N., & Saitou, N. (2016). Emergence and evolution of hominidae-specific coding and noncoding genomic sequences. *Genome Biology And Evolution*, 8(7), 2076-2092.
- Saha, R. N., Vasanthakumar, S., Bende, G., & Snehalatha, M. (2010). Nanoparticulate drug delivery systems for cancer chemotherapy. *Molecular Membrane Biology*, 27(7), 215-231.
- Santagata S., Demichelis F., Riva A., Varambally S., Hofer M. D., Kutok J. L., Kim R., Tang J., Montie J. E., Chinnaiyan A. M., Rubin M. A., & Aster J. C. (2004). JAGGED1 expression is associated with prostate cancer metastasis and recurrence. *Cancer Research*, 64(19), 6854-6857.

- Seigneuret, M., & Devaux, P. F. (1984). ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *81*(12), 3751-3755.
- Shah, D. R., Shah, R. R., & Morganroth, J. (2013). Tyrosine kinase inhibitors: their on-target toxicities as potential indicators of efficacy. *Drug Safety*, *36*(6), 413-426.
- Sharkey, R. M., Press, O. W., & Goldenberg, D. M. (2009). A re-examination of radioimmunotherapy in the treatment of non-Hodgkin lymphoma: prospects for dual-targeted antibody/radioantibody therapy. *Blood*, *113*(17), 3891-3895.
- Snustad, D. P., & Simmons, M. J. Relichová, J. (Ed.). (2009). *Genetika*. (J. Relichová, Ed.). Brno: Masarykova univerzita.
- Strojan, P. (2010). Role of radiotherapy in melanoma management. *Radiology And Oncology*, *44*(1), 1-12.
- Tsai, C. J., & Nussinov, R. (2013). The molecular basis of targeting protein kinases in cancer therapeutics. *Seminars in Cancer Biology*, *23*(4), 235-242.
- Tschopp, J., Martinon, F., & Hofmann, K. (1999). Apoptosis: silencing the death receptors. *Current Biology*, *9*(10), R381-R384.
- Vance, J. E., & Steenbergen, R. (2005). Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Progress in Lipid Research*, *44*(4), 207-234.
- Van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., Schutte, B., & Reutelingsperger, C. P. (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, *31*(1), 1-9.
- Verkleij, A. J., Zwaal, R. F. A., Roelofsen, B., Comfurius, P., Kastelij, D., & Van Deenen, L. L. M. (1973). The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *323*(2), 178-193.

Waldmannová, E., Caisová, V., Fáberová, J., Sváčková, P., Kovářová, M., Sváčková, D., Kumžáková, Z., Jačková, A., Vácová, N., Nedbalová, P., & Horká, M. (2016). The use of Zymosan A and bacteria anchored to tumor cells for effective cancer immunotherapy: B16-F10 murine melanoma model. *International Immunopharmacology*, *39*, 295-306.

Watson, M. E. (1984). Compilation of published signal sequences. *Nucleic Acids Research*, *12*(13), 5145.

Wayne, A. S., Bhojwani, D., Silverman, L. B., Richards, K., Stetler-Stevenson, M., Shah, N. N., Jeha, S., Pui, C., Buzoianu, M., FitzGerald, D. J., Kreitman, R. J., Ibrahim, R., & Pastan, I. (2011). A novel anti-CD22 immunotoxin, moxetumomab pasudotox: phase I study in pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood*, *118*(21), 248.

Weinstein, I. B. (2000). Disorders in cell circuitry during multistage carcinogenesis: the role of homeostasis. *Carcinogenesis*, *21*(5), 857-864.

Wicha, M. S., Liu, S., & Dontu, G. (2006). Cancer stem cells: an old idea—a paradigm shift. *Cancer Research*, *66*(4), 1883-1890.

Yamamoto, Y., Kiyoi, H., Nakano, Y., Suzuki, R., Kodera, Y., Miyawaki, S., Asou, N., Kuriyama, K., Yagasaki, F., Shimazaki, C., Akiyama, H., Saito, K., Nishimura, M., Motoji, T., Shinagawa, K., Takeshita, A., Saito, H., Ueda, R., Ohno, R., & Naoe, T. (2001). Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*, *97*(8), 2434-2439.

Yu, B. O., Tai, H. C., Xue, W., Lee, L. J., & Lee, R. J. (2010). Receptor-targeted nanocarriers for therapeutic delivery to cancer. *Molecular Membrane Biology*, *27*(7), 286-298.

Zhou, Q., Zhao, J., Stout, J. G., Luhm, R. A., Wiedmer, T., & Sims, P. J. (1997). Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase a protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(29), 18240-18244.