

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Autoreferát dizertační práce



**Proteomické přístupy ke studiu nádorových onemocnění**

Lucie Lorková

Praha 2014

## **Doktorské studijní programy v biomedicíně**

*Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky*

**Obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie**

**Předseda oborové rady: Prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc.**

**Školící pracoviště: Ústav patologické fyziologie, 1. lékařská fakulta,  
Univerzita Karlova, Praha**

**Školitel: Doc. RNDr. Jiří Petrák, PhD.**

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

## Obsah

<b>1</b>	<b>Abstrakt</b> .....	1
<b>2</b>	<b>Abstract</b> .....	3
<b>3</b>	<b>Proteom a proteomika</b> .....	5
<b>4</b>	<b>Identifikace potenciálních diagnostických markerů karcinomu ovaria</b> .....	7
4.1	Karcinom ovaria .....	7
4.2	Cíl práce.....	7
4.3	Porovnávací proteomická analýza sér zdravých žen a sér žen s karcinomem ovaria.....	7
4.4	Výsledky .....	9
4.5	Diskuze .....	12
<b>5</b>	<b>Objasnění molekulárních mechanismů rezistence lymfomu z buněk pláštěvé zóny na cytarabin</b> .....	14
5.1	Lymfom z buněk pláštěvé zóny .....	14
5.2	Cíl práce.....	16
5.3	Funkční charakteristika buněk MCL rezistentních na cytarabin a popis molekulárních změn v těchto buňkách. ....	17
5.4	Výsledky .....	18
5.5	Diskuze .....	21

<b>6</b>	<b>Hledání nových zásahových míst - identifikace molekulárních změn v buňkách lymfomu z buněk pláštěvé zóny (MCL) rezistentních na molekulu TRAIL .....</b>	<b>23</b>
6.1	TRAIL.....	23
6.2	Cíl práce.....	23
6.3	Odvození buněk MCL rezistentních na TRAIL a popis molekulárních změn v těchto buňkách.....	24
6.4	Výsledky .....	24
6.5	Diskuze .....	26
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>30</b>
<b>8</b>	<b>Publikace.....</b>	<b>31</b>
<b>9</b>	<b>Reference.....</b>	<b>32</b>

## 1 Abstrakt

Proteomika, jako soubor metod, technik a konceptů, byla využita ve třech projektech zaměřených na diagnózu a terapii onkologických onemocnění.

První práce byla zaměřena na hledání spolehlivých a dostatečně senzitivních biomarkerů pro detekci karcinomu ovaria. Dvěma odlišnými proteomickými přístupy jsme analyzovali séra žen s epiteliálním karcinomem ovaria a séra zdravých žen. Identifikovali jsme protein  $\alpha$ -1-antitrypsin s významně zvýšenou koncentrací v sérech pacientek a apolipoprotein A4 a retinol-binding protein 4 (RBP4) s významně sníženou koncentrací v sérech pacientek. Snížená koncentrace RBP4 v sérech žen s karcinomem ovaria může být výsledkem snížené produkce RBP4 ovariem nebo odrazem časných komplexních systematických změn v tělech pacientek.

Cílem druhé práce bylo popsat molekulární mechanismus rezistence na cytarabin v buňkách lymfomu z buněk pláštové zóny (MCL). K proteomické analýze byly použity buněčné linie odvozené od MCL a z těchto buněčných linií byly získány subklony rezistentní na cytarabin. Mezi nalezenými změnami exprese proteinů byla detekována významná změna exprese deoxycytidin kinázy (DCK), jež je klíčovým enzymem v aktivaci purinových a pyrimidinových nukleosidů a jejich analogů. Buňky MCL rezistentní na cytarabin byly rovněž křížově rezistentní k jiným terapeutickým nukleosidovým antimetabolitům (gemcitabin, kladribin, fludarabin). Rezistence na cytarabin a křížová rezistence v buňkách MCL jsou spojeny se sníženou expresí deoxycytidin kinázy. Z toho vyplývá, že by pacienti s MCL, u kterých došlo k relapsu a selhání protinádorové terapie založené na cytarabinu, neměli být dále léčeni nukleosidovými analogy.

Poslední práce usilovala o identifikaci molekulárních změn zodpovědných a spojených s rezistencí na TRAIL v buňkách MCL, které by mohly představovat potenciální terapeutický cíl k eliminaci TRAIL-rezistentních buněk MCL. Analýzou proteomů buněk MCL rezistentních a senzitivních na TRAIL byly nalezeny tři proteiny s významně sníženou expresí, jmenovitě purin nukleosid fosforyláza, adenin fosforibosyl transferáza a inosin 5-monofosfát dehydrogenáza 2. Tyto proteiny jsou klíčovými enzymy v metabolismu purinů a jejich snížená exprese může silně ovlivňovat homeostázu nukleotidů v TRAIL-rezistentních buňkách MCL. Oslabení metabolismu purinů představuje potenciální „slabinu“ TRAIL-rezistentních buněk MCL, kterou je možné dalším cíleným zásahem do metabolismu purinů využít k eliminaci TRAIL-rezistentních buněk.

## 2 Abstract

Proteomics as a modern comprehensive approach to the analysis of proteomes was applied in three projects aimed at diagnosis and therapy of cancer.

The aim of the first the project was to find a new diagnostic biomarker for ovarian cancer. Two different comparative proteomic approaches were used for comparative analysis of sera from patients diagnosed with ovarian cancer and from healthy age-matched women. We identified  $\alpha$ -1-antitrypsin with increased concentration in patient sera, and apolipoprotein A4 and retinol-binding protein 4 (RBP4) with significantly decreased concentration in patients. The significantly decreased concentration of RBP4 in patients is a new observation. We propose that RBP4 is either decreased in ovarian cancer patients as a result of its reduced production by ovary or it may reflect less specific systemic changes, for instance early onset of cancer cachexia.

The second project was focused on gaining insight into the molecular mechanism of cytarabine resistance in mantle cell lymphoma (MCL). Proteomic and transcriptomic analyses of cytarabine-resistant cells revealed marked downregulation of deoxycytidine kinase (DCK) – a protein essential to intracellular activation of purine and pyrimidine nucleosides and their analogues including cytarabine. The cytarabine-resistant MCL cells exhibited cross-resistance to other nucleoside antimetabolites (gemcitabine, cladribine, fludarabine). We conclude that the downregulation of DCK is the molecular mechanism of acquired resistance to cytarabine, gemcitabine, fludarabine in the MCL cells. Our data suggest that nucleoside analogs

should not be used in therapy of MCL patients, who relapse after failure of cytarabine-based therapies.

The objective of the third study was to identify the secondary molecular changes associated with resistance of MCL cells to cytokine TRAIL. Such changes could be exploited as a potential targets for selective elimination of such resistant cells. Using proteomic analysis we identified decreased expression of three enzymes involved in purine metabolism, namely nucleoside phosphorylase, adenine phosphoribosyltransferase and inosine-5'-monophosphate dehydrogenase in TRAIL-resistant MCL cells. Downregulation of these three enzymes may render TRAIL-resistant cells vulnerable to further disruption of purine nucleotide metabolism. This pathway thus represents a potential therapeutic target for selective elimination of such cells.



### 3 Proteom a proteomika

Pojem **proteom** představuje soubor všech proteinů, které se nacházejí v organismu, tkáni nebo v buňce v určitém okamžiku a zahrnuje veškeré modifikace, vzájemné interakce, lokalizace a metabolický obrat. Nástrojem pro studium sady proteinů je **proteomika**, jejímž cílem je nejen identifikovat všechny přítomné proteiny, ale zároveň pochopit jejich funkci a strukturu a vytvořit tak proteinovou mapu organismu, tkáně nebo buňky. Hlavními pilíři proteomiky jsou elektroforetické a chromatografické separační techniky a **hmotnostní spektrometrie**, která umožňuje proteiny identifikovat a kvantifikovat.

Kvantitativním porovnáním proteomů je možné popsat molekulární změny, ke kterým dochází za různých fyziologických a patologických stavů. Tato dizertační práce dokumentuje úspěšnou aplikaci různých proteomických postupů a metod v experimentální onkologii. Řešili jsme tři projekty zaměřené na diagnózu a terapii onkologických onemocnění. První práce se zabývá identifikací potenciálních diagnostických biomarkerů karcinomu ovaria v krevním séru pacientek, zatímco další dvě práce se soustřeďují na rezistenci buněk lymfomu na terapii. Ve druhé studii jsme se zaměřili na odhalení molekulárního mechanismu rezistence buněk lymfomu z plášťové zóny (Mantle cell lymphoma, MCL) na standardní terapii založenou na cytarabinu a ve třetí práci jsme usilovali o odhalení nových zásahových míst pro selektivní likvidaci buněk MCL rezistentních na experimentální protinádorovou molekulu TRAIL.

**V našich pracích jsme se kromě dosažení jejich primárních cílů snažili demonstrovat, že proteomika je cenným nástrojem k získávání vhledu do patologických procesů, ale může též poskytovat klinicky významné informace přenositelné do klinické praxe.**

## **4 Identifikace potenciálních diagnostických markerů karcinomu ovaria**

### **4.1 Karcinom ovaria**

Nádory ovaria jsou pátou nejčastější příčinou úmrtí žen na malignitu. V České republice je ročně diagnostikováno přibližně 1200 žen s nádorem ovaria, z nichž 700 žen každý rok onemocní podlehne ([www.svod.cz](http://www.svod.cz)). Vysoká úmrtnost žen je dána nepřítomností symptomů v počátečních stádiích onemocnění a absencí senzitivních diagnostických biomarkerů.

Biomarker je biologická molekula vykazující reprodukovatelné rozdíly v expresi či struktuře, jež jsou specifické pro dané onemocnění. Biomarkerem mohou být proteiny, nukleové kyseliny, malé molekuly, metabolity, a podobně, nacházející se ve snadno dostupné tkáni či tělní tekutině. Nedostatečná specifita a senzitivita dostupných markerů karcinomu ovaria (CA125, HE4) si vynucuje hledání nových molekul s diagnostickým potenciálem (Moore et al., 2008, Sarojini et al., 2012).

### **4.2 Cíl práce**

Cílem této práce bylo pomocí proteomických technik porovnat krevní séra pacientek s ovariálním karcinomem a zdravých žen a identifikovat tak proteiny, které by mohly být využitelné jako diagnostické markery.

### **4.3 Porovnávací proteomická analýza sér zdravých žen a sér žen s karcinomem ovaria**

Výchozím materiálem byla krevní séra zdravých žen (kontroly) a žen s karcinomem ovaria (pacientky) před zahájením léčby. Krevní sérum bylo

zvoleno kvůli výjimečnosti obsahu informací a jeho dostupnosti. U pacientek zahrnutých v této studii byla histologicky potvrzena přítomnost karcinomu ovaria. Věkový průměr ( $53,6 \pm 5,3$ ) pacientek odpovídal věkovému průměru zdravých žen ( $51,4 \pm 5,8$ ). K potlačení potenciální vnitřní variability byly sérové vzorky 10 žen s diagnostikovaným karcinomem ovaria smíchány a stejně tak tomu bylo u 10 sérových vzorků zdravých žen.

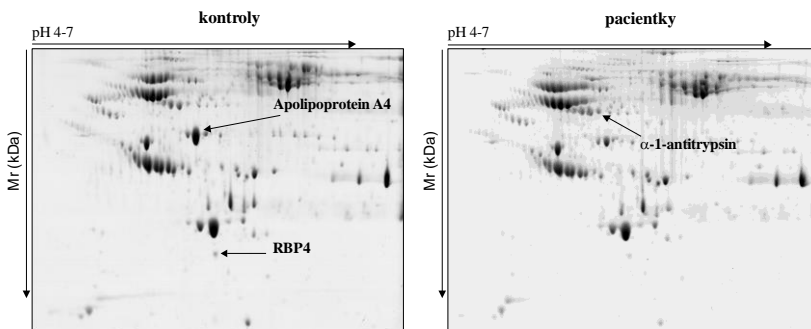
Proteom séra představuje velmi komplexní směs několika tisíc proteinů s výjimečným rozsahem koncentrací proteinů dosahujícím až 10 řádů (Anderson a Anderson, 2002). Analýzu séra komplikuje 22 nejkonzentrovanejších proteinů, jež představují přibližně 99% hmotnosti všech proteinů v séru (Anderson a Anderson, 2002). Tyto majoritní proteiny ztěžují analýzu proteinů méně hojných a před vlastní analýzou séra je nutné vypořádat se s vysokou koncentrací několika nejhojnějších proteinů.

K hledání sérových proteinů jako potenciálních markerů karcinomu ovaria byly zvoleny dva odlišné proteomické přístupy kombinující dva různé způsoby k překonání koncentračních rozdílů:

1. přístup (2-DE) - ekvalizace koncentrací proteinů vazbou na hexapeptidovou knihovnu s následnou 2-D elektroforézou a identifikací proteinů hmotnostní spektrometrií
2. přístup („shot-gun“) - imunoafinitní deplece 14 nejvíce zastoupených proteinů s následným štěpením a značením peptidů izotopickými iTRAQ značkami, jejich separací izoelektrickou fokusací na imobilizovaných pH gradientech a kapalinovou chromatografií ve spojení s hmotnostní spektrometrií

#### 4.4 Výsledky

V prvním (2-DE) přístupu byl dynamický rozsah koncentrací sérových vzorků snížen ekvalizací hexapeptidovou knihovnou (ProteoMiner) a výsledné směsné vzorky sér pacientek a kontrol byly následně rozdělány na 2-D elektroforéze. Po obarvení proteinových skvrn Coomassie Blue G-250 bylo kvantifikováno přibližně 750 proteinových skvrn (Obrázek 1) a 3 proteinové skvrny se statisticky významnými rozdíly optických denzit byly identifikovány hmotnostní spektrometrií (Tabulka 1). Těmito proteiny byly  **$\alpha$ -1-antitrypsin** se zvýšenou koncentrací (2x) a **apolipoprotein A4** (2,3x) a **retinol-binding protein 4 (RBP4)** (2,2x) oba se sníženou koncentrací v séru žen s karcinomem ovaria.



**Obrázek 1: Dvojměrná elektroforéza sér po ekvilizaci knihovnou hexapeptidových ligandů.** 2-DE byla provedena ze séra zdravých žen (kontroly) a žen s karcinomem ovaria (pacientky). U vizualizovaných skvrn Coomassie Blue G-250 byla stanovena jejich optická denzita. Byly nalezeny tři skvrny s významně změněnou denzitou mezi analyzovanými skupinami. Tyto proteiny byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie.

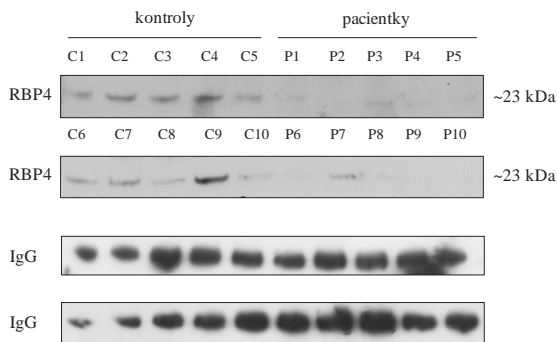
Swiss-Prot číslo	Název proteinu	Změna exprese proteinu	Mascot skóre	Sekvenční pokrytí (%)	Mr	pI
<b>Proteiny se sníženou koncentrací v séru pacientek</b>						
P06727	Apolipoprotein A4	2,3	335	58	45399	5,3
P02753	RBP4	2,2	153	57	23010	5,8
<b>Proteiny se zvýšenou koncentrací v séru pacientek</b>						
P01009	$\alpha$ -1-antitrypsin	2,0	115	42	46737	5,4

**Tabulka 1:** Identifikace proteinů se změněnou koncentrací v séru žen s karcinomem ovaria (minimální změna 1,5x se statistickou významností  $p < 0,05$ ).

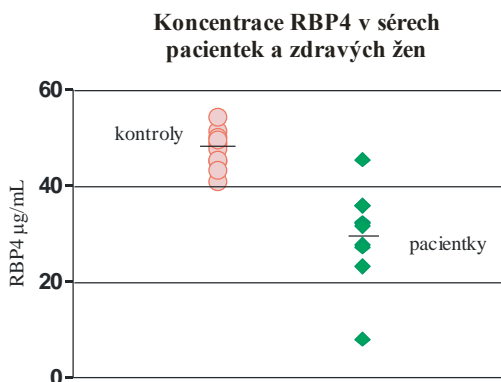
Ve druhém („shot-gun“) přístupu bylo ze séra pacientek a kontrol imunoafinitní deplecí (MARS) odstraněno 14 nejhojněji zastoupených proteinů. Depletované směsi vzorků byly štěpeny trypsinem a získané peptidy značeny izotopickými iTRAQ značkami. V dalším kroku proběhla separace peptidů izoelektrickou fokusací (rozsah pH 4-7) a následně nano-LC systémem na reverzní fázi. Eluované peptidy byly identifikovány a kvantifikovány hmotnostní spektrometrií. Takto byly identifikovány dva proteiny s významnou změnou v jejich koncentraci. Prvním proteinem byl opět  **$\alpha$ -1-antitrypsin**, jehož koncentrace v séru pacientek byla významně zvýšená (1,7x) a druhým proteinem byl znovu **apolipoprotein A4**, jehož koncentrace v séru pacientek byla statisticky významně snižená (1,6x).

Vztah mezi změnou koncentrace sérového apolipoproteinu A4 a  $\alpha$ -1-antitrypsin a karcinomem ovaria byl již publikován a oba proteiny jsou považovány za potenciální markery ovariálního karcinomu (Chen et al., 2008, Dieplinger et al., 2009). Změna koncentrace RBP4 však dosud nebyla popsána ve spojení s ovariálním karcinomem. Proto jsme se zaměřili na ověření snížené exprese RBP4 v individuálních sérových vzorcích

pacientek a zdravých žen western blotem (Obrázek 2) a stanovili jsme jeho absolutní koncentraci metodou ELISA (Obrázek 3). Průměrná koncentrace RBP4 v sérových vzorcích pacientek (29,9  $\mu\text{g/ml}$ ) byla 1,6x snižena v porovnání s kontrolními vzorky (47,7  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p < 0,007$ ).



**Obrázek 2: Ověření snížené exprese RBP4 v jednotlivých sérech žen s karcinomem ovaria metodou western blot.**



**Obrázek 3: Ověření změny koncentrace RBP4.** Absolutní koncentrace RBP4 v individuálních sérových vzorcích byla stanovena metodou ELISA. Každá hodnota odpovídá průměrné hodnotě získané ze třech replikátů.

## 4.5 Diskuze

Vztah mezi RBP4 a karcinomem ovaria nebo metabolickými změnami doprovázející nádorové onemocnění není známý. RBP4 je lipokalin, který je exprimován játry, adipocyty a některými epitelů včetně ovariálního epitelu. V krvi slouží RBP4 jako přenašeč retinolu (vitamin A). Množství RBP4 v krvi pozitivně koreluje s množstvím retinolu (Erikstrup et al., 2009). K objasnění příčiny snížené koncentrace RBP4 v séru pacientek s ovariálním karcinomem jsme stanovili sérové hladiny vitamínu A u pacientek i zdravých žen zařazených do studie. Koncentrace sérového retinolu se mezi oběma skupinami nelišily. Z toho vyplývá, že pokles koncentrace RBP4 u žen s ovariálním karcinomem není pravděpodobně způsoben změnami hladin vitamínu A v séru.

Změny hladin RBP4 v séru byly v minulosti dávány do souvislosti s metabolismem glukózy, diabetem a obezitou (Yang et al., 2009, Graham et al., 2006). Na základě těchto publikací jsme prověřili anamnézu pacientek i zdravých kontrol, u žádné z žen nebyl diagnostikován diabetes ani jiné závažné onemocnění. Následně jsme formulovali a testovali hypotézu o možném vztahu mezi poklesem koncentrace RBP4 v séru pacientek a změnou jejich BMI. Porovnáním BMI zdravých žen a pacientek jsme však zjistili, že není mezi nimi statisticky významný rozdíl a proto jsme vyloučili korelaci změny BMI jako příčinu snížení koncentrace RBP4 v séru pacientek s ovariálním karcinomem.

Jaký je tedy vztah RBP4 ke karcinomu ovaria? Pozorovaný pokles koncentrace proteinu RBP4 v séru pacientek by mohl být důsledkem snížené produkce RBP4 v ovariích. Vzhledem k tomu, že hlavními producenty RBP4



jsou játra a adipocyty, otázkou zůstává, zdali je vůbec možné pokles koncentrace RBP4 v séru pacientek přisuzovat jeho snížené produkci v ovariích. Snížená koncentrace RBP4 může být také odrazem systémových změn doprovázejících nádorové onemocnění. Mohla by být časným markerem metabolických změn souvisejících s růstem nádoru ještě před tím, než se tyto změny projeví nápadně ve formě nádorové kachexie. Nádorová kachexie je syndrom progresivní ztráty tělesné hmoty, kdy metabolické změny podmíněné aktivitou protizánětlivých cytokinů vedou v konečném důsledku k vyčerpání svalové a tukové hmoty. Kachexie představuje vážnou komplikaci při terapii a je příčinou až 20% úmrtí u pacientů s nádorovým onemocněním (Inui, 2002, MacDonald et al., 2003).

Pokles koncentrace RBP4 v sér pacientek je buď přímým markerem nádoru nebo odrazem nescifických paraneoplastických projevů doprovázejících karcinom ovaria. K ověření jeho diagnostické využitelnosti však bude nutné provést další studie na větší skupině žen s karcinomem ovaria a zdravých žen se zohledněním přesného typu nádoru a jeho stadia.

Práce byla publikována v roce 2012 v časopise *Oncology Reports*:

**Lorkova L, Pospisilova J, Lacheta J, Leahomschi S, Zivny J, Cibula D, Zivny J, Petrak J.; Decreased concentrations of retinol-binding protein 4 in sera of epithelial ovarian cancer patients: a potential biomarker identified by proteomics. *Oncology Reports* 2012;27:318. IF (2012)=2,29.**

## 5 Objasnění molekulárních mechanismů rezistence lymfomu z buněk pláštěvé zóny na cytarabin

Nejčastější příčinou komplikací a selhání protinádorové léčby je schopnost nádorových buněk odolávat účinkům protinádorových látek. V malignitách tak dochází ke vzniku **rezistence**. Nastává však situace, kdy při ztrátě citlivosti k jednomu terapeutiku vzniká současně rezistence na jiná, avšak strukturně příbuzná, protinádorová léčiva. V takovém případě jde o **křížovou rezistenci**.

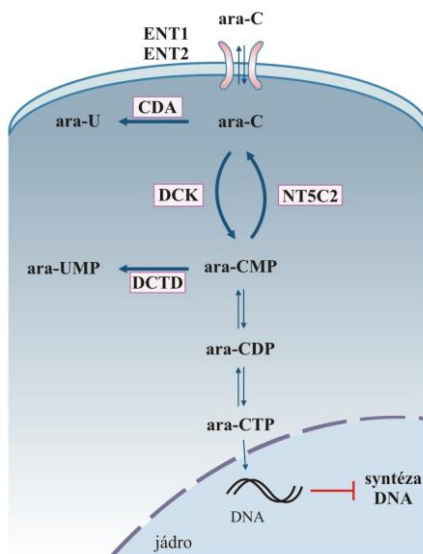
### 5.1 Lymfom z buněk pláštěvé zóny

Lymfom z buněk pláštěvé zóny (Mantle cell lymphoma, MCL) patří mezi nehodgkinské lymfomy, který vzniká maligní transformací zralých naivních B-buněk v pláštěvé zóně obklopující zárodečné centrum sekundárního lymfoidního folikulu. MCL je vzácným, ale agresivním lymfomem s incidencí v Evropě 0,45 na 100 000 osob (Sant et al., 2010).

Základem léčby MCL jsou kombinační terapie, například CHOP (Cyklofosfamid, Hydroxydaunorubicin (doxorubicin), Oncovin (vinkristin), Prednison) a cytarabin ve vysokých dávkách. Odezva na léčbu u MCL pacientů je krátkodobá a i po dosažení kompletní remise dochází dříve nebo později k opětovnému propuknutí nemoci (relapsu). Pro tyto pacienty neexistuje standardní léčebný režim a jejich další léčba spočívá v podávání několika cyklů vysokodávkované terapie kombinací účinných látek, kterými jsou například nukleosidové analogy, alkylační činidla, deriváty platiny a další. Prognóza pacientů s chemorezistentním MCL je velmi nepříznivá.

Cytarabin (cytosin arabinosid) je nukleosidový antimetabolit - strukturní analog deoxycytidinu, jež je do buňky transportován přes přenašeče ENT1 a ENT2 (Ward, 2000, Cai et al., 2008). Po vstupu do buňky je cytarabin metabolizován prostřednictvím dráhy, která je běžně využívanou prekurzory nukleotidů (Obrázek 4). Fosforylací cytarabinu klíčovým enzymem deoxycytidin kinázou (DCK) dochází k jeho aktivaci za vzniku cytarabinmonofosfátu (ara-CMP). První fosforylace cytarabinu enzymem DCK je limitujícím krokem dráhy nukleosidového analogu. Aktivovaná molekula je sledem reakcí fosforylována na trifosfát ara-C (ara-CTP) dalšími dvěma kinázami. Poté ara-CTP vstupuje do jádra a inkorporuje se do nově syntetizované DNA, čímž dochází k zastavení replikace DNA. Akumulace molekulárních senzorů na poškozené DNA vede k vyvolání buněčné odpovědi, kterou je aktivace kontrolních bodů v buněčném cyklu využívajících signálních mechanismů buď k pozastavení buněčného cyklu a opravy DNA nebo ke spuštění apoptózy.

Vývoj rezistence u pacientů s MCL vůči antimetabolitu cytarabinu je častou komplikací protinádorové léčby a jeho mechanismus nebyl dosud popsán.



**Obrázek 4: Schéma mechanismu působení cytarabinu v nádorové buňce.** Cytarabin (ara-C) vstupuje do buňky přes přenašeče ENT1 nebo ENT2 (Equilibrative nucleoside transporter). Po vstupu do buňky dochází k aktivaci cytarabinu fosforylací deoxycytidin kinázou (DCK) za vzniku cytarabinmonofosfátu (ara-CMP). Aktivovaný cytarabin je sledem reakcí dále fosforylován dvěma kinázami za vzniku cytarabintrifosfátu (ara-CTP). Tato molekula vstupuje do jádra a dochází k inkorporaci do DNA, k zastavení replikace a spuštění drah vedoucích k apoptóze. Cytarabin může být inaktivován cytidin deaminázou na ara-U. K deaktivaci ara-CMP rovněž dochází aktivitou 5'-nukleotidázy (NT5C2) a deoxycytidylát deaminázy (DCTD).

## 5.2 Cíl práce

Za selhání léčby MCL je zodpovědný především vývoj rezistence k protinádorovým molekulám, proto jsme se zaměřili na objasnění molekulárního mechanismu rezistence buněk MCL na cytarabin.

### **5.3 Funkční charakteristika buněk MCL rezistentních na cytarabin a popis molekulárních změn v těchto buňkách.**

K popisu molekulárního mechanismu rezistence byly zvoleny buněčné linie JEKO-1, MINO, REC-1, HBL-2, GRANTA-519 odvozené z MCL. Tyto buňky jsou citlivé na cytarabin, ale dlouhodobým vystavením subletálními dávkami cytarabinu dochází v buňkách k rozvoji rezistence na cytarabin. Tímto způsobem jsme získali cytarabin-rezistentní buněčné subpopulace MCL.

Senzitivita cytarabin-rezistentních subklonů MCL k protinádorovým molekulám byla testována *in vitro* a *in vivo*. Subklony MCL rezistentní na cytarabin byly vystaveny různým koncentracím relevantních klinicky využívaných protinádorových molekul (cisplatina, doxorubicin a bendamustin, nukleosidové analogy gemcitabin, kladribin a fludarabin a dále bortezomib (inhibitor proteazomu), temsirolimus (inhibitor mTOR) a ibrutinib (inhibitor Brutonovy tyrosin kinázy)). K *in vivo* testování toxicity protinádorových molekul jsme použili xenotransplantaci do imunodeficientních myší (model s absencí B a T buněk, komplementů, NK buněk a deficiencí makrofágů a dendritických buněk), do kterých byla intravenózně aplikována lidská buněčná linie MCL JEKO-1 senzitivní a rezistentní na cytarabin.

#### **Proteomická a transkriptomická analýza**

Intaktní proteiny buněčných lysátů jednotlivých buněčných linií MCL senzitivních a rezistentních na cytarabin byly separovány na 2-D elektroforéze. Po vizualizaci proteinových map Coomassie Blue G-250 byly denzity proteinových skvrn podrobeny softwarové analýze. Proteinové

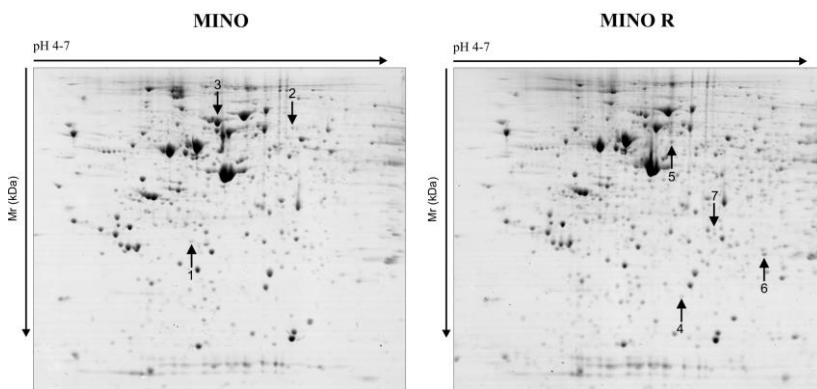
skvrny se statisticky významně změněnou optickou denzitou byly identifikovány hmotnostní spektrometrií. Paralelně s proteomickou analýzou proběhla i analýza transkriptomická (Illumina bead chip).

#### 5.4 Výsledky

Buněčné subklony se získanou rezistencí k cytarabinu vykazovaly v *in vitro* i *in vivo* testech křížovou rezistenci k ostatním testovaným nukleosidovým (purinovým i pyrimidinovým) antimetabolitům (gemcitabin fludarabin, kladribin), ale jejich citlivost na jiné typy protinádorových látek zůstala porovnatelná s původními buněčnými liniemi senzitivními na cytarabin.

Proteomickým profilováním jsme našli sníženou expresi **deoxycytidin kinázy** (DCK) v buňkách MINO rezistentních na cytarabin (4,6x snížená) (Obrázek 5, Tabulka 2). Změna koncentrace DCK byla imunochemickou metodou western blot ověřena u buněčných liniích MCL MINO, GRANTA-519, REC-1, JEKO-1 a HBL-2 (Obrázek 6). Ve všech analyzovaných rezistentních buněčných liniích MCL byla na úrovni mRNA nalezena jediná společná změna, kterou byla rovněž snížená exprese mRNA pro **deoxycytidin kinázu**.

Snížená exprese DCK byla následně ověřena metodou western blot i na primárních buňkách získaných z krve pacientů s MCL, u kterých došlo k progresi a relapsu onemocnění po léčbě cytarabinem.



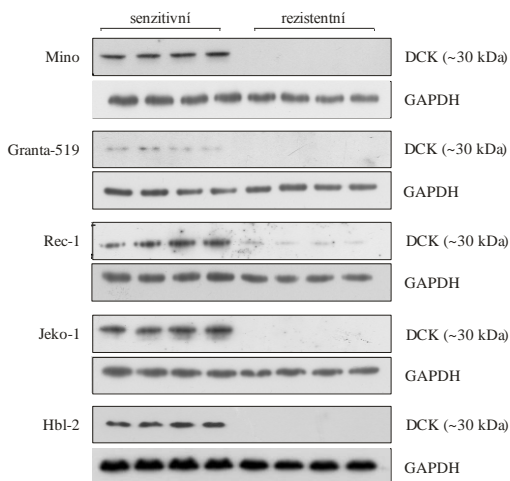
**Obrázek 5: Dvojměrná elektroforéza proteinů z buněk MINO (senzitivní) a MINO/R (rezistentní) na cytarabin.** Po vizualizaci skvrn Coomassie Blue G-250 byla stanovena jejich optická densita. Porovnáním optických denzit jednotlivých skvrn mezi gely MINO a MINO/R byly detekovány skvrny 1-7 se změnou optickou denzitou, jež byly identifikovány hmotnostní spektrometrií (Tabulka 2).

Číslo skvrny	Swiss-Prot číslo	Název proteinu	Změna exprese proteinu	Mascot skóre	Sekvenční pokrytí (%)	Mr
<b>Proteiny se sníženou expresí v MINO</b>						
1	P27707	Deoxycytidine kinase	4.6	44*	16	30841
2	Q99829	Copine-1	4.7	102	17	59649
3	P13796	Plastin-2	2	453	65	70814
<b>Proteiny se zvýšenou expresí MINO R</b>						
4	P07741	Adenine phosphoribosyltransferase	41.5	70	40	19766
5	P68363	Tubulin alpha-1B chain	5	169	32	50804
6	P04792	Heat shock protein beta-1	2.3	73	32	22826
7	P31937	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	2.1	4*		35712

\*MS/MS potvrzení identifikace

Číslo skvrny	Swiss-Prot číslo	Název proteinu	sekvence peptidu	Skóre
1	P27707	Deoxycytidine kinase	LKDAEKPVLFER, QLCEDWEVVPEPVAR	41, 46
7	P31937	3-Hydroxyisobutyrate Dehydrogenase, mitochondrial	DFSSVFQFLREEETF SPILLGSLAHQIYR	49, 28

**Tabulka 2:** Identifikace diferenciálně exprimovaných proteinů v buňkách MINO/R hmotnostní spektrometrií (minimální změna 1,5x se statistickou významností  $p < 0,05$ ).



**Obrázek 6:** Ověření snížené exprese deoxycytidin kinázy (DCK) v jednotlivých buněčných liniích MCL metodou western blot.



## 5.5 Diskuze

Enzym DCK katalyzuje první fosforylaci nukleosidů a jejich analogů vedoucí k jejich aktivaci (Obrázek 4). Nukleosidmonofosfáty jsou dalšími dvěma kinázami fosforylovány a následně inkorporovány do DNA. Charakteristickou vlastností DCK je nízká substrátová specifita, díky které může fosforylovat nukleosidy jak s pyrimidinovými tak i s purinovými bázemi (Staub a Eriksson, 2007). Snížená exprese DCK ve studovaných buněčných modelech MCL je pravděpodobně molekulárním mechanismem vzniku rezistence. Křížovou rezistencí k jiným purinovým (gemcitabin) a pyrimidinovým (fludarabin, kladribin) terapeutickým molekulám, kterou jsme pozorovali jak v *in vivo* tak v *in vitro* experimentech, je snadno vysvětlitelná sníženou expresí promiskuitní DCK (Galmarini et al., 2001, Ewald et al., 2008). Jiné významné sekundární změny na úrovni mRNA a proteinů v buněčných liniích MCL rezistentních na cytarabin jsme nepozorovali.

**Ze snížené exprese DCK a rovněž z *in vivo* a *in vitro* testování toxicity různých protinádorových molekul v buněčných liniích MCL rezistentních na cytarabin lze odvodit, že snížená exprese DCK je pravděpodobně příčinou rezistence MCL na cytarabin. Z toho vyplývá, že k léčbě pacientů s MCL rezistentní na cytarabin není vhodné používat nukleosidové analogy aktivované DCK. Pacientům s MCL onemocněním, kteří již ztratili senzitivitu vůči terapii cytarabinem, by měly být podávány jiné typy protinádorových látek, např. genotoxická cisplatina, alkylační činidla nebo cílené látky jako jsou temsirolimus, bortezomib nebo rituximab (monoklonální anti-CD20 protilátka).**

Práce byla publikována v roce 2014 v časopise *Molecular Cancer*:

**Klanova M, Lorkova L, Vit O, Maswabi B, Molinsky J, Pospisilova J, Mavis C, Lateckova L, Kulvait V, Vejmelkova D, Jaksá R, Hernandez F, Trneny M, Vokurka M, Petrak J, Klener P Jr.;** Downregulation of deoxycytidine kinase in cytarabine-resistant mantle cell lymphoma cells confers cross-resistance to nucleoside analogs gemcitabine, fludarabine and cladribine, but not to other classes of anti-lymphoma agents. *Molecular Cancer* 2014;13:159. IF (2014)=5,39.

## **6 Hledání nových zásahových míst - identifikace molekulárních změn v buňkách lymfomu z buněk pláštěvé zóny (MCL) rezistentních na molekulu TRAIL**

Jak již bylo uvedeno v předchozí části, MCL je vzácný, nehodgkinský lymfom, který vzniká transformací zralých naivních B-buněk v pláštěvé zóně obklopující zárodečné centrum sekundárního lymfoidního folikulu. Účinnost léčby MCL je však bohužel velmi nízká. Proto se hledají nové protinádorové molekuly, které by vedly k úspěšné eliminaci lymfomových buněk.

### **6.1 TRAIL**

TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) je proapoptotický cytokin se silným protinádorovým účinkem a terapeutickým potenciálem k léčbě různých typů malignit včetně MCL. TRAIL indukuje apoptózu vazbou na „death“ receptory DR4 a DR5, které jsou exprimovány na povrchu cílových buněk. Rekombinantní lidský TRAIL vyvolává apoptózu v nádorových buňkách, aniž by poškodil okolní zdravé buňky (Walczak et al., 1999). Jeho selektivní účinek by tak mohl být využitý v protinádorové terapii. Nicméně ani molekula TRAILu není mezi protinádorovými látkami výjimkou a jeho dlouhodobé působení v nádorových buňkách vede ke vzniku rezistence.

### **6.2 Cíl práce**

Cílem této práce bylo popsat a pochopit změny v expresi proteinů, ke kterým dochází v souvislosti se vznikem a rozvojem rezistentních nádorových buněk na proapoptotickou molekulu TRAIL. Nehledali jsme mechanismus rezistence, kterým je zpravidla snížení exprese TRAIL

receptorů (Maksimovic-Ivanic et al., 2012), ale další změny, ke kterým v buňkách v souvislosti s rezistencí dochází. Identifikace takových specifických změn by mohla odhalit vhodná zásahová místa (druggable targets) pro selektivní likvidaci takových rezistentních buněk.

### **6.3 Odvození buněk MCL rezistentních na TRAIL a popis molekulárních změn v těchto buňkách**

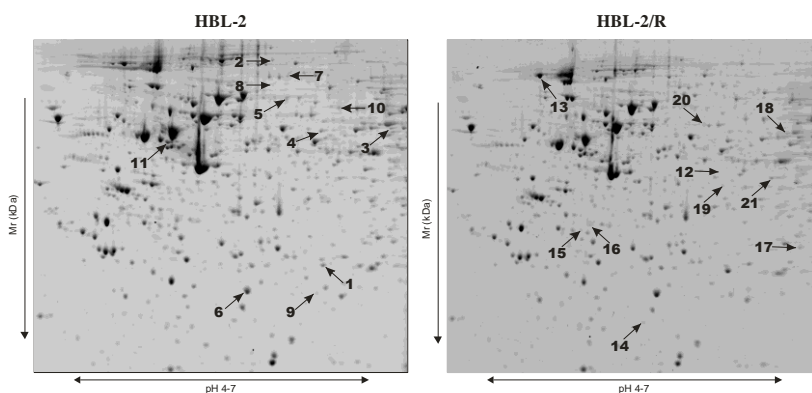
Pro popsání změn v rezistentních buňkách technikami byla zvolena buněčná linie HBL-2. Tato linie je odvozená z MCL a je senzitivní na účinky rekombinantního TRAILu. Expozicí zvyšujícím se koncentracím TRAILu jsme odvodili TRAIL-rezistentní HBL-2 subklon HBL-2/R. Odvozený subklon HBL-2/R byl společně s HBL-2 buňkami podroben expresní proteomické analýze. Proteinové směsi buněk byly rozděleny na 2-D elektroforéze a po vizualizaci proteinových skvrn Coomassie Blue G-250 byly na výsledné proteinové mapě skvrny porovnány a proteinové skvrny s významnou změnou v optické densitě identifikovány hmotnostní spektrometrií.

Změny v expresi TRAIL receptorů DR4 a DR5 jsou jednou ze známých příčin snížení citlivosti nádorových buněk k účinkům TRAILu (Maksimovic-Ivanic et al., 2012). Průtokovou cytometrií byla stanovena relativní úroveň exprese TRAIL receptorů na povrchu TRAIL-rezistentních HBL-2/R buněk a HBL-2 buněk.

### **6.4 Výsledky**

Buněčné lyzáty HBL-2 a HBL-2/R buněk byly podrobeny 2-DE analýze a identifikaci diferenciálních skvrn pomocí hmotnostní spektrometrie

(Obrázek 7). Statisticky významná změna v expresi byla nalezena u 21 proteinů (Tabulka 3). Mezi diferenciálně exprimovanými proteiny v TRAIL-rezistentních HBL-2/R buňkách byly tři klíčové proteiny metabolismu purinů - **purin nukleosid fosforyláza (PNP)** (1,6x snižená), **adenin fosforibosyl transferáza (APRT)** (2,2x snižená) a **inosin 5-monofosfát dehydrogenáza 2 (IMPDH2)** (1,6x snižená).



**Obrázek 7:** Dvojměrná elektroforéza proteinů z buněk HBL-2 a HBL-2/R. Po vizualizaci skvrn Coomassie Blue G-250 byla stanovena jejich optická densita. Porovnáním optických densit jednotlivých skvrn mezi gely HBL-2 a HBL-2/R byly detekované skvrny označeny 1-11 se sníženou a skvrny 12-21 se zvýšenou optickou densitou na HBL-2/R gelu.

Číslo skvrny	SwissProt číslo	Název proteinu	Změna exprese proteinu	Mascot skóre	Sekvenční pokrytí %	pI	Mr
<b>Proteiny se zvýšenou expresí v HBL-2/R</b>							
1	P04792	Heat shock protein beta-1	3.9	84	51	5.98	22826
2	P42704	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	2.6	100	23	5.81	159003
3	O75351	Vacuolar protein sorting-associated protein 4B	2.6	171	32	6.75	49443
4	P23381	Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	2.4	240	54	5.83	53474
5	P20591	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1	2.2	176	42	5.60	75872
6	P09211	Glutathione S-transferase P	1.9	110	56	5.43	23569
7	P06396	Gelsolin	1.9	115	22	5.90	86043
8	P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5	1.7	262	46	5.55	83222
9	Q9HAV7	GrpE protein homolog 1, mitochondrial	1.6	99	44	8.24	24492
10	O43776	Asparaginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	1.5	250	41	5.90	63758
11	Q15084	Protein disulfide-isomerase A6	1.5	76	29	4.95	48490
<b>Proteiny se sníženou expresí v HBL-2/R</b>							
12	P08559	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	3.2	111	32	8.35	43952
13	P19338	Nucleolin	2.4	146	29	4.60	76625
14	P07741	<b>Adenine phosphoribosyltransferase</b>	2.2	227	79	5.78	19766
15	O75792	Ribonuclease H2 subunit A	1.7	348	72	5.14	33716
16	Q07955	Serine/arginine-rich splicing factor 1	1.7	82	35	10.37	27842
17	P00491	<b>Purine nucleoside phosphorylase</b>	1.6	182	68	6.45	32325
18	P12268	<b>Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2</b>	1.6	230	44	6.44	56226
19	P40121	Macrophage-capping protein	1.6	102	41	5.82	38760
20	P13674	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	1.5	234	48	5.70	61296
21	Q15019	Septin-2	1.5	62	26	6.15	41689

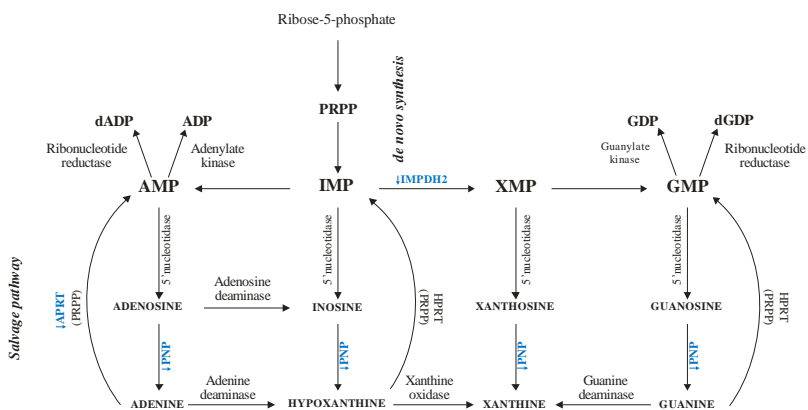
**Tabulka 3:** Diferenciálně exprimované proteiny v buňkách HBL-2/R (minimální změna 1,5x se statistickou významností  $p < 0,05$ ).

## 6.5 Diskuze

**PNP**, **APRT** a **IMPDH2** jsou klíčovými enzymy metabolismu purinů a změny v jejich expresi mohou vést k narušení homeostázy nukleotidů a nukleosidů v TRAIL-rezistentních buňkách (Obrázek 8). Purinové nukleotidy představují základní stavební kameny pro syntézu DNA, RNA a kofaktorů. Tvoří se dvěma nezávislými mechanismy a to buď *de novo* syntézou z nízkomolekulárních prekurzorů nebo recyklací volných bází v tzv. *salvage* (záchranné) dráze. Produkty obou drah nukleosid-5'-fosfáty jsou

*de novo* a *salvage* dráhou dodávány pro buněčnou potřebu nezávisle. Míra využití obou metabolických drah je tkáňově specifická a může se odvíjet od závislosti na fyziologických podmínkách. V leukemických a lymfomových buňkách představuje *salvage* dráha hlavní zdroj purinových nukleotidů (Scavennec et al., 1982, Natsumeda et al., 1984).

Změny v koncentraci a aktivitě klíčových enzymů vedou k narušení rovnováhy metabolismu purinů. Hromadění a/nebo úbytek ribonukleotidů, deoxyribonukleotidů nebo jejich meziproductů v buňce může vést ke spuštění apoptózy (Galmarini et al., 2008, Bollée et al., 2012). **Narušený purinový metabolismus tak představuje potenciální „slabinu“ buněk MCL rezistentních na TRAIL, kterou je teoreticky možné dalším cíleným zásahem do metabolismu purinů využít k eliminaci těchto buněk. K tomu je k dispozici několik inhibičních molekul – například metotrexát (inhibitor dihydrofolát reduktázy) nebo experimentální terapeutické molekuly ribavirin, kyselina mykofenolová (inhibitory IMPDH2) a forodesin (nový inhibitor PNP).**



**Obrázek 8:** Schéma purinového metabolismu a úloha enzymů IMPDH2, APRT a PNP v syntéze purinových nukleotidů. *De novo* syntéza purinových nukleotidů začíná fosforylací ribosa-5'-fosfátu enzymem PRPP. Sledem reakcí dojde k vytvoření nukleotidu IMP, který je v dalším kroku za přítomnosti IMPDH2 přeměněn na GMP. PNP reverzibilně katalyzuje reakci, ve které dochází ke štěpení purinových nukleosidů za vzniku jednotlivých purinových bází (adenin, hypoxantin, xantin, guanin). V *salvage* dráze jsou volné nukleové báze zpět přeměněny na příslušné nukleosid-5'-monofosfáty za současné aktivace PRPP enzymem APRT.

IMPDH2, inosin-5'- monofosfát dehydrogenáza 2; APRT, adenin fosforibosyl transferáza; PNP, purin nukleosid fosforyláza; PRPP, 5-fosforibosyl-1-pyrofosfát; IMP, inosin-5'-monofosfát; GMP, guanin-5'-monofosfát; dADP, deoxyadenin difosfát; ADP, adenin difosfát; GDP, guanin difosfát; dGDP, deoxyguanin difosfát; AMP, adenin-5'-monofosfát; XMP, xantosin-5'-monofosfát



Práce byla publikována v roce 2013 v časopise International Journal of Molecular Medicine:

**Pospisilova J, Vit O, Lorkova L, Klanova M, Zivny J, Klener P, Petrak J; Resistance to TRAIL in mantle cell lymphoma cells is associated with the decreased expression of purine metabolism enzymes. *International Journal of Molecular Medicine* 2013;31:1273. IF (2013)=1,88.**

## 7 Závěr

Proteomické techniky a přístupy je možné využít ke studiu různých biologických nebo medicínských problémů. Ve zmíněných třech pracích jsme pomocí proteomických přístupů hledali řešení některých problémů v diagnostice a léčbě onkologických onemocnění. Identifikovali jsme protein RBP4 jako potenciální biomarker ovariálního karcinomu. Odhalili jsme molekulární mechanismus rezistence buněk MCL na cytarabin a popsali jsme molekulární změny spojené s rezistencí buněk MCL na experimentální protinádorovou molekulu TRAIL.

Proteomika je dynamický obor, který se v posledních letech dostává do popředí zájmu nejen molekulárních biologů a biochemiků, ale i lékařů. Výrazný rozvoj analytické instrumentace a metodických přístupů během posledních dvou desetiletí významně rozšířil možnosti studia proteinů v živých systémech. Analýza proteomu poskytuje neustále se prohlubující vhled do biologických procesů na úrovni kvalitativních a kvantitativních změn proteinového složení v souvislosti s fyziologickými a patologickými stavy organismu. Nabízí tak možnost lepšího pochopení různých stavů organismu a stává se přínosem pro vývoj diagnostických a terapeutických přístupů. Takový přínos jsme demonstrovali na třech projektech, jež jsou těsně propojeny s klinickou praxí.

## 8 Publikace

1. **Lorkova L**, Pospisilova J, Lacheta J, Leahomschi S, Zivny J, Cibula D, Zivny J, Petrak J. Decreased concentrations of retinol-binding protein 4 in sera of epithelial ovarian cancer patients: a potential biomarker identified by proteomics. *Oncology Reports* 2012 Feb;27(2):318-24. IF (2012)=2,29.
2. Klanova M, **Lorkova L**, Vit O, Maswabi B, Molinsky J, Pospisilova J, Mavis C, Lateckova L, Kulvait V, Vejmelkova D, Jaksa R, Hernandez F, Trneny M, Vokurka M, Petrak J, Klener K Jr. Downregulation of deoxycytidine kinase in cytarabine-resistant mantle cell lymphoma cells confers cross-resistance to nucleoside analogs gemcitabine, fludarabine and cladribine, but not to other classes of anti-lymphoma agents. *Molecular Cancer* 2014;13:159. IF (2014)=5,39.
3. Pospisilova J, Vit O, **Lorkova L**, Klanova M, Zivny J, Klener P, Petrak J. Resistance to TRAIL in mantle cell lymphoma cells is associated with the decreased expression of purine metabolism enzymes. *International Journal of Molecular Medicine* 2013;31:1273-1279. IF (2013)=1,88.
4. Petrak J, Pospisilova J, Sedinova M, Jedelsky P, **Lorkova L**, Vit O, Kolar M, Strnad H, Benes J, Sedmera D, Cervenka L, Melenovsky V. Proteomic and transcriptomic analysis of heart failure due to volume overload in a rat aorto-caval fistula model provides support for new potential therapeutic targets-monoamine oxidase A and transglutaminase 2. *Proteome Science* 2011;9(1):69. IF (2011)=2,32.

**Tato práce tématicky bezprostředně nesouvisí s tématem dizertační práce.**

## 9 Reference

- Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Molecular and Cellular Proteomics* 2002;1:845-867.
- Cai J, Damaraju VL, Groulx N, Mowles D, Peng Y, Robins MJ, Gros P. Two distinct molecular mechanisms underlying cytarabine resistance in human leukemic cells. *Cancer Research* 2008;68(7):2349-57.
- Dieplinger H, Ankerst DP, Burges A, Lenhard M, Lingenhel A, Fineder L, Stieber P. Afamin and apolipoprotein A-IV: novel protein markers for ovarian cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2009;18(4):1127-33.
- Erikstrup C, Mortensen OH, Nielsen AR, Fischer CP, Plomgaard P, Petersen AM, Pedersen BK. RBP-to-retinol ratio, but not total RBP, is elevated in patients with type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2009;11(3):204-12.
- Ewald B, Sampath D, Plunkett W. Nucleoside analogs: molecular mechanisms signaling cell death. *Oncogene* 2008;27:6522-6537.
- Galmarini CM, Popowycz F, Joseph B. Cytotoxic nucleoside analogues: different strategies to improve their clinical efficacy. *Current Medicinal Chemistry* 2008;15:1072-1082.

- Graham TE, Yang Q, Blüher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, Kahn BB. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *The New England Journal of Medicine* 2006;354(24):2552-63.
- Chen Y, Lim BK, Peh SC, Abdul-Rahman PS, Hashim OH. Profiling of serum and tissue high abundance acute-phase proteins of patients with epithelial and germ line ovarian carcinoma. *Proteome Science* 2008;6:20-31.
- Inui A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and management. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2002;52:72-91.
- MacDonald N, Easson AM, Mazurak VC, Dunn GP, Baracos VE. Understanding and managing cancer cachexia. *Journal of the American College of Surgeons* 2003;197(1):143-161.
- Maksimovic-Ivanic D, Stosic-Grujicic S, Nicoletti F, Mijatovic S. Resistance to TRAIL and how to surmount it. *Immunologic Research* 2012;52:157-168.
- Moore RG, Brown AK, Miller MC, Skates S, Allard WJ, Verch T, Bast RC. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecologic Oncology* 2008;108(2):402-8.
- Natsumeda Y, Prajda N, Donohue JP, Glover JL, Weber G. Enzymic capacities of purine de novo and salvage pathways for nucleotide synthesis in normal and neoplastic tissues. *Cancer Research* 1984;44:2475-2479.

- Scavennec J, Maraninchi D, Gastaut JA, Carcassonne Y, Cailla HL. Purine and pyrimidine ribonucleoside monophosphate patterns of peripheral blood and bone marrow cells in human acute leukemias. *Cancer Research* 1982;42:1326-1330.
- Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, Steward J. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: Results of the HAEMACARE project. *Blood* 2010;116:3724-3734.
- Sarojini S, Tamir A, Lim H, Li S, Zhang S, Goy A, Suh KS. Early detection biomarkers for ovarian cancer. *Journal of Oncology* 2012;9(2):171-185.
- Staub M, Eriksson S. The role of deoxycytidine kinase in DNA synthesis and nucleoside analog activation. *Deoxynucleoside Analogs in Cancer Therapy* 2007;29-53.
- Walczak H, Miller RE, Ariail K, et al. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nature Medicine* 1999;5:157-163.
- Ward JL. Kinetic and pharmacological properties of cloned human equilibrative nucleoside transporters, ENT1 and ENT2, stably expressed in nucleoside transporter-deficient PK15 cells. ENT2 exhibits a low affinity for guanosine and cytidine but a high affinity for inosine. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275(12):8375-8381.

- Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kahn BB. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 2005;436(7049):356-62.