Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2014 Denisa Hendrychová

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky

Biologická charakterizace substituovaných 2-hydroxy-*N*-(arylalkyl)benzamidů

Bakalářská práce

Denisa Hendrychová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2014 **Vedoucí práce: Mgr. Radek Jorda, Ph.D.**

„Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Radka Jordy, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.“

V Olomouci dne 6. května 2014 Podpis .....

SOUHRN

Rakovina je jedno z nejzávažnějších a nejrozšířenějších onemocnění, které vzniká v různých tkáních a především z různých příčin. V důsledku toho je i léčba každého typu rakoviny individuální. V současné době se při léčbě využívá chemoterapeutických i radioterapeutických metod a to zejména v kombinaci s cílenou biologickou léčbou, která představuje zásadní pokrok v léčbě. Je založena na použití nové generace léčiv specificky navrhovaných proti konkrétním cílům, které zasahují do různých signálních drah včetně regulace buněčného cyklu, apoptózy a angiogeneze. Teoretická část bakalářské práce shrnuje poznatky o rakovinném onemocnění a o současných možnostech léčby. Experimentální část práce se zabývá stanovením některých biologických účinků čtyř vybraných inhibitorů z knihovny 2-hydroxy-*N*-(arylalkyl)benzamidů na nádorovou linii G361 *in* vitro.

SUMMARY

Cancer is one of the most serious disease worldwide, which has arised in various tissues and especially for various reasons. Therefore, the treatment of each type of cancer is individual. Current treatment has involved both chemo- and radiotherapy methods, especially in combination with targeted biological therapy, which has represented an essential progress. It is based on new generation of drugs proposed against specific targets, which interfere in different signaling pathways including cell cycle regulation, apoptosis and angiogenesis. The theoretical part of bachelor thesis summarizes knowledge about cancer and about current treatment approaches. The experimental part is focused on biological effect of four inhibitors from a library of 2-hydroxy-*N*-(arylalkyl)benzamides in the G361 cell line.

Ráda bych poděkovala vedoucímu Mgr. Radku Jordovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a trpělivost při vypracování mé bakalářské práce. Dále děkuji kolektivu pracovníků Laboratoře růstových regulátorů Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého a Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., zejména Ditě Parobkové, Olze Hustákové a Janě Hudcové za vstřícnost a praktické rady.

OBSAH

1 ÚVOD 9
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY 10
2.1 Molekulární podstata rakovinného onemocnění 10
2.1.1 Aktivace proto-onkogenů 11
2.1.2 Inaktivace tumor supresorových genů 12
2.2 Konvenční terapie 12
2.3 Cílená biologická terapie 13
2.3.1 Medicinální chemie 14
2.3.2 Významné cíle léčebných metod 15
2.3.2.1 Receptor epidermálního růstového faktoru 15
2.3.2.2 Ras signální dráha 16
2.3.2.3 Raf/MEK/Erk signální dráha 17
2.3.2.4 PI3K/Akt/mTOR signální dráha 17
2.3.2.5 Protein p53 18
2.3.2.6 Cyklin-dependentní kinázy 20
2.3.2.7 Telomery a telomeráza 20
2.3.2.8 Multichaperonový komplex a ubiquitin-proteazomový systém 21
2.3.3 Léčebné přístupy 22
2.3.3.1 Komplementární oligonukleotidy a mikro RNA 22
2.3.3.2 Imunoterapie 23
2.3.3.3 Monoklonální protilátky 24
2.3.3.4 Genová terapie a onkolytické viry 25
2.3.3.5 Syntetická letalita 26
3 CÍL PRÁCE 28
4 MATERIÁL 29
4.1 Přístrojové vybavení 29
4.2 Použité chemikálie 29
4.3 Použité roztoky 30
4.4 Použité protilátky 30
4.5 Použité substituované 2-hydroxy-*N*-(arylalkyl)benzamidy 31
4.6 Použitá buněčná linie 31
5 METODIKA 32
5.1 Kultivace, ovlivnění buněčné linie, sklízení a lyzace 32

5.2 Elektroforéza, western blotting, imunodetekce 33
5.3 Stanovení aktivity kaspázy 3 a 7 33
5.4 Cytometrická analýza 34
6 VÝSLEDKY 35
6.1 Stanovení aktivity kaspázy 3 a 7 35
6.2 Stanovení hladiny exprese vybraných proteinů 36
6.3 Cytometrická analýza buněčného cyklu 40
7 DISKUZE 42
8 ZÁVĚR 45
9 POUŽITÁ LITERATURA 46
10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK 55

1 ÚVOD

Rakovina představuje jedno z nejzávažnějších onemocnění na světě. V roce 2012 zemřelo na tuto nemoc 8,2 milionů lidí (z toho 3,5 milionů žen a 4,7 milionů mužů) a bylo diagnostikováno 14,1 milionů nových případů tohoto onemocnění. Celkem 32,6 milionů lidí v roce 2012 trpělo touto chorobou. Předpokládá se, že v roce 2030 vzroste počet úmrtí až dvojnásobně (http://globocan.iarc.fr). Současná studia zabývající se molekulární a buněčnou podstatou tohoto onemocnění přináší nové poznatky, jež umožňují vývoj nových terapeutických přístupů, které jsou často mnohem účinnější a méně toxičtější. Rozvíjí se přístup cílené terapie, kdy jsou léčiva navrhována a testována proti konkrétním cílům. Velmi pozitivní účinek byl takové pozorován při použití kombinované molekulárně cílené terapie a také terapie kombinované s konvenční chemoterapií a radioterapií. Poměrně novým přístupem je princip syntetické letality, který je v současné době velmi intenzivně studován.

Nicméně, rakovinné onemocnění vzniká v různých tkáních a především z různých příčin. V důsledku toho musí být i léčba každého typu rakoviny individuální (Evan *et* Vousden, 2001).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Molekulární podstata rakovinného onemocnění

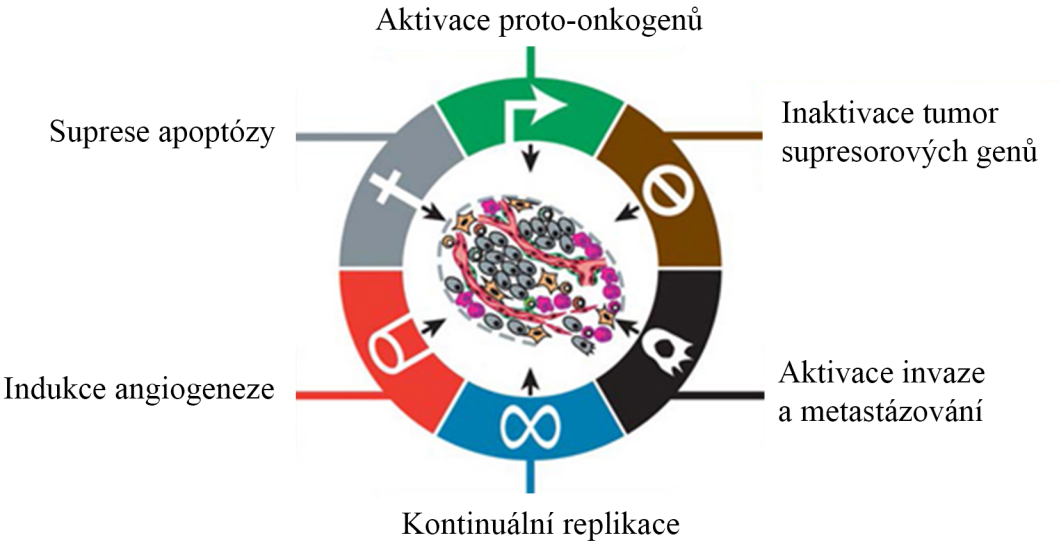
Rakovinu lze obecně definovat jako onemocnění, při kterém dochází k abnormálnímu a nekontrolovanému růstu buněk. Za fyziologických podmínek jsou buňky každého organizmu striktně koordinovány a musí velmi úzce spolupracovat. Každá z nich vysílá, interpretuje a přijímá signály, které určují, zda buňky mají růst, dělit se, diferenciovat se či odumřít podle aktuálních potřeb organizmu. Narušení buněčné signalizace může iniciovat nekontrolovanou proliferaci.

Karcinogeneze je několikastupňový proces, který se vyvíjí i desítky let, přičemž dochází k progresivnímu akumulování mutací a epigenetických změn genů s rozdílnými biochemickými funkcemi. Jedna mutace nemusí nutně znamenat vznik onemocnění. K transformaci v nádorovou buňku vede ve většině případů nahromadění několika epigenetických změn či drobných mutacích proto-onkogenů a tumor supresorových genů, které označujeme jako geny kritické. Výsledkem těchto změn jsou deregulace klíčových molekul odpovědných za správný průběh buněčného cyklu, ale i dalších významných signálních drah (Weinstein, 2000; Croce, 2008).

Mutace se běžně vyskytují v genomech všech dělících se buněk, normálních i nádorových. Mohou nastat v důsledku nesprávné inkorporace nukleotidů během replikace DNA nebo působením exogenních či endogenních mutagenů (Greenman *et al.*, 2007). Nejen genetické modifikace, ale i epigenetické změny mohou iniciovat vznik tumoru. Jedná se o dědičné modifikace genomu regulující genovou expresi, přičemž se nemění nukleotidová sekvence DNA. Zahrnují změny v uspořádání nukleozomů i vyšších struktur, post-translační modifikace aminokyselin histonů a změny v metylaci DNA. Deregulace těchto epigenetických modifikací také může vést k vývoji rakovinného onemocnění, přičemž jejich onkogenní potenciál je reverzibilní na rozdíl od běžných genetických mutací (Feinberg, 2004; Grønbæk *et al*., 2007).

Je nepravděpodobné, že míra spontánních mutací v lidských buňkách je dostatečná pro vznik nádorového onemocnění. Předpokládá se, že tumorigeneze souvisí se schopností buněk získat genetickou nestabilitu, kdy se zvyšuje rychlost vzniku genových

i chromozomových mutací (Morgan, 2007). Tato genetická nestabilita umožňuje nádorové buňce postupně získat šest zásadních vlastností (Hanahan *et* Weinberg, 2011) (Obr. 1).



Obr. 1: Šest zásadních vlastností rakovinných buněk: schopnost kontinuální signalizace proliferace (aktivací proto-onkogenů) a inhibice systémů negativně regulujících proliferaci (inaktivací tumor supresorových genů), dále schopnost suprese apoptózy, kontinuální replikace, indukce angiogeneze a aktivace invaze a metastázování (upraveno podle Hanahan et Weinberg, 2011)

2.1.1 Aktivace proto-onkogenů

Proto-onkogeny se běžně vyskytují v genomu a jejich funkcí je kontrolovat procesy související se stimulací buněčného dělení, inhibicí diferenciace a buněčné smrti. Všechny tyto procesy jsou důležité pro normální vývoj organizmu, homeostázu počtu buněk, architekturu a funkci tkání (Chial, 2008; Hanahan *et* Weinberg, 2011).

Proto-onkogeny mohou být deregulovány nebo aktivovány bodovými mutacemi, které obvykle vznikají v důsledku působení chemických nebo fyzikálních mutagenů, dále genovou amplifikací a chromozomálním přeskupením (Croce, 2008). Vyznačují se dominantní aktivitou, to znamená, že k jejich deregulaci či aktivaci postačuje mutace pouze jedné alely. Mutovaná verze se nazývá onkogen a vede k transformaci normální buňky

v buňku nádorovou (Chial, 2008). Onkogeny můžeme dělit do několika skupin podle toho, ve které signální kaskádě hrají klíčovou roli: transkripční faktory, chromatinové remodelátory, růstové faktory, receptory růstových faktorů, signální transduktory a regulátory apoptózy (Croce, 2008).

2.1.2 Inaktivace tumor supresorových genů

Tumor supresorové geny mají opačnou funkci k onkogenům. Za fyziologických podmínek různými způsoby negativně regulují buněčný růst a proliferaci. K tomu, aby získaly onkogenní potenciál, vyžadují mutaci v obou alelách, čímž ztrácí svou inhibiční funkci. Mezi tyto mutace patří delece a inzerce různého rozsahu, ale i mutace vedoucí k produkci kratších proteinů. Tumor supresorové geny jsou tedy u nádorových buněk inaktivovány na rozdíl od proto-onkogenů, které jsou aktivovány. Dalším ze způsobů jejich inaktivace je tzv. genové umlčování prostřednictvím epigenetických změn (Levine, 1995; Vogelstein *et* Kinzler, 2004; Hanahan *et* Weinberg, 2011).

2.2 Konvenční terapie

V současné době se při léčbě nádorových onemocnění využívá jak chemoterapeutických, tak i radioterapeutických metod a to zejména v kombinaci s cílenou biologickou léčbou.

Chemoterapie využívající tradičních cytotoxických léčiv je založena na přímém poškození DNA nebo na ovlivnění procesů asociovaných s DNA. Cytostatika mohou interagovat přímo s DNA, vmezeřovat se mezi její báze, chemicky modifikovat její strukturu nebo nahrazovat báze za jejich analogy. Také mohou snižovat množství volných bází potřebných pro syntézu DNA (a RNA), mohou interagovat s některými proteiny asociovanými s DNA a mohou postihovat mikrotubuly, které organizují chromozomy v průběhu mitózy. Všechny tyto procesy vedou k zastavení buněčného cyklu a v důsledku častého poškození reparačních systémů rakovinných buněk, které nemohou opravit DNA, dojde k navození buněčné smrti. Na účinek cytostatik jsou citlivé rychle se dělící buňky, zejména rakovinné, ale i buňky kostní dřeně, kůže, vlasových folikulů a gastrointestinální sliznice. Chemoterapie je tedy často doprovázena nežádoucími účinky.

Radioterapie spočívá v absorpci ionizujícího záření rakovinnými buňkami, přičemž dochází k tvorbě nestabilních volných radikálů. Tyto radikály interagují s buněčnými strukturami a způsobují vznik jednovláknových a dvouvláknových zlomů DNA, které ve výsledku vedou k navození buněčné smrti. V současné době lze za pomoci moderních vizualizačních technik (počítačová tomografie, magnetická rezonance apod.) rakovinné buňky zacílit s velmi velkou přesnosti, díky čemuž se eliminuje poškození normálních buněk (Knowles *et* Selby, 2005).

2.3 Cílená biologická terapie

Přechod od cytotoxické terapie k mechanizmu molekulárně cílené terapie představuje zásadní pokrok v progresivním výzkumu léčby rakoviny v posledním desetiletí. Cílená biologická terapie představuje použití nové generace léčiv specificky navrhovaných proti konkrétním definovaným cílům, které zasahují do různých signálních drah včetně regulace buněčného cyklu, apoptózy a angiogeneze. Nové poznatky molekulární genetiky a biologie nádorů umožnily objasnění molekulárních drah podílejících se na patogenezi a progresi rakovinného onemocnění a tím i objasnění celé řady molekulárních cílů pro terapeutickou intervenci (Adjei *et* Rowinsky, 2003; Hoelder *et al.*, 2012).

V minulosti byla většina terapeutických léčiv objevena postupným empirickým testováním velkého množství chemických látek. Takto objevená léčiva však často vykazovala omezenou účinnost a značnou toxicitu. Cílená terapie umožnila mnohem předvídatelnější a účinnější vývoj léčiv, který má za následek zvyšující se počet úspěšných léčebných metod (Adjei *et* Rowinsky, 2003).

V polovině 20. století byly středem zájmu při vývoji protirakovinných léčiv především metabolické enzymy, což vedlo k objevu folátů a metotrexátů jako cílené terapie. Objev struktury DNA a molekulární podstaty replikace DNA umožnil vývoj terapie namířené proti DNA polymerázám a topoizomerázám. Taktéž studium hormonální signalizace a jaderných hormonálních receptorů, objasnění role mnoha kinázových signálních drah, receptorů pro růstový faktor a jejich efektorů poskytlo nové možnosti léčby. V současné době jsou signální dráhy velmi podrobně zkoumány, což spolu s dostupností experimentálních

modelů a např. znalostí principu syntetické letality přispívá k objevu nových cílů (Benson *et al.*, 2006).

2.3.1 Medicinální chemie

Medicinální chemie se zabývá návrhem a syntézou léčiv, která interagují s biologickým systémem a vyvolávají požadovanou biologickou odpověď. Přispívá tedy k rychlejšímu a efektivnějšímu vývoji terapeutik a také snižuje náklady na vývoj (Johnstone, 2012). V posledních letech prodělala převratné změny a to právě v důsledku rychlých pokroků a objevů ve vědě.

V současné době mnoho výzkumných projektů ve farmaceutickém průmyslu začíná právě identifikací vhodného biologického cíle spjatého s chorobou a následně navrhováním léčiva, které interaguje právě s daným cílem. Znalost struktury a funkce cíle, stejně tak jako mechanizmus, jakým interaguje s léčivem, je v tomto přístupu zásadní (Patrick, 2013).

Pro výzkumný projekt je klíčový výběr vhodné biologické eseje nebo vhodného testovacího setu pro nalezení základní struktury léčiva. Test by měl být jednoduchý, rychlý a relevantní, protože ve většině případů je analyzováno velké množství látek. Testy jsou prováděny *in vitro* (na izolovaných buňkách, tkáních, enzymech a receptorech) nebo *in vivo* (na zvířatech). Obecně jsou preferovány *in vitro* testy pro jednoduchost provedení, nižší finanční náročnost a možnost automatizace. Miniaturizace *in vitro* testů a jejich robotizace vedla k procesům nazývaným HTS (high-throughput screening), které umožňují automatickou a efektivní identifikaci potenciálních struktur léčiv z velkého množství látek. Nukleární magnetická rezonanční spektroskopie je dalším analytickým nástrojem pro stanovení, zda testovaná látka interaguje s daným cílem. Izotermická titrační kalorimetrie je termodynamická technika založená na detekci tepelného efektu, jež je generován nebo absorbován při vazbě molekul. Měření tohoto tepla umožňuje stanovit vazebné konstanty, stechiometrii reakce, entalpii a entropii. Tato technika je často využívána pro charakterizaci interakce molekul. Mezi další testovací metody patří také tzv. afinitní screening, povrchová plazmonová rezonance a další (Lopez *et* Makhatadze, 2002; Patrick, 2013).

V současné době se také využívají bioinformatické *in silico* techniky, pomocí kterých je navrhována struktura léčiva na základě struktury vazebného místa cíle. Tyto přístupy umožňují návrh vysoce selektivních léčiv. Jedním z postupů *de novo* navrhování je tzv. návrh molekul na základě fragmentů. V podstatě se jedná o nalezení malých molekul, epitopů, které se navazují na specifické oblasti vazebného místa proteinového cíle. Navržením molekuly obsahující tyto epitopy pak můžeme získat strukturu, která je aktivní a váže se do vazebného místa. Dalším přístupem je navrhování nových látek na základě vlastností jiného léčiva, které je již používáno v medicíně a vykazuje aktivitu. Také strukturní modifikace již užívané látky mohou vést k návrhu léčiv s vyšší účinností (Tang *et al.*, 2006; Patrick, 2013).

2.3.2 Významné cíle léčebných metod

Na počátku signalizační kaskády stojí extracelulární protein, ligand, který se váže na specifický receptor buněčného povrchu. Vazbou dochází k aktivaci intracelulární signalizační kaskády, tedy k transdukci signálu do buňky, jejímž konečným výsledkem je buněčná odpověď. Nádorové buňky se vyznačují poruchami komponent těchto signalizačních drah. Právě tyto komponenty představují potenciální cíle pro terapii (ligandy, receptory, sekundární přenašeče, transkripční faktory apod.). Snahou je inaktivace/aktivace těchto cílů či celých procesů, jejímž výsledkem je regrese nebo destrukce maligního růstu.

2.3.2.1 Receptor epidermálního růstového faktoru

Receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR neboli ErbB1) náleží do skupiny tyrozin kinázových receptorů zahrnující také jeho známé homology ErbB2, ErbB3 a ErbB4. Receptor se skládá z extracelulární domény s vazebným místem pro ligand, transmembránové domény a cytoplazmatické tyrozin kinázové domény. Vazbou růstového faktoru na extracelulární doménu dochází k dimerizaci receptoru za vzniku homodimerů nebo heterodimerů. Následně dochází k autofosforylaci mezi tyrozinovými rezidui cytoplazmatických domén dimeru vedoucí ke konformační změně. Fosforylovaná rezidua poté slouží jako vazebná místa pro proteiny obsahující Src homologní domény 2 nebo fosfotyrozinové domény, jejichž vazba vede k aktivaci významných intracelulárních

signálních drah zapojených do regulace buněčné proliferace a suprese apoptózy (např. Ras, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt/mTOR) (Jorissen *et al.*, 2003; Pecorino, 2008).

Abnormální exprese nebo mutace EGFR a jejich ligandů hraje významnou roli v progresi některých typů tumorů. Inhibice extracelulární domény EGFR, tedy zabránění aktivace receptoru je jedním z racionálních přístupu v protirakovinné léčbě. Další možností terapie je návrh inhibitorů vázajících se do ATP vazebného místa receptoru, čímž je zabráněno autofosforylaci a následné signalizaci (Adjei *et* Rowinsky, 2003).

2.3.2.2 Ras signální dráha

Signální dráha Ras proteinu hraje klíčovou roli v přenosu proliferativních a antiapoptotických signálů z receptorů umístěných na povrchu buňky do jejího jádra. Ras proteiny a jejich geny byly objeveny a charakterizovány již před 30 lety. Patří do skupiny nízkomolekulárních G-proteinů, které cyklují mezi inaktivním stavem s vázaným GDP a aktivním stavem s vázaným GTP. Proces aktivace Ras proteinu zahrnuje přeměnu GDP na GTP katalyzovanou specifickými faktory GEFs (guanin nucleotide exchange factors). K inaktivaci dochází hydrolýzou GTP na GDP katalyzovanou GTP-aktivačními proteiny (GAPs). Ras proteiny tedy fungují jako molekulární přepínače, které zprostředkovávají transdukci signálu mezi růstovým faktorem na povrchu buňky a intracelulárními signálními drahami. Mutace genu Ras byla zaznamenána přibližně u 30 % lidských malignit a vede k rezistenci proteinu Ras vůči GAPs, čímž je zabráněno jejich inaktivaci. Výsledkem je kontinuální stimulace buněčné proliferace a inhibice apoptózy. Z tohoto důvodu je právě Ras signalizace důležitým cílem nových terapeutických léčiv (Kjeldgaard *et al.*, 1996; Adjei *et* Rowinsky, 2003; Downward, 2003; Gysin *et al.*, 2011).

Nově nasyntetizované Ras proteiny podstupují řadu post-translačních modifikací, které jsou uskutečňovány na CAAX motivu přítomném na karboxylovém konci. Prvním krokem modifikace je farnezylace Ras proteinu, jež je kritická pro jeho funkci. Enzym farnezyltransferáza katalyzuje vazbu farnezylu na cystein v CAAX motivu. Následuje endoproteolytické odštěpení zbytků AAX a reverzibilní karboxymethylace cysteinu. Účelem post-translační modifikace je lokalizace Ras proteinu do subcelulárního prostoru (především na vnitřní stranu plazmatické membrány), která je klíčová pro jeho biologickou funkci (Cox *et* Der, 2002; Downward, 2003).

Právě inaktivace enzymu farnezyltransferázy je jednou z možností inhibice buněčné proliferace. Především se jedná o navrhování sloučenin napodobujících CAAX motiv. Tyto sloučeniny jsou schopny vázat se do vazebného místa enzymu a zabraňují tak vazbě Ras proteinu. Především farnezyltransferázové inhibitory prokázaly pozoruhodnou schopnost blokovat onkogenezi v preklinických studiích i určitou účinnost v klinických studiích a to zejména v kombinaci s taxany (Adjei, 2001; Cox *et* Der, 2002). Nicméně v posledních letech se ukazuje, že klíčovým cílem těchto inhibitorů nemusí být pouze Ras proteiny, ale i další proteiny nesoucí motiv CAAX (Crul *et al.*, 2001).

Ras protein reguluje velké množství signálních drah, mezi které patří např. Rac, Rho a Raf/MEK/ERK dráhy.

2.3.2.3 Raf/MEK/Erk signální dráha

Raf je rodinou serin/threoninových kináz zahrnující tři izoformy. Vazba proteinu Ras v aktivním stavu (ve vazbě s GTP) na Raf způsobuje jeho relokalizaci do plazmatické membrány, čímž je aktivován. Aktivované Raf fosforylují mitogen-aktivované protein kinázy kinázy 1 a 2 (MEK1 a 2), které dále fosforylují mitogen-aktivované protein kinázy 1 a 2 (MAPK1 a 2 neboli ERK1 a 2). Aktivované ERK jsou transportovány do jádra, kde prostřednictvím transkripčních faktorů regulují genovou expresi efektorů, která vede k proliferaci. Raf i MEK představují další potenciální cíle, které mohou být využity při terapii (Lyons *et al.*, 2001; Downward, 2003).

2.3.2.4 PI3K/Akt/mTOR signální dráha

Protein mTOR (mammalian target of rapamycin) náleží do skupiny serin/threoninových kináz a je nezbytným mediátorem signálů pocházejících ze signální dráhy fosfoinositol-3-kinázy (PI3K) aktivované prostřednictvím tyrozin kinázových receptorů. Aktivovaná PI3K katalyzuje produkci sekundárních přenašečů, které aktivují proteinkinázu B (PKB neboli Akt). Negativním regulátorem PI3K signální dráhy je fosfatázový a tenzinový homolog (PTEN). Protein mTOR se podílí zejména na regulaci translace, buněčného růstu a metabolizmu. Jeho hyperaktivita spolu s mutacemi PTEN byla zaznamenána u mnoha nádorových buněk,

proto se signální dráha PI3K/Akt/mTOR stala objektem studia a novým cílem terapie (Huang *et* Houghton, 2003; Meric-Bernstam *et* Gonzalez-Angulo, 2009).

Protein mTOR interaguje s dalšími proteiny a vytváří mTOR komplex 1 a 2 (mTORC1 a mTORC2). Aktivace komplexu mTORC1 vede k translaci mediátorových RNA (mRNA), které jsou kritické pro průběh buněčného cyklu a pro proliferaci. Nejlépe prostudovaným efektorem tohoto komplexu je ribozomální S6 kináza, která fosforyluje 40S ribozomální protein S6 a tím stimuluje translaci mRNA nesoucí 5' terminální oligopyrimidinový trakt. Dalším významným efektorem je 4E vázající protein (4E-BP), jehož fosforylace vede k uvolnění eukaryotického iniciačního faktoru 4E. Iniciační faktor se následně váže na čepičku mRNA jako součást translačního iniciačního komplexu (Vogt, 2001; Wang *et al.*, 2008).

Signální dráha mTOR byla objevena v souvislosti se studiemi zabývajícími se mechanizmem účinku rapamycinu, který se s jeho intracelulárním receptorem váže na komplex mTORC1 a inhibuje ho. Spolu s jeho analogy představují významné inhibitory, které zastavují mnoho procesů spojených s proliferací, angiogenezí a inhibicí buněčné smrti (Vogt, 2001).

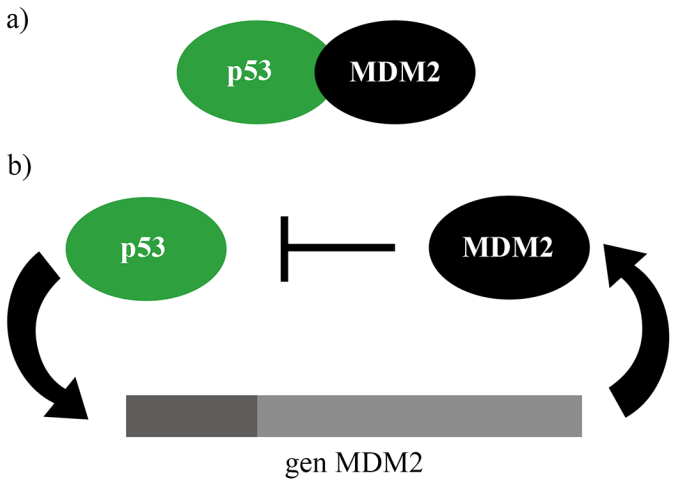
2.3.2.5 Protein p53

Protein p53 byl poprvé popsán již v roce 1979 a později byl identifikován jako tumor supresor (Linzer *et* Levine, 1979; Lane *et* Crawford, 1979; Levine *et* Momand, 1990). U více než 50 % lidských nádorů je funkce proteinu p53 pozměněna, přičemž přibližně v polovině případů je způsobena přímou mutací v jeho genu. Velmi často se také vyskytují poruchy v regulačních drahách tohoto proteinu. Jedná se o transkripční faktor, který je za normálních podmínek v buňce neaktivní. K jeho aktivaci dochází např. působením buněčného stresu či v důsledku poškození DNA buňky. Ve snaze ochránit organizmus před potenciálními rakovinnými buňkami pozastavuje buněčný cyklus poškozených buněk, aby mohlo dojít k jejich opravě reparačními mechanizmy, případně k indukci apoptózy. Často bývá označován jako tzv. strážce genomu.

Jedním z jeho významných transkripčních cílů je gen kódující protein p21. Tento protein inhibuje některé komplexy cyklin-dependentních kináz (CDK) a jejich cyklinů, díky čemuž dochází k pozastavení buněčného cyklu. Protein p21 se také váže na PCNA (proliferating cell nuclear antigen) a tím inhibuje syntézu DNA a naopak stimuluje opravu

poškozené DNA. Mezi další transkripční cíle patří geny proapoptotických proteinů (např. Bax), jejichž exprese je vlivem proteinu p53 indukována, a geny antiapoptotických proteinů (např. Bcl-2), jejichž exprese je naopak potlačena. Výsledkem tohoto působení je stimulace apoptózy (Vogelstein *et al.*, 2000; Steele *et* Lane, 2005; Pecorino, 2008).

Hladina proteinu p53 v buňce je za normálních podmínek nízká a jeho aktivita je regulována prostřednictvím degradace. Hlavním regulátorem je protein MDM2 (murine double minute 2). Je to ubiquitin ligáza, která připojuje ke karboxy-terminální doméně proteinu malý peptid ubiquitin, čímž ho označí k degradaci ubiquitin-proteazomovým systémem. Dále také modifikuje transkripční aktivitu proteinu p53 v jádře tím, že se na něj váže a transportuje ho do cytoplazmy. Jedná se o zpětnovazebnou regulaci, protože gen proteinu MDM2 je pozitivním transkripčním cílem proteinu p53 (Obr. 2). To znamená, že protein p53 stimuluje produkci svého vlastního negativního regulátoru (Boyd *et al.*, 2000; Geyer *et al.*, 2000; Michael *et* Oren, 2002).



Obr. 2: Zpětnovazebná regulace p53, a) interakce proteinů p53 a MDM2 vede k degradaci proteinu p53, b) volný protein p53 aktivuje transkripci genu MDM2 (upraveno podle Fotouhi et Graves, 2005)

Mutace v genu p53 vede k expresi aberantních konformací proteinu, jež se nemohou vázat na DNA, a v důsledku toho nedochází k syntéze inhibitoru MDM2 a proteinů esenciálních pro indukci apoptózy. Vývoj terapeutik, která stabilizují strukturu

mutovaných p53 a obnovují jejich transkripční aktivitu, představuje jeden ze způsobů léčby (Pecorino, 2008). V případě poruchy regulace proteinu p53 v důsledku zvýšené hladiny proteinu MDM2 je jedním z možných způsobů terapie inhibice ubiquitin ligázové aktivity nebo inhibice interakce proteinů p53 a MDM2, díky čemuž dochází k obnovení tumor supresorové funkce proteinu p53 (Vassilev, 2004; Vassilev, 2007)

2.3.2.6 Cyklin-dependentní kinázy

Cyklin-dependentní kinázy patří do skupiny serin/threoninových proteinkináz, které hrají klíčovou roli zejména v regulaci buněčného cyklu a transkripce, ale i apoptózy a diferenciace. Představují atraktivní soubor cílů pro vývoj nových léčiv (Knockaert *et al.*, 2002; Shapiro, 2006). Aktivita CDK je ovlivněna syntézou a degradací pozitivních regulátorů cyklinů, fosforylací a defosforylací, přítomností inhibitorů CDK a také subcelulární lokalizací. Hladina CDK je konstantní, zatímco hladina cyklinů v průběhu buněčného cyklu osciluje. K úplné aktivaci CDK dochází po navázání odpovídajícího cyklinu, přičemž komplexy CDK a cyklinů řídí progresi různými fázemi buněčného cyklu. Aktivace je také podmíněna přítomností CDK-aktivačních kináz a CDC25 fosfatáz (Carnero, 2002; Morgan, 2007). V buňkách se přirozeně vyskytují dvě rodiny inhibitorů CDK. Rodina Cip/Kip, která zahrnuje např. proteiny p21, p27 a p57, a rodina INK4 zahrnující např. INK4A a INK4B (Malumbres *et* Barbacid, 2009).

Nadexprimací cyklinů, inaktivací endogenních inhibitorů či modifikací vlastních CDK dochází k deregulaci buněčného cyklu, která přispívá k rozvoji rakoviny (Malumbres *et* Carnero, 2003). CDK se díky své významné funkci v regulaci buněčného cyklu staly významným cílem pro vývoj cílené biologické léčby.

2.3.2.7 Telomery a telomeráza

Konce lineárních chromozomů jsou opatřeny DNA-proteinovými strukturami, telomerami, které jsou tvořeny tandemově se opakujícími jednotkami sekvence TTAGGG. Slouží jako ochranné čepičky chromozomů, které odlišují přirozené konce od náhodných zlomů na chromozomech, zabraňují aktivaci reparačních mechanizmů, fúzi chromozomů a jejich přítomnost zabraňuje zkracování kódujících sekvencí.

Při každé replikaci dochází ke zkracování telomery o 50-200 bází v důsledku omezených vlastností DNA polymerázy. Její funkčnost je závislá na přítomnosti 3'OH volného konce RNA primeru pro iniciaci syntézy komplementárního vlákna. Po odstranění tohoto primeru zůstává 5' konec nově syntetizovaného vlákna zkrácen. Aby nedocházelo ke ztrátám kódujících sekvencí v každém buněčném cyklu, jsou na koncích chromozomů přítomny telomery. Počet dělení buňky je omezen právě délkou telomer. Jakmile dosáhnou kritické délky, buňka vstupuje do stabilního a ireverzibilního stavu tzv. senescence nebo je stimulována její programovaná buněčná smrt. U zárodečných buněk a některých kmenových buněk je telomera syntetizována *de novo* prostřednictvím reverzní transkriptázy telomerázy (Fleisig *et* Wong, 2007).

Role telomerázy v tumorigenezi je paradoxní. V počátečních stádiích přispívají zkrácené telomery k chromozomální nestabilitě, která urychluje nástup karcinogeneze. V pozdějších stádiích naopak dochází k aktivaci telomerázy, jež vede k nesmrtelnosti rakovinných buněk. Telomeráza je aktivována u 90 % nádorů. Inhibice její enzymové aktivity představuje další ze způsobů cílené terapie (Hackett *et* Greider, 2002).

2.3.2.8 Multichaperonový komplex a ubiquitin-proteazomový systém

Protein Hsp90 (heat shock protein 90) se vyskytuje převážně v cytozolu a to ve všech savčích buňkách. Spolu s kochaperony vytváří multichaperonový komplex, který zajišťuje složení, udržení strukturální integrity a správnou regulaci podjednotek cytozolických proteinů. Je tedy nezbytný pro správnou funkci mnoha proteinů a to včetně proteinů zapojených do regulace buněčného cyklu a přenosu signálů (Picard, 2002). Komplex cykluje mezi otevřeným a uzavřeným stavem. V otevřeném stavu se na něj váže substrát za pomoci kochaperonů. Po navázání ATP a následné hydrolýze komplex přechází do uzavřeného stavu, přičemž dochází k maturaci substrátu (Prodromou *et* Pearl, 2003).

Mezi substráty patří i mnoho významných onkogenních transdukčních proteinů. V případě inhibice Hsp90 dochází k uzamknutí komplexu Hsp90-substrát v otevřeném stavu a k indukci degradace substrátu ubiquitin-proteazomovou drahou. Cílení proteinu Hsp90 představuje významný potenciál pro léčbu rakoviny s výskytem většího množství onkogenních změn, protože může vést k současnému přerušení většího počtu onkogenních drah (Zhang *et* Burrows, 2004).

Ubiquitin-proteazomový systém (UPS) je vysoce konzervovaná dráha odpovědná za degradaci většiny intracelulárních proteinů včetně klíčových proteinů podílejících se na regulaci buněčného cyklu a programované buněčné smrti (např. cykliny, CDK, p21). Jedním z mechanizmů protirakovinné léčby je potlačení buněčné signalizace jaderného faktoru-κB (NF-κB) prostřednictvím inhibice proteazomu. NF-κB je transkripční faktor ovlivňující expresi genů zapojených do procesů onkogeneze, angiogeneze, buněčné invaze, proliferace a inhibice apoptózy. Běžně se vyskytuje v cytoplazmě ve vazbě se svým inhibitorem IκB. Ubiquitinací inhibitoru IκB a jeho následnou degradací proteazomem dochází k aktivaci NF-κB, který je transportován do jádra, kde spouští transkripci cílových genů. Inhibice proteazomu zabraňuje degradaci IκB a tím i aktivaci transkripční funkce NF-κB (Bharti *et* Aggarwal, 2002; Orlowski *et* Kuhn, 2008).

2.3.3 Léčebné přístupy

Cílená terapie zahrnuje nejen použití nízkomolekulárních inhibitorů, ale i dalších metod založených na existenci komplementárního párování bází nukleových kyselin, vnášení terapeutických genů, využití přirozených onkolytických virů apod. Mnohé z cílů uvedených v předchozí kapitole mohou být ovlivněny právě těmito terapeutickými přístupy.

2.3.3.1 Komplementární oligonukleotidy a mikro RNA

Cílená terapie zahrnuje použití komplementárních antisense oligonukleotidů (ASO) a mikro RNA (miRNA), které se vážou se specifickými mRNA sekvencemi. Výsledkem je zablokování translace genetické informace nesené těmito mRNA.

ASO jsou krátké úseky chemicky modifikované jednovláknové DNA dlouhé přibližně 18-20 nukleotidů, které specificky hybridizují s cílovou mRNA na základě párování bází. Nemodifikované fosfodiesterové oligonukleotidy nemají žádné klinické použití a to v důsledku jejich degradace endogenními nukleázami a také z důvodu jejich špatné distribuce *in vivo*. Existuje několik mechanizmů terapeutického působení ASO. Jedním z nich je přímé fyzické blokování sekvencí mRNA. Další možností je inhibice translace založená na působení enzymu ribonukleázy H. Jedná se o běžně se vyskytující endonukleázu hydrolyzující

mRNA vlákna v heteroduplexu DNA/mRNA vzniklého hybridizací ASO s cílovou mRNA (Jansen *et* Zangemeister-Wittke, 2002; Rayburn *et.* Zhang, 2009)

Jedním z velkých objevů bylo zjištění, že do procesu tumorigeneze jsou zapojeny nekódující **miRNA**. Jsou to 19-24 nukleotidů dlouhé RNA transkribované jako dlouhé primární transkripty, které vytváří strukturu vlásenky. Tato struktura je v cytoplazmě štěpena na jednovláknové miRNA, které se mohou specificky vázat na základě komplementarity na odpovídající mRNA a inhibovat její translaci (podobně jako ASO), případně způsobit její degradaci, čímž se v buňce snižuje množství odpovídajícího proteinu. Role endogenních miRNA je pro organizmus esenciální v řadě biologických procesů a jejich modifikace je spojena s aberantní genovou expresí. Použití anti-miRNA, miRNA mimikující přirozené miRNA, poupravené miRNA apod. představuje významný potenciál v léčbě mnoha nemocí (Kota *et al.*, 2009).

S postupným odhalováním genů zapojených do progrese tumorigeneze se objevují noví kandidáti pro tento způsob terapie. Zvýšená/snížená exprese kritických genů totiž může být potlačena právě použitím specifických ASO a zmíněných miRNA.

2.3.3.2 Imunoterapie

Nádorové buňky produkují velké množství specifických proteinů, antigenů, které mohou být rozpoznány imunitním systémem a díky tomu jsou odlišeny od normálních buněk. Avšak i přesto přirozená imunitní odpověď organizmu obvykle není dostatečná k tomu, aby došlo k regresi tumorigeneze. Tumory totiž velmi často využívají různých mechanizmů k tomu, aby se vyhnuly imunitní odpovědi a byly tedy imunitním systémem tolerovány. Např. mutace v antigenech, exprese molekul inhibujících efektorové funkce imunitního systému, odstranění molekul prezentujících antigeny T-buňkám (Drake *et al.*, 2006, Dougan *et* Dranoff, 2009).

Aktivace efektivní protirakovinné imunitní odpovědi vyžaduje dosažení několika základních kroků a to buď spontánně, nebo terapeuticky. Prvním krokem je prezentace antigenů tumoru na povrch dendritických buněk, přičemž antigeny mohou být dodány i exogenně jako součást terapeutické vakcíny. Dendritické buňky musí dále projít procesem maturace a to prostřednictvím aktivačních signálů, které také mohou být dodány terapeuticky. Dalším krokem je generování protektivní T-buněčné odpovědi v lymfatických orgánech

prostřednictvím maturovaných dendritických buněk. Lymfatické uzliny jsou dalším místem terapeutické intervence a to dodáním látek, jež mohou napomáhat v řízení T-buněčné odpovědi. Rakovinné buňky při celém procesu uplatňují mechanizmy, díky kterým se vyhýbají buněčné odpovědi. Dodání terapeutických léčiv může napomáhat ke správné indukci imunitního systému jedince. Terapeutické vakcíny tedy nejen musí vyvolávat T-buněčnou odpověď, ale také musí překonávat toleranci imunitního systému vůči tumoru a indukovat efektorové odpovědi, které budou úspěšné v inhibičním mikroprostředí tumoru. Existují různé typy vakcín, avšak právě dendritické buňky, které jsou kritické pro aktivaci T-buněk, se staly primárním cílem pro vývoj terapeutických vakcín, jež modulují jejich maturaci a funkci (Mendelsohn *et al.*, 2008; Mellman *et al.*, 2011).

2.3.3.3 Monoklonální protilátky

Terapeutika na bázi monoklonálních protilátek představují účinnou terapii pro mnoho typů rakovin. Nové pokroky v molekulární biologii umožnily výrazné zlepšení ve schopnosti navrhovat protilátky, které se specificky zaměřují a následně eliminují rakovinné buňky. Většina používaných terapeutik je odvozeno od protilátek typu IgG (imunoglobulin G). Jsou složeny ze dvou fragmentů vázajících antigen, flexibilní oblasti a konstantní oblasti, jež je odpovědná za interakci s komplementem imunitního systému, s imunitními efektorovými buňkami a s receptory podílejícími se na udržování konstantní koncentrace IgG v krevním oběhu. Struktura protilátky obsahuje dva identické lehké a dva identické těžké polypeptidové řetězce (Trail *et al.*, 2003; Binyamin *et al.*, 2006).

Protilátky mohou zničit rakovinné buňky několika různými způsoby. Mohou se vázat jak na ligand (např. růstový faktor), tak na receptor (např. EGFR) a blokovat, případně stimulovat ligand-receptorové signální dráhy související s rozvojem tumoru. Druhou méně častou možností je obalení rakovinné buňky produkující antigeny protilátkami, jež přitahují fagocytující buňky (neutrofily a makrofágy), které jsou schopné fagocytovat označenou buňku.

Významnou složkou imunitního systému je tzv. komplement. Jedním ze způsobů jeho aktivace je vazba komplexu protilátka-antigen na jeho C1 podjednotku. Aktivace komplementu vede k produkci tzv. membrány atakujícího komplexu, který perforuje membránu buňky a tím navozuje její buněčnou smrt. Dalším mechanizmem je eliminace

buněk prostřednictvím tzv. přirozených zabijáků buněk, makrofágů, neutrofilů a eozinofilů, kteří postrádají imunologickou specifitu a paměť, avšak nesou membránový receptor vázající konstantní oblast protilátek navázaných na antigeny buňky. Po vazbě dochází k produkci lytických enzymů, tumor nekrotizujících faktorů a dalších cytotoxických látek, které vedou k cílené buněčné smrti (Knowles *et* Selby, 2005).

2.3.3.4 Genová terapie a onkolytické viry

Jak již bylo zmíněno, nádorové buňky nesou mutace či epigenetické modifikace v genech, jejichž produkty mají zásadní roli v regulaci proliferace a apoptózy. Nahrazení těchto poškozených genů funkčními je jednou z možností, jak zvrátit proces tumorigeneze.

Genová terapie představuje vnesení exogenní nukleové kyseliny (obvykle DNA) do poškozených buněk s cílem změnit jejich fenotyp. Exogenní sekvence sestávají z transkripční jednotky terapeutického genu a regulačních sekvencí kontrolujících iniciaci a terminaci transkripce. Mohou nahrazovat chybějící nebo poškozené buněčné chromozomální sekvence nebo mohou poskytovat zcela nový genový produkt. Výsledkem může být obnovení normálního fenotypu nebo indukce buněčné smrti rakovinné buňky prostřednictvím exprese tzv. sebevražedných genů. Cílem genové terapie je maximální účinnost a minimální toxicita (Knowles *et* Selby, 2005).

Úspěch genové terapie závisí v podstatě na tom, zda terapeutický gen vstoupí do cílové buňky bez jakéhokoliv biologického poškození. DNA je v biologickém materiálu vysoce náchylná na působení nukleáz a navíc její hydrofilní aniontová povaha a velikost zabraňuje pasivnímu průniku přes buněčnou membránu. DNA proto musí být vpravena prostřednictvím transportních systémů nebo vektorů, které vnesou terapeutický gen do cílové buňky a chrání ho před působením nukleáz. Využívají se jak vektory virové, tak i nevirové (Ibraheem *et al.*, 2014).

Onkolytické viry se vyznačují selektivní replikací pouze v nádorových buňkách. Některé viry vykazují selektivní replikaci přirozeně. Využívají narušených obranných mechanizmů k průniku do rakovinné buňky a následnému růstu. Rakovinné buňky jsou vůči virové infekci bezbranné, zatímco normální buňky jsou chráněny. Infekce ve většině případů vede k buněčné smrti. V současné době jsou již i další viry geneticky modifikovány za účelem selektivní replikace a lytické funkce v rakovinných buňkách (Mendelsohn *et al*, 2008).

2.3.3.5 Syntetická letalita

Poměrně novým přístupem v léčbě rakoviny je koncept syntetické letality, jehož efekt spočívá v existenci různých genových interakcí. Pokud dva geny mají mezi sebou syntetickou letální interakci, tak inhibice nebo mutace jednoho z nich nevede ke snížení viability buněk. Avšak simultální inhibice obou genů má za následek ztrátu buněčné viability.

Pokud jedním z genů v interakci je tumor supresorový gen či onkogen, tak druhý gen se stává potenciálním terapeutickým cílem, jehož cílení může být využito pro eliminaci rakovinných buněk, ale nikoliv normálních buněk. Tato interakce se může vyskytovat mezi geny účastnící se stejné, ale i odlišné biochemické dráhy, avšak komponenty jedné dráhy často sdílejí stejný gen. V současné době nové technologie umožňují rychlou identifikaci interakcí mezi geny v lidských buňkách a jejich využití při cílení tumor supresorů a onkogenů, jež mají omezené farmakologické působení. Ačkoli potenciál konceptu syntetické letality v léčbě rakoviny byl navržen již před více než 10 lety, do klinického testování se dostal teprve nedávno (Brough, 2011).

Jedním z příkladů je dysfunkce tumor supresorových genů BRCA1 nebo BRCA2 kódujících velké proteiny, které jsou součástí několika buněčných drah včetně transkripce, regulace buněčného cyklu a udržování integrity genomu. Nejlépe prostudovaná je pak jejich role v opravě dvouvláknových zlomů DNA pomocí genové konverze. Dysfunkce těchto genů je letální v kombinaci s inhibicí enzymu poly(ADP-ribóza) polymeráza 1 (PARP-1), který je klíčový pro opravu jednovláknových zlomů DNA. BRCA1/2 deficientní buňky však nejsou inhibovány pouze genovým umlčováním PARP-1, ale jsou také senzitivní na použití nízkomolekulárních inhibitorů enzymu PARP-1. Dysfunkce BRCA1/2 a použití PARP-1 inhibitorů totiž vede k inhibici reparačních systémů a následnému kumulování lézí v DNA, což může vést k zastavení buněčného cyklu a případně i k buněčné smrti. PARP-1 inhibitory tedy mohou poskytovat účinnou léčbu u pacientů nesoucích mutace v BRCA1/2 genech (Ashworth, 2008).

Dalším příkladem je vliv inhibice CDK4 na buňky nemalobuněčného karcinomu plic výrazně exprimující K-Ras onkogen. Absence CDK4 v těchto buňkách má výrazný dopad na růst nádoru a to v důsledku syntetické letální interakce mezi onkogenem K-Ras a absencí CDK4, jejímž výsledkem je bezprostřední nástup senescence buněk. Avšak důvod, proč je

signální dráha K-Ras tak úzce spjata s přítomností CDK4, zatím není objasněn. Nicméně tato interakce poskytuje nový potenciál pro terapeutickou léčbu (Puyol *et al.*, 2010).

Atraktivním cílem pro terapeutickou léčbu je MYC gen, který je jedním z nejčastějších onkogenů, jehož amplifikace či nadexprimace přispívá ke vzniku a rozvoji lidského karcinomu prsu. Nicméně, dosud není dostupné žádné léčivo, které by na MYC působilo přímo a bylo klinicky efektivní. Avšak několik kináz buněčného cyklu se vyznačuje syntetickou letální interakcí s MYC. Inhibice CDK1 prostřednictvím nízkomolekulárních inhibitorů, nikoliv však inhibice CDK2 a CDK4/6, výrazně snižuje viabilitu MYC-dependentních rakovinných buněk (Kang *et al.*, 2014).

3 CÍL PRÁCE

Cílem experimentální části bakalářské práce bylo charakterizovat vliv čtyř vybraných inhibitorů z knihovny substituovaných 2-hydroxy-*N*-(arylalkyl)benzamidů na nádorovou linii G361 *in* vitro. Cílem bylo stanovit jejich proapoptotické účinky a následně blíže specifikovat vliv jednoho kandidáta na expresi vybraných proteinů a na buněčný cyklus nádorové linie.

4 MATERIÁL

4.1 Přístrojové vybavení

V experimentální části bakalářské práce bylo použito následující přístrojové vybavení: flowbox s vertikálním prouděním vzduchu TC 48 (Gelaire), CO_2 inkubátor (Sanyo), vodní lázeň, mikroskop Nikon TMS (Nikon), membránová vývěva KNFlab (P-lab), centrifuga BR4i (Jouan), ultrazvukový homogenizátor Sonopuls HD2200 (Bandelin), UV-VIS spektrofotometr UV-1800 (Shimadzu), aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad), blotovací aparatura Mini Trans-Blot Cell (BioRad), chemiluminiscenční vyvolávací automat LAS4000 (FujiFilm), fluorescenční reader pro mikrotitrační destičky Fluoroskan Ascent (Thermo Labsystems), průtokový cytometr Cell Lab Quanta^{TM} SC-MPL (Beckman Coulter).

4.2 Použité chemikálie

Při experimentech byly použity následující chemikálie: thylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), ethylenglykoltetraoctová kyselina (EGTA), trypsin, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), penicilin, streptomycin, glutamin, dimethylsulfoxid (DMSO), leupeptin, aprotinin, dithiothreitol (DTT), fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), fluorid sodný, akrylamid, N,N'-methylenbisakrylamid, tetramethylethylendiamin (TEMED), peroxodisíran amonný, hydroxid draselný, Nonidet P-40, Triton X-100, bromfenolová modř, ribonukleáza A, propidiumjodid, acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylkumarin (Ac-DEVD-AMC), 5-brom-2'-deoxyuridin (BrdU) od firmy Sigma Aldrich; hovězí sérový albumin (BSA) od firmy Invitrogen; Tween 20, tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) od firmy MP Biomedicals; chemiluminiscenční substráty luminol a peroxid od firmy Thermo Scientific; 2-merkaptoethanol, Ponceau S od firmy Serva; kyslina chlorovodíková, chlorid sodný, glycerol, dodecylsíran sodný (SDS) od firmy Lach-ner; KH_2PO_4, $Na_2B_4O_7.10H_2O$ od firmy Chemapol; piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonová kyselina) (PIPES); ethanol, chlorid draselný, $Na_2HPO_4.12H_2O$ od firmy Penta; glycin od firmy MGP Zlín.

4.3 Použité roztoky

Při experimentech byly použity následující roztoky:

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM $Na_2HPO_4.12H_2O$, 2 mM KH_2PO_4 (pH = 7,4 – 7,5);

TBS: 137 mM NaCl, 20 mM TRIS (pH = 6,8);

RIPA pufr: 20 mM TRIS (pH = 7,4), 100 mM NaCl, 2 mM EGTA, 5 mM EDTA, 2 mM NaF, 0,2% Nonidet P-40 (pH = 7,4), před použitím přidán: 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 μg/ml leupeptin, 10 μg/ml aprotinin;

Činidlo Bradfordové: 0,01% Coomassie brilliant blue, 95% etanol, 85% kyselina fosforečná

5x SDS vzorkovací pufr: 0,3 M TRIS (pH = 6,8), 10% SDS, 50% glycerol, 0,05% Bromfenolová modř, 5% 2-merkaptoethanol;

Elektoforetický pufr: 25 mM TRIS, 192 mM glycin, 0,1% SDS;

Blotovací pufr: 25 mM TRIS, 192 mM glycin;

Blokovací roztok: 3% BSA v TBS s 0,1% Tween 20;

Ponceau S: 0,2% v 1% kyselině octové;

Kaspázový reakční pufr: 25 mM PIPES/KOH (pH = 7,3), 2 mM EGTA, 2 mM $MgCl_2$, před použitím přidán 5 mM DTT;

Promývací roztoky pro cytometrické techniky: 1% BSA v PBS, 1% BSA v PBS s 0,1% Tween 20, 0,5% BSA v PBS a 2 M HCl s 0,5% Triton X-100.

4.4 Použité protilátky

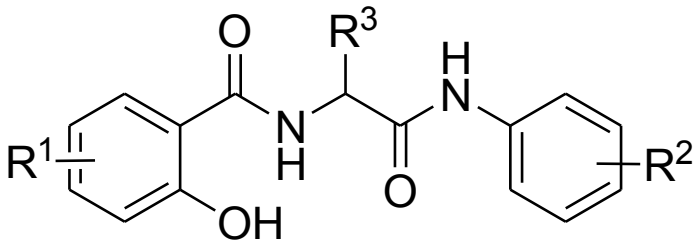
V experimentální části bakalářské práce byly použity specifické protilátky od firmy Santa Cruz Biotechnology rozlišující proteiny p27 (klon F-8), PARP-1 (klon F2), cyklin B (klon GNS1), cyklin E (klon HE12), cyklin A (klon BF683), β-aktin (klon C4), Mcl-1 (klon S-19) a CDK1, protilátky od firmy Cell Signalling rozlišující proteiny Rb (klon 4H1), kaspáza 7, kaspáza 3 (klon SG2), protilátka od firmy Sigma Aldrich rozlišující protein LC3 a protilátka od firmy Calbiochem rozlišující protein Bcl-2. Dále byly použity protilátky rozlišující proteiny p53 (klon DO-1), p21 a CDK4 (DCS156.2) od Dr. B. Vojtěška z Masarykova onkologického ústavu v Brně.

Primární protilátky byly vizualizovány pomocí sekundárních protilátek značených křenovou peroxidázou od firmy Sigma Aldrich. Při cytometrických analýzách byla použita protilátka anti-BrdU-FITC od firmy Roche.

4.5 Použité substituované 2-hydroxy-*N*-(arylalkyl)benzamidy

V experimentální části bakalářské práce byly testovány biologické účinky čtyř substituovaných 2-hydroxy-*N*-(arylalkyl)benzamidů z kolekce Dr. Aleše Imramovského z Ústavu organické chemie a technologie při Fakultě chemicko-technologické Univerzity Pardubice.

Vybrané látky byly připraveny jako 100 mM roztoky ve 100% DMSO a při experimentech byly ředěny v kultivačním médiu, přičemž koncentrace DMSO nepřesáhla 0,1 %.



Obr. 3: Obecná chemická struktura testovaných látek

4.6 Použitá buněčná linie

Při experimentech byla použita nádorová buněčná linie G361 odvozená od lidského melanomu.

Buňky byly kultivovány v kultivačním médiu DMEM s přídavkem 10% fetálního bovinního séra, penicilinu (0,1 U/ml), streptomycinu (0,1 mg/ml) a L-glutaminu (0,3 mg/ml), přičemž kultivace probíhala v inkubátoru při teplotě 37 °C v 5% CO_2.

5 METODIKA

5.1 Kultivace, ovlivnění buněčné linie, sklízení a lyzace

Buněčná linie G361 byla kultivována při teplotě 37 °C v atmosféře obsahující 5 % CO_2. Buňky byly vysazeny na kultivační Petriho misky a byly kultivovány 40 hodin, aby došlo k jejich přilnutí (adhezi) ke dnu kultivační nádoby. Poté jim bylo vyměněno kultivační médium za médium obsahující testovanou látku o příslušné koncentraci, ve kterém byly inkubovány 24 hodin. V případě kontrolních buněk bylo použito médium s odpovídajícím množstvím DMSO, přičemž koncentrace nepřesáhla 0,1 %.

Buňky určené pro další analýzu metodou western blotting a metodou stanovení aktivity kaspázy 3, 7 byly sklizeny seškrabáním ze dna misky pomocí škrabky, přeneseny do zkumavky a centrifugovány 8 minut při 1000 g a teplotě 4 °C. Následně byly 2x promyty roztokem PBS, přičemž byly přeneseny do mikrozkumavek a centrifugovány. Promývací roztok byl odstraněn a buněčný pelet uskladněn při −80 °C.

Buněčný pelet byl resuspendován v příslušném objemu lyzačního pufru RIPA podle velikosti peletu a po dobu 25 minut byl lyzován na ledu s občasným resuspendováním, poté sonikován pomocí ultrazvukového homogenizátoru (3 cykly, 10 sekund, 40 % max). Následovala centrifugace po dobu 25 minut při 14 000 rpm a teplotě 4 °C. Lyzát byl odebrán do mikrozkumavky a spektrofotometrickou metodou podle Bradfordové (Bradford, 1976) byla stanovena koncentrace proteinů, která byla u jednotlivých vzorků vyrovnána ředěním pomocí RIPA pufru. K lyzátům určeným pro analýzu metodou western blotting byl přidán 5x SDS vzorkovací pufr a byly denaturovány po dobu 5 minut při teplotě 95 °C.

Buňky určené pro cytometrickou analýzu byly 30 minut před sklízením naznačeny pomocí 10 μM 5-bromo-2‘-deoxyuridinu a poté sklizeny trypsinizací. Kultivační médium bylo odebráno do zkumavky, dno misky s buňkami opláchnuto roztokem EDTA, který byl také odebrán. Buňky byly inkubovány 3 minuty s trypsinem, aby došlo k jejich odlepení ode dna kultivační nádoby, a následně přidáno kultivační médium a vše bylo přeneseno do zkumavky. Následovala centrifugace 8 minut při 1000 g a teplotě 4 °C a promytí roztokem PBS. Poté byly vzorky opět centrifugovány, promývací roztok odstraněn, buněčný pelet resuspendován ve 100 μl PBS a následně zafixován vychlazeným 70% ethanolem přidávaným po kapkách za mírného míchání. Vzorky byly uskladněny při −20 °C.

5.2 Elektroforéza, western blotting, imunodetekce

Proteiny byly separovány elektroforézou v polyakrylamidovém gelu za denaturujících podmínek. Pro separaci byly použity 5% zaostřovací gely v kombinaci s 10% nebo 12,5% dělícími gely v závislosti na molekulových hmotnostech sledovaných proteinů. Separace probíhala přibližně 30 min při napětí 80 V, jakmile vzorky pronikly do dělícího gelu, bylo napětí zvýšeno na 120 V. Po separaci byly proteiny přeneseny na nitrocelulózovou membránu pomocí metody western blotting při proudu 270 mA a stálého chlazení ledem po dobu 2 hodin. Proteiny na nitrocelulózové membráně byly obarveny roztokem Ponceau S pro zjištění vyrovnané koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích. Membrány poté byly odbarveny v roztoku TBS a poté blokovány po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě v 3% roztoku BSA v TBS s 0,1% Tween 20. Následně byla provedena imunodetekce, kdy na membrány byly naneseny roztoky příslušných primárních protilátek v blokovacím pufru, inkubace probíhala přes noc při teplotě 4 °C. Druhý den byly membrány krátce promyty v TBS a TBS s 0,1% Tween 20 a inkubovány při laboratorní teplotě s roztoky příslušných sekundárních protilátek značených křenovou peroxidázou. Membrány byly znovu promyty v TBS a TBS s 0,1% Tween 20. K samotné vizualizaci byl použit chemiluminiscenční kit ECL (roztok peroxidu a luminolu v poměru 1:1) a detekce signálu byla provedena na přístroji LAS4000 (FujiFilm).

5.3 Stanovení aktivity kaspázy 3 a 7

Měření aktivity kaspázy je založeno na hydrolýze peptidového substrátu Ac-DEVD-AMC kaspázami 3 a 7, přičemž vzniká fluoreskující produkt AMC, který po ozáření vlnovou délkou 346 nm emituje záření o vlnové délce 442 nm, které je zaznamenáno detektorem.

Buněčné lyzáty byly napipetovány do mikrotitrační destičky s kulatým dnem tak, aby jamce přibližně odpovídalo 15 μg proteinů, poté bylo přidáno 100 μl reakčního pufru se 100 μM substrátem Ac-DEVD-AMC. Jako negativní kontrola pro stanovení autolýzy substrátu v lyzačním pufru a pro následný výpočet relativní aktivity kaspázy sledovaných vzorků byl použit lyzační pufr. Destička byla inkubována při laboratorní teplotě ve tmě a po hodinových intervalech byla měřena fluorescence při 346/442 nm (ex/em) pomocí fluorescenčního readru Fluoroskan Ascent (Thermo Labsystems).

5.4 Cytometrická analýza

Sklizené buňky zafixované v 70% ethanolu byly centrifugovány 8 minut při 1000 g a teplotě 4 °C a následně hydratovány roztokem PBS. Po další centrifugaci byl pelet resuspendován v malém objemu roztoku 1% BSA v PBS s 0,1% Tween 20 a po kapkách byla přidána 2M HCl s 0,5% tritonem X-100 za mírného míchání. Následovalo 30 minut inkubace za občasného promíchávání při laboratorní teplotě a centrifugace. Buňky byly promyty 0,1M $Na_2B_4O_7.10\ H_2O$ (pH = 8,5) a poté roztokem 1% BSA v PBS s 0,5% Tween 20. Po centrifugaci a odsátí supernatantu byly buňky inkubovány s protilátkou anti-BrdU-FITC v roztoku 1% BSA v PBS s 0,1% Tween 20 po dobu 1,5 hodiny při pokojové teplotě ve tmě, poté promyty v roztoku 1% BSA v PBS s 0,1% Tween 20 a centrifugovány. Buněčný pelet byl resuspendován v 1 ml roztoku filtrovaného PBS s 20 µl RNázy (10 mg/ml) a 10 µl propidium jodidu (0,1 mg/ml). Buňky byly inkubovány při laboratorní teplotě ve tmě po dobu 30 minut za občasného promíchávání. Analýza vzorku byla provedena s použitím 488 nm laseru na průtokovém cytometru Cell Lab Quanta^{TM} SC-Mpl (Beckman Coulter)

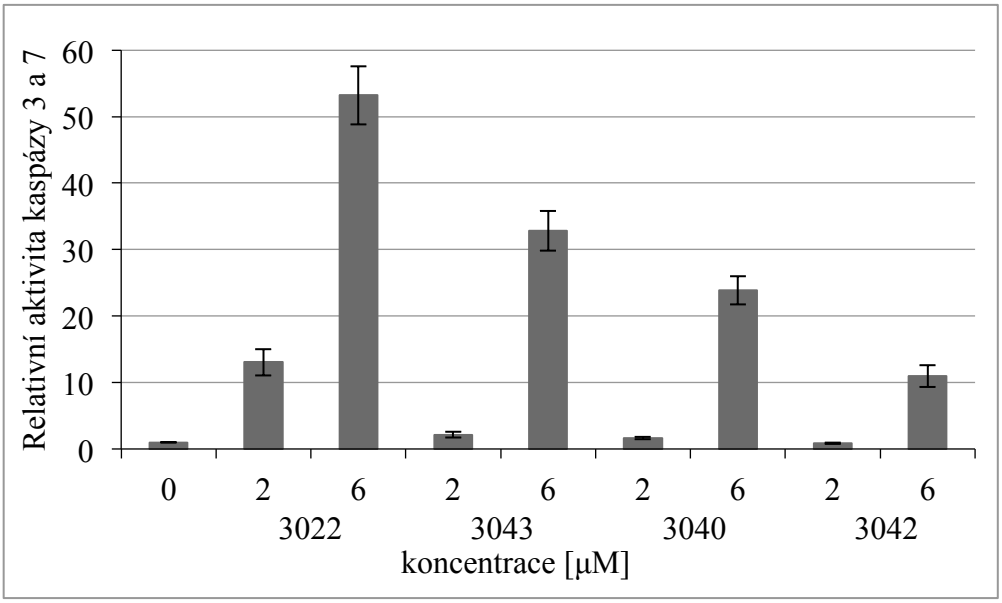
Propidium jodid působí jako interkalační agens. Jeho široké emisní spektrum s maximální intenzitou okolo 610 nm po excitaci zářením o vlnové délce 480 nm bylo zachycováno detektorem spojeným s filtrem FL3, přičemž emise záření stechiometricky odpovídá množství DNA v buňce. Současně byla pomocí protilátky anti-Brdu-FITC detekována inkorporace 5-bromo-2‘-deoxyuridinu, který se inkorporuje do nově syntetizované DNA dělících se buněk jako analog thymidinu v S fázi buněčného cyklu. Je tedy často používaným markerem aktivně proliferujících buněk a slouží také k přesné kvantifikaci buněk v S fázi. Emisní spektrum FITC s maximální intenzitou okolo 510 nm po excitaci záření o vlnové délce 494 nm bylo zachycováno detektorem spojeným s filtrem FL1.

6 VÝSLEDKY

6.1 Stanovení aktivity kaspázy 3 a 7

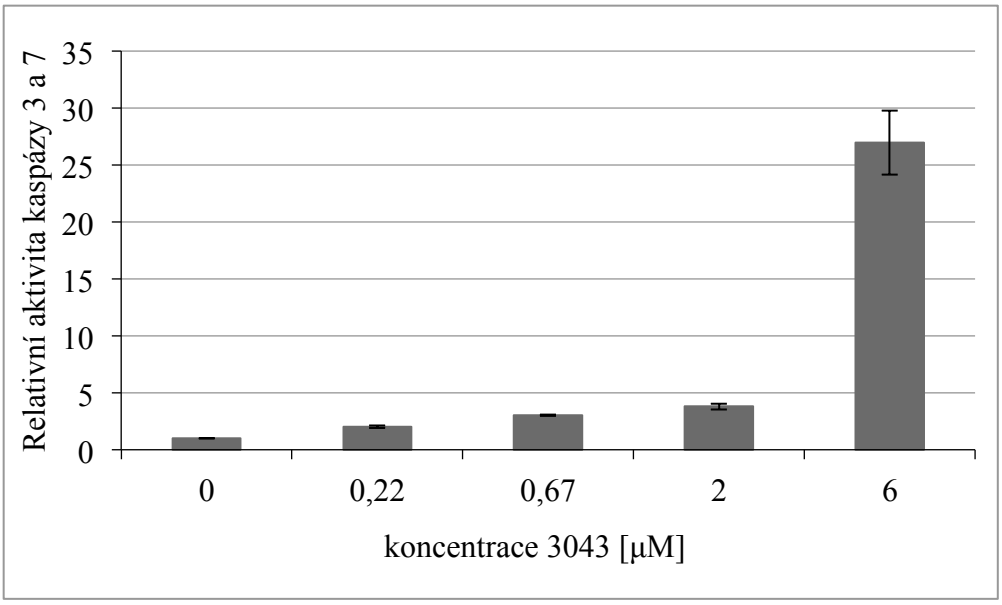
Proapoptotické účinky substituovaných 2-hydroxy-*N*-(arylalkyl)benzamidů 3022, 3043, 3042 a 3040 na buněčné linii G361 byly stanoveny použitím metody fluorimetrického stanovení aktivity kaspázy 3 a 7. Absolutní hodnoty fluorescence byly normalizovány podle kontrolního vzorku a převedeny na relativní aktivitu.

Při tomto experimentu bylo zjištěno, že všechny látky jsou schopny aktivovat kaspázu 3 a 7 a vykazují tedy proapoptotické účinky. Nejvyšší relativní kaspázová aktivita byla naměřena u sloučenin 3022 a 3043 a to v koncentraci 6 μM. U látky 3022 došlo ke zvýšení aktivity kaspáz již v koncentraci 2 μM, zatímco látka 3043 je účinná až ve vyšší koncentraci odpovídající hodnotě 6 μM. Naopak nejnižší proapoptotické účinky byly pozorovány u sloučenin 3040 a 3042 (Obr. 4).



Obr. 4: Relativní aktivita kaspázy 3 a 7 v buněčné linii G361 po 24 hodinové kultivaci s látkami 3022, 3043, 3040, 3042 v koncentracích 2 a 6 μM. Hladina fluorescence byla měřena po 7 hodinách inkubace.

Dalším experimentem zaměřeným na stanovení koncentrační závislosti proapoptotických účinků látky 3043 byly potvrzeny předchozí výsledky. Relativní aktivita kaspázy 3 a 7 roste se vzrůstající koncentrací (Obr. 5).



Obr. 5: Relativní aktivita kaspázy 3 a 7 v buněčné linii G361 po 24 hodinové kultivaci s látkou 3043 o různých koncentracích. Hladina fluorescence byla měřena po 7 hodinách inkubace.

6.2 Stanovení hladiny exprese vybraných proteinů

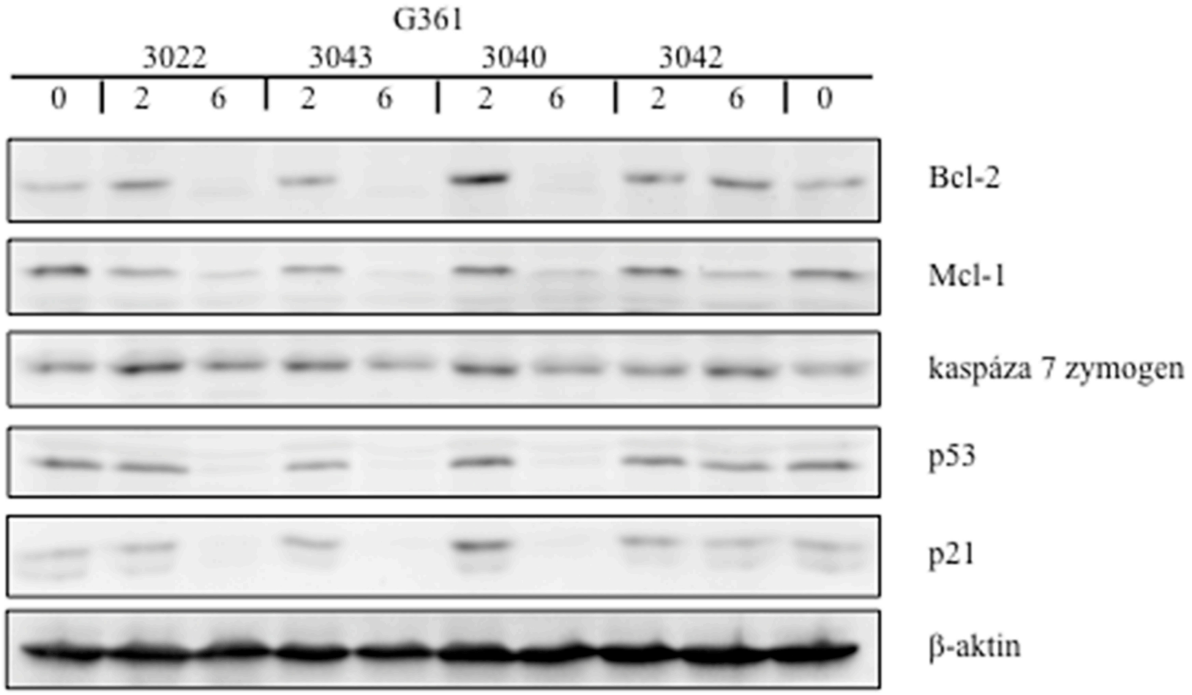
Proapoptotické účinky testovaných látek 3022, 3043, 3042 a 3040 byly ověřeny sledováním exprese vybraných proteinů pomocí western blottingu.

V prvním experimentu byla sledována hladina exprese proteinů náležících do rodiny Bcl-2. Jednotliví členové této rodiny se vyznačují proapoptotickými nebo antiapoptotickými vlastnostmi a jsou centrálními regulátory aktivity kaspáz, jež hrají klíčovou roli v průběhu programované buněčné smrti (Cory *et* Adams, 2002). Hladina exprese antiapoptotických proteinů Bcl-2 a Mcl-1 se u testovaných sloučenin 3022, 3043 a 3040 v koncentraci 6 μM výrazně snížila, v případě proteinu Bcl-2 dokonce exprese nebyla detekována. U látky 3042 v koncentraci 6 μM došlo ke snížení hladiny pouze u proteinu Mcl-1 (Obr. 6).

Dále byla detekována hladina neaktivní formy kaspázy 7 (zymogen), která je v apoptotických buňkách proteolyticky štěpena za vzniku aktivního fragmentu (Cohen, 1997).

V případě testovaných sloučenin 3022, 3043 a 3040 v koncentraci 6 μM došlo k mírnému snížení hladiny tohoto proteinu. U látky 3042 v koncentraci 6 μM naopak došlo ke zvýšení hladiny, které pravděpodobně bylo způsobeno nepřesností při experimentu (Obr. 6).

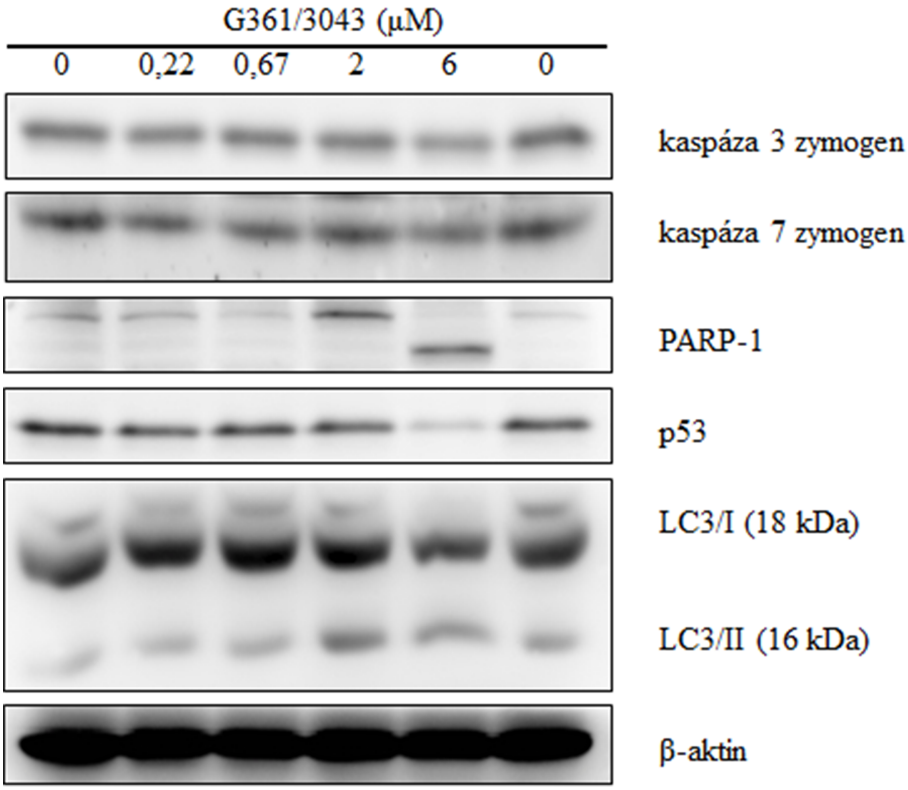
Dále byla sledována hladina nádorového supresoru p53 a proteinu p21. Protein p21 je přirozeným inhibitorem CDK náležící do rodiny Cip/Kip, jež je regulován prostřednictvím proteinu p53 (El-Deiry, 1998). Hladina exprese proteinů p53 i p21 v buňkách ovlivněných testovanými diamidy 3022, 3043 a 3040 v koncentraci 2 μM odpovídala hladině kontrolních vzorků, zatímco v koncentraci 6 μM nebyla detekována vůbec. V případě ovlivnění látkou 3042 nedošlo k výrazné změně v expresi těchto proteinů (Obr. 6).



Obr. 6: Analýza exprese proteinů Bcl-2, Mcl-1, kaspázy 7 zymogenu, p53 a p21 v buňkách G361 po 24 hodinové kultivaci s látkami 3022, 3043, 3040 a 3042 a v kontrolních buňkách. Pro ověření rovnoměrné koncentrace v jednotlivých vzorcích byla provedena detekce β-aktinu.

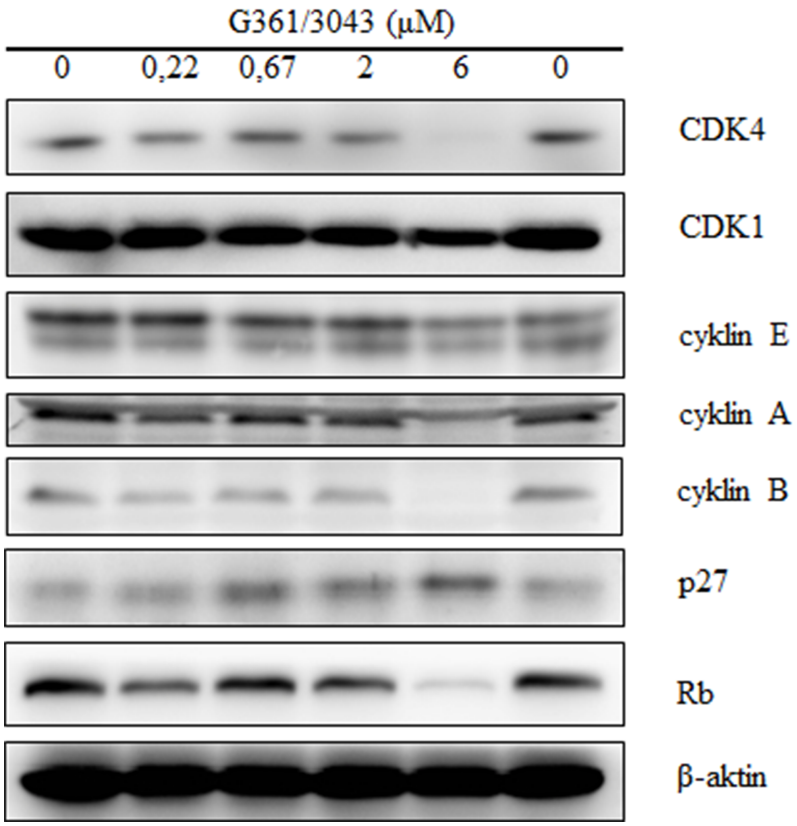
Po zhodnocení těchto výsledků byla pro další experimenty vybrána sloučenina 3043, která vykazovala výrazné proapoptotické účinky, jak při měření relativní aktivity kaspázy 3 a 7, tak i při analýze hladiny exprese vybraných proteinů.

V dalším experimentu byla buněčná linie G361 ovlivněna rostoucími koncentracemi sloučeniny 3043 a byla sledována hladina exprese vybraných proteinů zapojených do apoptotické dráhy. Nejprve byl analyzován vliv na hladinu exprese neaktivních forem kaspázy 3 a 7 (zymogen). V obou případech došlo k výraznému poklesu hladiny proteinů v koncentracích 6 µM. Dále byla sledována hladina proteinu PARP-1 (113 kDa), který se účastní oprav DNA. Během apoptózy je štěpen kaspázou 3 na dva fragmenty o velikosti 89 kDa a 24 kDa (Soldani *et* Scovassi, 2002). Hladina nádorového supresoru p53 v buňkách ovlivněných látkou 3043 v koncentraci 6 µM velmi výrazně poklesla. V případě hladiny proteinu LC3/II došlo ke zvýšení v koncentraci 2 µM a 6 µM (Obr. 7).



Obr. 7: Analýza exprese proteinů kaspázy 3 a 7 zymogenu, PARP-1, p53 a LC3 v buňkách G361 po 24 hodinové kultivaci s látkou 3043 a v kontrolních buňkách. Pro ověření rovnoměrné koncentrace v jednotlivých vzorcích byla provedena detekce β-aktinu.

Dále byla sledována exprese vybraných proteinů zapojených do regulace buněčného cyklu. CDK4 s CDK6 v G1 fázi buněčného cyklu asociují s cykliny D. Vzniklé komplexy fosforylují tumor supresorový protein Rb (Retinoblastomový protein), což vede k disociaci transkripčních faktorů E2F, které regulují expresi genů umožňující přechod do S fáze. Cyklin E vytváří komplex s CDK2, jež je odpovědný za přechod G1/S. S CDK2 asociuje také cyklin A a vzniklý komplex je odpovědný za regulaci replikace DNA a inaktivaci G1 transkripčních faktorů. CDK1 asociuje s cyklinem A a společně regulují přechod S/G2, následně CDK1 asociuje s cyklinem B a vzniklý komplex reguluje přechod G2/M a dokončení mitózy (Knockaert *et al.*, 2002). Zatímco exprese CDK1 a cyklinu E v buňkách ovlivněných látkou 3043 v koncentraci 6 μM se snížila, exprese CDK4 a cyklinů A a B v této koncentraci nebyla vůbec detekována. Protein p27 je členem Cip/Kip rodiny přirozených inhibitorů CDK, který blokuje buněčný cyklus interakcí s komplexy CDK2-cyklin E a CDK2-cyklin A (Malumbres *et* Barbacid, 2007). S rostoucí koncentrací sloučeniny 3043 se zvyšovala exprese proteinu p27. K výraznému snížení exprese došlo i v případě proteinu Rb a to v koncentraci 6 μM (Obr. 8).

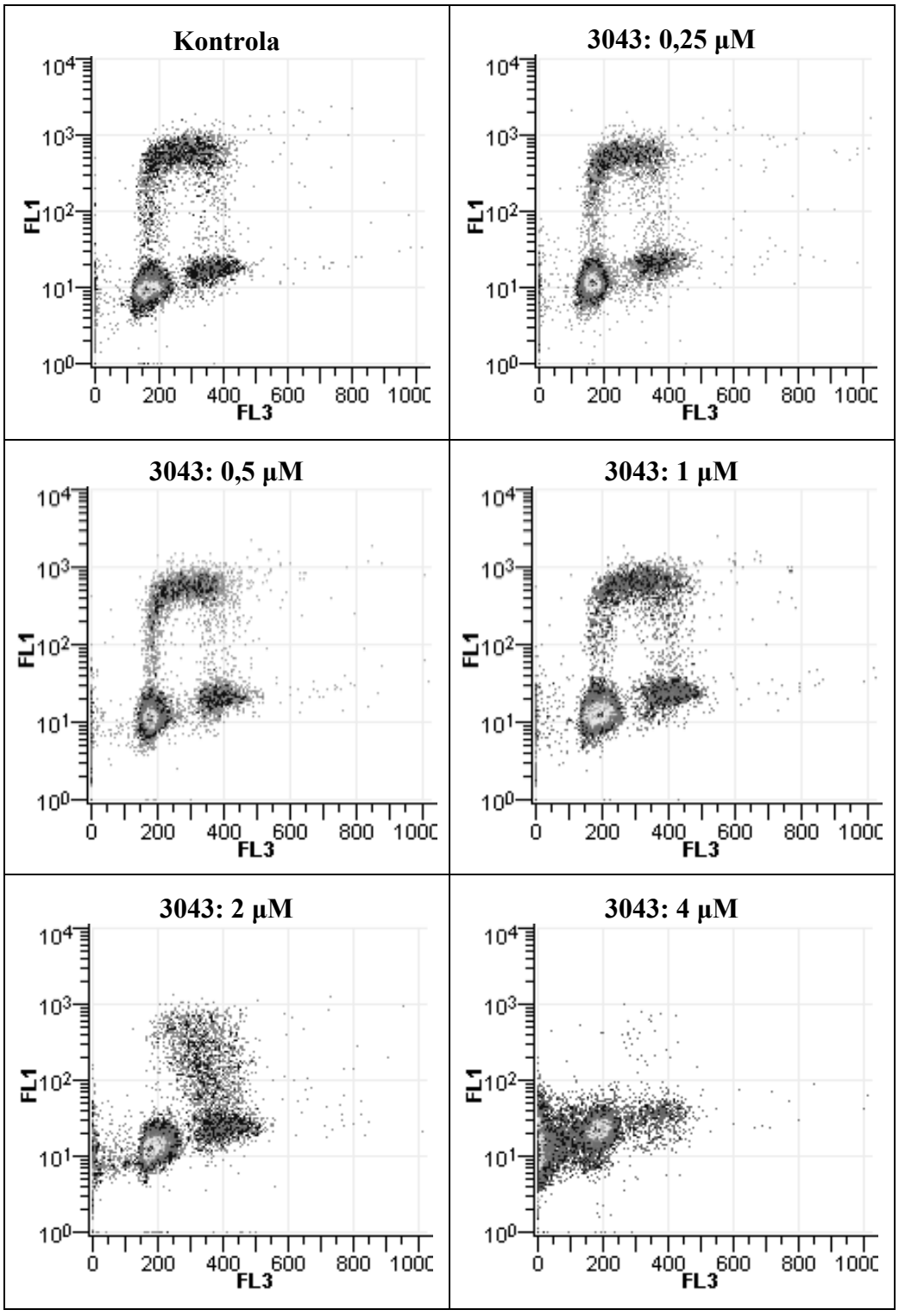


Obr. 8: Analýza exprese proteinů CDK4, CDK1, cyklinů E, A a B, p27 a Rb v buňkách G361 po 24 hodinové kultivaci s látkou 3043 a v kontrolních buňkách. Pro ověření rovnoměrné koncentrace v jednotlivých vzorcích byla provedena detekce β-aktinu

6.3 Cytometrická analýza buněčného cyklu

Buněčná linie G361 byla ovlivněna sloučeninou 3043 v koncentracích 0,25; 0,5; 1 a 2 μM po dobu 24 hodin a pomocí dvouparametrové cytometrické analýzy byly sledovány změny v distribuci buněk ve fázích buněčného cyklu. Dvouparametrová analýza umožňuje přesnější stanovení a rozlišení příslušné fáze buněčného cyklu.

Z histogramů cytometrické analýzy vyplývá, že v případě ovlivnění látkou v koncentraci 2 μM dochází k výraznému přesunu buněk do pozdní S fáze buněčného cyklu oproti nižším koncentracím. Ve vyšší koncentraci odpovídající hodnotě 4 μM dochází k poklesu buněk v S a G2/M fázi buněčného cyklu a výraznému nárůstu apoptotických buněk (Obr. 9).



Obr. 9: Histogramy analýzy buněčného cyklu linie G361 po ovlivnění látkou 3043.
FL3 odpovídá signálu propidium jodidu, FL1 odpovídá signálu fluorescenční značky FITC, jež byla konjugována s protilátkou anti-BrdU.

7 DISKUZE

V praktické části bakalářské práce byly nejprve charakterizovány biologické účinky čtyř vybraných inhibitorů z knihovny substituovaných 2-hydroxy-*N*-(arylalkyl)benzamidů na buněčné linii G361 odvozené od lidského melanomu. Následně byly sledovány další biologické účinky nejúčinnější látky 3043 ze série.

Výsledky experimentu fluorimetrického stanovení aktivity kaspázy 3 a 7 ukázaly, že testované sloučeniny 3022, 3043, 3040 a 3042 vykazují proapoptotické účinky, přičemž nejvýraznější efekt byl pozorován u látek 3022 a 3043 (Obr. 4). Proapoptotické účinky byly dále ověřeny stanovením hladiny exprese proteinů zapojených do apoptotické dráhy pomocí western blottingu. Byla sledována snížená hladina proteinů z rodiny Bcl-2 s antiapoptotickou funkcí (Bcl-2 a Mcl-1) zejména u sloučenin 3022, 3043 a 3040. Také byla sledována snížená hladina neaktivní formy kaspázy 7, která je v případě aktivace apoptotické dráhy štěpena za vzniku aktivního fragmentu (Obr. 6), což odpovídá výsledkům kaspázové eseje (Obr. 4). Tyto výsledky také korespondují s publikovanými daty, které se zaměřují na charakterizaci látky 3022 (označení 6k; Imramovský *et al.*, 2013).

Imunodetekcí byl pozorován zvláštní efekt u nádorového supresoru p53. V případě buněk ovlivněných sloučeninami 3022, 3043 a 3040 v koncentraci 6 μM bylo sledováno výrazné snížení hladiny exprese proteinu p53 (Obr. 6). Hladina proteinu p53 v buňkách je za normálních podmínek nízká. V odpovědi na řadu stresových signálů spojených např. s maligní proliferací nebo s poškozením DNA dochází k jeho aktivaci a prudkému zvýšení hladiny exprese (Lu *et al.*, 2001). Při experimentu byl však pozorován opačný efekt, který byl také doprovázen snížením hladiny proteinu p21, který je transkripčním cílem proteinu p53 (Obr. 6). Tento efekt byl také pozorován v případě publikované látky 3022 (Imramovský *et al.*, 2013).

Na základě výsledků napovídajících o proapoptotické aktivitě nových derivátů byla pro další experimenty zvolena látka 3043. Její proapoptotické účinky byly ověřeny stanovením hladiny exprese neaktivních forem kaspázy 3 a 7 pomocí western blottingu. V koncentraci 6 μM bylo také detekováno štěpení substrátu kaspázy 3, proteinu PARP-1, na inaktivní fragment o velikosti 89 kDa, který je významným apoptotickým markerem (Obr. 7). Tyto výsledky korelují s výsledky fluorimetrického stanovení aktivity kapázy 3 a 7 po ovlivnění buněk rostoucími koncentracemi látky 3043 (Obr. 5).

Pomocí western blottingu byl sledován vliv rostoucích koncentrací sloučeniny 3043 na hladinu proteinu p53. K výraznému poklesu hladiny došlo při koncentraci 6 μM. Také byla sledována hladina proteinu LC3 a jeho fragmentace, která je využívána pro stanovení autofágické aktivity v buňkách. Po ovlivnění látkou 3043 v koncentracích 2 μM a 6 μM bylo zaznamenáno zvýšení hladiny exprese proteinu LC3/II (Obr. 7). Tento protein je lokalizován na membránách, autofágozomech a méně pak na autolyzozomech a slouží tedy jako indikátor autofágozomové formace (Mizushima *et* Yoshimori, 2007). V případě publikované sloučeniny 3022 byl u proteinu p53 zaznamenán stejný efekt. Zvýšení hladiny proteinu LC3/II bylo zaznamenáno až v koncentraci 6 μM (Imramovský *et al.*, 2013).

Předpokládá se souvislost mezi snížením hladiny proteinu p53 a aktivací autofágie. Je známo, že cytoplazmatický protein p53 (nikoliv jaderný) hraje roli v regulaci autofágie, normální hladiny proteinu inhibují autofágii. Apoptóza a autofágie mohou koordinovaně a kooperativně působit společně při indukci buněčné smrti. Dokonce některé autofágické proteiny mohou hrát roli v událostech, které nastávají během apoptózy. Snížení hladiny proteinu p53 by tedy mohlo podpořit autofágii, která by eventuálně mohla vést k buněčné smrti vyvolané kaspázami (Eisenberg-Lerner *et al.*, 2009; Green *et* Kroemer, 2009; Tasdemir *et al.*, 2009; Rikiishi, 2012).

Dále byla stanovena exprese významných regulátorů buněčného cyklu pomocí western blottingu. Po ovlivnění buněk látkou 3043 v koncentraci 6 μM došlo k poklesu hladiny exprese CDK1 a CDK4, cyklinů E, A, B. Pokles hladiny exprese byl zaznamenán také v případě proteinu Rb, který je v průběhu apoptózy štěpen (An *et* Dou, 1996). Tyto výsledky korelují s výsledky v publikaci pro sloučeninu 3022 s tím rozdílem, že snížení hladiny exprese cyklinů A a B bylo detekováno po ovlivnění látkou 3022 již v koncentraci 2 μM. Výrazný rozdíl byl zaznamenán také v expresi přirozeného inhibitoru CDK proteinu p27, jehož hladina se významně zvýšila v případě ovlivnění sloučeninou 3022 pouze v koncentraci 0,67 μM a 2 μM, zatímco v případě ovlivnění látkou 3043 došlo k postupnému zvyšování exprese (Obr. 8). Pravděpodobně 6 μM koncentrace sloučeniny 3043 vede již k velkému poškození buněk a k poklesu buněčných procesů (transkripce, replikace). Cykliny mají krátký poločas rozpadu a při poklesu transkripce již téměř nejsou nově syntetizovány, tím pádem dochází ke snížení jejich hladiny. Hladina CDK je v buňce za normálních podmínek stabilní,

ale v případě velkého poškození může docházet ke snížení exprese a může doprovázet sníženou hladinu cyklinů (Harper *et* Adams, 2001).

Dalším bodem charakterizace účinku diamidu 3043 bylo určení vlivu na buněčný cyklus. Pomocí dvouparametrové cytometrické analýzy byla sledována změna v distribuci buněk ve fázích buněčného cyklu a vliv na replikaci DNA Analýzou bylo zjištěno, že v případě ovlivnění látkou v koncentraci 2 μM dochází k výraznému přesunu buněk do pozdní S fáze oproti nižším koncentracím. V koncentraci 4 μM pak dochází k výraznému poklesu buněk v S a G2/M fázi buněčného cyklu a naopak nárůstu buněk apoptotických (Obr. 9), což koreluje s údaji o proapoptotických účincích testované sloučeniny. Při vyšších koncentracích látky 3043 pak zřejmě dochází k potlačení všech význačných buněčných procesů, jakými jsou replikace, nejspíše i transkripce a translace.

Na základě dosažených výsledků z několika různých experimentů lze říci, že testovaná látka 3043 vykazuje významné proapoptotické účinky.

8 ZÁVĚR

Pomocí několika nezávislých metod byly stanoveny některé biologické účinky čtyř vybraných inhibitorů z knihovny substituovaných 2-hydroxy-*N*-(arylalkyl)benzamidů na buněčné linii G361 odvozené od lidského melanomu.

Výsledky experimentů poukazují na významné proapoptotické účinky testovaných látek 3022, 3043, 3040, o něco nižší účinek byl pozorován v případě sloučeniny 3042. Podrobnější mechanismus účinku byl následně studován na látce 3043. Nezávislými metodami bylo prokázáno, že s rostoucí koncentrací látky 3043 rostou i její proapoptotické účinky. Sloučenina ve vyšších koncentracích způsobuje prudký pokles hladiny nádorového supresoru p53, přičemž se předpokládá souvislost tohoto jevu s aktivací autofágie, která může kooperativně společně s apoptózou indukovat buněčnou smrt. Výsledky cytometrické analýzy značí, že vyšší koncentrace této látky také pravděpodobně způsobuje rozsáhlejší poškození buněk a potlačení všech významných buněčných procesů, jakými jsou především replikace, ale nejspíše i transkripce a translace.

Vzhledem k řadě pozorovaných efektů, zejména v případě trendu hladiny proteinu p53, by bylo vhodné se v budoucnu zaměřit pomocí dalších experimentů na objasnění přesného mechanismu účinku této sloučeniny. Jedním z možných experimentů je použití inhibitoru proteazomu MG132 a sledování, zda-li snížená hladina proteinu p53 souvisí právě se zvýšenou degradací proteazomem. Dále pak lze použít inhibitory kaspáz a sledovat, zda se projeví stejné efekty i v případě inhibice apoptózy, případně inhibitory interakce proteinu p53 s MDM-2 (např. nutliny), díky čemuž za normálních podmínek roste bazální hladina proteinu p53. V neposlední řadě pak lze pozorovat, zda dojde ke stejnému efektu i v případě ovlivnění p53 deficientních nádorových buněčných linií.

9 POUŽITÁ LITERATURA

Adjei, A.A. (2001): Ras signaling pathway proteins as therapeutic targets. Current Pharmaceutical Design 7: 1581-1594.

Adjei, A.A., Rowinsky, E.K. (2003): Novel anticancer agents in clinical development. Cancer biology & Therapy 2: S5-S15.

An, B., Dou, Q. (1996): Cleavage of retinoblastoma protein during apoptosis: an interleukin 1β-converting enzyme-like protease as candidate. Cancer Research 56: 438-442.

Ashworth, A. (2008): A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair. Journal of Clinical Oncology 26: 3785-3790.

Benson, J.D., Chen, Y.P., Cornell-Kennon, S.A., Dorsch, M., Kim, S., Leszczyniecka, M., Sellers, W.R., Lengauer, Ch. (2006): Validating cancer drug targets. Nature 441: 451-456.

Bharti, A.C., Aggarwal, B.B. (2002): Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. Biochemical Pharmacology 64: 883-888.

Binyamin, L., Borghaei, H., Weiner, L.M. (2006): Cancer therapy with engineered monoclocal antibodies. Update on Cancer Therapeutics 1: 147-157.

Boyd, S.D., Tsai, K.Y., Jacks, T. (2000): An intact HHM2 ring-finger domain is required for nuclear exclusion of p53. Nature Cell Biology 2: 563-568.

Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Brough, R., Frankum, J.R., Costa-Cabral, S., Lord, Ch.J., Ashworth, A. (2011): Searching for synthetic lethality in cancer. Current Opinion in Genetics & Development 21: 34-41.

Carnero, A. (2002): Targeting the cell cycle for cancer therapy. British Journal of Cancer 87: 129-133.

Cohen, G.M. (1997): Caspases: the executioners of apoptosis. Biochemical Journal 326: 1-16.

Cory, S., Adams, J.M. (2002): The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. Nature Reviews Cancer 2: 647-656.

Cox, A.D., Der, Ch.J. (2002): Farnesyltransferase inhibitors: promise and realities. Current Opinion in Pharmacology 2: 388-393.

Croce, C.M. (2008): Oncogenes and cancer. The New England Journal of Medicine 358: 502-522.

Crul, M., de Klerk, G.J., Beijnen, J.H., Schellens, J.H.M. (2001): Ras biochemistry and farnesyl transferase inhibitors: a literature survey. Anti-Cancer Drugs 12: 163-184.

Dougan, M., Dranoff, G. (2009): Immune therapy for cancer. Annual Review of Immunology 27: 83-117.

Downward, J. (2003): Targeting Ras signaling pathways in cancer therapy. Nature Reviews Cancer 3: 11-22.

Drake, Ch.G., Jaffee, E., Pardoll, D.M. (2006): Mechanisms of immune evasion by tumors. Advances in Immunology 90: 51-81.

Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H-U., Kimchi, A. (2009): Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. Cell Death and Differentiation 16: 966-975.

El-Deiry, W.S. (1998): Regulation of p53 downstream genes. Seminars in Cancer Biology 8: 345-357.

Evan, G.I., Vousden, K.H. (2001): Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. Nature 411: 342-348.

Feinberg, A.P. (2004): The epigenetics of cancer etiology. Seminars in Cancer Biology 14: 427-432.

Fleisig, H.B., Wong, J.M.Y. (2007): Telomerase as a clinical target: current strategies and potential applications. Experimental Gerontology 42: 102-112.

Fotouhi, N., Graves, B. (2005): Small molecule inhibitors of p53/MDM2 interaction. Current Topics in Medicinal Chemistry 5: 159-165.

Geyer, R.K., Yu, Z.K., Maki, C.G. (2000): The MDM2 ring-finger domain is required to promote p53 nuclear export. Nature Cell Biology 2: 569-573.

Green, D.R., Kroemer, G. (2009): Cytoplasmic functions of the tumor suppressor p53. Nature 458: 1127-1130.

Greenman, Ch., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G.L., Hunter, Ch., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., Edkins, S., O'Meara, S., Vastrik, I., Schmidt, E.E., Avis, T., Barthorpe, S., Bhamra, G., Buck, G., Choudhury, B., Clements, J., Cole, J., Dicks, E., Forbes, S., Gray, K., Halliday, K., Harrison, R., Hills, K., Hinton, J., Jenkinson, A., Jones, D., Menzies, A., Mironenko, T., Perry, J., Raine, K., Richardson, D., Shepherd, R., Small, A., Tofts, C., Varian, J., Webb, T., West, S., Widaa, S., Yates, A., Cahill, D.P., Louis, D.N., Goldstraw, P., Nicholson, A.G., Brasseur, F., Looijenga, L., Weber, B.L., Chiew, Y., deFazio, A., Greaves, M.F., Green, A.R., Campbell, P., Birney, E., Easton, D.F., Chenevix-Trench, G., Tan, M., Khoo, S.K., Teh, B.T., Yuen, S.T., Leung, S.Y., Wooster, R., Futreal, P.A., Stratton, M.R. (2007): Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. Nature 446: 153-158.

Grønbæk, K., Hother, Ch., Jones, P.A. (2007): Epigenetic changes in cancer. Apmis 115: 1039-1059.

Gysin, S., Salt, M., Young, A., McCormick, F. (2011): Therapeutic strategies for targeting Ras proteins. Genes & Cancer 2: 359-372.

Hackett, J.A., Greider, C.W. (2002): Balancing instability: dual roles for telomerase and telomere dysfunction in tumorigenesis. Oncogene 21: 619-626.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144: 646-674.

Harper, J.W., Adams, P.D. (2001): Cyclin-dependent kinases. Chemical Reviews 101: 2511-2526.

Hoelder, S., Clarke, P.A., Workman, P. (2012): Discovery of small molecule cancer drugs: successes, challenges and opportunities. Molecular Oncology 6: 155-176.

Huang, S., Houghton, P.J. (2003): Targeting mTOR signaling for cancer therapy. Current Opinion in Pharmacology 3: 371-377.

Chial, H. (2008): Proto-oncogenes to oncogenes to cancer. Nature Education 1: 33.

Ibraheem, D., Elaissari, A., Fessi, H. (2014): Gene therapy and DNA delivery systems. International Journal of Pharmaceutics 459: 70-83.

Immramovský, A., Jorda, R., Pauk, K, Řezníčková, E., Dušek, J., Hanusek, J., Kryštof, V. (2013): Substituted 2-hydroxy-*N*-(arylalkyl)benzamides induce apoptosis in cancer cell lines. European Journal od Medicinal Chemistry 68: 253-259.

Jansen, B., Zangemeister-Wittke, U. (2002): Antisense therapy for cancer − the time of truth. The Lancet Oncology 3: 672-683.

Johnstone, C. (2012): Medicinal chemistry matters – a call for discipline in our discipline. Drug Discovery Today 17: 538-543.

Jorissen, R.N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T.P.J., Ward, C.W., Burgess, A.W. (2003): Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. Experimental Cell Research 284: 31-53.

Kang, J., Sergio, C.M., Sutherland, R.L., Musgrove, E.A (2014): Targeting cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) but not CDK4/6 or CDK2 is selectively lethal to MYC-dependent human breast cancer cells. BioMed Central Cancer 14: 32.

Kjeldgaard, M., Nyborg, J., Clark, B.F.C. (1996): The GTP binding motif: variations on a theme. The FASEB Journal 10: 1347-1368.

Knockaert, M., Greengard, P., Meijer, L. (2002): Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. Trends in Pharmacological Sciences 23: 417-532.

Knowles, M.A., Selby, P.J. (Eds.) (2005): Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. Oxford University Press: 532 s.

Kota, J., Chivukula, R.R., O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Montgomery, Ch.L., Hwang, H., Chang, T., Vivekanandan, P., Torbenson, M., Clark, K.R., Mendell, J.R., Mendell, J.T. (2009): Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. Cell 137: 1005-1017.

Lane, D.P., Crawford, L.V. (1979): T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. Nature 278: 261-263.

Levine, A.J. (1995): Tumor suppressor genes. Science & Medicine 2 (1): 28-37.

Levine, A.J., Momand, J. (1990): Tumor suppressor genes: the p53 and retinoblastoma sensitivity genes and gene products. Biochimica *et* Biophysica Acta 1032: 119-136.

Linzer, D.I., Levine, A.J. (1979): Characterisation of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfeceted embryonal carcinoma cells. Cell 17: 43-52.

Lopez, M.M., Makhatadze, G.I. (2002): Isothermal titration calorimetry. Methods in Molecular Biology, 173: 121-126.

Lu, W., Chen, L., Peng, Y., Chen, J. (2001): Activation of p53 by roscovitine-mediated suppression od MDM2 expression. Oncogene 20: 3206-3216.

Lyons, J.F., Wilhelm, S., Hibner, B., Bollag, G. (2001): Discovery of a novel Raf kinase inhibitor. Endocrine-Related Cancer 8: 219-225.

Malumbres, M., Barbacid, M. (2007): Cell cycle kinases in cancer. Current Opinion in Genetics & Development 17: 60-65.

Malumbres, M., Barbacid, M. (2009): Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. Nature Reviews Cancer 9: 153-166.

Malumbres, M., Carnero, A. (2003): Cell cycle deregulation: a common motif in cancer. Progress in Cell Cycle Research 5: 5-18.

Mellman, I., Coukos, G., Dranoff, G. (2011): Cancer immunotherapy comes of ages. Nature 480: 480-489.

Mendelsohn, J., Howley, P.M., Israel, M.A., Gray, J.W., Thompson, C.B. (Eds.) (2008): The molecular basis of cancer. Saunders Elsevier: 757 s.

Meric-Bernstam, F., Gonzales-Angulo, A.M. (2009): Targeting mTOR signaling network for cancer therapy. Journal of Clinical Oncology 27: 2278-2287.

Michael, D., Oren, M. (2002): The p53 and MDM2 families in cancer. Current Opinion in Genetics & Development 12: 53-59.

Mizushima, N., Yoshimori, T. (2007): How to interpret LC3 immunoblotting. Autophagy 3: 542-545.

Morgan, D.O. (2007): The cell cycle: principles of control. New Science Press Ltd: 297 s.

Orlowski, R.Z., Kuhn, D.J. (2008): Proteasome inhibitors in cancer therapy: lessons from the first decade. Clinical Cancer Research 14: 1649-1657.

Patrick, G.L. (2013): An introduction to medicinal chemistry. Oxford University Press: 789 s.

Pecorino, L. (2008): Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics. Oxford University Press: 316 s.

Picard, D. (2002): Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. Cellular and Molecular Life Sciences 59: 1640-1648.

Prodromou, C., Pearl, L.H. (2003): Structure and functional relationships of Hsp90. Curr Cancer Drug Targets 3: 301-323.

Puyol, M., Martín, A., Dubus, P., Mulero, F., Pizcueta, P., Khan, G., Guerra, C., Santamaría, D., Barbacid, M. (2010): A synthetic lethal interaction between K-Ras oncogenes and Cdk4 unveils a therapeutic stratégy for non-small cell lung carcinoma. Cancer Cell 18: 63-73.

Rayburn, E.R., Zhang, R. (2008): Antisense, RNAi, and gene silencing strategies for cancer therapy: Mission possible or impossible? Drug Discovery Today 13: 513-521.

Rikiishi, H. (2012): Novel insights into the interplay between apoptosis and autophagy. International Journal of Cell Biology 2012: 317645.

Shapiro, G.I. (2006): Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. Journal of Clinical Oncology 24: 1770-1783.

Soldani, C., Scovassi, A.I. (2002): Poly(ADP-ribose)polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. Apoptosis 7: 321-328.

Steele, R.J.C., Lane, D.P. (2005): p53 in cancer: a paradigm for modern management of cancer. The Surgeon 3: 197-205.

Tang, Y., Zhu, W., Chen, K., Jiang, H. (2006): New technologies in computer-aided drug design: toward target identification and new chemical entity discovery. Drug Discovery Today: Technologies 3: 307-313.

Tasdemir, E., Maiuri, M.Ch., Galluzzi, L., Vitale, I., Djavaheri-Mergny, M., D'Amelio, M., Criollo, A., Morselli, E., Zhu, Ch., Harper, F., Nannmark, U., Samara, Ch., Pinton, P., Vincencio, J.M., Carnuccio, R., Moll, U.M., Madeo, F., Paterlini-Brechot, P., Rizzuto, R., Szadabkai, G., Pierron, G., Blomgren, K., Tavernarakis, N., Codogno, P., Cecconi, F., Kroemer, G. (2008): Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. Nature Cell Biology 10: 676-687.

Trail, P.A., King, H.D., Dubowchik, G.M. (2003): Monoclonal antibody drug immunoconjugates for targeted treatment of cancer. Cancer Immunology, Immunotherapy 52: 328-337.

Vassilev, L.T. (2007): MDM2 inhibitors for cancer therapy. Trends in Molecular Medicine 13: 23-31.

Vassilev, L.T., Vu, B.T., Graves, B., Carjaval, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, Z., Klein, Ch., Fotouhi, N., Liu, E.A. (2004): In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. Science 303: 844-848.

Vogelstein, B., Kinzler, K.W. (2004): Cancer genes and the pathways they control. Nature Medicine 10: 789-799.

Vogelstein, B., Lane, D., Levine, A.J. (2000): Surfing the p53 network. Nature 408: 307-310.

Vogt, P.K. (2001): PI 3-kinase, mTOR, protein synthesis and cancer. Trends in Molecular Medicine 7: 482-484.

Wang, X., Yue, P., Kim, Y.A., Fu, H., Khuri, F.R., Sun, S. (2008): Enhancing mammalian target of tapamycin (mTOR) − targeted cancer therapy by preventing mTOR/raptor inhibition-initiated, mTOR/rictor-independent Akt activation. Cancer Research 68: 7409-7418.

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

Zhang, H., Burrows, F. (2004): Targeting multiple signal transductions pathways through inhibition of Hsp90. Journal of Molecular Medicine 82: 488-499.

Internetové zdroje:

http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx

10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

4E-BP	4E binding protein
Ac-DEVD-AMC	Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylcoumarin
Akt	Protein kinase B
AMC	7-amido-4-methylcoumarin
ASO	Antisense oligonucleotide
ATP	Adenosine triphosphate
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
BSA	Bovine serum albumin
CDK	Cyclin-dependent kinase
Cip/Kip	CDK interacting protein/kinase inhibitory protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGTA	Ethylenglycoltetraacetic acid
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GAPs	GTPase activating proteins
GDP	Guanosine diphosphate

GEFs	Guanine exchanging factors
GTP	Guanosine triphosphate
Hsp90	Heat shock protein 90
HTS	High-throughput screening
IgG	Imunoglobulin G
IκB	Inhibitor of nuclear faktor κB
LC3	Microtubule-associated protein light chain 3
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MDM2	Murine double minute 2
miRNA	Micro ribonucleic acid
mRNA	Messenger ribonucleic acid
mTOR	Mammalian target of rapamycin
mTORC	mTOR complex
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PARP-1	Poly(ADP-ribose) polymerase 1
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PI3K	Phosphatidylinositide 3-kinase
PIPES	Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)
PKB	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
Rb	Retinoblastoma protein

RIPA	Radioimmunoprecipitation buffer
RNA	Ribonucleic acid
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	Sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	Tetramethylethylendiammin
TBS	Tris-buffered saline
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UPS	Ubiquitin proteasome system