

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**



**Pseudopeptidové inhibitory proteasomu**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

<b>Autor:</b>	<b>Veronika Molitorová</b>
<b>Studijní program:</b>	<b>N1501 Biologie</b>
<b>Studijní obor:</b>	<b>Experimentální biologie</b>
<b>Forma studia:</b>	<b>Prezenční</b>
<b>Vedoucí práce:</b>	<b>doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.</b>
<b>Termín odevzdání práce:</b>	<b>2020</b>

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Veronika Molitorová
Název práce	Pseudopeptidové inhibitory proteasomu
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	<p>Proteasom je složitý proteinový enzymatický komplex, jehož hlavním úkolem v rámci buňky je degradace proteinů, jejímž prostřednictvím se podílí na důležitých fyziologických a biochemických procesech, čímž zajišťuje správnou funkci orgánů či tkání. Jelikož nádorové buňky obecně vykazují vyšší proteasomální aktivitu, je proteasom, jehož narušení aktivity vede k buněčné smrti, považován za racionální terapeutický cíl. Proteasomální inhibitory bývají hojně využívány pro léčbu mnohočetného myelomu. Od schválení bortezomibu pro léčbu mnohočetného myelomu v roce 2003 neustále probíhá další vývoj látek s potenciální antiproteasomální aktivitou. Přestože proteasomální inhibitory zahrnují širokou škálu strukturně odlišných látek, nové látky nejčastěji vycházejí z již osvědčené peptidové či pseudopeptidové základní struktury, která je následně dále modifikována. Experimentální část diplomové práce je zaměřena na charakterizaci účinků tří potenciálních proteasomálních inhibitorů. Zkoumána byla jejich schopnost inhibice proteasomu, vliv na jednotlivé proteasomální podjednotky, vliv na míru ubiquitinace proteinů v buňce a schopnost vyvolat apoptózu. Součástí experimentální části byla také optimalizace metody pro stanovení aktivity proteasomálních podjednotek.</p>
Klíčová slova	Apoptóza, mnohočetný myelom, proteasom, proteasomální inhibice, pseudopeptidy
Počet stran	83
Počet příloh	1
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Veronika Molitorová
Title of thesis	Pseudopeptide inhibitors of proteasome
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
The year of presentation	2020
Abstract	<p>Proteasome is protein enzymatic complex, whose main role is protein degradation in the cell. Through this process it is involved in important physiological and biochemical actions to maintain proper function of organs or tissues. Inasmuch as tumor cells report higher proteasomal activity, it is considered as therapeutic target because disruption of its activity leads to cell death. Proteasomal inhibitors are often used in treatment of multiple myeloma. Since approval of bortezomib for treatment of multiple myeloma in 2003, there is constant development of drugs with potential antiproteasomal activity. Although proteasomal inhibitors include wide scale of compounds with structural diversity, the new substances are most often derived from already proven peptide or pseudopeptide structure, which is then modified. Experimental part of master thesis is focused on characterization of effects of three potential proteasomal inhibitors. Their inhibition of proteasome, impact on individual proteasomal subunits, the rate of ubiquitination of proteins in the cell and finally capability to induce apoptosis was tested. Method optimization for determination of proteasomal subunits activity was also part of experimental work.</p>
Keywords	Apoptosis, multiple myeloma, proteasome, proteasomal inhibition, pseudopeptides
Number of pages	83
Number of appendices	1
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně, pod odborným vedením doc. RNDr. Vladimíra Kryštofa, Ph.D, za užití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

„Na tomto místě bych ráda poděkovala panu doc. RNDr. Vladimíru Kryštofovi, Ph.D, za odborné vedení práce, vstřícnost a všechny poskytnuté konzultace. Mé díky patří také Mgr. Radku Jordovi, Ph.D za ochotu a cenné rady při zpracování experimentální části práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Miroslavu Peřinovi za cenné rady při provádění experimentů. Díky patří také celému kolektivu Laboratoře růstových regulátorů Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého a zejména pak Janě Hudcové, za vytvoření příjemného pracovního prostředí, ochotu a vstřícnost. Ráda bych poděkovala za grantovou podporu Univerzity palackého v Olomouci (IGA\_PrF\_2020\_021) a Grantové agentuře České republiky (GACR 18-0384S). V neposlední řadě patří mé poděkování rodině, která mě po celou dobu studia podporovala.“

# Obsah

1	Úvod a cíle práce.....	8
2	Mnohočetný myelom .....	9
2.1	Vznik a podstata onemocnění .....	9
2.2	Příznaky a diagnostika .....	12
2.3	Léčba.....	14
3	Proteasom.....	16
3.1	Funkce.....	16
3.1.1	Proteasom-ubikvitinový systém.....	16
3.1.2	Degradace nezávislá na ubikvitinu.....	20
3.1.3	Další funkce proteasomu.....	21
3.2	Struktura proteasomu .....	21
3.2.1	Konstitutivní proteasom.....	21
3.2.2	Imunoproteasom.....	25
3.3	Proteasom jako terapeutický cíl .....	25
3.3.1	Znamé inhibitory proteasomu .....	26
3.3.2	Vývoj inhibitorů použitých v experimentální části .....	32
4	Experimentální část.....	34
4.1	Materiál a metody .....	34
4.1.1	Přístroje .....	34
4.1.2	Chemikálie .....	34
4.1.3	Roztoky .....	35
4.1.4	Protilátky.....	36
4.1.5	Testované látky .....	36
4.1.6	Kultivace a použité buněčné linie .....	36
4.1.7	Stanovení aktivity proteasomálních podjednotek.....	37
4.1.8	Fluorescenční vizualizace inhibice proteasomu .....	37
4.1.9	SDS-PAGE, Westernblotting s následnou imunodetekcí.....	38
4.1.10	Fluorimetrické stanovení aktivity kaspáz 3/7.....	39

4.2	Výsledky .....	39
4.2.1	Optimalizace měření aktivity podjednotek proteasomu.....	39
4.2.2	Vliv testovaných látek na aktivity jednotlivých podjednotek proteasomu v buněčné linii U2OS .....	43
4.2.3	Účinek studovaných látek na buněčné linii U266.....	48
4.2.4	Fluorescenční vizualizace inhibice proteasomu.....	54
4.2.5	Vliv testovaných látek na vybrané buněčné proteiny.....	63
4.2.6	Stanovení aktivity kaspázy 3/7.....	65
4.3	Diskuze.....	67
5	Závěr .....	70
6	Zdroje .....	71
6.1	Internetové zdroje.....	79
7	Použité zkratky.....	80
8	Přílohy.....	82

# 1 Úvod a cíle práce

Mnohočetný myelom (MM) je onemocnění spadající mezi hematologické malignity (Hájek *et al.* 2011). Přestože se jedná o druhé nejčastější rakovinné onemocnění krve, kterým jenom v České republice trpí přibližně 1500 osob a ročně je nově diagnostikováno zhruba 400 případů (Česká myelomová skupina 2017), léčba, která by vedla k úplnému vyléčení, stále neexistuje (Gerecke *et al.* 2016). Terapie v současné době zahrnuje léčbu chemoterapeutiky, transplantaci kmenových buněk a podpůrnou terapii (Gerecke *et al.* 2016). Standardní chemoterapeutika pak bývají kombinována s nově vyvinutými látkami, které bývají vyvíjeny proti cílům identifikovaným na základě znalosti patogeneze onemocnění (Raab *et al.* 2009). Mezi tyto látky patří mimo jiné také proteasomální inhibitory, jelikož rakovinné buňky obecně mají vyšší proteasomální aktivitu a jsou na proapoptické účinky inhibice proteasomu citlivější než normální buňky (Moreau *et al.* 2012). Proteasomální inhibitory zahrnují hned několik skupin s rozmanitou strukturou, zdaleka ne všechny je ale možno terapeuticky využít pro léčbu MM. Prvním schváleným léčivem byl v roce 2003 bortezomib a od té doby vývoj nových látek stále pokračuje s cílem překonat limitace látek předchozích. Většina z nich se však stále drží osvědčené peptidové či pseudopeptidové základní struktury (Brown 2008).

Cílem této práce bylo studium vztahů mezi strukturou a aktivitou nových 2-hydroxy-N-[1-(2-hydroxyfenylamino)-1-oxoalkan-2-yl]benzamidů a charakterizace mechanismu jejich cytotoxického působení.

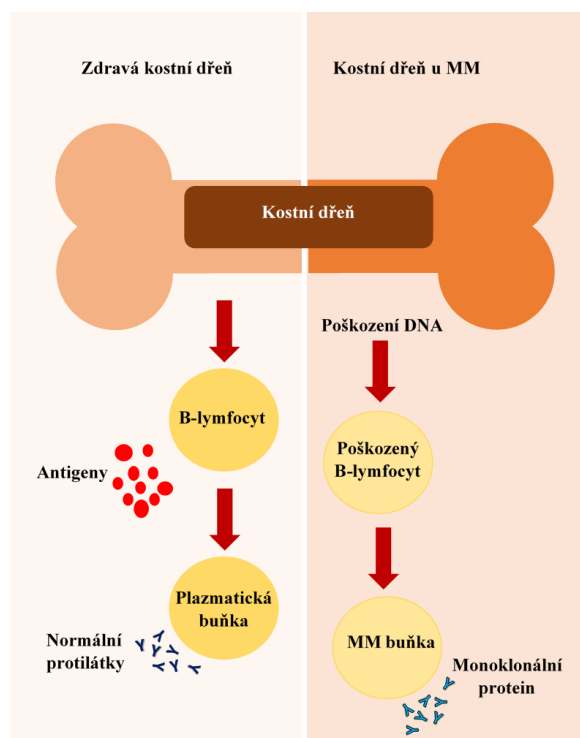


## 2 Mnohočetný myelom

Mnohočetný myelom je onemocnění tvořící asi 1 % všech malignit a se svým 10% zastoupením, je také druhou nejčastější hematologickou malignitou (Hájek *et al.* 2011; Pertesi *et al.* 2020). V České republice je incidence tohoto onemocnění 4/100 000 obyvatel, přičemž se zvyšuje s narůstajícím věkem, medián věku při diagnóze je 65 let (Hájek *et al.* 2011). Jedná se o neoplastickou poruchu plazmatických buněk (Palumbo *et al.* 2014), kdy hlavním znakem je akumulace klonálních plazmatických buněk v kostní dřeni, které u většiny pacientů produkují abnormální cirkulující monoklonální imunoglobulin, který je následně přítomen v krvi a/nebo v moči (Gentile *et al.* 2013, Chng 2014). Tato proliferace plazmatických buněk spolu s přítomností monoklonálního imunoglobulinu vede k širším projevům nemoci a poškození koncových orgánů (Cejalvo a Rubia 2015).

### 2.1 Vznik a podstata onemocnění

Obdobně jako u jiných malignit je příčina tohoto onemocnění multifaktoriální a špatně definovaná (Mehta 2015). Roli mohou hrát nejen genetické predispozice, ale také expozice organickým chemikáliím, toxinům a ionizujícímu záření. Myelom vzniká z asymptomatické premaligní proliferace monoklonálních plazmatických buněk pocházejících z post-germinálních center B-lymfocytů (Obrázek 1), (Palumbo *et al.* 2014). Až několikastupňové genetické změny a změny v mikroprostředí vedou k transformaci těchto buněk na maligní novotvar.



Obrázek 1: Porovnání funkce zdravé kostní dřeně s kostní dření poškozenou buňkami MM (upraveno podle Multiple myeloma research foundation)

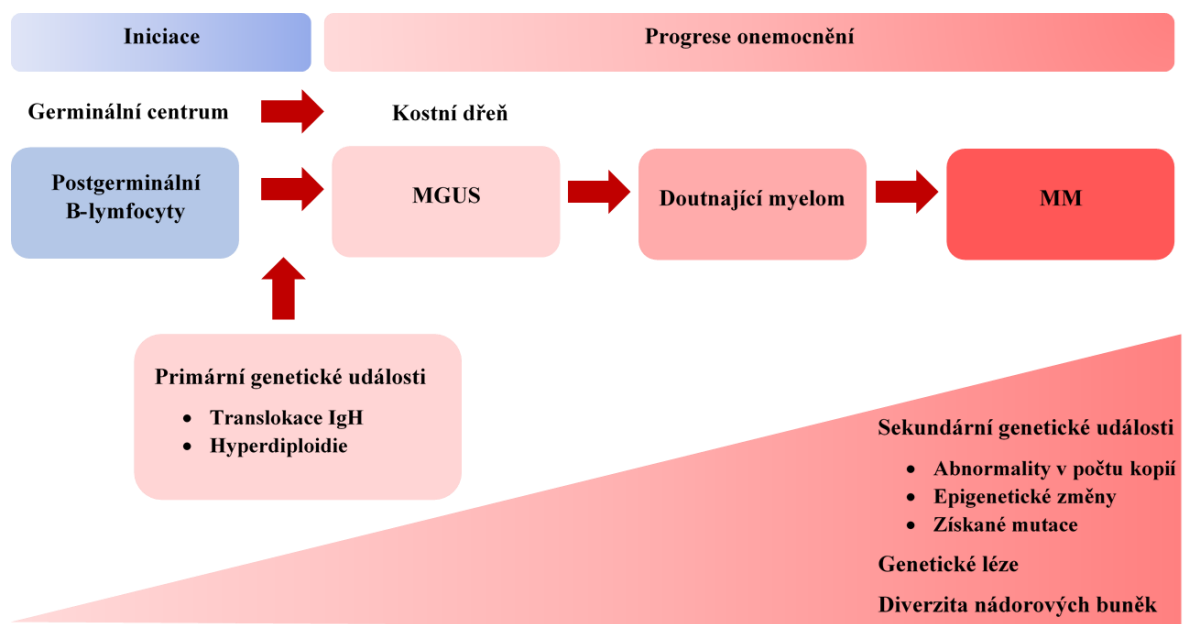
Rozvoji MM vždy předchází tiché premaligní stádium charakteristické vznikem limitovaného počtu klonálních plazmatických buněk neboli monoklonální gamapatie neurčeného významu (MGUS), (Rajkumar 2016<sup>a</sup>). Jedná se o klasický premaligní stav, kdy je riziko maligní konverze nízké, v tomto případě asi 1 % ročně. Část pacientů pak může vykazovat ještě další přechodné stádium, mezi MGUS a MM, takzvaný doutnající myelom. Přesto, že obě tato stádia jsou asymptomatická a pacienti bývají zachyceni spíše náhodně díky nesouvisejícímu laboratornímu vyšetření, riziko progresu doutnajícího myelomu je podstatně vyšší, než tomu bylo v předchozím případě. Po dobu prvních pěti let je riziko progresu kolem 10 % ročně, následně, pokud již nedošlo k rozvoji onemocnění, se snižuje na 3 % ročně po dobu dalších pěti let, pokud ani po těchto deseti letech nedojde k progresi, zůstává 1% roční riziko (Rajkumar 2016<sup>b</sup>). Přechod mezi MGUS a MM je uskutečněn komplexem změn, a to jak genetických probíhajících v neoplastické plazmatické buňce, tak změn v mikroprostředí kostní dřeně (Obrázek 2), (Kyle *et al.* 2004). Z toho důvodu je při hledání genetických souvislostí pro vznik MM důležité zaměřit se také na faktory vedoucí k MGUS, spolu s faktory ovlivňujícími přechod mezi MGUS a MM (Morgan *et al.* 2012).

V této souvislosti byly definovány různé genetické léze, jež mohou vést k MM (Morgan *et al.* 2012). Patří mezi ně například dědičně variace, translokace, změny v počtu kopií, mutace a abnormality v methylaci a miRNA. Chromozomální abnormality bývají detekovány až u 90 % pacientů s MM (Laubach *et al.* 2011). Na základě karyotypu je možno rozdělit MM do dvou skupin, a to hyperdiploidní, nebo nonhyperdiploidní, tyto skupiny pak představují různé onkogenetické dráhy. U hyperdiploidních pacientů bývají časté trizomie chromozomů 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 a 21, naopak translokace těžkého řetězce imunoglobulinů (IgH) se vyskytují jen s nízkou četností (Fonseca *et al.* 2009; Laubach *et al.* 2011). Tato třída tvoří zhruba 40 % všech případů MM (Brigle a Rogers 2017). Nonhyperdiploidní pacienti mohou být hypodiploidní, pseudodiploidní či téměř tetraploidní. V tomto případě dochází k četným translokacím IgH (Fonseca *et al.* 2009). Translokace IgH bývají přítomny asi u 30 % případů MM. Nejčastěji se jedná o translokace mezi lokusem IgH na 14q32 a některým z partnerských genů majícím onkogenní vlastnosti (Brigle a Rogers 2017). Nejčastějšími geny sloužícími jako translokační partneři jsou geny pro cyklin D1 (chromosom 11q13), cyklin D3 (chromosom 6p21), FGFR3/MMSET (chromosom 4p16), MAF (chromosom 16q23) a MAFB (chromosom 20q11) (Brigle a Rogers 2017, Laubach *et al.* 2011). Obecně se předpokládá, že všechny výše zmíněné mutace vedou ke změnám v růstu zasaženého klonu buněk (Brigle a Rogers 2017). Poslední tři zmíněné translokace vedou mimo jiné ke změnám v regulaci cyklinu D2.

Vliv deregulace proteinů z rodiny cyklin D na vznik MGUS potažmo MM je tedy zřejmý, nicméně samy o sobě tyto mutace k rozvoji onemocnění nestačí a pro vznik aktivní abnormalní plazmatické buňky je potřeba dalších genetických událostí (Brigle a Rogers 2017). Ty mohou

v počátcích zahrnovat například ztrátu 13. chromosomu, kde je lokalizován gen pro tumorsupresor RB, nebo aktivaci onkogenů MYC a RAS v důsledku mutací. Postupně s rozvojem onemocnění cytogenetických událostí přibývá a obecně nebývají spojovány s dobrou prognózou. Docházet může ke změnám v počtu kopií u prvního chromosomu, změnám na lokusu 8q24 vedoucím k aktivaci C-MYC, či ke ztrátě tumor supresorové funkce p53 v důsledku zasažení genu TP53 delecí části 17. chromosomu či mutací v příslušné oblasti. V pozdní fázi onemocnění pak bývají přítomny mutace vedoucí k inaktivaci regulace nukleárního faktoru kB, který by měl regulovat expresi adhezních molekul zapojených do interakce MM buněk se stromatem kostní dřeně.

V rozvoji onemocnění hrají roli také epigenetické změny jako methylace DNA, methylace a acetylace histonů, přičemž tyto obvykle bývají pozorovány až v pozdějších stádiích onemocnění (Brigle a Rogers 2017). V pozdějších stádiích onemocnění bývají časté hypermethylace cílových genů, jež mohou vést k rezistenci, buněčné adhezi a buněčné signalizaci. Demethylace histonů zase vede k nárůstu transkripce a exprese některých onkogenů.



Obrázek 2: Události související s iniciací a progresí MM (upraveno podle Morgan et al. 2012)

Mikroprostředí kostní dřeně je významným činitelem ve vývoji, přežívání a progresi MM (Raab *et al.* 2009). Funkčně jej můžeme rozdělit na část buněčnou a nebuněčnou. Buněčná část je tvořena hematopoetickými buňkami zahrnujícími myeloidní buňky, T a B lymfocyty, NK buňky a osteoklasty, zatímco stromální buňky kostní dřeně, mezenchymální stromální buňky odvozené od kostní dřeně, fibroblasty, osteoblasty, adipocyty, endoteliální buňky a krevní cévy patří mezi nehematopoetické buňky. Nebuněčná část je pak tvořena extracelulární matrix a tekutinou, na jejíž produkci se podílí buňky kostní dřeně včetně těch myelomových, a to pod regulací parakrinních a autokrinních smyček. Tekutina je tvořena cytokiny, chemokiny, růstovými faktory a exosomy. Interakce mezi buňkami MM a stromálními buňkami kostní dřeně nebo proteiny

extracelulární matrix mají významný podíl na zvýšeném růstu, přežívání, migraci či rezistenci na léčiva (Chou 2012). Tyto interakce zprostředkovávají receptory na buněčném povrchu, jako jsou integriny, kadheriny, selektiny a buněčné adhezivní molekuly. Adheze buněk MM k hematopoetickým buňkám a stromálním buňkám kostní dřeně vede k sekreci cytokinů a růstových faktorů. Zařadit zde můžeme například interleukin-6, interleukin-10, insulinu podobný růstový faktor 1, vaskulární endoteliální růstový faktor, proteiny z rodiny tumor nekrotizujícího faktoru, transformující růstový faktor  $\beta 1$ . Tyto pak mohou vést k imunosupresi a vzniku lytických kostních lézí (Raab *et al.* 2009). Adheze buněk MM k proteinům extracelulární matrice jako jsou fibronectin, laminin, kolagen a vitronektin způsobují zvýšenou produkci proteinů regulujících buněčný cyklus a anti-apoptotických proteinů (Chou 2012). To může mít za důsledek vznik kostních lézí díky nevyvážené funkci osteoblastů a osteoklastů. Osteoblasty jsou potlačeny inhibicí Wnt dráhy, naopak osteoklasty jsou díky amplifikaci RANK dráhy a aktivitě makrofágového zánětlivého proteinu  $1\alpha$  aktivovány. Indukce proangiogenních faktorů pak ještě zvyšuje hustotu mikrovaskulární cirkulace v kostní dřeni a odpovídá za abnormální strukturu cév vyživujících myelom.

## 2.2 Příznaky a diagnostika

Příznaky se u pacientů mohou vyskytovat po různou dobu, přičemž obvykle nebývají příliš specifické (Brigle a Rogers 2017). Nicméně je možno uvést nejčastěji udávané symptomy pacientů, jímž byl MM diagnostikován. Mezi tyto patří únava, úbytek na váze, opakující se infekce, leukocytopenie, trombocytopenie, periferní neuropatie, bolest způsobená poškozením kostní tkáně, anémie a selhání ledvin (Brigle a Rogers 2017, Laubach *et al.* 2011). Posledních několik zmíněných patří mezi takzvaná „CRAB“ kritéria, popisující poškození orgánů související s myelomem. Tato jsou charakteristická pro MM a pomáhají jej odlišit od MGUS či doutnajícího myelomu. Patří zde renální insuficience, kdy k poškození ledvin dochází především akumulací nadbytečných lehkých řetězců v distálním tubulu, kde interagují s Tamm-Horsfall proteinem, přičemž vznikají voskové válce a dochází k obstrukční nefropatii (Laubach *et al.* 2011). Dále pak hyperkalcémie, vzniklá v důsledku osteolýzy a kostní resorpce spojené s efluxem vápníku do extracelulární tekutiny a také v důsledku nefunkčnosti ledvin spolu se zvýšenou tubulární resorpcí. Hyperkalcémie může zpříčiňovat bolesti břicha, žízeň, nadměrnou ztrátu moči až selhání ledvin (Mehta 2015). Pak zde můžeme zařadit anémii, která bývá obecně způsobena infiltrací kostní dřeně, nebo dysfunkcí ledvin, ale nejspíš hrají roli i jiné faktory jako je nadměrná exprese Fas ligandu a podobně (Laubach *et al.* 2011, Palumbo *et al.* 2014). Posledním z CRAB kritérií je poškození kostí, které může zahrnovat lytické kostní léze, kompresí zlomeniny obratlů,

osteopenii či osteoporózu. Tato poškození pak mohou, ale nemusí vyvolávat bolest (Laubach *et al.* 2011). Obecně jsou tato poškození způsobena změnami v aktivitě osteoblastů a osteoklastů.

Přestože příznaky onemocnění nemusí být velmi specifické, kombinací vhodných diagnostických metod je možno symptomatický MM odhalit a odlišit jej od MGUS, doutnajícího myelomu, solitárního plazmocytomu i jiných nemocí plazmatických buněk na základě kritérií Mezinárodní pracovní skupiny pro mnohočetný myelom (Palumbo *et al.* 2014). Diagnostika zahrnuje široké spektrum různých analýz, do nichž spadají analýzy krevního obrazu, analýzy moči, biopsie kostní dřeně a radiologické hodnocení (Brigle a Rogers 2017). Během laboratorní analýzy je zkoumán celkový počet krevních buněk s diferencíalem a krevními destičkami, laktát dehydrogenáza, mikroglobulin, přítomnost volných lehkých řetězců imunoglobulinů. Prováděna je také elektroforéza sérových proteinů s kvantifikací a imunofixací monoklonálního proteinu. Močová analýza sestává z elektroforézy s imunofixací pro sérové a celkové proteiny ze 24hodinového vzorku moči. Biopsie kostní dřeně je následně hodnocena metodami imunohistochemie a/nebo průtokové cytometrie, fluorescenční in situ hybridizace a cytogenetiky. Pro detekci skeletálních lézí se využívá počítačové tomografie, magnetické rezonance a pozitronové emisní tomografie. Od dříve používané rentgenové analýzy se upouští z důvodu její nízké citlivosti.

Díky kombinaci výše zmíněných metod je možno přiřadit pacientům příslušnou diagnózu (Obrázek 3). Pro MGUS je nutná přítomnost sérového monoklonálního proteinu (IgG nebo IgA) nižší než 3g/100 ml spolu s přítomností klonálních plazmatických buněk kostní dřeně, které však nepřevyšující 10 % a zároveň nepřítomnost žádného z CRAB kritérií (Palumbo *et al.* 2014). Doutnající myelom jakožto mezistádium mezi MGUS a MM je charakteristický přítomností sérového monoklonálního proteinu (IgG nebo IgA) vyšší nebo rovnou 3 g/100 ml, nebo přítomností tohoto proteinu ve vzorku moči v množství větším, nebo rovném 500 mg za 24 hodin a/nebo přítomností klonálních plazmatických buněk kostní dřeně v rozmezí od 10 % do 60 % (Palumbo *et al.* 2014, Rajkumar 2019). Ani v tomto případě nesmí být přítomno žádné z CRAB kritérií (Palumbo *et al.* 2014). Pro vyslovení diagnózy MM je pak nezbytné splnění třech podmínek. Mezi ně patří podíl klonálních buněk kostní dřeně vyšší nebo roven 10 %, nebo biopticky prokázaný kostní či extramedulární plazmocytom. Dále pak přítomnost sérového, nebo močového monoklonálního proteinu (vyjma pacientů s nesekretonickou formou MM). Třetím kritériem je přítomnost jednoho či více z CRAB kritérií.

MGUS	Doutnající myelom	MM
<p>&lt; 3g/100 ml sérový monoklonální protein</p> <p>A</p> <p>&lt; 10% klonálních plazmatických buněk kostní dřeně</p>	<p>≥ 3g/100 ml sérový monoklonální protein/ ≥ 500 mg monoklonálního proteinu za 24 v moči</p> <p>A/NEBO</p> <p>10-60% klonálních plazmatických buněk kostní dřeně</p>	<p>Monoklonální protein v krvi/moči</p> <p>A</p> <p>≥ 10% klonálních plazmatických buněk kostní dřeně</p> <p>A</p> <p>Nejméně 1 z CRAB</p>

Obrázek 3: Diagnostická kritéria pro MGUS, doutnající myelom a MM

## 2.3 Léčba

Pacienti s MGUS a doutnajícím MM v časném stádiu jsou obvykle pozorováni bez léčby (Laubach *et al.* 2011). Důvodem jsou chybějící důkazy o přínosu léčby asymptotického či doutnajícího MM (Kyle a Rajkumar 2004). Střední doba od diagnózy po progresi do symptomatického onemocnění je dva až tři roky, přesto existují pacienti, jež zůstávají bez progresu i několik let. Právě to v kombinaci s možnou toxicitou léčiv je důvodem, proč se léčba těchto stádií nedoporučuje. Léčbu tedy postupují až pacienti se symptomatickým MM (Mehta 2015). Terapie MM obecně zatím nevede k vyléčení pacientů, nicméně zvyšuje délku jejich přežití. Novodobé léčebné plány zvýšily pětileté přežití pacientů s myelomem do 75 let na více než 50 % (Gerecke *et al.* 2016). U 3–20 % pacientů může úplná remise trvat mnoho let. Rozhodnutí o typu léčby je ovlivňováno řadou faktorů v závislosti na konkrétním pacientovi (Laubach *et al.* 2011). Mezi tyto patří věk, charakteristika onemocnění, zdravotní komorbidity, způsobilost podstoupit transplantaci kmenových buněk a v neposlední řadě také preference pacienta. Pacienty je obecně možno rozdělit na dvě základní skupiny. Na způsobilé pro transplantaci kmenových buněk, a ty, jež z nějakého důvodu způsobilí nejsou. V obou případech se obecně začíná takzvanou indukční terapií s cílem zastavit růst nádoru a dysfunkci orgánů spojenou s MM. Pacienti dostávají chemoterapeutika, které negativně ovlivňují sběr kmenových buněk, např. melfalan v kombinaci s proteasomálním inhibítor borteomibem a steroidy, nebo imunomodulačním lékem thalidomidem (Mehta 2015). U těch, jež transplantaci kmenových buněk podstoupit nemohou, a není možno jim podávat vysoké dávky léčiva, může tato terapie probíhat po dobu neurčitou, nebo do bodu nejlepší reakce následované obdobím bez léčby (Laubach *et al.* 2011, Röllig *et al.* 2015). Nicméně musí být kladen důraz na dobrou snášenlivost léčby, aby se předešlo významným toxickým účinkům, nemocnosti či úmrtí (Röllig *et al.* 2015). Léčba by měla být podávána po několik cyklů, protože kvalita odpovědi se v průběhu času často zvyšuje. U pacientů

způsobilých podstoupit transplantaci probíhá tato terapie s cílem dosáhnout maximální odezvy před zahájením léčby vysokými dávkami, která má po transplantaci kmenových buněk za následek ještě vyšší míru remise. V případě, že pacient podstupuje autologní transplantaci kmenových buněk je nutno jejich odběr provést v bodu maximální odpovědi, před zahájením vysokodávkové terapie (Laubach *et al.* 2011, Röllig *et al.* 2015). Obdobně jako v předchozím případě jsou používána nová léčiva jako proteasomální inhibitory, steroidy, imunomodulační léky v kombinaci s konvenčními chemoterapeutiky (Röllig *et al.* 2015). Tato léčba trvá obvykle v rozmezí 4 až 6 měsíců a je následována nejčastěji autologní transplantací kmenových buněk s melphalanovou udržovací léčbou (Mehta 2015). Ve výjimečných případech bývá prováděna také allogenní transplantace kmenových buněk, nicméně jejím velkým limitem je podmínka věku pacienta pod 50 let a HLA identický sourozenec (Dalton *et al.* 2001). Díky tomu je tento typ transplantace možno využít pouze pro velmi úzkou skupinu pacientů, navíc je zde velké riziko reakce štěpu proti hostiteli, která může vést k infekci až smrti pacienta. Některé studie však naznačují, že v důsledku protinádorového účinku štěpu by alogenní transplantace kmenových buněk mohla být jedinou skutečně léčebnou terapií MM.

Přestože léčba pacientů s nově diagnostikovaným MM je v současné době poměrně efektivní, stále se nelze vyhnout relapsům onemocnění (Martin a Huff 2019). V těchto případech je nutná další terapie, která může zahrnovat různé kombinace schválených léčiv. Významnými skupinami léčiv s vysokou aktivitou jsou imunomodulační látky (lenalidomid a pomalidomid), inhibitory proteasomu (bortezomib, carfilzomib, ixazomib) a molekulární protilátky (daratumumab a elozutumab). Tyto pak mohou být kombinovány s dalšími aktivními léčivy, jako jsou kortikosteroidy, alkylační látky, anthracykliny inhibitory histondeacetylas a dalšími chemoterapeutiky.

Významnou součástí léčby pacientů s MM je také takzvaná „podpůrná péče“, která vede ke zvládnutí komplikací souvisejících s léčbou, jakož i zvládnutí nepříznivých účinků používaných léčiv (Gerecke *et al.* 2016). Mezi tyto komplikace patří například bolest, periferní neuropatie, neutropenie, snížené množství protilátek, zvýšená náchylnost k infekcím, hyperkalcémie, zhoršená funkce ledvin a žilní tromboembolismus. Do této terapie lze tedy zařadit léky k tišení bolesti, protizánětlivé léky, bisfosfonáty, radioterapii, antikonvulziva, dietní opatření, dialýzu a podobně (Gerecke *et al.* 2016, Multiple myeloma research foundation). Jako vhodné se považuje také dodržování očkovacích plánů pro snížení rizika přenosných infekcí (Laubach *et al.* 2011). A v neposlední řadě také pomoc specialistů na duševní zdraví, jako jsou psychiatři nebo psychologové, díky nimž se zvyšuje schopnost pacienta vyrovnat se se stresem spojeným s diagnostikou a léčbou onemocnění.

## 3 Proteasom

### 3.1 Funkce

Proteasom plní v buňce hned několik důležitých funkcí. Nejčastěji bývají popisovány funkce proteolytické, a to buď v závislosti na ubikvitinaci nebo bez ní. Tyto dráhy jsou v následujících kapitolách popsány podrobněji. Kromě proteolytických funkcí se může zapojovat také neproteolytický, k čemuž nejčastěji dochází prostřednictvím ATPasových podjednotek částice 19S (DeMartino a Gillette 2007). Tímto se regulační částice podílí na různých buněčných procesech zahrnujících transkripci, opravu DNA a remodelaci chromatinu.

#### 3.1.1 Proteasom-ubikvitinový systém

Ubikvitin-proteasomální systém (UPS) je vysoce selektivní systém degradace proteinů v eukaryotických buňkách, který se podílí na degradaci více než 80 % buněčných proteinů (Wang a Le 2019). V rámci buňky může hrát UPS dvě základní role, buď může udržovat kvalitu buněk rozkladem abnormálních, nebo poškozených proteinů, nebo může řídit základní biologické procesy v buňkách rozkladem proteinů se specifickými funkcemi. Tím se podílí na důležitých fyziologických a biochemických procesech, kam můžeme zařadit například růst a diferenciaci buněk, buněčný metabolismus, imunitní odpověď, nebo také replikace a opravy DNA, což má společně za důsledek správnou funkci tkání a orgánů.

Aby mohl být protein degradován cestou závislou na proteasomu, musí být nejprve ubikvitinován (Roos-Mattjus a Sistonen 2004). Při tomto procesu je na protein, jež je určen k degradaci za pomoci enzymů kovalentně, navázáno několik malých polypeptidů (ubikvitinů). Takto označené proteiny již mohou být rozpoznány proteasomem, kde dochází k recyklaci ubikvitinu a degradaci cílového proteinu.

##### 1.1.1.1 Ubikvitin

Ubikvitin je jedním z nejrozšířenějších postranlačních modifikátorů proteinů (Zheng a Shabek 2017). Je tvořený 76 aminokyselinami (Zheng a Shabek 2017) a jeho struktura je mezi všemi eukaryotními organismy vysoce konzervovaná, což umožňuje rozpoznání jeho povrchových struktur doménami vázajícími ubikvitin (Komander a Rape 2012). Z hlediska formace ubikvitinových řetězců jsou nejdůležitějšími rysy ubikvitinu jeho N-konec (methioninu) a sedm lysinů, který slouží jako připojovací místo pro sestavení řetězce, čímž nabízejí nespočet možností pro sestavení specifického polymeru (Akutsu *et al.* 2016). Samotné proteinové substráty pak



mohou být ubikvitinem modifikovány na jednom, nebo více lysinových zbytcích, a to buď jedinou molekulou ubikvitinu, nebo různě dlouhým ubikvitinovým řetězcem. Rozmanitost ubikvitinového kódu je dále podpořena různými možnostmi vazby ubikvitinu v řetězci. Vznikají tak řetězce homotypické, obsahující pouze jeden typ vazby a řetězce heterotypické mající smíšené typy vazeb v rámci jednoho polymeru; tento typ řetězce se navíc může dále větvit. Krom toho mohou být molekuly ubikvitinu modifikovány postranlačními modifikacemi. Různé možnosti ubikvitinace proteinů a rozmanitost v ubikvitinových řetězcích umožňuje ubikvitinu plnit celou řadu funkcí. I když je nejčastěji ubikvitin spojován s degradací proteinů 26S proteasomem (Clague a Urbé 2010), při níž dochází k modifikaci proteinových substrátů nejčastěji připojením polyubikvitinylových řetězců, v nichž jsou ubikvitiny propojeny přes lysin 48 nebo lysin 11 (Zheng a Shabek 2017), je ubikvitin zapojen také do zbývajících dvou degračních drah proteinů u savců, což se týká degradace lysozomem a autofagozomem (Clague a Urbé 2010). Krom funkcí proteolytických byly zjištěny také jeho další role v řízení transportu přes membrány, aktivaci protein kináz, opravě DNA a v regulaci dynamiky chromatinu (Chen a Sun 2009). Naopak deregulace ubikvitinového systému může vést k rozvoji mnoha onemocnění (Akutsu *et al.* 2016).

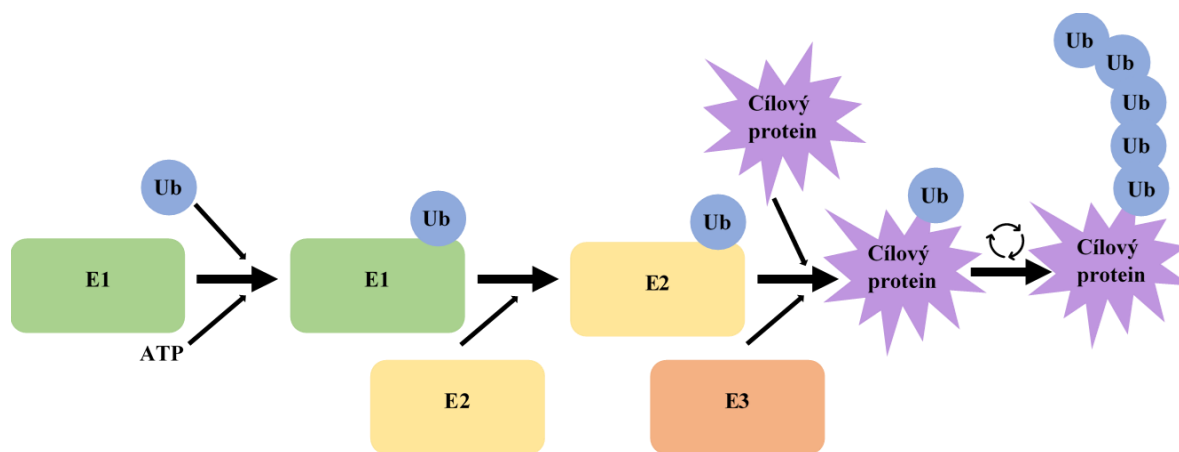
#### **1.1.1.2 Enzymy ubikvitinační kaskády**

Kovalentní vazba ubikvitinů na cílový protein probíhá v několika krocích zahrnujících sekvenční akci 3 enzymů označovaných jako E1, E2 a E3, z nichž každý má svou roli (Li *et al.* 2018). Ubikvitin-aktivující enzym, E1, je zodpovědný za aktivaci ubikvitinu nezbytnou pro všechny modifikace (Myung *et al.* 2001). Zprostředkovává přenos ubikvitinu na enzym E2 za spotřeby ATP (Burger a Seth 2014). Ubikvitin-konjugační rodina enzymů, E2, je tvořená téměř 40 členy (Li *et al.* 2018). Tyto enzymy zprostředkovávají konjugaci ubikvitinu k substrátům a tím kontrolují stabilitu proteinů a interakce v rámci UPS. Ubikvitin ligázy, E3, jsou u eukaryot tvořeny stovkami členů, díky čemuž jsou schopny pracovat v odlišných buněčných kontextech, reagovat na různé buněčné signály a zpracovávat různé proteinové substráty (Zheng a Shabek 2017). Jako takové jsou tedy E3 ligázy zodpovědné za specifitu při cílení na zájmové proteiny (Li *et al.* 2018). Jejich úkolem je, interakcí se substrátem a E2 na níž je vázán ubikvitin, zprostředkovat finální krok ubikvitinace při němž dochází k vytvoření isopeptidové vazby mezi  $\epsilon$ -aminoskupinou lysinu substrátu a C-terminální karboxylovou skupinou ubikvitinu (Zheng a Shabek 2017).

#### **1.1.1.3 Průběh degradace ubikvitin proteasomálním systémem**

Jak již bylo zmíněno výše, kovalentní vazba ubikvitinů na cílový protein je zprostředkována pomocí 3 enzymů označovaných jako E1, E2 a E3 (Kudriaeva a Belogurov 2019). Celý proces začíná tím, že enzym E1 ve dvou krocích, závislých na ATP, aktivuje ubikvitin vytvořením

thioesterového komplexu E1-ubikvitin s vysokou energií. Takto aktivovaný ubikvitin je následně přenesen na ubikvitin konjugující enzym E2. Kruhová doména nesoucí E3 ligázu se váže na E2 a substrát a přenáší je do vzdálenosti dostatečné pro E2 ke katalyzaci přenosu ubikvitinu na substrát. Druhá část enzymu E3, takzvaná HECT doména, nesoucí ubikvitin-ligázu nezávisle katalyzuje přenos ubikvitinu na aminoskupinu cílového proteinu. Touto cestou je tedy ubikvitin přenesen na lysinový zbytek substrátu (Roos-Mattjus a Sistonen 2004). Tato enzymatická kaskáda, při níž dochází k vazbě ubikvitinu na lysin 48 nebo lysin 11 se několikrát cyklicky opakuje za vzniku polyubikvitinylovaného řetězce, což vede k degradaci proteinu. V některých případech bývá popisován ještě čtvrtý enzym, E4, jedná se o ubikvitin ligázu katalyzující prodlužování ubikvitinového řetězce (Kudriaeva a Belogurov 2019). Po několika cyklech ubikvitinace je cílový protein připraven pro rozpoznání proteasomem a degradaci (Roos-Mattjus a Sistonen 2004). Celý průběh ubikvitinace proteinů je znázorněn na obrázku 4.



Obrázek 4: Schéma ubikvitinace proteinů (upraveno podle Tsukamoto a Yokosawa 2009).

Za rozpoznání ubikvitinovaného proteinu proteasomem je zodpovědná regulační část, která má rozmanitou škálu ubikvitinových receptorů (Ehlinger a Walters 2013). Mezi tyto patří Rpn10 a Rpn13, jež mají vyhrazená vazebná místa v regulační části. Dále zde spadají také další ubikvitinu podobné proteiny (ubiquitin-like a ubiquitin-associated), které pravděpodobně přenášejí ubikvitinovaný substrát k proteasomu prostřednictvím více překrývajících se dokovacích míst. Kromě rozpoznání ubikvitinovaného substrátu je pak tato část zodpovědná za rozvinutí a translokaci vybraných substrátů do lumen proteasomu 20S (Borissenko a Groll 2007). K aktivaci proteasomu dochází po vazbě ubikvitinových konjugátů a ATP, které spouštějí reverzibilní strukturální změny 19S a otevření brány 20S proteasomu (Collins a Goldberg 2017). Tento aktivovaný stav, je potom udržován, dokud substrát není deubikvinovaný a neunikne, nebo nepodstoupí degradaci.

Vazba ubikvitinovaného substrátu vyvolává v komplexu 19S řadu strukturálních změn (Collins a Goldberg 2017). Tyto pak pravděpodobně odpovídají za jeho zvýšenou katalytickou aktivitu. Nejvýznamnějšími změnami pozorovanými pomocí kryogenní-elektronové mikroskopie

jsou rozšíření centrálního tranzitního kanálu pro substrát přes APásový kruh a jeho zarovnání se vstupní bránou do 20S. K otevření brány do centrální částice dochází, když se C-terminální HbYX motivy (Hb: hydrofóbní; Y: tyrosin nebo fenylalanin; X: jakákoliv aminokyselina) na třech 19S ATPázách (Rpt2, Rpt3 a Rpt5) vážou na lysiny  $\alpha$ -kapes centrální částice (Collins a Goldberg 2017, Rousseau a Bertolotti 2018). Tato interakce vyvolává v centrální části konformační změny přemístěním N-terminálních ocásků  $\alpha$ -podjednotky z centra jádrové částice (Rousseau a Bertolotti 2018). Tím dochází k otevření brány do této částice, když je substrát navázán. Zdá se, že zbývající tři konce, které jsou non-HbYX, pak udržují spojení mezi regulačními a jádrovými částicemi (Collins, a Goldberg 2017). Zároveň existují také mechanismy bránící předčasnému spojení těchto dvou částí (Rousseau a Bertolotti 2018). Tento krok je pro aktivaci proteasomu nezbytný, jelikož bez něj je přístup do středu  $\alpha$ -prstence blokován N-terminálními konci  $\alpha$ -podjednotek. Právě tyto konce tak brání neselektivnímu vstupu a destrukci buněčných proteinů (Collins a Goldberg 2017).

Většina ubikvitinovaných substrátů v nativní formě však nemůže procházet do axiálního kanálu jádrové částice, jelikož je tento kanál i v otevřené formě pro jejich průchod příliš úzký (Ehlinger a Walters 2013). Další překážkou je také to, že ubikvitin vytváří velmi stabilní struktury, jejichž teplota tání přesahuje 80 °C. Přeměna takto stabilně složených proteinů probíhá pomalu v závislosti na vysoké energii potřebné pro jejich termodynamickou destabilizaci. Z toho důvodu je odstranění ubikvitinu pomocí deubikvitinačních enzymů a jeho recyklace koordinována s rozvolněním substrátu a jeho translokací do jádra k proteolýze. Víko se během proteolytického cyklu otáčí (Budenholzer *et al.* 2017). Díky těmto pohybům, může docházet k přemístění substrátů z jejich původních vazebných míst v regulační části do poloh umožňujících jejich rozvinutí ATPázami báze a deubikvitinaci pomocí Rpn11. Rpn11 je proteasomální deubikvitinační enzym, který štěpí ubikvitinové řetězce poté, co byly substráty ireverzibilně zapojeny do úzkého proteasomálního vstupního kanálu (Rousseau a Bertolotti 2018). Ubikvitin C-terminální hydroláza (USP14; Ubp6 v kvasinkách) a ubikvitin C-terminální hydroláza UCH37 (také známá jako UCHL5) jsou také deubikvitinační enzymy, které mohou být spojovány s proteasomem a deubikvitylací. Za rozvinutí proteinů jejich translokací do proteolytické komory v 20S části jsou tedy zodpovědné ATPázy báze (Sharon *et al.* 2006). To je řízeno heterohexamerickým motorem Rpt1-Rpt6, který funguje jako motor proteasomu, přeměňující chemickou energii vazby ATP a hydrolýzy na mechanickou práci (Bard *et al.* 2018).

Na rozdíl od typických proteas má 20S proteasom schopnost štěpit téměř všechny vazby uvnitř proteinového substrátu (Myung *et al.* 2001). Tato vlastnost je zapříčiněna přítomností více proteolytických aktivit ve vnitřní proteolytické komoře proteasomu. Obvykle je jeho proteolytická aktivita popisována na základě jeho preferencí ke štěpení peptidové vazby bezprostředně po určité aminokyselině. Díky tomu můžeme popisovat aktivitu chymotrypsinovou, kdy ke štěpení dochází po objemných hydrofóbních aminokyselinových zbytcích, připomínající chymotrypsin. Dále

aktivitu trypsinovou, kde štěpí peptidovou vazbu za bazickými zbytky, analogickými k trypsinu. Po kyselých zbytcích dochází ke štěpení u post-glutamyl peptidové hydrolyzační, neboli kaspázové aktivity. Kromě těchto dobře charakterizovaných proteolytických aktivit je také známo, že proteasom 20S má dvě další proteolytické aktivity. Jedná se o aktivitu zaměřenou na aminokyseliny s větveným postranním řetězcem a na malé neutrální aminokyseliny. Zatím však není známo, zda tyto aktivity jednoduše odrážejí širokou specifičnost katalytických podjednotek, které jsou odpovědné za výše uvedené tři klasické aktivity, nebo se jedná o dosud neidentifikovaný katalytický mechanismus.

### 3.1.2 Degradace nezávislá na ubikvitinu

Jak již bylo zmíněno výše, značná část buněčných proteinů je degradována pomocí UPS (Wang a Le 2019). Aby mohl být protein degradován touto cestou, musí být nejprve označen ubikvitinem. Nicméně existují také případy, kdy k proteasomální degradaci dochází i bez předchozí ubikvitinace (Hwang *et al.* 2011). Odhady říkají, že touto cestou by mohlo být degradováno až 20 % celkových buněčných proteinů (Sánchez-Lanzas a Castaño 2014). Přestože se jedná o dva odlišné degradační mechanismy, neznamená to, že by se vzájemně vylučovaly (Ben-Nissan a Sharon 2014). Různé populace stejného proteinu tak mohou být degradovány rozlišnými způsoby. V případě degradace nezávislé na ubikvitinu je jeho role pro degradaci proteasomem nahrazena jiným proteinem, nebo degradačními signály v sekvenci proteinu, jež má degradaci podstoupit (Orlowski a Wilk 2003).

Obvykle bývají popisovány dva různé mechanismy, jimiž k tomuto jevu dochází (Hwang *et al.* 2011). Prvním z nich je asociace substrátu s katalytickou podjednotkou 20S, k níž dochází často pomocí dalších proteinů. Tímto typem bývají degradovány některé proteiny vykazující abnormální strukturu, špatně složené, staré či vysoce oxidované proteiny. Hydrofobní oblasti rozvinutých řetězců, pak zastávají roli ubikvitinu (Sorokin *et al.* 2009) a zvyšují možnost rozpoznání pomocí 20S částice (Hwang *et al.* 2011). Rozvolněná struktura takovýchto proteinů spolu s jejich schopností otevřít bránu do jádra 20S proteasomu, jsou pravděpodobně odpovědné za to, že v tomto případě není nutná regulační částice 19S (Sorokin *et al.* 2009, Hwang *et al.* 2011). Druhá varianta pak probíhá prostřednictvím funkce proteasomových aktivátorů (Hwang *et al.* 2011). Jsou to komplexy, které asociují s 20S částicí a modulují její funkci. Touto cestou je degradována například ornitindekarboxyláza nebo proteiny p21, p14, SRC-3. Mezi proteasomové aktivátory můžeme zařadit například PA28 $\alpha\beta$  vyskytující se v cytosolu, jaderný PA28 $\gamma$  nebo PA200 (Ben-Nissan a Sharon 2014).

### 3.1.3 Další funkce proteasomu

Regulační částice 19S se neproteolyticky podílí na nukleotidové excisní opravě prostřednictvím Rad23 (Reed a Gillette 2007). A to nezávisle na de novo syntéze proteinů, proto jsou tyto opravy kontrolovány prostřednictvím interakce s již existujícími proteiny. Další neproteolytické funkce pak proteasom zastává v průběhu transkripce (DeMartino a Gillette 2007). Během iniciace se složky 19S proteasomu zapojují do „stripování“ aktivátorů z promotorů a stimulují interakci mezi komplexem aktivátor-koaktivátor, které vedou k nárůstu asociace pre-iniciačního komplexu na promotoru (Durairaj a Kaiser 2014). V roce 2002 Ferdous *et al.*, publikoval článek, v němž popisuje také nezbytnost 19S částice pro úspěšnou transkripční elongaci pomocí RNA polymerázy II v savčích systémech. Zde prokázal, že neproteolytická aktivita 19S částice je nezbytná především pro aktivovanou transkripci, kterou ovlivňuje působením v průběhu elongační fáze, nebo v průběhu fáze, která ji v transkripčním cyklu předchází. Svou roli má také v remodelaci chromatinu, kdy ATPasy tvořící 19S částici zprostředkovávají umlčení genů v oblastech telomer tím, že kontrolují metylaci histonu H3 v závislosti na ubikvitinaci histonu H2B (DeMartino a Gillette 2007).

Imunoproteasomy specializovaně štěpí zájmové proteiny za vzniku vysoce kvalitních peptidů pro prezentaci molekul hlavnímu histokompatibilnímu komplexu první třídy a aktivaci cytotoxických T-lymfocytů (Eskandari *et al.* 2017). Roli hraje také v regulaci zánětlivých drah, a to prostřednictvím přímého efektu na transkripční aktivátory a na secernované prozánětlivé cytokiny. Tyto závisí na typu buňky ve smyslu navození nebo rozrušení diferenciaci a expanze imunitních buněk. Dále se podílí také na diferenciaci B a T-lymfocytů. U B-lymfocytů bylo pokusy na myších zjištěno, že snížené množství imunoproteasomu vede k snížení jak celkového počtu B-lymfocytů, tak jejich životaschopnosti a funkčnosti. Imunoproteasomová aktivita pak podporuje diferenciaci pomocných a efektorových T-lymfocytů, zatímco potlačuje diferenciaci regulačních T-lymfocytů. Ve srovnání s konstitutivním proteasomem je pak možno zmínit také mnohem efektivnější proteolytickou aktivitu vedoucí k nárůstu viability buněk vystavených zvýšenému oxidativnímu stresu a poškozením způsobených cytokiny.

## 3.2 Struktura proteasomu

### 3.2.1 Konstitutivní proteasom

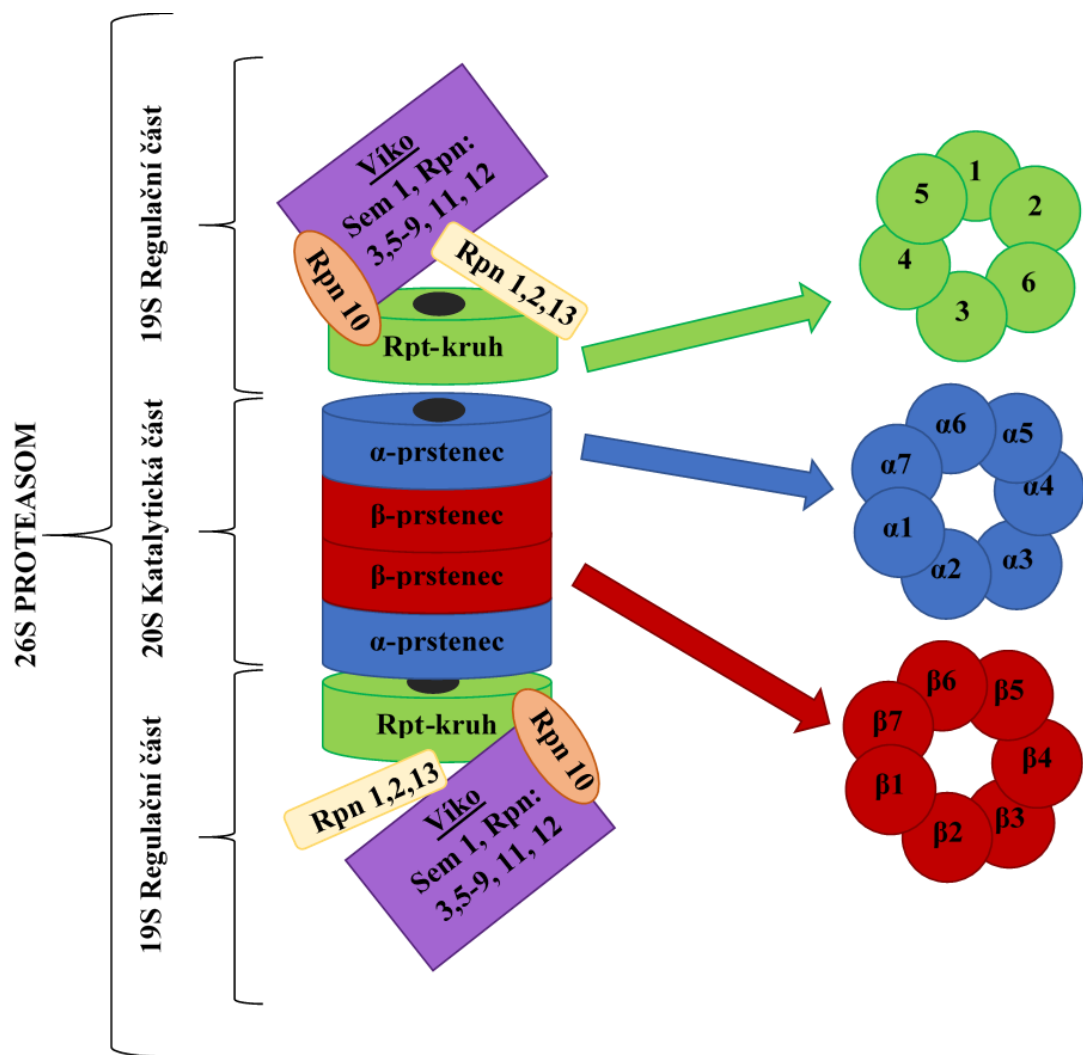
Proteasom je mnohoproteinový enzymatický komplex (Adams 2003) s molekulovou hmotností 2500000 Da a sedimentačním koeficientem 26S (Borissenko a Groll 2007). Proteasomy se vyskytují v jádře a cytosolu, přičemž mohou představovat až 1 % buněčných proteinů

vyskytujících se u eukaryot (Burger a Seth 2004). Eukaryotní proteasom se skládá z 20S katalytické části, která je na každém konci uzavřena 19S regulační částí (Borissenko a Groll 2007). Schématicky je struktura proteasomu a jeho částí znázorněna na obrázku 5.

Proteasom 20S je velká proteasa válcovitého tvaru s molekulovou hmotností kolem 700 000 Da (Borissenko a Groll 2007). V této části se nacházejí proteolyticky aktivní místa (Tsukamoto a Yokosawa 2009). Dochází zde k degradaci proteinů za vzniku peptidů o délce 3-25 aminokyselin (Adams 2003). Komplex 20S proteasomu je tvořen 28 proteinovými podjednotkami, které jsou uspořádány do čtyř prstenců (Borissenko a Groll 2007). Vnější dva obsahují sedm podjednotek  $\alpha$  a dva vnitřní prstence se skládají ze sedmi podjednotek  $\beta$  (Burger a Seth 2004). Dva vnější prstence tvoří komplex s 19S regulační částí a vytváří úzký kanál, jímž mohou procházet proteiny pouze v denaturovaném stavu (Adams 2003). Katalytická komora je tvořena dvěma vnitřními  $\beta$  prstenci (Adams 2003), z nichž každý obsahuje pouze tři proteolyticky aktivní  $\beta$  podjednotky ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 5$ ), zatímco ostatní podjednotky jsou neaktivní (Borissenko a Groll 2007). Tato místa se liší v substrátové specifitě a aktivitě, přičemž byla pojmenována po enzymech, které vykazují stejnou proteolytickou aktivitu nebo specifitu (Adams 2003). Jedná se o  $\beta 1$  podjednotku obsahující katalytické místo pro kaspázovou aktivitu,  $\beta 2$  podjednotku s katalytickým místem pro trypsinovou aktivitu a podjednotku  $\beta 5$  s katalytickým místem chymotrypsinové aktivity (Tsukamoto a Yokosawa 2009).

Regulační částice 19S je zodpovědná za rozpoznávání, rozvinutí a translokaci vybraných substrátů do jádra proteasomu 20S po otevření bran tvořených  $\alpha$ -prstenci (Rousseau a Bertolotti 2018). Skládá se ze dvou základních částí: báze a víka, které sestávají přibližně z 20 různých podjednotek (Tsukamoto a Yokosawa 2009). Vzhledem k tomu, že názvosloví jednotlivých podjednotek se liší v závislosti na organismu, je v následující části, pro vyšší přehlednost, užíváno označení zavedené u *Saccharomyces cerevisiae*. Odpovídající označení pro lidské proteiny spolu se základním přehledem jejich funkcí je uvedeno v tabulce 1. Báze je tvořena šesti různými příbuznými AAA<sup>+</sup>-ATPasovými podjednotkami, které jsou označovány jako Rpt1-6 a čtyřmi non-ATPasovými podjednotkami RP non-ATPasa 1 (Rpn1), Rpn2, Rpn10 and Rpn13 (Rousseau a Bertolotti 2018). Šest AAA<sup>+</sup>-ATPasových proteinů vytváří heterohexamerní kruh (Rousseau a Bertolotti 2018) tím, že podjednotky sdružuje ve třech párech (Rpt1-Rpt2, Rpt3-Rpt6, Rpt4-Rpt5) uspořádaných v následujícím pořadí Rpt1-Rpt2-Rpt6-Rpt3-Rpt4-Rpt5. (Budenholzer *et al.* 2017). Každá z těchto Rpt podjednotek má N-konce  $\alpha$ -helixu a oligonukleotid vazebnou doménu, nebo oligosacharid vazebnou doménu v případě kvasinek, která se v hexamerním uspořádání přeskupuje do jiného N-kruhu nad AAA<sup>+</sup> kruhovou doménou (Bard *et al.* 2018). Tyto Rpt proteiny používají konzervované smyčky vstupující z jejich AAA<sup>+</sup> domény do centrálního póru motoru k zachycení proteinových substrátů, jejich rozvinutí mechanickou silou a následné přemístění do jádra 20S proteasomu. Non-ATPasové podjednotky báze Rpn1 a Rpn2 obsahují velké  $\alpha$ -solenoidy,

mající několik vazebných míst pro ubikvitin a ubikvitinu podobné proteiny v případě Rpn1 a vazebné místo pro ubikvitinový receptor Rpn13 na Rpn2. Podjednotka Rpn10 sloužící jako ubikvitin receptor přemosťuje komplex báze a víka. Víko je tvořeno devíti non-ATPasovými podjednotkami označovanými jako Rpn3, Rpn5–Rpn9, Rpn11, Rpn12 a Sem1 (Rousseau a Bertolotti 2018). Tyto podjednotky můžeme rozdělit na dvě domény. Proteasom-CSN-iniciační faktor 3 doménu zahrnující Rpn3, Rpn5-7, Rpn9 a Rpn12 a Mpr1-Pad1 N-terminalní doménu do níž spadají Rpn8 a Rpn11 (Bard *et al.* 2018). Dále proteasom obsahuje ještě jeden nebo dva přídatné deubikvitinační enzymy Ubp6 a Uch37.



Obrázek 5: Struktura proteasomu (upraveno podle Bedford *et al.* 2010)

Tabulka 1: Názvoslovní proteasomálních podjednotek a jejich funkce (upraveno podle Bard et al. 2018).

Subkomplex	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	Funkce
Báze	Rpt1	PSMC2/S7	ATPasa
	Rpt2	PSMC1/S1	ATPasa
	Rpt3	PSMC4/S6	ATPasa
	Rpt4	PSMC6/S10	ATPasa
	Rpt5	PSMC3/S6a	ATPasa
	Rpt6	PSMC5/S8	ATPasa
	Rpn1	PSMD2/S2	Vazba Ubp6 a ubikvitin/ubikvitin-like proteinů
	Rpn2	PSMD1/S1	Strukturní
	Rpn10	PSMD4/S5a	Přídavný faktor, Vazba ubikvitin/ubikvitin-like proteinů
	Rpn13	ADRM1	Vazba ubikvitin/ubikvitin- like proteinů
Víko	Rpn3	PSMD3/S3	Strukturní
	Rpn5	PSMD12	Strukturní
	Rpn6	PSMD11/S9	Strukturní
	Rpn7	PSMD6/S10	Strukturní
	Rpn8	PSMD7/S12	Strukturní
	Rpn9	PSMD13/S11	Strukturní
	Rpn11	PSMD14/Poh1/Pad1	Deubikvitinasa
	Rpn12	PSMD8/S14	Strukturní
	Sem1	PSMD9/Dss1/Rpn15	Strukturní
Asociované deubikvitinasy	Ubp6	Usp14	Deubikvitinasa
	-	Uch37	Deubikvitinasa



### 3.2.2 Imunoproteasom

Kromě výše popsaného konstitutivního proteasomu může v imunitních buňkách docházet ke vzniku takzvaných imunoproteasomů (Eskandari *et al.* 2017). K tomu dochází, jestliže jsou buňky hematopoetického původu vystaveny buď prozánětlivým cytokinům, mezi něž patří například interferon- $\gamma$ , tumor nekrotizující faktor  $\alpha$  a lipopolysacharid, nebo stresorům, jež nejsou závislé na cytokinech, jako je oxidační stres. Konstitutivně jsou pak imunoproteasomy exprimovány v buňkách sleziny (Dahlmann 2016). V obou případech dochází k tomu, že jsou do katalytické podjednotky 20S místo podjednotek  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 5$  začleněny indukovatelné katalytické podjednotky LMP2 ( $\beta 1i$ ), MECL-1 ( $\beta 2i$ ) a LMP7 ( $\beta 5i$ ), (Eskandari *et al.* 2017). Ani regulační částice 19S v případě imunoproteasomu nezůstává beze změny, naopak bývá nahrazována menším a lehčím komplexem 11S, označovaným také jako PA28. Přesto vznikají hybridní molekuly imunoproteasomu nesoucí buď jednu z regulačních částic 19S nebo 11S, či obě tyto částice. Komplex 11S, pak na rozdíl od 19S zodpovědného za vazbu ubikvitinovaných proteinů, nejspíš usnadňuje zpracování neubikvitinovaných peptidových substrátů.

### 3.3 Proteasom jako terapeutický cíl

Jak již bylo zmíněno výše, UPS odpovídá za degradaci většiny regulačních proteinů v eukaryotických buňkách včetně proteinů, které kontrolují progresi buněčného cyklu, apoptózu a opravy DNA (Moreau *et al.* 2012). Mezi takto regulované proteiny, u nichž byla prokázána spojitost s rakovinou, patří například tumorsupresory p53 a p27, povrchové receptory růstových faktorů, receptor pro epidermální růstový faktor či receptor transformujícího růstového faktoru  $\beta$  (Burger a Seth 2014). Narušení proteasomové aktivity vede k zastavení růstu a buněčné smrti kvůli indukci apoptotické kaskády v důsledku rychlé akumulace nekompatibilních regulačních proteinů v buňce (Moreau *et al.* 2012). Narušena je zároveň také angiogeneze a vývoj nových krevních cév z endoteliálních buněk (Frankland-Searby a Bhaumik 2011). Vzhledem k faktu, že rakovinné buňky obecně vykazují vyšší hladiny proteasomové aktivity ve srovnání s buňkami normálními, přičemž jsou citlivější na proapoptotické účinky inhibice proteasomu, činí to z proteasomu racionální terapeutický cíl v onkologické léčbě (Moreau *et al.* 2012).

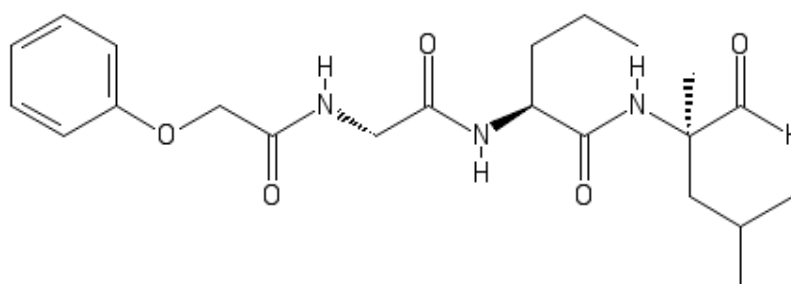
Za vhodný terapeutický cíl je považován také imunoproteasom (Cromm a Crews 2017). Díky faktu, že bývá spojován s vývojem a progresí neurodegenerativních onemocnění, autoimunitních poruch, zánětů a také některých malignit mohla by jeho inhibice přinést významný terapeutický potenciál. Cílením na imunoproteasom lze dosáhnout selektivnější inhibice v rakovinných buňkách, což vede k rozšíření terapeutického okna (Park *et al.* 2018).

### 3.3.1 Známé inhibitory proteasomu

Současné inhibitory proteasomu můžeme dle jejich původu rozdělit na dvě základní skupiny, a to inhibitory syntetické a přírodní (Myung *et al.* 2001). Zatím co přírodní inhibitory proteasomu vykazují širokou variabilitu v kostře hlavní struktury, syntetické inhibitory jsou založeny obvykle na bázi peptidů. Zároveň je můžeme dělit také na základě inhibičního mechanismu (Tsukamoto a Yokosawa 2009). V tomto případě pak připadá v úvahu pět skupin zahrnujících peptidové aldehydy, peptidové vinylsulfony, peptidové boronáty, peptidové epoxy-ketony a  $\beta$ -laktony (Frankland-Searby a Bhaumik 2011). Většina současných inhibitorů cílí na podjednotku  $\beta$ 5, vykazující chymotrypsinovou aktivitu (Cromm a Crews 2017). Inhibice právě této podjednotky způsobuje nejvýznamnější zpomalení proteolýzy ve srovnání s podjednotkami  $\beta$ 1 a  $\beta$ 2, jejichž inhibice má na rychlost rozkladu proteinů menší dopad.

#### 1.1.1.4 Peptidové aldehydy

Prvními syntetizovanými proteasomálními inhibitory byly jednoduché peptidové aldehydy, což byly analogy preferovaných substrátů aktivního místa chymotrypsinové podjednotky (Goldberg 2012). Vyvinuto bylo hned několik silných a selektivních inhibitorů chymotrypsinové podjednotky 20S proteasomu. A to právě díky tomu, že tyto inhibitory lze snadno připravit i optimalizovat (Myung *et al.* 2001). Přestože jsou inhibitory tohoto typu schopny vstupovat do buněk, jsou používány pouze v biologických a biochemických studiích, například pro studium role proteasomu v různých buněčných procesech. Jejich terapeutické využití je limitováno nedostatečnou specifitou způsobenou přítomností vysoce reaktivní aldehydové funkční skupiny.

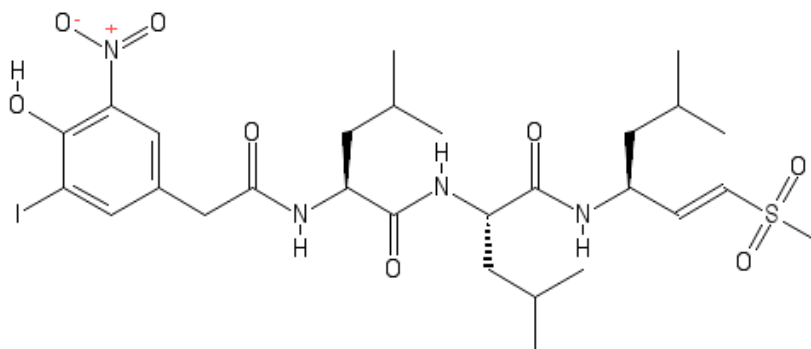


Obrázek 6: Struktura MG-132 jako jednoho ze zástupců peptidových aldehydů

#### 1.1.1.5 Peptidové vinylsulfony

Peptidové vinylsulfony jsou irreverzibilní inhibitory 20S proteasomu zaměřené na aktivní místo modifikací hydroxylové skupiny amino terminálního threoninu. (Myung *et al.* 2001). Tato třída inhibitorů byla opět rozsáhle používána pro biologické studie, nicméně obdobně jako v případě peptidových aldehydů, je terapeutické využití této skupiny limitováno její nedostatečnou specifitou.

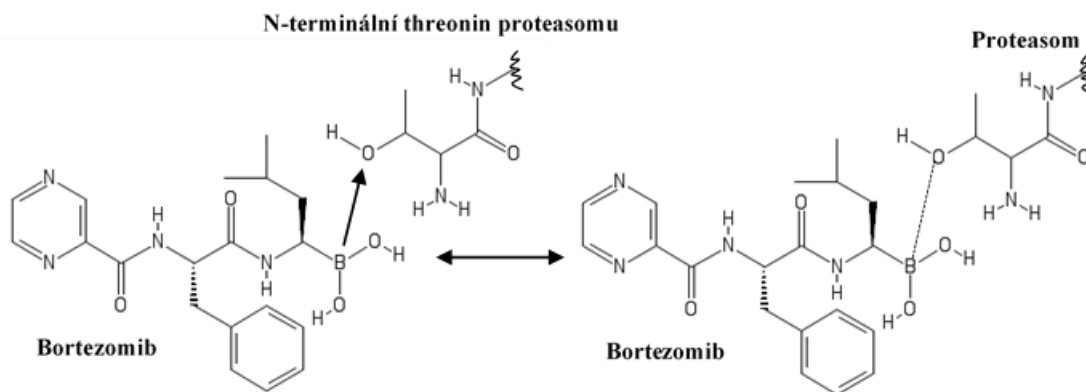
Nízká specifita je způsobena schopností těchto látek inhibovat nejen 20S proteasom, ale také schopností inhibovat cysteinové proteázy za účelem, jejichž inhibice byly původně syntetizovány.



Obrázek 7: struktura inhibitoru NLVS jako jednoho ze zástupců peptidových vinylsulfonů

### 1.1.1.6 Peptidové boronáty

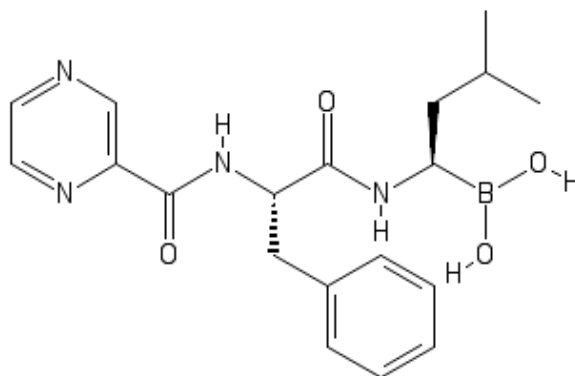
Další zde zmíněná třída inhibitorů založených na bázi peptidů využívá funkční skupinu kyseliny boronové (Myung *et al.* 2001). Peptidové boronáty byly odvozeny od aldehydů pro zvýšení účinnosti, selektivity a stability. Za tímto účelem byla jejich aldehydová skupina nahrazena boronovou skupinou (Chari 2010). Jedná se o mnohem účinnější inhibitory s výrazně pomalejší disociační rychlostí, než mají výše zmíněné peptidové aldehydy (Borissenko a Groll 2007). K inhibici proteasomu v tomto případě dochází pravděpodobně prostřednictvím tvorby nekovalentních komplexů (Myung *et al.* 2001). Komplex je nejspíš tvořen tak, že prázdný p-orbital na atomu boru je umístěn v takové pozici, aby byl schopen přijmout osamocený kyslíkový pár zbytku N-terminálního threoninu 20S proteasomu, čímž vznikne stabilní tetrahedrální meziprodukt (Obrázek 8). Ten umožňuje zkrácení délky peptidového řetězce inhibitoru na bázi kyseliny borité na dipeptid. To poskytuje praktické výhody, zejména ve srovnání s předchozími dvěma třídami, u nichž je zapotřebí pro alespoň mírnou inhibici proteasomální aktivity minimálně tři aminokyselinové řetězce.



Obrázek 8: Vznik tetrahedrálního meziproduktu na příkladu bortezomibu (upraveno podle Myung *et al.* 2001)

Obdobně jako předchozí dvě skupiny také tyto inhibitory se používají v biologických studiích, nicméně díky své biologické dostupnosti a relativní stabilitě za fyziologických podmínek jsou deriváty dipeptidboronátu vhodné pro aplikace *in vivo* (Borissenko a Groll 2007). Navíc se ukázalo, že i když inhibují serinové proteázy, na rozdíl od aldehydů a vinylsulfonů jsou špatnými inhibitory cysteinových proteáz, což z nich činí atraktivní kandidáty pro vývoj léčiv.

Bortezomib (Obrázek 9) byl prvním proteasomálním inhibitorem schváleným FDA v roce 2003 pro léčbu MM, později byl schválen také k léčbě lymfomu z plášťových buněk (Cromm a Crews 2017). Jedná se o reverzibilní dipeptidboronát, jež cílí především na chymotrypsinové podjednotky jak konstitutivního proteasomu tak imunoproteasomu. Inhibice je zprostředkována kovalentní vazbou bortezomibu s  $\beta$ 5-podjednotkou za vzniku tetrahedrálního intermediátu na N-terminálních threoninových zbytcích (Frankland-Searby a Bhaumik 2011). Podstatně nižší je afinita k podjednotce vykazující aktivitu kaspázovou, k poslední podjednotce je jeho inhibiční účinek zanedbatelný (Cromm a Crews 2017). Na jiné buněčné proteasy účinnost prokázána nebyla (Frankland-Searby a Bhaumik 2011).



Obrázek 9: Struktura bortezomibu

Vzhledem k rozsáhlému množství proteinů, které jsou proteasomem degradovány je proteasomální inhibicí ovlivněna celá řada buněčných procesů (Adams 2004). Proto aktivita bortezomibu může u různých rakovin vykazovat různé molekulární mechanismy. Obecně bortezomib inhibuje růst nádoru, selektivně vede k apoptóze, působí na mikroprostředí kostní dřeně, snižuje míru angiogeneze a pomáhá překonat rezistenci ke standardním chemoterapeutikům (Seval a Beksac 2018). Apoptotický účinek bortezomibu byl prokázán na buněčných kulturách hematologických malignit i solidních nádorů. K indukci apoptózy může docházet prostřednictvím stabilizace proapoptotických a antiapoptotických faktorů. Aplikace bortezomibu vede v buňkách k aktivaci kaspázy-3 prostřednictvím kaspázy-8, brání opravám DNA v důsledku štěpení DNA-protein kinázové katalytické podjednotky, nebo ATM. Dále pak aktivuje p53 fosforylací a degradací MDM2 (Hideshima *et al.* 2003) a zároveň vede k nadměrné expresi p53 mRNA (Poulaki *et al.* 2007). Kromě zvýšených intracelulárních hladin proteinu p53 je pozorován také

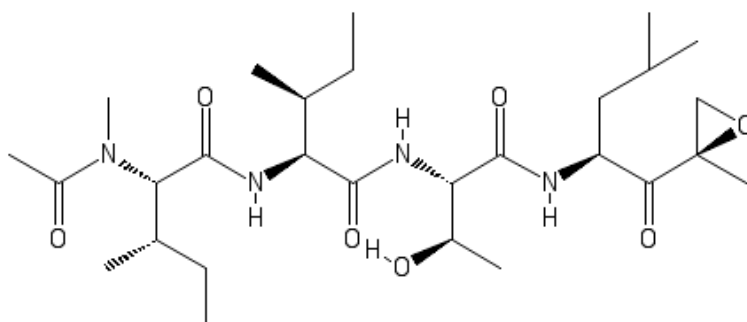
nárůst hladiny proteinu p27 (Robak a Robak 2019). Krom výše zmíněného dochází také k stabilizaci c-myc a k fosforylaci a aktivaci c-jun (Poulaki *et al.* 2007). U solidních nádorů vede bortezomib navíc k apoptóze prostřednictvím TNF, TRAIL-ligandu a nárůstu hladin receptorů smrti (DR) DR4 a DR5. Inhibicí proteasomu dochází také k narušení degradace inhibitoru nukleárního faktoru –  $\kappa$ B, což vede k jeho akumulaci v cytoplazmě buněk, kde blokuje translokaci do jádra a transkripční aktivitu nukleárního faktoru –  $\kappa$ B (Poulaki *et al.* 2007), která by za normálních okolností vedla k aktivaci genové transkripce genů pro růstové faktory, enzymy stresové odpovědi, buněčné adhezni molekuly a inhibitory apoptózy (Adams 2004). Bortezomib cílí na mikroprostředí kostní dřeně inhibicí vazby MM buněk k stromálním buňkám kostní dřeně, která hraje hlavní roli v růstu a přežití nádoru (Shank *et al.* 2015, Seval a Beksac 2018). Mikroprostředí kostní dřeně hraje významnou roli také v indukci angiogenní odpovědi, která bývá léčbou bortezomibem také zasažena (Wang *et al.* 2012). Mezenchymální kmenové buňky totiž mohou produkovat růstové signály, cytokiny a přímo se podílet na novotvorbě krevních cév. Bortezomib blokuje kritické prvky nezbytné pro angiogenezi jako je proliferace, tvorba kapilár a migrace endoteliálních buněk. Zároveň také v závislosti na dávce vede ke snížení hladin mRNA a proteinů proangiogenních faktorů VEGF, HGF a bFGF u mezenchymálních kmenových buněk. V závislosti na koncentraci je také inhibován růst mezenchymálních kmenových buněk. Angiogeneze může být bortezomibem ovlivněna také působením na mikrovesikuly, tedy extracelulární váčky hrajících významnou roli v komunikaci mezi buňkami (Guo *et al.* 2018). Právě tyto váčky pocházející z buněk MM vykazují aktivitu podporující angiogenezi. Pokusy *in vitro* bylo zjištěno, že použitím bortezomibu bylo množství mikrovesikulů pocházejících z MM výrazně zvýšeno, nicméně tyto váčky vykazovaly snížený angiogenní potenciál, obsahovaly méně angiogenních cytokinů jako je VEGF a IL-6. Zároveň bylo pozorováno také snížení exprese VEGF, IL-6, bFGF a snížení aktivity nukleárního faktoru- $\kappa$ B u endoteliálních buněk inkubovaných s mikrovesikuly buněk jež byly bortezomibu exponovány. Nicméně přesný mechanismus působení na angiogenezi prostřednictvím mikrovesikulů zatím nebyl objasněn. Bortezomib také jak přímo, tak nepřímo působí na endoteliální buňky odvozené od pacientů s MM, jež jsou s angiogenezi spojovány (Roccaro *et al.* 2006). Ovlivňuje angiogenezi v proliferaci, chemotaxi, adhezi na fibronectin, tvorbě kapilár a vede k snížené produkci VEGF, IL-6, IGF-I, Ang1, a Ang2, které jsou nezbytné v autokrinní a parakrinní signalizaci pro růst endoteliálních buněk.

Zjištěn byl také velký potenciál v léčbě nádorových onemocnění za užití kombinace bortezomibu s dalšími léčivy, jako jsou například Hsp90 inhibitory, inhibitory histondeacetylázy, Akt inhibitory a lenalidomid, kdy byla prokázána vyšší účinnost léčby, než je tomu v případě užití samotného bortezomibu (Frankland-Searby a Bhaumik 2011). Nevýhodami bortezomibu je, že musí být podáván intravenózně a vykazuje širokou škálu nežádoucích účinků jako je periferní neurofágie, trombocytopenie a gastrointestinální problémy (Cromm a Crews 2017).

### 1.1.1.7 Peptidové epoxyketony

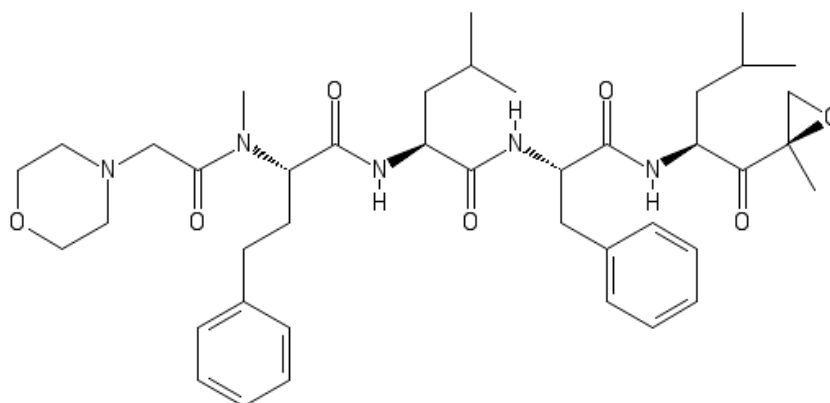
Přestože všechny výše zmíněné skupiny zahrnovaly syntetické inhibitory, ukázalo se, že některé přírodní látky mohou také fungovat jako selektivní a účinné inhibitory proteasomu (Myung *et al.* 2001). Do skupiny peptidových epoxyketonů můžeme řadit jak přírodní sloučeniny, mezi něž patří například epoxomicin, tak sloučeniny syntetické, z nichž je velmi známý například carfilzomib (Moreau *et al.* 2012). Epoxyketony se ireverzibilně váží na N-terminální threonin, kde mohou ve srovnání s reverzibilními boronáty prodloužit dobu inhibice (Manasanch a Orłowski 2017)

Epoxomicin (Obrázek 10), jakožto hlavní člen této skupiny získaný z blíže nespecifikované aktinomycéty, patří mezi lineární peptidové epoxyketony (Kim a Crews 2013). Nicméně ani jeho slibná protinádorová aktivita nevedla k jeho zařazení mezi potenciální léčiva. Pravděpodobně díky jeho nevhodným vlastnostem, jako je základní peptidová struktura a přítomnost labilního epoxyketonového farmakoforu.



Obrázek 10: struktura epoxomicinu

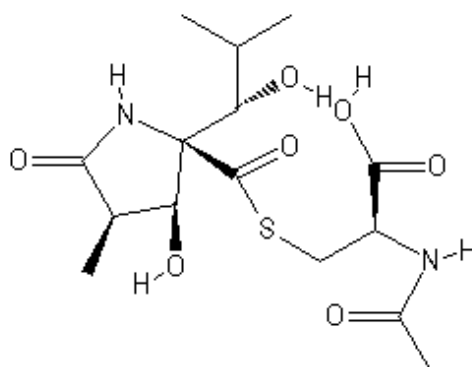
Přestože se epoxomicin pro léčebné účely nepoužívá, neplatí to o jeho derivátech. Carfilzomib (Obrázek 11) byl FDA schválen v červenci 2012 pro léčbu pacientů s relabujícím/refraktorním MM, u kterých docházelo k progresi onemocnění po léčbě bortezomibem kombinované s imunomodulační léčbou (Pautasso *et al.* 2013). Jedná se o tetrapeptidový epoxyketonový derivát epoxomicinu, jež byl identifikován díky jeho *in vitro* protinádorové aktivitě. S proteasomem vytváří stabilní a ireverzibilní komplexy (Pautasso *et al.* 2013), které však nevytváří s jinými proteasami (Kortuem a Stewart 2013). Po použití této látky dochází primárně k selektivní inhibici  $\beta 5$ -podjednotky konstitutivního proteasomu a  $\beta 5i$  podjednotky immunoproteasomu (Groen *et al.* 2019), nicméně ve vysokých dávkách vede také k inhibici na podjednotce trypsinové a kaspázové (Pautasso *et al.* 2013).



Obrázek 11: Struktura carfilzomibu

### 1.1.1.8 $\beta$ -laktony

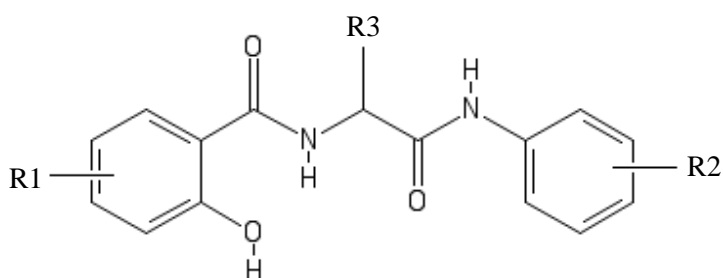
Další skupinou, do níž jsou řazeny přírodní proteasomální inhibitory jsou  $\beta$ -laktony. Prvním členem této skupiny je lactacystin (Obrázek 12) produkovaný bakteriemi rodu *Streptomyces* (Chari 2010). Lactacystin je ireverzibilní inhibitor tvořený nepeptidovým skeletem sestávajícím ze dvou  $\alpha$ -aminokyselin, N-acetylcysteinu a derivátu kyseliny pyroglutamové (Ůmura a Crump 2019). Jeho působením dochází ke kovalentní modifikaci amino-konce threoninů všech tří katalytických  $\beta$ -podjednotek. Nejvyšší afinitu má k  $\beta_5$  podjednotce, zbývající dvě podjednotky jsou také blokovány, ale v menší míře (Borissenko a Groll 2007). K modifikaci dochází díky spontánní laktonizaci mezi thioesterem lactacystinu a hydroxylovou skupinou na C6 uhlíku, což vede ke vzniku velmi reaktivního omuralidu (Ůmura a Crump 2019). Ten pak tvoří esterově vázaný adukt s aminokoncovým threoninem  $\beta_5$ -podjednotky savčího 20S proteasomu. Prostřednictvím kovalentní vazby omuralid inhibuje všechny tři proteolytické aktivity 20S proteasomu. Lactacystin je skrze jeho působení přes omuralid vysoce specifický pro proteasom a neinhibuje serinové ani cysteinové proteasy či lysozomální degradaci proteinů.



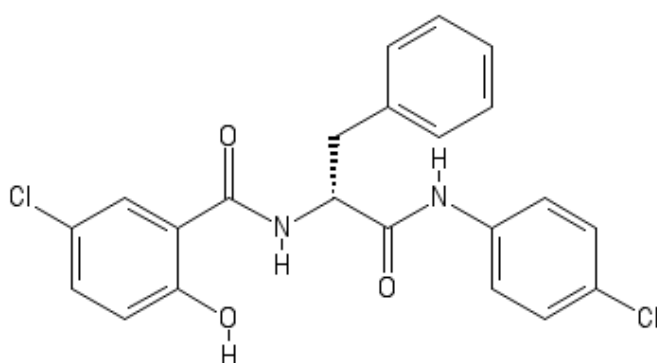
Obrázek 12: Struktura lactacystinu

### 3.3.2 Vývoj inhibitorů použitých v experimentální části

V experimentální části byly použity látky, u nichž se při vývoji vycházelo ze studia antiproliferativních a proapoptotických vlastností různě substituovaných 2-hydroxy-N-(arylalkyl)benzamidů (Imramovský *et al.* 2013). Na základě stanovení cytotoxicity byly vybrány nejúčinnější látky, jejichž hodnoty  $IC_{50}$  se na vybraných buněčných liniích pohybovaly v jednotkách mikromolů. Ve všech případech se jednalo o diamidy substituované chlorem na čtvrté nebo páté pozici salicylové skupiny (R1 substituent), lišící se v substituentech R2 a R3 (Obrázek 13). Část z těchto pěti látek vykazovala také silnou schopnost aktivovat kaspázy 3 a 7, což jejich proapoptotické vlastnosti potvrdilo. Nejúčinnější látka této série (**a**), (Obrázek 14) byla dále testována, přičemž byl zjištěn její inhibiční účinek na replikaci DNA, a to bez vlivu na expresi proteinů regulujících buněčný cyklus, vyjma p27<sup>KIP1</sup>, jež byl nadměrně exprimován při 670 nM koncentraci. Zároveň tato látka vedla kromě aktivace apoptózy také k aktivaci autofagie. Také bylo pozorováno snížení exprese nádorového supresoru p53.



Obrázek 13: obecná struktura nejúčinnějších látek série

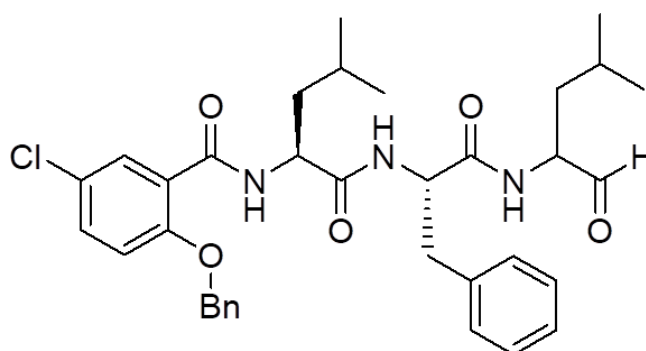


Obrázek 14: Nejúčinnější látka série a

Tyto 2-hydroxy-N-(arylalkyl)benzamidů byly v další práci modifikovány (Jorda *et al.* 2017). Tak byla připravena knihovna látek tvořených krátkou dipeptidovou či tripeptidovou kostrou, tvořenou leuciny, fenylalaniny nebo jejich kombinací. Tato kostra nesla na N-konci



kyselinu O-benzylsalicylovou a na C-konci různé funkční skupiny jako jsou estery, Weinreb amidy a aldehydy. Série obsahovala také deriváty s nemodifikovaným N-koncem. Antiproliferační vlastnosti nových látek byly testovány na několika buněčných liniích odvozených od hematopoetických malignit (K562, CEM, U266), přičemž jejich cytotoxická účinnost se pohybovala v rozmezí od vysokých mikromolárních hodnot až po hodnoty submikromolární. Jako nejúčinnější se ukázaly tripeptidové deriváty s aldehydovou funkční skupinou v kombinaci s nemodifikovaným N-koncem. Délka polypeptidového řetězce se ukázala jako významný prvek ovlivňující aktivitu látky v buňce. Zjištěno bylo také, že salicylamidy, které nesly fenylalanin vedle aldehydové skupiny, dosahovaly lepších hodnot, než ty co v této pozici nesly L-leucin. Obdobný trend byl patrný taky pro některé nemodifikované salicylamidy. Kromě antiproliferační aktivity byla u těchto látek pozorována také aktivita antiproteasomální. Nejúčinnější látky byly testovány pro jejich potenciální inhibiční aktivitu vůči proteasomu. Z nich všechny více účinně inhibovaly podjednotku s chymotrypsinovou aktivitou, kde se jejich hodnoty  $IC_{50}$  pohybovaly v nanomolárních koncentracích. Opět dosahovaly lepších výsledků látky nesoucí fenylalanin vedle aldehydové skupiny ve srovnání s těmi, co v této pozici nesly L-leucin. U všech těchto látek byla nalezena silná korelace mezi antiproliferativními účinky a schopností inhibovat proteasom. Inhibiční účinek na proteasom byl ověřen také v buňkách exprimujících zelený fluorescenční protein modifikovaný sekvencí, která vede k jeho rychlé proteasomálně-závislé degradaci. Zároveň u nejúčinnější látky, **5815**, (Obrázek 15) byla potvrzena akumulace polyubiquitinylovaných proteinů v závislosti na dávce v buňkách MM. Nejúčinnější látka této série, **5815**, byla použita v experimentální části. Na základě analýzy vztahů mezi strukturou těchto látek a jejich biologickou aktivitou byly navrženy další deriváty (V. Kryštof, nepublikované výsledky), z nichž látky **7359**, **7357** byly studovány v této diplomové práci.



Obrázek 15: struktura látky 5815

Látky **7359** a **7357** byly získány modifikací **5815** na N konci, a to kyselinou salicylovou, a C konce byly modifikovány aromatickými aminy obsahujícími donory elektronů, akceptory elektronů nebo alicyklickými či heterocyklickými aminy (Jorda *et al.* 2020). Přestože tyto sloučeniny vykazují antiproliferativní účinky, mechanismus jejich účinku, na rozdíl od výchozích sloučenin, pravděpodobně nespočívá primárně v inhibici proteasomu.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Materiál a metody

#### 4.1.1 Přístroje

Laminární box TC48 (Gelaire), invertovaný mikroskop Nikon TMS (Nikon), CO<sub>2</sub> inkubátor (Sanyo), Centrifuga 5702 (Ependorf), centrifuga BR4i (Jouan), centrifuga Heareus Megafuge16R (Thermo Scientific), třepačka Heidolph REAX top (Heidolph), MINI digitální třepačka s kývavým pohybem typ MR-1 (BioSan), vodní lázeň, UV-VIS spektrofotometr UV-1800 (Shimadzu), aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad), zdroj pro elektroforézu EC 105 (E-C Aparatus Corporation), blotovací aparatura Mini Trans-Blot Cell (BioRad), ultrazvukový homogenizátor Sonoplus HD2200 (Bandelin), chemiluminiscenční kamera LAS4000 (FujiFilm), mikrodestičkový fluorimetr Fluoroskan Ascent (Thermo Labssystem), automatický mikroskop Lionheart FX (BioTek), analytické váhy ABT 120 - 5DM (Kern), pH metr pH 50 (XS instruments), termoblok, mikrodestičkový fluorimetr Tecan infinite 200 pro (Life Sciences)

#### 4.1.2 Chemikálie

Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), fetální bovinní sérum, streptomycin, L-glutamin, penicilin, streptomycin, geneticin, ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), trypsin, digitonin, dimethylsulfoxid, aprotinin, leupeptin, dithiothreitol (DTT), fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF), bromfenolová modř, glycin, akrylamid, N,N'-metylenbisakrylamid, tetramethylethylendiamin (TEMED), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES), ethylenglykoltetraoctová kyselina (EGTA), nonidet P40, Coomassie brilliant blue, peroxidisíran amonný (APS), vanadičnan trisodný, fluorid sodný, hovězí sérový albumin (BSA), 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát hydrát (CHAPS) (Sigma Aldrich). Dále bylo použito fetální bovinní sérum, médium RPMI 1640 od firmy Biowest, 2-merkapt ethanol, ponceau S (Serva), dodecylsírán sodný (SDS), glycerol, kyselina chlorovodíková, kyselina trihydrogenfosforečná (Lach-Ner), chlorid sodný, chlorid draselný, dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, ethanol, kyselina octová, hydroxid draselný (Penta), dihydrogenfosforečnan draselný (Chemapol Tween 20, tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), 1,4-Piperazindiethansulfonová kyselina (PIPES) (MP Biomedicals); chlorid hořečnatý (Erba Lachema). Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp7-amido-4-methylkumarin (Ac-DEVD-AMC), N-Succinyl-

Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4-methylkumarin (N-Suc-LLVY-AMC), Benzoyl-Val-Gly-Arg-(7-amido-4-methylkumarin) (Bz-VGR-AMC), Z-Leu-Leu-Glu-7-amido-4-methylkumarin (Z-LLE-AMC), Z-Gly-Gly-Arg-(7-amido-4-methylkumarin) (Z-GGR-AMC) a inhibitor kaspáz N-acetyl-L- $\alpha$ -aspartyl-L- $\alpha$ -glutamyl-N-(2-carboxyl-1-formylethyl)-L-valinamid (Ac-DEVD-CHO) (Enzo Life Science); luminol a peroxid (Thermo Scientific).

### 4.1.3 Roztoky

Blokovací roztok: 4% BSA v TBS s 0,1% Tween 20;

Blotovací pufr: 25 mM Tris, 192 mM glycin;

Bradfordovo činidlo: 0,01% Coomassie brilliant blue, 95% ethanol, 85% kyselina fosforečná;

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

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,4 – 7,5);

Ponceau S: 0,2% ponceau S v 1% kyselině octové;

Reakční pufr pro fluorimetrické stanovení aktivity kaspázy 3/7: 25 mM PIPES/KOH (pH 7,3), 2 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, před použitím přidán: 5 mM DTT, 100 mM PMSF;

Reakční pufr A pro stanovení aktivity proteasomu: 20 mM HEPES (pH 8,2), 0,5 mM EDTA, 0,05 % SDS;

Reakční pufr B pro stanovení aktivity proteasomu: 10 mM Tris-HCl pH (7,8), 0,5 mM DTT, 5 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, před použitím přidáno: 5 mM ATP;

Reakční pufr C pro stanovení aktivity proteasomu: 50 mM Tris (pH 7,4), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, před použitím přidán: 0,2 mg/mL digitonin;

Reakční pufr D pro stanovení aktivity proteasomu: 10 mM Tris-HCl pH (7,8), 5 mM MgCl<sub>2</sub>;

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

Lyzační pufr: 10 mM HEPES (pH 7,4), 5 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,5% nonidet P40, před použitím přidán 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM NaF;

Vzorkovací pufr SDS (5x) 0,3 M TRIS pH = 6,8, 50 % glycerol, 10 % SDS, 0,05 % bromfenolová modř, 5 % 2-merkaptoethanol.

#### 4.1.4 Protilátky

Pro imunodetekci vybraných proteinů byly použity tyto protilátky: anti-PARP (Cell Signaling); anti-p27 a anti- $\beta$ -aktin (Santa Cruz Biotechnology); anti-ubikvitin (Dako Cytomation) a anti- $\alpha$ -tubulin (Sigma Aldrich). Tyto protilátky byly detekovány pomocí sekundárních protilátek značených křenuvou peroxidázou (Sigma Aldrich): RAM/Px (rabbit anti-mouse), SWAR/Px (swine anti-rabbit).

#### 4.1.5 Testované látky

V experimentální části byly jako standardy použity bortezomib a carfilzomib, jež byly rozpuštěny v DMSO na koncentraci 2,6 mM v případě bortezomibu a na 1 mM v případě carfilzomibu. Tyto roztoky byly jako zásobní uchovány při -20 °C. Dále byly použity látky **5815**, **7357**, **7359**. Tyto byly syntetizovány na Ústavu organické chemie a technologie Chemicko-technologické fakulty Univerzity Pardubice (doc. Ing. Aleš Imramovský, Ph.D.). Z těchto látek byly rozpuštěním v DMSO připraveny zásobní roztoky o koncentraci 100 mM. Takto připravené sloučeniny byly uchovávány při 4 °C. Ředění standardů i testovaných látek na požadované koncentrace probíhalo těsně před použitím.

#### 4.1.6 Kultivace a použité buněčné linie

Pro experimentální část práce byly použity buněčné linie U2OS, U2OS-PI-GFP a U266. Linie U2OS je adherentní linie odvozena z lidské kostní tkáně osteosarkomu. Buněčná linie U2OS-PI-GFP stabilně produkuje zelený fluorescenční protein (GFP) fúzovaný s krátkým degronem, jenž je za normálních okolností proteasomem rychle degradován. Linie U266 je odvozená od mnohočetného myelomu.

Kultivace všech buněčných linií probíhala na Petriho miskách v 10 ml kultivačního média při 37 °C v atmosféře s 5 % oxidu uhličitého. Pasážování buněčných linií U2OS a U2OS-PI-GFP probíhalo každé 2-3 dny v závislosti na jejich množství, tak aby nebyl povrch kultivační misky pokryt na 100%, což by vedlo k odlepování buněk ode dna kultivační nádoby a jejich možnému odumírání. Linie U266 byla pasážována v závislosti na množství buněk přítomných v kultivačním médiu. Při samotné pasáži bylo nejdříve odstraněno stávající médium a buňky byly opláchnuty EDTA, po jejímž odstranění byl přidán roztok trypsinu v EDTA, jež slouží k uvolnění buněk ze dna misky. Následovala krátká inkubace při 7°C. Po uvolnění buněk ze dna misky bylo štěpení zastaveno přidávkem kultivačního média. Pro odstranění média s přidávkem trypsinu a EDTA byla vzniklá suspenze centrifugována po dobu 5 minut při 1000 g. Vzniklý supernatant byl odstraněn a buňky byly resuspendovány v čerstvém kultivačním médiu. Následně mohly být buď rozděleny

na nové kultivační misky a doplněny do příslušného objemu, nebo byl stanoven jejich počet pomocí Bürkerovy komůrky a buňky byly nasazeny v požadovaném počtu na příslušný experiment.

Linie U2OS byla kultivována v médiu DMEM s přidavkem fetálního bovinního séra (10%, Biowest), streptomycinu (0,1 mg/ml) a L-glutaminu (0,3 mg/ml). Buněčná linie U2OS-PI-GFP byla kultivována v médiu DMEM s přidavkem fetálního bovinního séra (10%, Sigma-Aldrich), streptomycinu (0,1 mg/ml), L-glutaminu (0,3 mg/ml) a geneticinu G418 (350 $\mu$ g/ml). Buněčná linie U266 byla kultivována v médiu RPMI 1640 s přidavkem fetálního bovinního séra (10%, Biowest), streptomycinu (0,1 mg/ml) a L-glutaminu (0,3 mg/ml).

#### **4.1.7 Stanovení aktivity proteasomálních podjednotek**

Stanovení aktivity proteasomálních podjednotek bylo prováděno v buněčných liniích U2OS a U266, kdy z důvodu odlišných vlastností těchto linií bylo nutno postupy mírně upravit. V případě linie U2OS bylo do jednotlivých jamek 96jamkové mikrotitrační destičky nanášeno 20 000 buněk v 80  $\mu$ l kultivačního média. Následovala 24hodinová inkubace. Při použití buněčné linie U266 bylo do jedné jamky aplikováno 100 000 buněk v 80  $\mu$ l kultivačního média a inkubace probíhala pouze 1 hodinu. Po tomto čase bylo v obou případech do jednotlivých jamek přidáno 20  $\mu$ l roztoku testované sloučeniny nebo média s odpovídajícím množstvím DMSO (negativní kontrola). Po 1 hodině bylo médium odstraněno a buňky byly promyty PBS. Po odstranění PBS bylo k buňkám přidáno 100  $\mu$ l vychlazeného reakčního pufru (A/B/C/D) obsahujícího příslušný substrát v koncentraci 50  $\mu$ M. V případě linie U266 každé výměně média předcházela centrifugace (1000 g, 4 $^{\circ}$ C, 5 minut). Po přidání pufru se substráty následovala hodinová inkubace při 37  $^{\circ}$ C, po níž následovalo měření při 37  $^{\circ}$ C v hodinovém intervalu po dobu 17 hodin na mikrodestičkovém fluorimetru Tecan infinite 200 pro, při 355 nm/460 nm (excitační/emisní vlnová délka).

#### **4.1.8 Fluorescenční vizualizace inhibice proteasomu**

Vliv studovaných sloučenin na aktivitu proteasomu byl sledován také v buněčné linii U2OS-PI-GP, exprimující GFP fúzovaný s degronem. Buňky byly ovlivňovány v 96jamkové mikrotitrační destičce, kdy do jedné jamky bylo nanášeno 4000 buněk v 80  $\mu$ l média. Po 48hodinové inkubaci bylo k buňkám přidáno 20  $\mu$ l média s testovanou sloučeninou v koncentrační řadě 10  $\mu$ M-5  $\mu$ M - 2,5  $\mu$ M-1,25  $\mu$ M- 0,625. Následně byla mikrotitrační deska s buňkami přenesena do automatizovaného mikroskopu Lionheart FX, v němž byla teplota nastavena na 37  $^{\circ}$ C a v atmosféře bylo 5 % oxidu uhličitého. Po uplynutí hodinové inkubační doby bylo zahájeno měření, které se opakovalo v hodinových intervalech po dobu 48 hodin.

#### 4.1.9 SDS-PAGE, Westernblotting s následnou imunodetekcí

Pro tento typ experimentů byly buňky U266 vysazeny na Petriho misku v počtu 4 milióny v 10 ml kultivačního média. Po hodině byly do média přidány testované látky v požadované koncentraci. Ke kontrolním buňkám bylo přidáno odpovídající množství DMSO. Takto ovlivněné buňky byly inkubovány při 37 °C v atmosféře s 5% CO<sub>2</sub> po dobu 24 hodin.

Následovalo sklízení buněk, probíhající na ledu z důvodu zamezení degradace proteinů. Buňky byly ze dna misek mechanicky seškrábány a centrifugovány při 4 °C a 1000 g po dobu 8 minut. Následně byly buňky 2x promyty roztokem PBS. Po odstranění promývacího roztoku byly pelety buněk uskladněny při – 80 °C.

V dalším kroku byly buněčné pelety resuspendovány v lyzačním pufru, přičemž samotná lyzace probíhala na ledu po dobu 30 minut za občasného promíchání. Následovala sonikace pomocí ultrazvukového homogenizátoru. Poté byly vzorky centrifugovány po dobu 30 minut při 4 °C a 14000 g. Následně bylo metodou Bradfordové stanoveno množství proteinů, přítomných v supernatantu. Koncentrace proteinů v příslušných vzorcích byly přidáním lyzačního pufru upraveny na stejnou hodnotu. Po tomto kroku bylo odebráno příslušné množství vzorku pro fluorometrický test aktivity kaspázy 3 a 7, tyto alikvoty byly uskladněny při -20 °C. Ke zbývajícím vzorkům pro elektroforézu byl přidán vzorkovací SDS pufr a denaturace proteinů byla dokončena zahřátím na 95 °C po dobu 5 minut. Takto připravené vzorky byly uchovávány při teplotě -20 °C.

Pro separaci proteinů byla použita metoda SDS-PAGE v 5% zaostřovacím gelu v kombinaci s 10% nebo 12,5% dělicím gelem. Samotná separace proteinů probíhala při napětí 80 V, dokud nedošlo k přechodu proteinů do dělicího gelu, následně bylo napětí zvýšeno na 120 V. Po dokončení dělicího procesu byly proteiny přeneseny na nitrocelulóзовou membránu metodou westernblottingu, který probíhal po dobu 3 hodin při 270 mA za stálého chlazení ledem.

Membrány, či jejich části obsahující zájmové proteiny, byly inkubovány 1 hodinu při pokojové teplotě v roztoku 4% BSA v TBS s 0,1% TWEEN 20, pro zabránění vzniku nespecifických vazeb. Poté byla nanесena specifická primární protilátka. Inkubace s touto protilátkou probíhala přes noc při 4 °C. Další den byly membrány promyty roztoky TBS a TBS s 0,1% TWEEN 20. Následovalo nanесení sekundární protilátky značené křenovou peroxidázou, s touto protilátkou probíhala inkubace 1 hodinu při pokojové teplotě. Po inkubaci následovalo opět promytí roztoky TBS a TBS s 0,1% TWEEN 20. Finální vizualizace proběhla pomocí detekčních reagensů ECL (peroxid, luminol). Luminiscence byla zaznamenávána kamerou LAS4000.

#### 4.1.10 Fluorimetrické stanovení aktivity kaspáz 3/7

Pro fluorimetrický test aktivity kaspáz 3/7 byly použity lyzáty získané odebráním části vzorku před přidáním vzorkovacího elektroforetického pufru při přípravě vzorků pro SDS-PAGE s westernblottingem a následnou imunodetekcí. Pro tento experiment byla použita bílá 96jamková mikrotitrační deska. Do každé jamky bylo nanášeno 5  $\mu$ l vzorku obsahujícího 15  $\mu$ g proteinů, k nimž bylo přidáno 100  $\mu$ l reakčního pufru obsahujícího substrát Ac-DEVD-AMC ve 100  $\mu$ M koncentraci. Následovala inkubace 6 hodin ve tmě při pokojové teplotě, po níž probíhalo měření fluorescence na přístroji Fluoroskan Ascent při 346/442 nm (excitační/emisní vlnová délka). Souběžně byla měřena také autolýza substrátu (pozadí) a negativní kontrola, do které byl přidán inhibitor kaspáz Ac-DEVD-CHO.

## 4.2 Výsledky

### 4.2.1 Optimalizace měření aktivity podjednotek proteasomu

Měření aktivity proteasomu v buňkách se provádí za užití fluorogenních substrátů, které jsou specificky štěpeny a produkty mají výrazně vyšší fluorescenci. Optimalizace metody pro měření aktivity jednotlivých podjednotek proteasomu vykazujících různý typ aktivity vycházela z publikovaného protokolu (Jorda *et al.* 2017). V něm je popsáno měření aktivity v suspenzní buněčné linii U266 za použití pufru A (20 mM HEPES (pH 8,2), 0,5 mM EDTA, 0,05 % SDS) pro měření chymotrypsinové a kaspázové aktivity, nebo pufru B (10 mM Tris-HCl pH (7,8), 0,5 mM DTT, 5 mM ATP, 5 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) pro aktivitu trypsinovou. Používány byly také tři různé druhy substrátu (N-Suc-LLVY-AMC pro chymotrypsinovou, Bz-VGR-AMC pro trypsinovou a Z-LLE-AMC pro kaspázovou aktivitu).

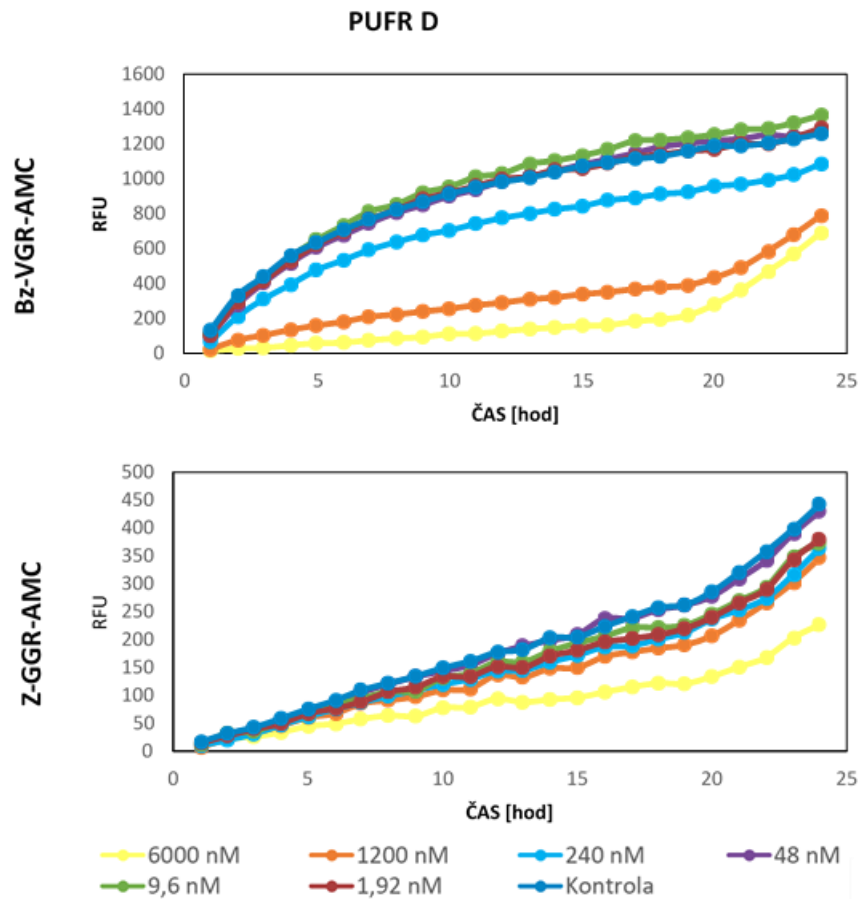
Pro použití této metody na adherentní buněčné linii U2OS bylo tedy nutné ji optimalizovat. Cílem bylo vybrat jeden pufr, ve kterém by za optimálních podmínek bylo možno měřit všechny tři typy proteasomálních aktivit. V průběhu optimalizace byly výše zmíněné pufrы A a B doplněny o pufrы C a D. Pufr C vychází ze článku Yoshida *et al.* 2018 a jedná se o 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mg/mL digitonin. Pufr D byl odvozen na základě složení předchozích pufrů a jeho výsledné složení bylo 50 mM Tris-HCl (pH 8,2); 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Tyto pufrы byly použity v kombinaci se čtyřmi typy substrátů: N-Suc-LLVY-AMC pro chymotrypsinovou, Z-LLE-AMC pro kaspázovou, Bz-VGR-AMC a Z-GGR-AMC pro trypsinovou aktivitu.

Během optimalizace byla sledována závislost signálu na počtu buněk a na použitém pufru. Mikroskopickým pozorováním bylo již po 24-hodinové preinkubaci zjištěno, že v jamkách

obsahujících 50 000 a 25 000 buněk dochází ke 100% pokrytí dna jamky a k uvolňování buněk ze dna, což by mohlo negativně ovlivnit výsledky měření. Proto byly následující experimenty prováděny s 20 000 buňkami.

V rámci optimalizace byl vybrán optimální poměr buněk (20 000/jamka) pro dosažení co nejvyšší odezvy detektoru, a zároveň aby nedocházelo během experimentu k přerůstání buněk. Vyzkoušeny byly čtyři různé pufrů v kombinaci se čtyřmi substráty pro tři různé proteasomální aktivity. Chymotrypsinovou a kaspázovou aktivitu bylo možno měřit v pufrů A, C a D, kde byla ve všech případech dobře patrná závislost mezi koncentrací bortezomibu a intenzitou fluorescenčního signálu. Trypsinová aktivita byla měřitelná v pufrů C a D, přičemž lepší odezvy bylo dosaženo za použití substrátu Bz-VGR-AMC. Závislost aktivity proteasomálních podjednotek na délce inkubace se substrátem, za použití pufru D, po ovlivnění buněk bortezomibem či carfilzomibem, je patrná na obrázcích 16 a 17. V pufru B jsme nebyli schopni měřit ani jednu z proteasomálních aktivit. Veškeré následující experimenty byly z tohoto důvodu prováděny s 20 000 buňkami U2OS na jamku 96jamkové mikrotitrační destičky. Použitým pufrů byl pufr D v kombinaci se substráty N-Suc-LLVY-AMC, Bz-VGR-AMC, Z-LLE-AMC.





Obrázek 16: Závislost aktivity jednotlivých proteasomálních podjednotek na délce inkubace lyzátu se substráty. Buňky U2OS (20 000 buněk na jamku) byly ovlivněny carfilzomibem a lyzovány v reakčním pufru D. Aktivita měřena pomocí substrátů pro trypsinovou aktivitu Bz-VGR-AMC a Z-GGR-AMC

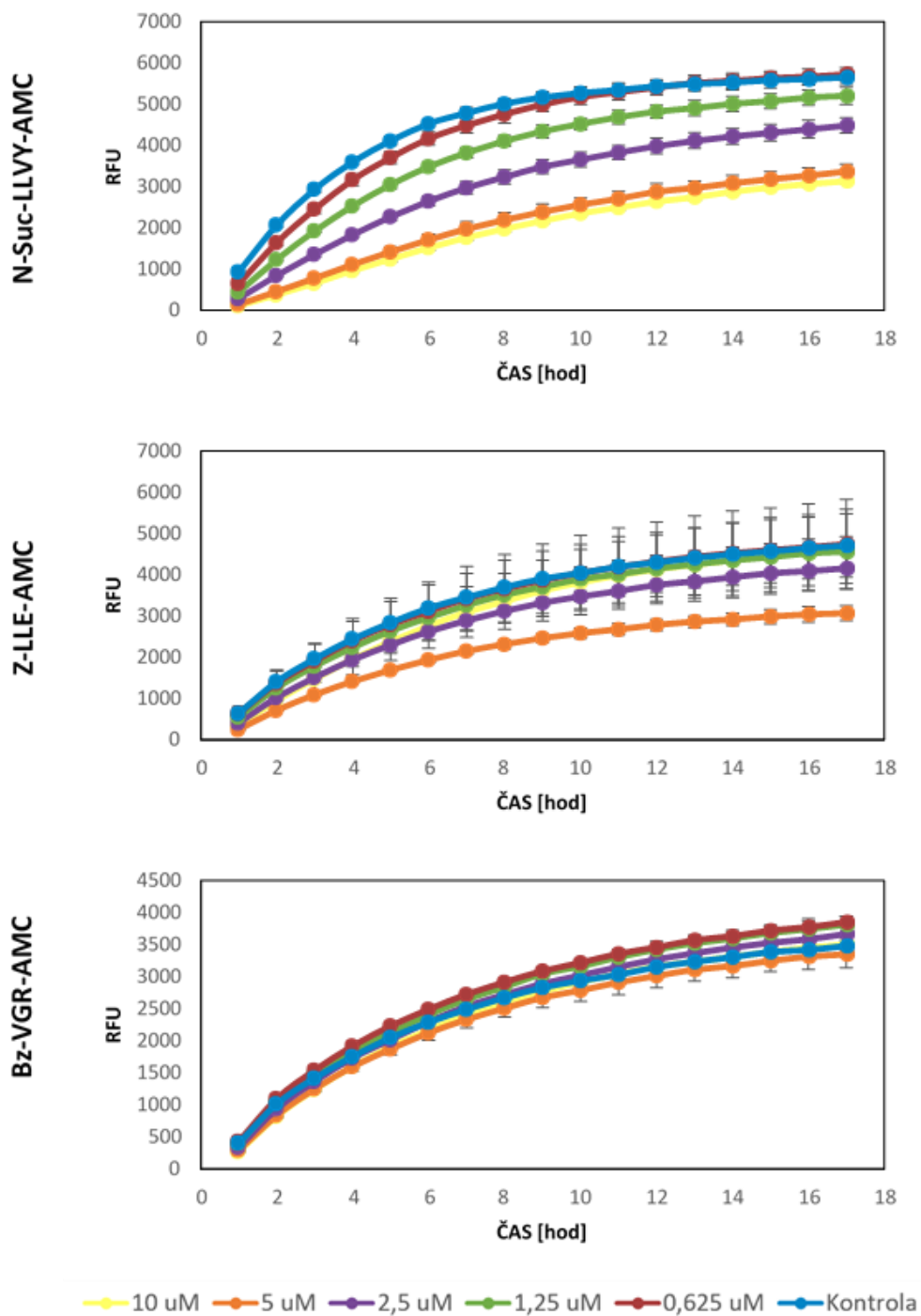


## 4.2.2 Vliv testovaných látek na aktivity jednotlivých podjednotek proteasomu v buněčné linii U2OS

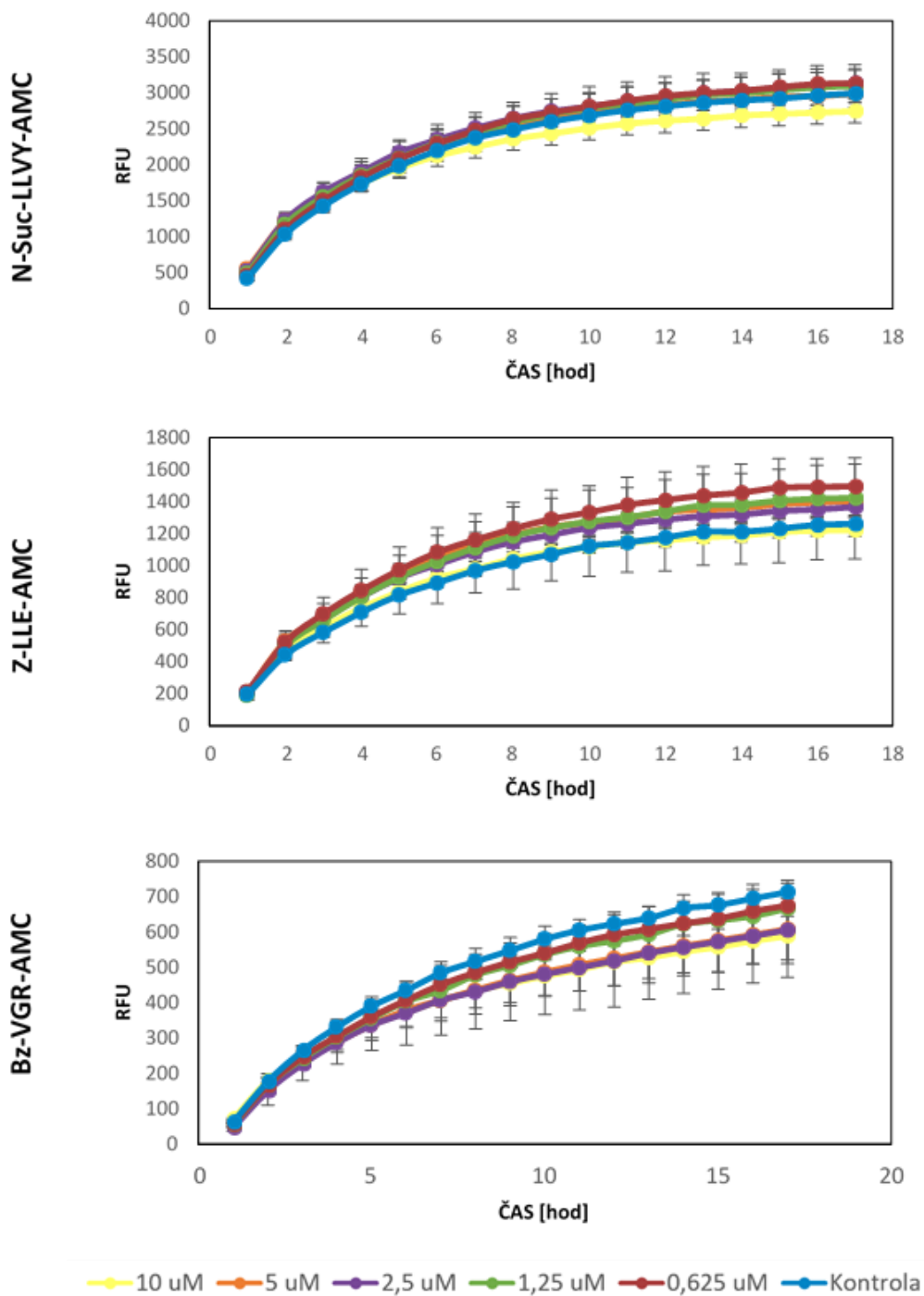
Látky byly testovány v koncentračních řadách sestávajících z 5 koncentrací (10  $\mu\text{M}$ ; 5  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$ ; 1,25  $\mu\text{M}$  a 0,625  $\mu\text{M}$ ) a kontrolních buněk, neovlivněných přítomností látky. Studované látky byly pro větší přesnost měření testovány v triplikátu, z nichž byly následně vytvořeny průměrné hodnoty vynesené do grafů. Změřené hodnoty, po tříhodinové inkubaci, jelikož v některých uspořádáních docházelo již po tomto čase k zakřivení naznačujícím možnou saturaci, byly následně převedeny na procentuální aktivitu příslušných proteasomálních podjednotek a z těchto hodnot byly sestaveny grafy pro odečtení hodnoty  $\text{IC}_{50}$ . Po aplikaci látky **5815** za užití substrátu pro chymotrypsinovou aktivitu je velmi dobře patrná závislost mezi koncentrací látky a fluorescencí odpovídající aktivitě této podjednotky (obrázek 18). Hodnota  $\text{IC}_{50}$  pro tuto aktivitu byla stanovena na 2,082  $\mu\text{M}$  (obrázek 21, tabulka 2). Na kaspázovou podjednotku je patrný inhibiční vliv především koncentrace 5  $\mu\text{M}$ , mírný vliv má také koncentrace 2,5  $\mu\text{M}$ . Paradoxně vliv nejvyšší testované koncentrace zde patrný není, tento fakt byl nejspíš zapříčiněn experimentální chybou. Na trypsinovou podjednotku se tato látka v testovaných koncentracích jeví jako téměř neúčinná, hodnoty  $\text{IC}_{50}$  jsou v tomto případě vyšší než 10  $\mu\text{M}$ .

Po aplikaci látky **7357** byly všechny naměřené hodnoty velmi blízko k hodnotám kontroly, z čehož je patrné, že tato látka v testovaných koncentracích nevykazuje žádný inhibiční efekt ani na jednu z proteasomálních podjednotek (obrázek 19). Z toho důvodu nebylo možno ani pro jednu podjednotku stanovit hodnotu  $\text{IC}_{50}$ .

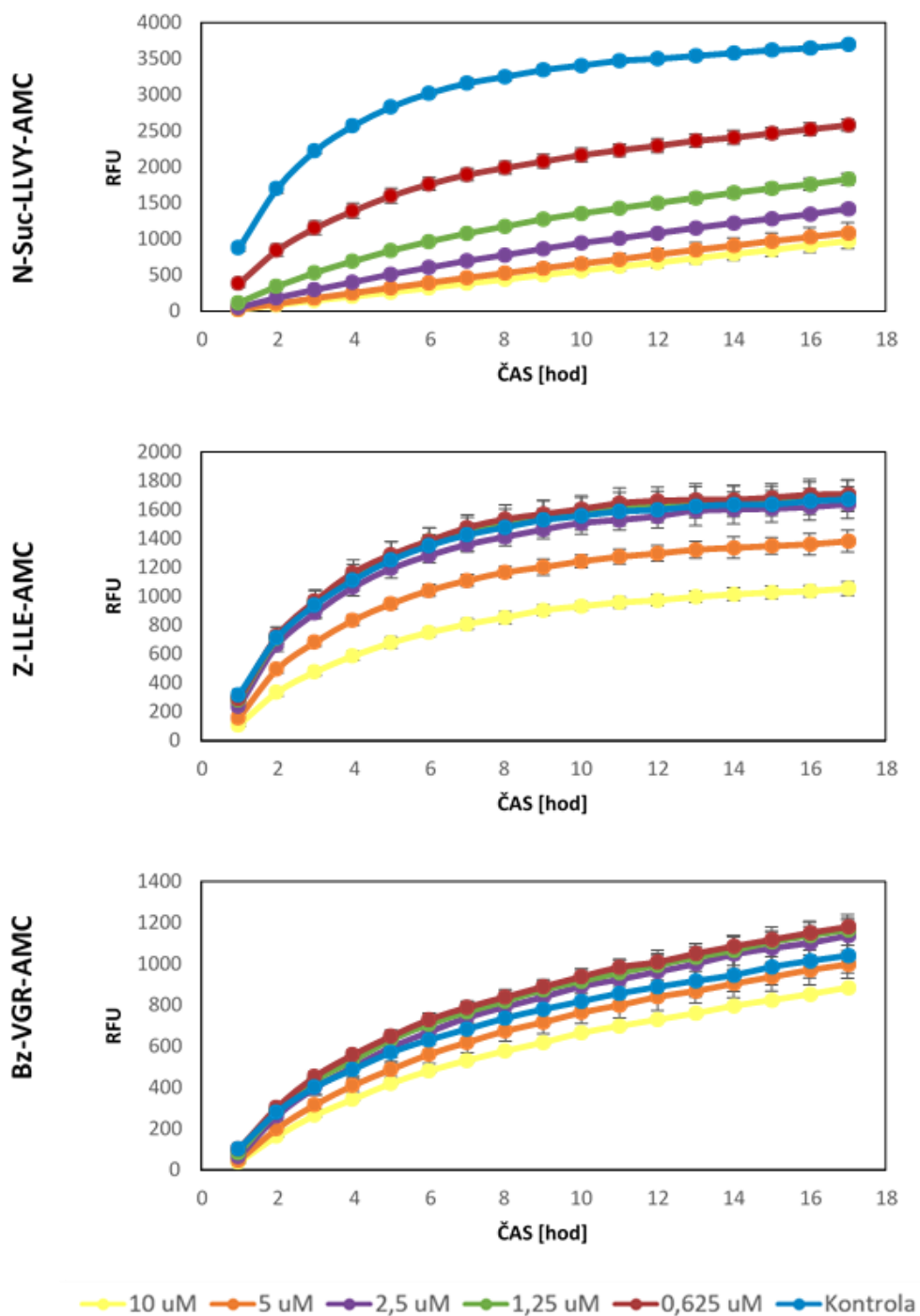
Aplikací látky **7359** na buněčnou kulturu byly zjištěny výrazné inhibiční účinky na chymotrypsinovou podjednotku proteasomu, které byly patrné již u nejnižší z testovaných koncentrací (0,625  $\mu\text{M}$ ), (obrázek 20). Hodnota  $\text{IC}_{50}$  byla v tomto případě stanovena na 0,649  $\mu\text{M}$  (obrázek 21, tabulka 2). Koncentrační závislost mezi přidanou látkou a mírou inhibice byla patrná také u kaspázové podjednotky. V tomto případě se ale jednalo pouze o dvě nejvyšší z testovaných koncentrací (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ). Přesto, že nebylo možno stanovit přesnou hodnotu  $\text{IC}_{50}$ , získané výsledky naznačují, že by měly být jen mírně vyšší, než byla nejvyšší testovaná koncentrace. V posledním grafu je vidět vliv látky na trypsinovou podjednotku, který není příliš patrný, byť k mírné inhibici v případě dvou nejvyšších testovaných koncentrací pravděpodobně dochází.



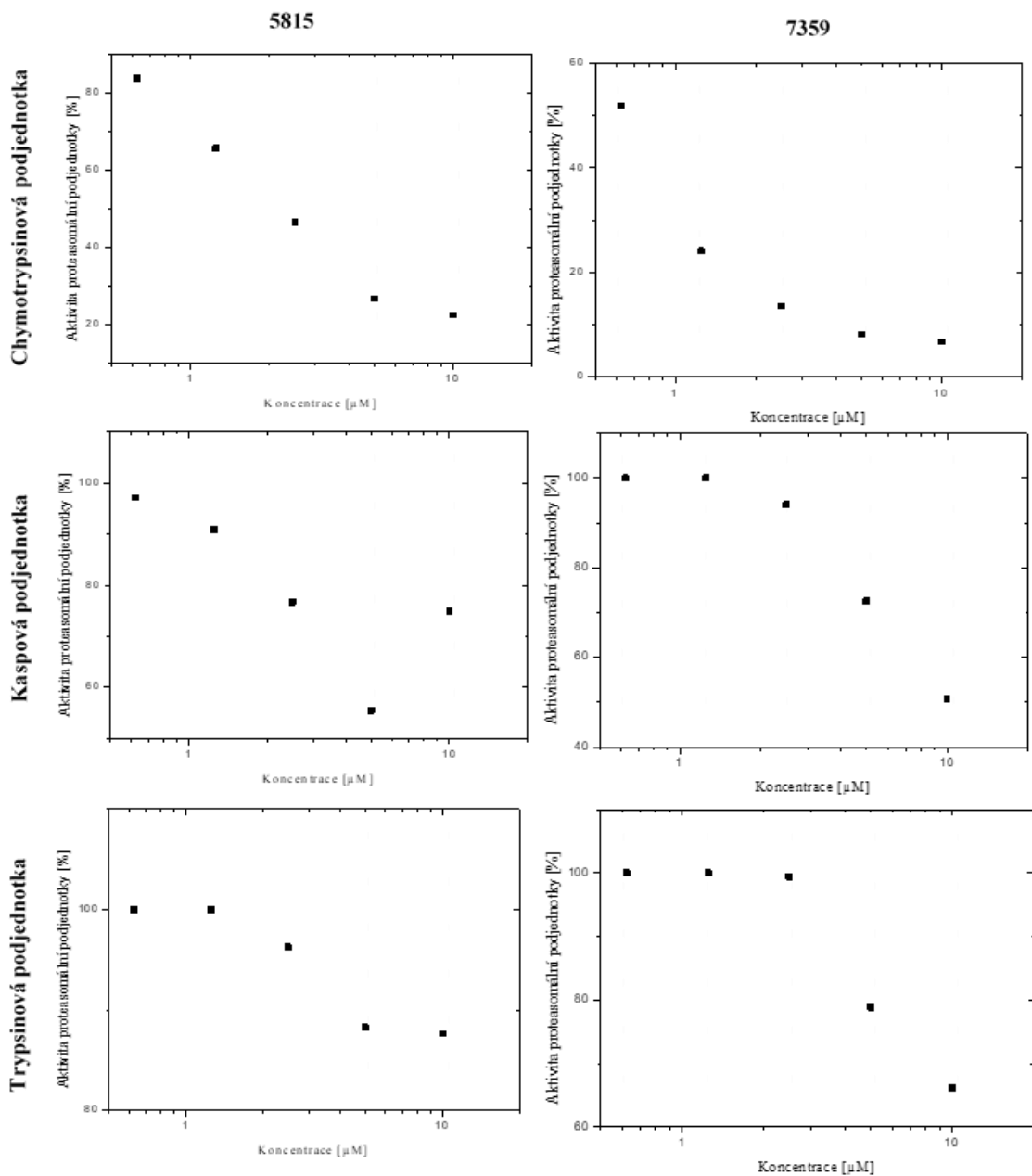
Obrázek 18: Závislost aktivity jednotlivých proteasomálních podjednotek na koncentraci látky 5815 a na délce inkubace lyzátu se substráty. Buňky U2OS (20 000 buněk na jamku) byly ovlivněny po hodinové inkubaci s látkou 5815 lyzovány v reakčním pufru D. Aktivita byla měřena se substráty N-Suc-LLVY-AMC (chymotrypsinová aktivita), Z-LLE-AMC (kaspázová aktivita), Bz-VGR-AMC (trypsinová aktivita).



Obrázek 19: Závislost aktivity jednotlivých proteasomálních podjednotek na koncentraci látky 7357 a na délce inkubace lyzátu se substráty. Buňky U2OS (20 000 buněk na jamku) byly ovlivněny po hodinové inkubaci s látkou 7357 lyzovány v reakčním pufru D. Aktivita byla měřena se substráty N-Suc-LLVY-AMC (chymotrypsinová aktivita), Z-LLE-AMC (kaspázová aktivita), Bz-VGR-AMC (trypsinová aktivita)



Obrázek 20: Závislost aktivity jednotlivých proteasomálních podjednotek na koncentraci látky 7359 a na délce inkubace lyzátu se substráty. Buňky U2OS (20 000 buněk na jamku) byly ovlivněny po hodinové inkubaci s látkou 7359 lyzovány v reakčním pufru D. Aktivita byla měřena se substráty N-Suc-LLVY-AMC (chymotrypsinová aktivita), Z-LLE-AMC (kaspázová aktivita), Bz-VGR-AMC (trypsinová aktivita).



Obrázek 21: Grafy sloužící pro odečtení hodnot  $IC_{50}$  pro inhibici jednotlivých aktivit proteasomu po hodinovém působení látek na buněčnou linii U2OS. Hodnoty pro stanovení procentuální inhibice proteasomálních podjednotek byly odečteny po 3 hodinové inkubaci s lyzačním reakčním pufrem D a substráty N-Suc-LLVY-AMC (chymotrypsinová aktivita), Z-LLE-AMC (kaspázová aktivita), Bz-VGR-AMC (trypsinová aktivita).

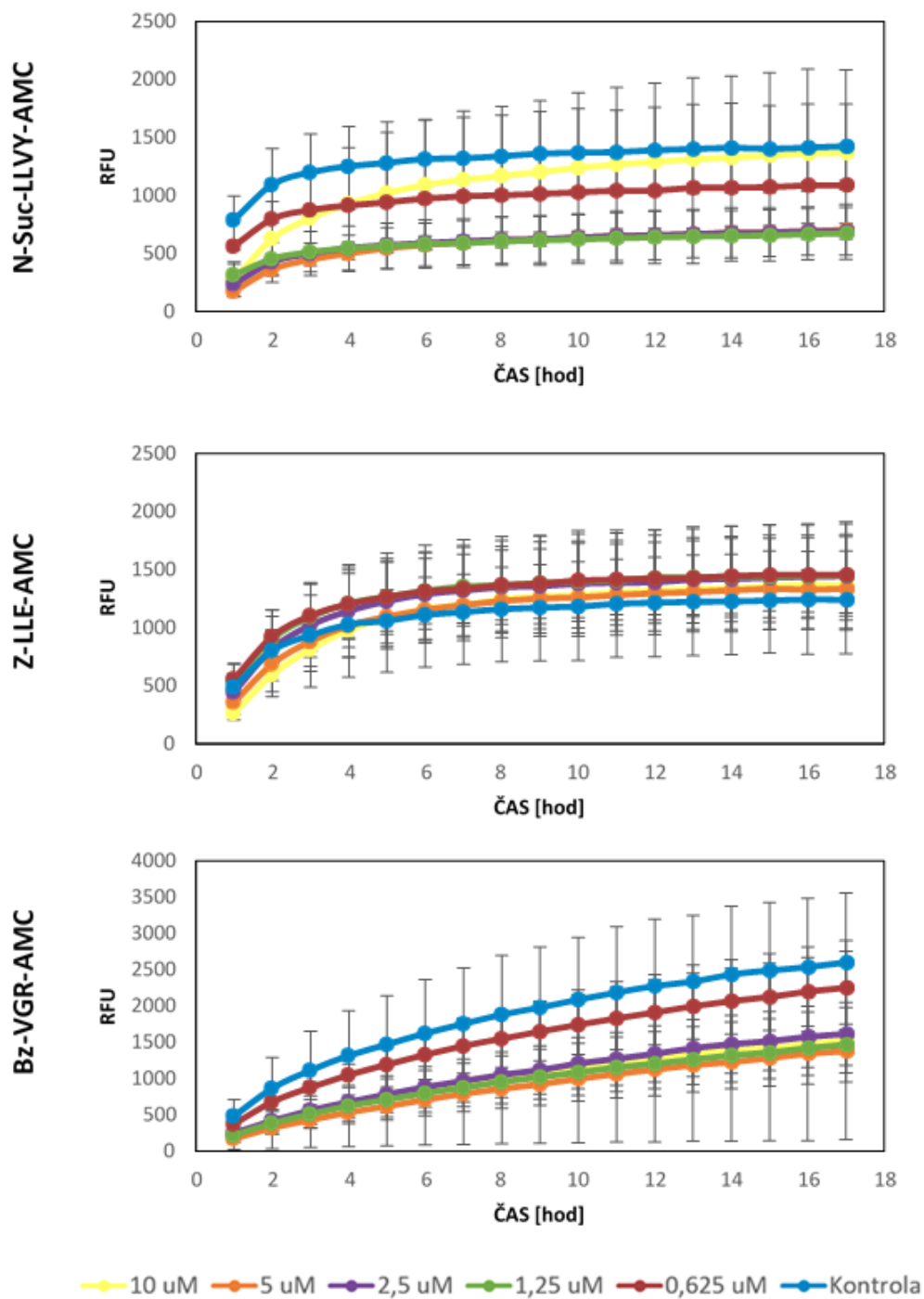
Tabulka 2: Stanovené hodnoty  $IC_{50}$  pro inhibici jednotlivých aktivit proteasomu po hodinovém působení testovaných látek na buněčnou linii U2OS

Sloučenina	IC <sub>50</sub> (μM)		
	Chymotrypsinová	Kaspázová	Trypsinová
5815	2,082	?	>10
7357	>10	>10	>10
7359	0,649	>10	>10

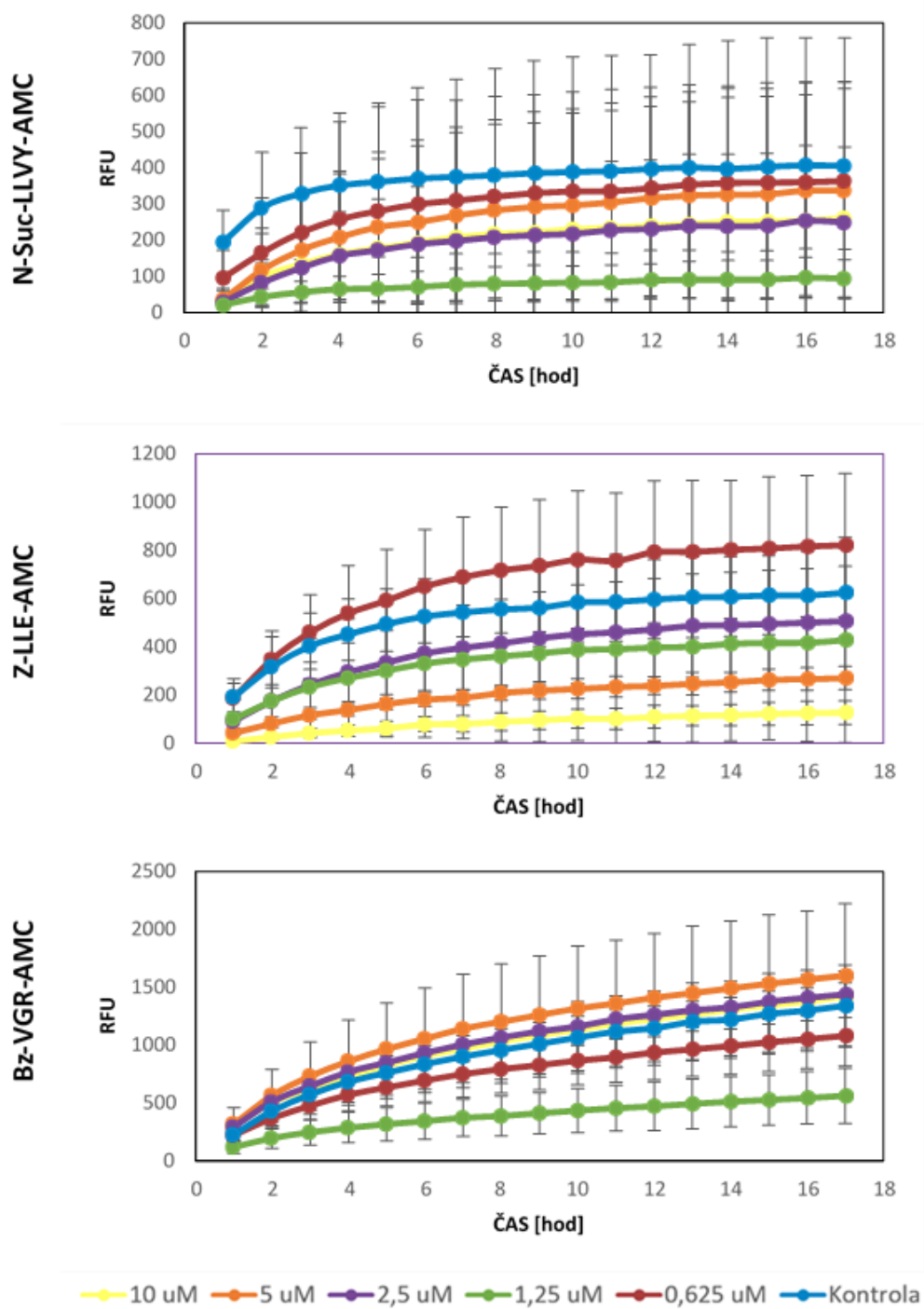
### 4.2.3 Účinek studovaných látek na buněčné linii U266

Vzhledem k tomu, že inhibitory proteasomu jsou klinicky využívány zejména k léčbě myelomů, pokusili jsme se tuto metodu použít také pro ověření vlivu studovaných látek na suspenzní linii U266 pro kterou ale metoda nebyla optimalizována. V případě této buněčné linie bylo nutno vždy při promývání provést centrifugaci, tak aby nebyly spolu s médiem nebo pufrům odstraněny také buňky. Z technických důvodů však promývací kroky způsobovaly vždy ztráty buněk, což výrazně zatížilo výsledky celého experimentu. Jak je patrné z obrázků 22-24 variabilita výsledků je velmi vysoká a nelze rozlišit, zda jsou rozdíly v signálech způsobeny inhibicí proteasomu, nebo odstraněním části buněk při promývání a přidávání pufrů se substráty. Obdobný problém nastal také u kontrolních látek bortezomibu a carfilzomibu (obrázky 25, 26).

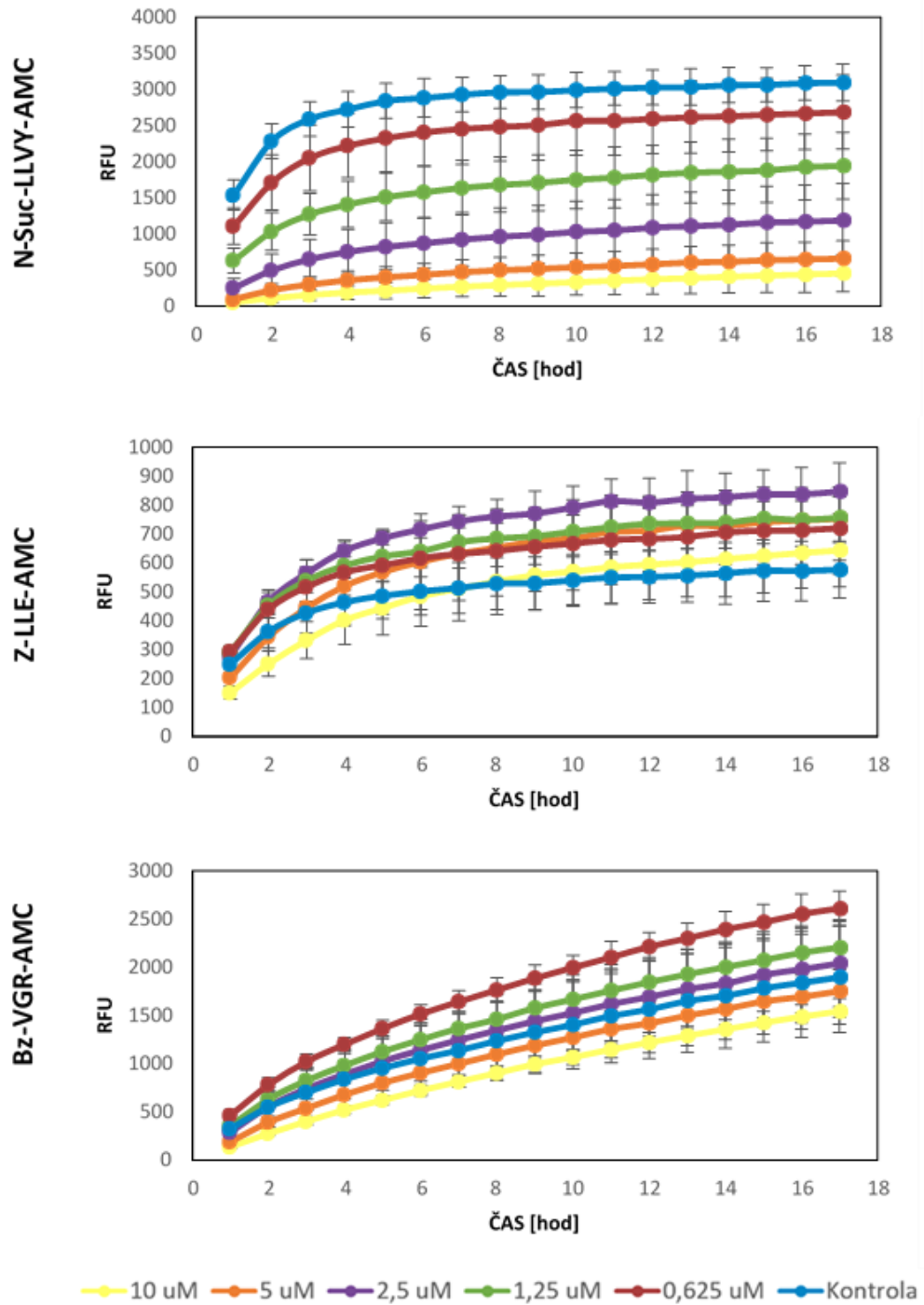




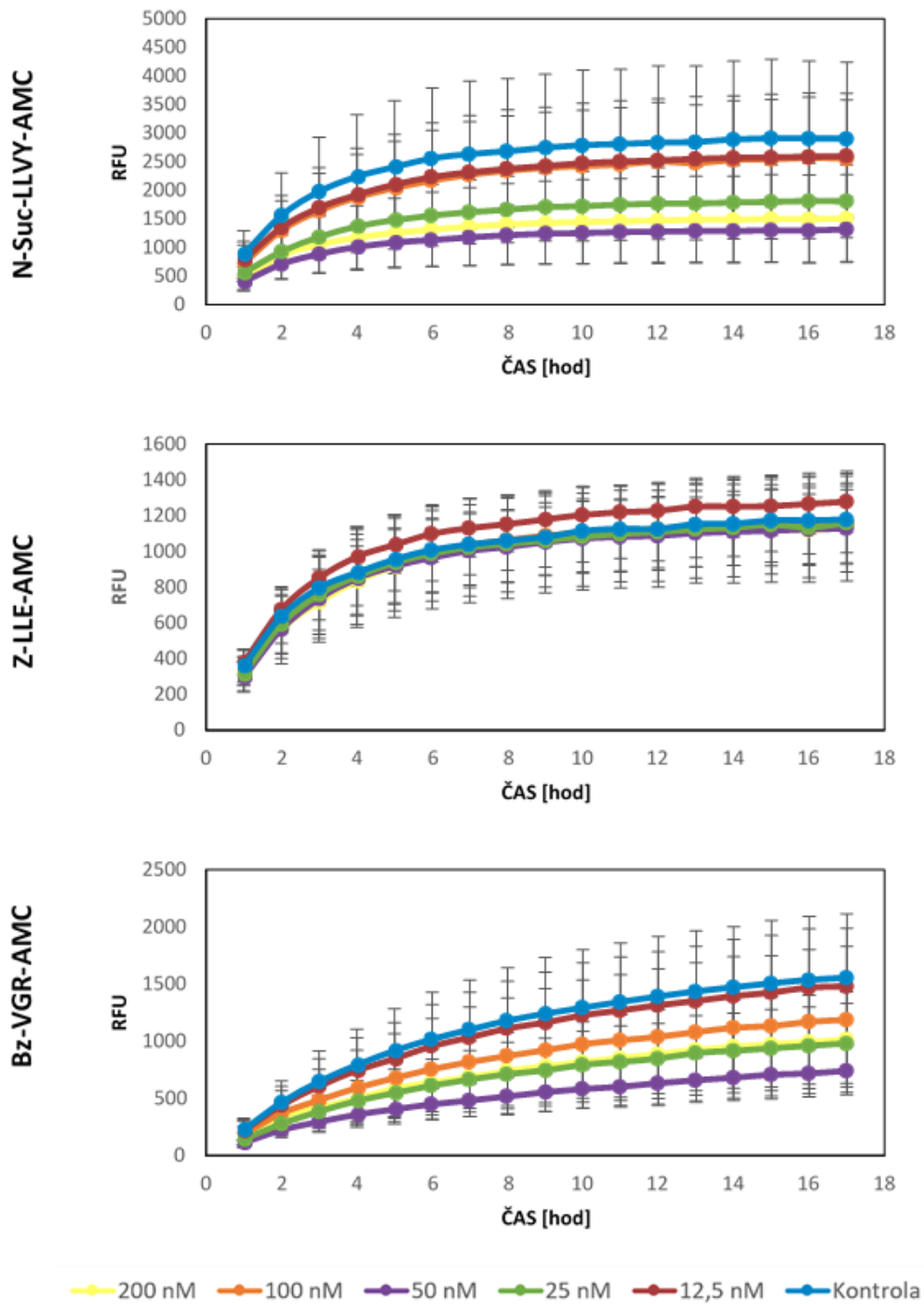
Obrázek 22: Závislost aktivity jednotlivých proteasomálních podjednotek na koncentraci látky 5815 a na délce inkubace lyzátu se substráty. Buňky U266 (100 000 buněk na jamku) byly ovlivněny po hodinové inkubaci s látkou 5815 lyzovány v reakčním pufru D. Aktivita byla měřena se substráty N-Suc-LLVY-AMC (chymotrypsinová aktivita), Z-LLE-AMC (kaspázová aktivita), Bz-VGR-AMC (trypsinová aktivita).



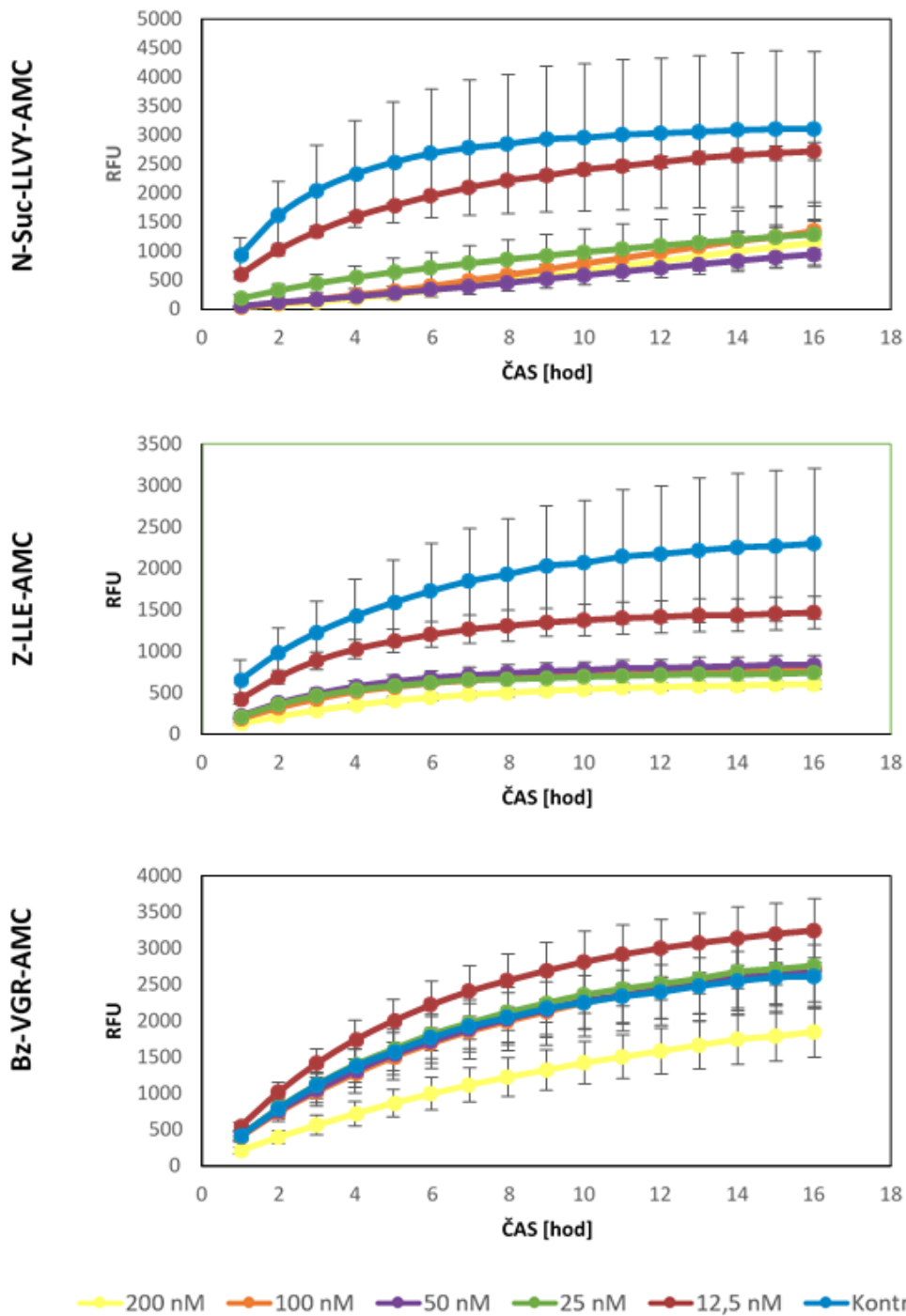
Obrázek 23: Závislost aktivity jednotlivých proteasomálních podjednotek na koncentraci látky 7357 a na délce inkubace lyzátu se substráty. Buňky U266 (100 000 buněk na jamku) byly ovlivněny po hodinové inkubaci s látkou 7357 lyzovány v reakčním pufru D. Aktivita byla měřena se substráty N-Suc-LLVY-AMC (chymotrypsinová aktivita), Z-LLE-AMC (kaspázová aktivita), Bz-VGR-AMC (trypsinová aktivita).



Obrázek 24: Závislost aktivity jednotlivých proteasomálních podjednotek na koncentraci látky 7359 a na délce inkubace lyzátu se substráty. Buňky U266 (100 000 buněk na jamku) byly ovlivněny po hodinové inkubaci s látkou 7359 lyzovány v reakčním pufru D. Aktivita byla měřena se substráty N-Suc-LLVY-AMC (chymotrypsinová aktivita), Z-LLE-AMC (kaspázová aktivita), Bz-VGR-AMC (trypsinová aktivita).



Obrázek 25: Závislost aktivity jednotlivých proteasomálních podjednotek na koncentraci bortezomibu a na délce inkubace lyzátu se substráty. Buňky U266 (100 000 buněk na jamku) byly ovlivněny po hodinové inkubaci s bortezomibem lyzovány v reakčním pufru D. Aktivita byla měřena se substráty N-Suc-LLVY-AMC (chymotrypsinová aktivita), Z-LLE-AMC (kaspázová aktivita), Bz-VGR-AMC (trypsinová aktivita).

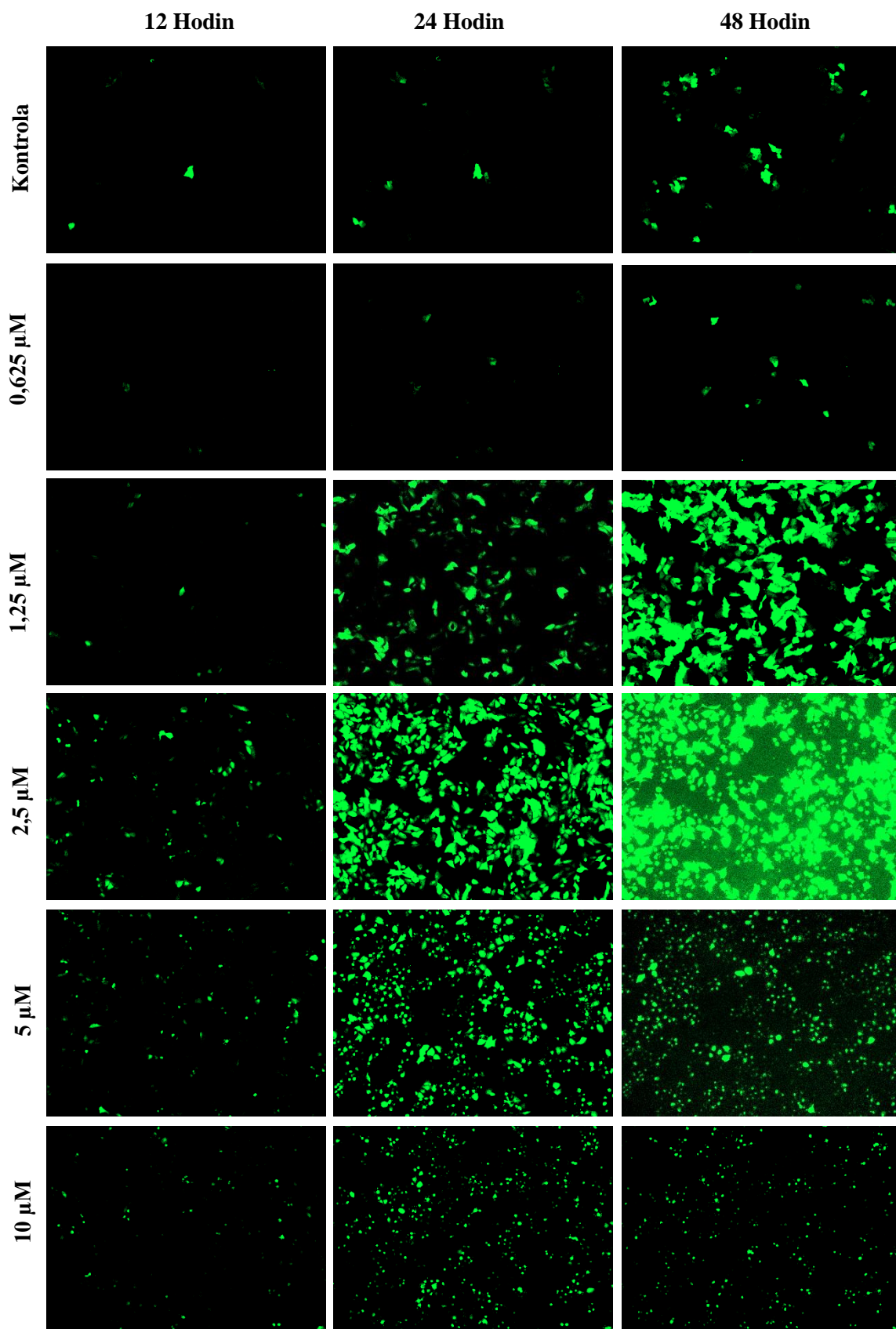


Obrázek 26: Závislost aktivity jednotlivých proteasomálních podjednotek na koncentraci carfilzomibu a na délce inkubace lyzátu se substráty. Buňky U266 (100 000 buněk na jamku) byly ovlivněny po hodinové inkubaci s carfilzomibem lyzovány v reakčním pufru D. Aktivita byla měřena se substráty N-Suc-LLVY-AMC (chymotrypsinová aktivita), Z-LLE-AMC (kaspázová aktivita), Bz-VGR-AMC (trypsinová aktivita).

## 4.2.4 Fluorescenční vizualizace inhibice proteasomu

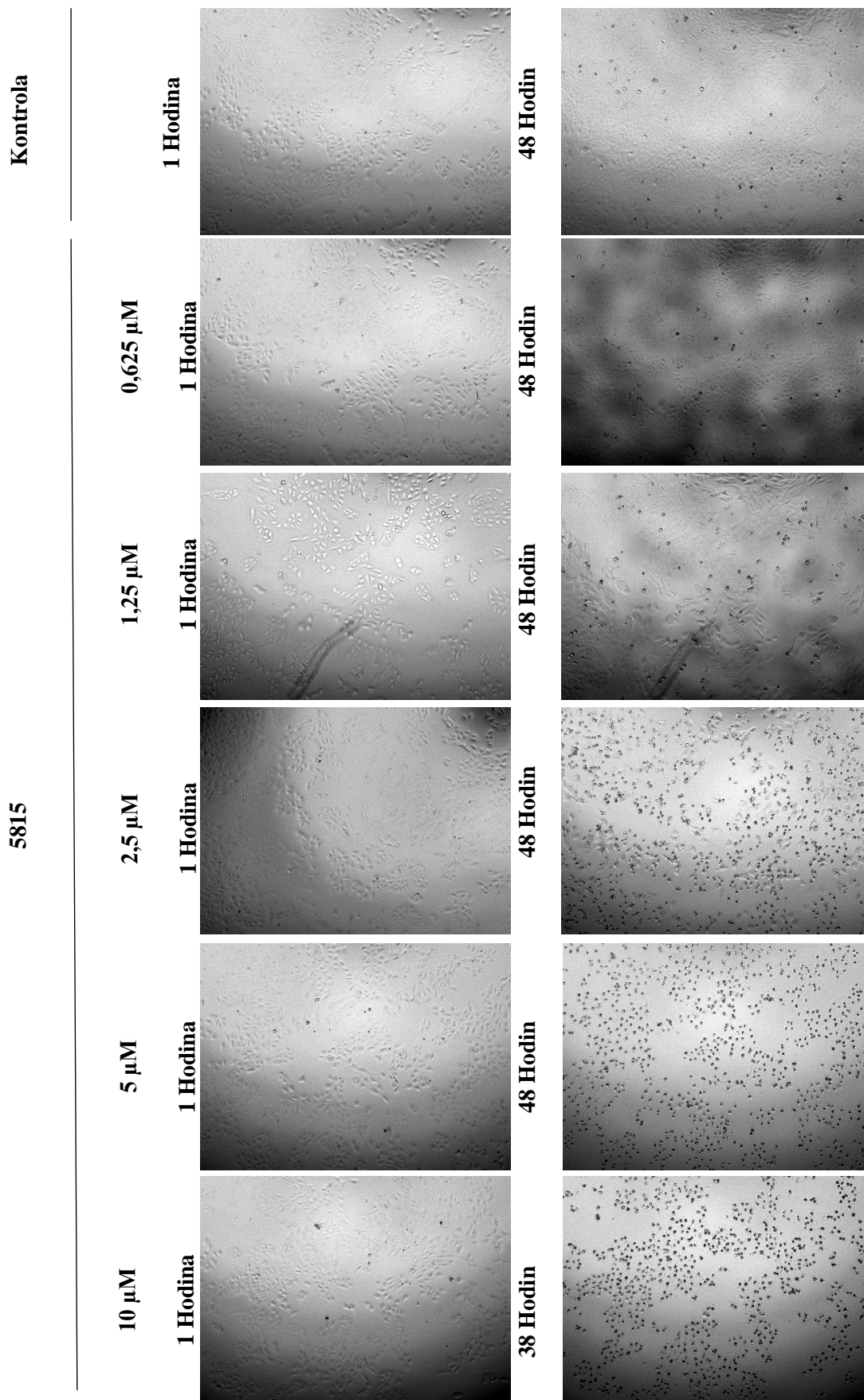
Účinky studovaných látek na degradaci buněčných proteinů byly zkoumány také prostřednictvím automatizované fluorescenční mikroskopie za použití buněk U2OS-PI-GFP. Na obrázcích 27, 30 je vždy jen ukázka tří časových bodů (12, 24, 48 hodin). Látka **7357** je na obrázku 29 znázorněna pouze v čase 48 hodin, celý časový průběh změn fluorescence je pak možno shlédnout na odpovídajících videích na přiloženém CD (příloha A). Snímky z fluorescenční mikroskopie byly doplněny také o snímky ve viditelném světle. Na obrázcích 28, 29, 31, jsou pak buňky vizualizovány vždy v první hodině a následně buď v nejdelším testovaném čase (48 hodin), nebo v čase ve kterém již není možno pozorovat žádné buňky nejevící známky odumírání. U látky **5815** v nejnižší testované koncentraci nebyl patrný žádný významný inhibiční účinek na proteasom ve srovnání s kontrolními buňkami (obrázek 27; Příloha A: videa 1, 2). V obou případech byl patrný nárůst fluoreskujících buněk v čase, nicméně se jednalo pouze o malý počet jednotlivých buněk, kde mohla být stabilizace GFP zapříčiněna jinými buněčnými procesy. Již u druhé nejnižší koncentrace (1,25  $\mu\text{M}$ ) je po 6. hodinové inkubaci s touto látkou možno sledovat nárůst fluorescence, který se od 12. hodiny zrychluje a v průběhu času roste až po 48. hodinu (Příloha A: video 3). Pozorováním těchto buněk ve viditelném světle bylo zjištěno že, přestože dochází k inhibici proteasomu, počet umírajících buněk je i v nejdelším sledovaném čase jen velmi nízký a je patrné, že se buňky i po aplikaci látky dále dělily (obrázek 28). U koncentrace 2,5  $\mu\text{M}$  dochází opět k nárůstu fluorescence, a to již po 5hodinové inkubaci. Nárůst probíhá rychleji a počet fluoreskujících objektů je v daných časech ve srovnání s předchozí koncentrací vyšší (Příloha A: video 4), a to až po 38. hodinu, kdy signál začíná opět pomalu klesat. K tomuto jevu dochází pravděpodobně v důsledku odumírání buněk z důvodu vysoké toxicity této látky. Toto tvrzení navíc potvrzují také snímky z mikroskopie ve viditelném světle, kdy je možno již od časných inkubačních časů sledovat změnu tvaru buněk z přirozeného cípatého tvaru na tvar kulatý, provázený odlepováním buněk ode dna jamky a jejich následným odumíráním. Nicméně ani v nejdelším testovaném čase nejsou změny tvaru patrné u všech buněk, přestože je jejich počet vysoký. Další testovaná koncentrace (5  $\mu\text{M}$ ) vykazuje inhibiční účinky již po 5 hodinách, fluorescenční signál však v následujících časech, pravděpodobně v důsledku přílišné toxicity, nedosahuje takových intenzit jako tomu bylo v předchozím případě, u koncentrace 2,5  $\mu\text{M}$ , a od 23. hodiny, již významně klesá (Příloha A: video 5). Také tvar fluoreskujících buněk se ve srovnání s předchozí koncentrací liší, jsou menší a kulatější. Tomuto odpovídají také snímky ve viditelném světle, kdy je možno sledovat postupné odumírání buněk, jež vrcholí ve 48. hodině, kdy není možno pozorovat již žádné buňky, jež by nejevily známky odumírání. U nejvyšší testované koncentrace (10  $\mu\text{M}$ ) byl fluorescenční signál patrný opět již po pěti hodinách, nicméně jeho intenzita byla nižší a opět již od 23. hodiny klesá (Příloha A: video 6). Také tvar fluoreskujících

buněk má již od počátku blíže k odumírajícím buňkám. Vysokou toxicitu této látky také potvrzuje fakt, že ve viditelném světle nebylo možno najít buňky původního tvaru již po 38 hodinách.



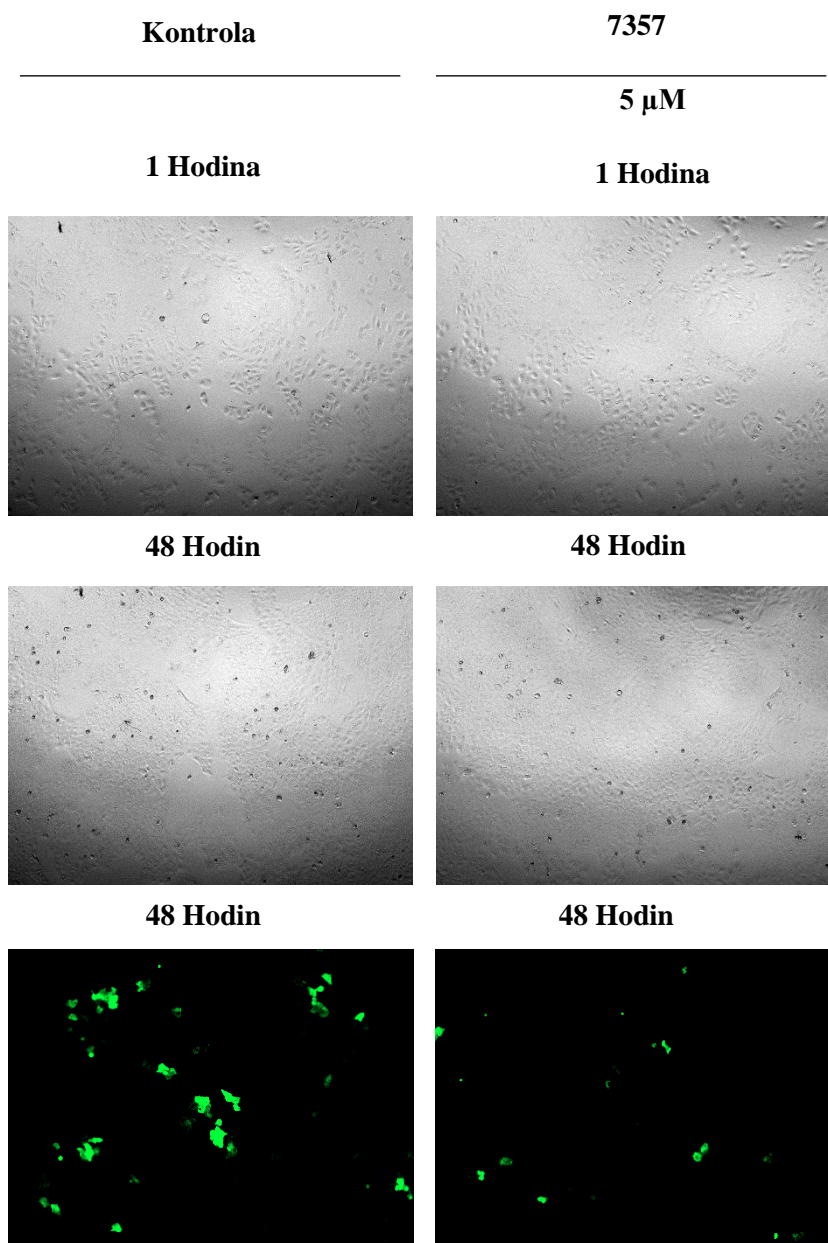
Obrázek 27: Vliv látky 5815 na expresi GFP fúzovaného s degonem v buněčné linii U2OS-PI-GFP. Zvětšeno 4x.





Obrázek 28: Vliv látky 5815 na buněčnou linii U2OS-PI-GFP. Viditelné světlo, zvětšeno 4x.

Látka **7357** nevykazovala v žádné z testovaných koncentrací významný inhibiční efekt vůči proteasomu, přestože v časech vyšších než 20 hodin bylo možno sledovat velmi mírný nárůst fluoreskujících buněk, bylo množství těchto buněk dokonce nižší než v případě buněk kontrolních (Příloha A: video 7-11). Nedošlo tedy nejspíš k inhibici proteasomu, ale jednalo se spíše o jiné buněčné události, jež zapříčinily, že k degradaci GFP nedošlo. Mikroskopií ve viditelném světle bylo zjištěno, že nadále docházelo k proliferaci buněk, přičemž podíl odumírajících buněk byl velmi nízký a odpovídal spíše vysokému pokrytí dna jamky, než proteasomální inhibici, a to ve všech použitých koncentracích. Jako příklad je na obrázku 29 uvedena koncentrace 5  $\mu\text{M}$  v porovnání s kontrolními buňkami.

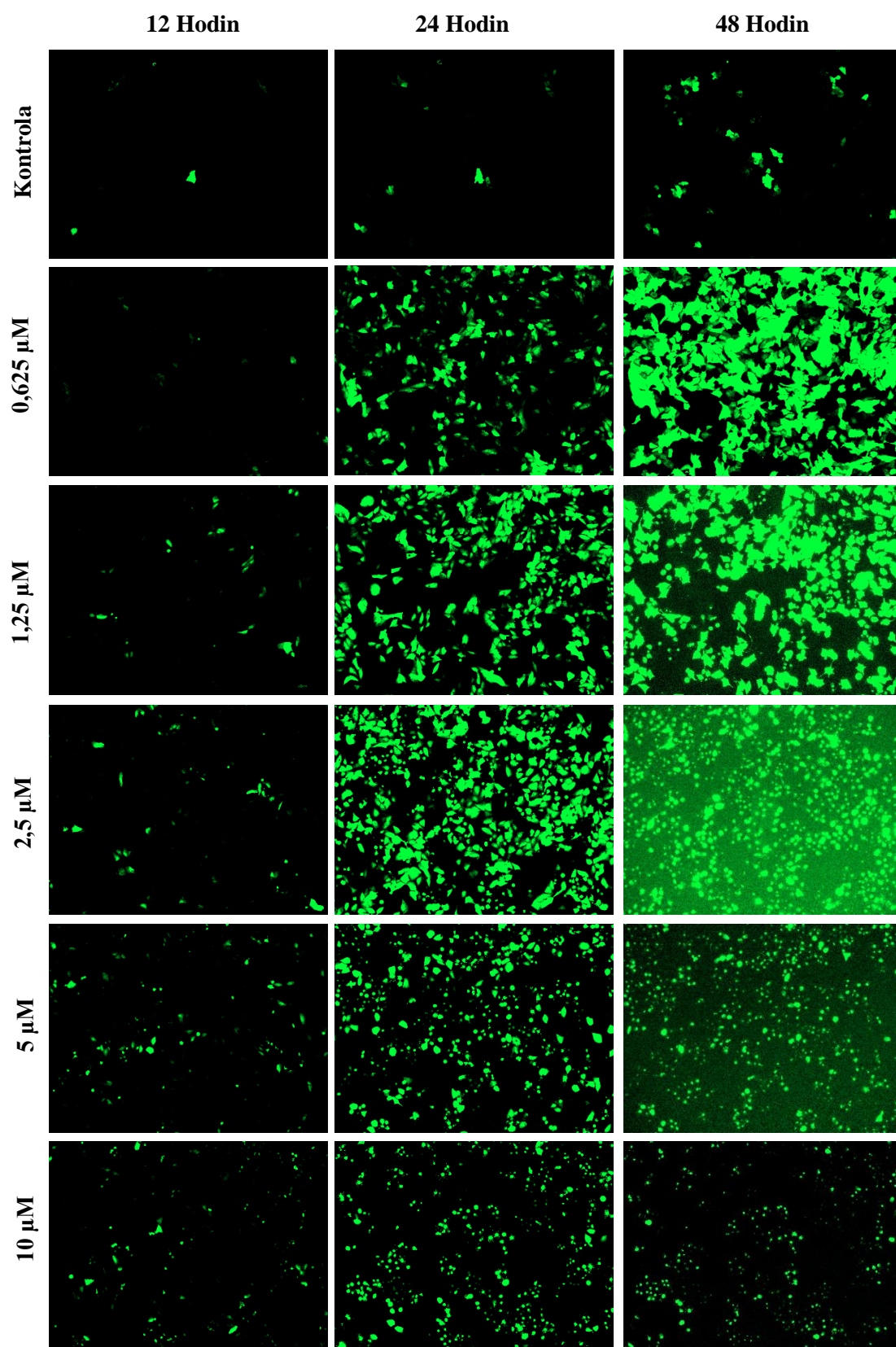


Obrázek 29: Vliv látky 7357 na buněčnou linii U2OS-PI-GFP. Viditelné světlo, a na expresi GFP řízovaného s degronem v buněčné linii U2OS-PI-GFP. Zvětšeno 4x.

Látka **7359** jako jediná z testovaných způsobovala akumulaci GFP již v nejnižší koncentraci (obrázek 30; Příloha A: video 12). K mírnému nárůstu GFP docházelo již po 6hodinové inkubaci, významnější nárůst byl pak pozorován od dvanácté hodiny a postupně rostl až po 48 hodinu. Snímky z mikroskopie v procházejícím světle napovídají, že přesto že docházelo k významným inhibičním účinkům na proteasom, množství buněk, jež vykazují známky odumírání, bylo i v nejvyšším testovaném čase velmi nízké (obrázek 31). V případě koncentrace 1,25  $\mu\text{M}$  bylo možno pozorovat mírný nárůst fluorescence opět již po 6hodinové inkubaci s testovanou látkou,

přičemž významnější nárůst bylo možno sledovat od 10. hodiny, kdy signál postupně rostl až do 33. hodiny a následně velmi mírně klesal (Příloha A: video 13). Mikroskopií ve fázovém kontrastu byly zvýrazněny značné rozdíly v počtu odumírajících buněk, kdy v koncentraci 1,25  $\mu\text{M}$  od 6 hodiny počet odumírajících buněk významně rostl a počty těchto buněk byly výrazně vyšší než u nižší koncentrace. U koncentrace 2,5  $\mu\text{M}$  je patrný nárůst fluorescence od 6 hodiny, přičemž signál roste až do 23. hodiny, po níž signál začíná postupně klesat (Příloha A: video 14). Tento jev byl s největší pravděpodobností zapříčiněn vysokou cytotoxicitou této látky, což potvrzují také snímky ve viditelném světle, kdy je možno od 4 hodiny sledovat, že postupně přibývá buněk, které se zakulacují a umírají. V nejdelším čase již není možno pozorovat žádné živé buňky. U koncentrace 5  $\mu\text{M}$  dochází k nárůstu fluorescenčního signálu již po 5. hodinové inkubaci s testovanou látkou, přestože signál narůstá až do 21 hodiny, je možno sledovat rozdíly jak v intenzitě fluorescence, tak ve tvaru fluoreskujících objektů ve srovnání s předchozím případem, kdy u této koncentrace je ve 24. hodině fluorescence nižší a poměr menších zakulacených fluoreskujících objektů je naopak vyšší (Příloha A: video 15). Tento jev opět vypovídá o rostoucí toxicitě látky spolu s rostoucí koncentrací. Mikroskopií ve viditelném světle bylo zjištěno, že již po 3. hodinové inkubaci dochází k odlepování buněk ode dna jamky, ve 45 hodině již není možno na snímku nalézt buňky jiného než kulatého tvaru. V nejvyšší použité koncentraci (10  $\mu\text{M}$ ) bylo možné nárůst GFP pozorovat již po 3. hodinovém působení této látky, přičemž množství fluoreskujících buněk spolu s intenzitou signálu postupně rostlo, přibližně do 19 hodiny, kdy množství fluoreskujících buněk a intenzita signálu začala opět klesat (Příloha A: video 16). Tento fakt byl opět potvrzen snímky ve viditelném světle, kdy je možno od 4. hodiny sledovat, že postupně přibývá odumírajících buněk a ve 31. hodině již není možno nalézt buňky jiného než kulatého tvaru.

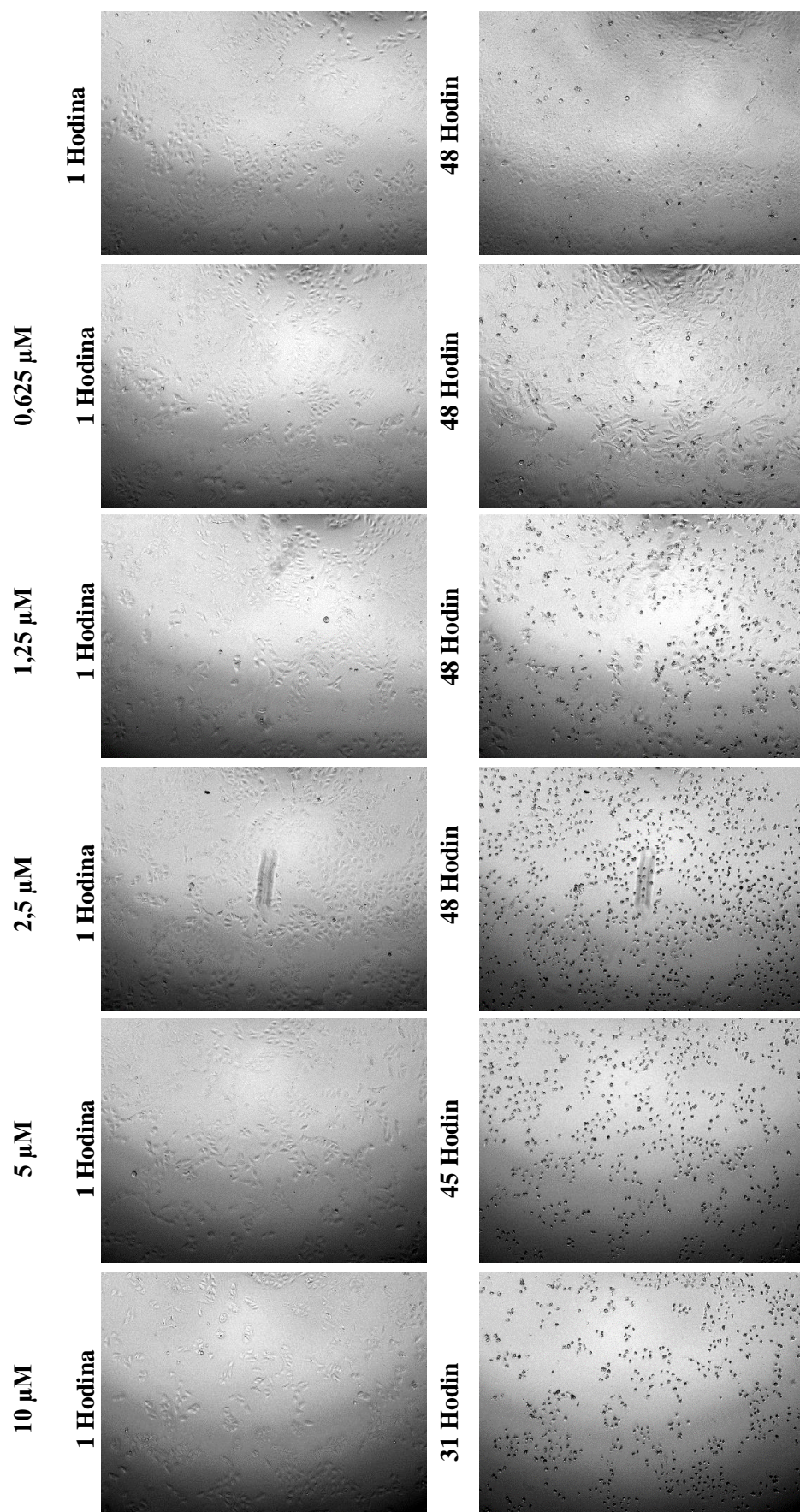




Obrázek 30: Vliv látky 7359 na expresi GFP fúzovaného s degronem v buněčné linii U2OS-PI-GFP. Zvětšeno 4x.

Kontrola

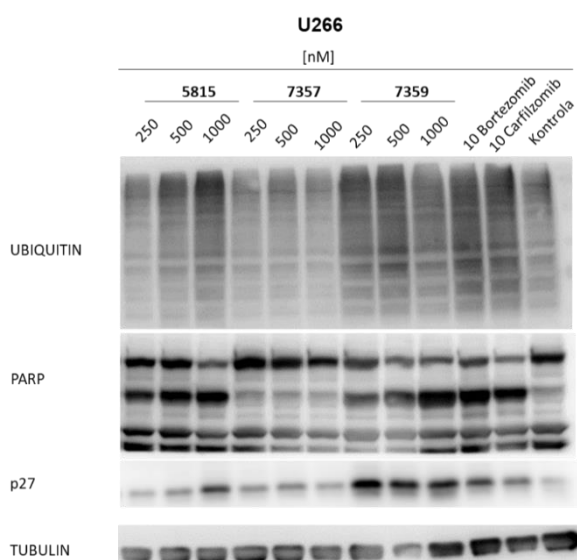
7359



Obrázek 31: Vliv látky 7359 na buněčnou linii U2OS-PI-GFP. Viditelné světlo, zvětšeno 4x

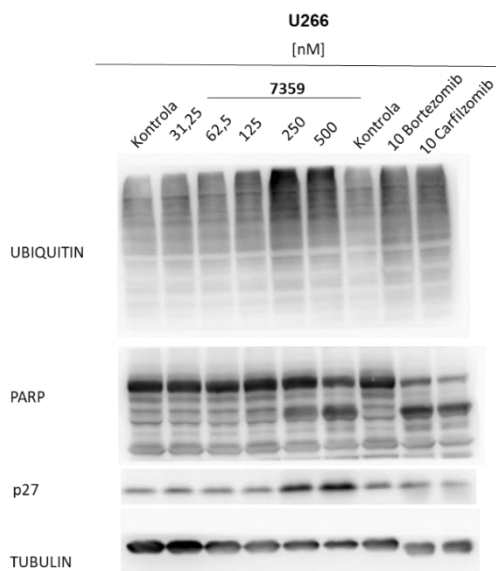
## 4.2.5 Vliv testovaných látek na vybrané buněčné proteiny

Účinky jednotlivých látek byly následně charakterizovány metodou immunoblottingu. Analyzována byla míra ubiquitinace proteinů, hladina proteinu p27 a fragmentace PARP po 24hodinovém působení sledovaných látek, **5815**, **7357**, **7359**, v koncentracích 250 nM, 500 nM a 1000 nM v buněčné linii U266 (obrázek 32). U látky **5815** je při koncentraci 250 nM míra ubiquitinace proteinů přibližně stejná jako v kontrole, nicméně na rozdíl od kontrolního vzorku je již při této koncentraci možno pozorovat 89 kDa fragment proteinu PARP. Od koncentrace 500 nM je možno pozorovat zvýšenou ubiquitinaci proteinů. K nárůstu hladiny proteinu p27 dochází mírně již při koncentraci 500 nM a výrazný nárůst je patrný až při nejvyšší testované koncentraci (1000 nM). Látka **7357** v buňkách U266 v experimentu nezpůsobovala žádné významné změny, což odpovídá také výsledkům z předchozích experimentů. Naopak látka **7359** vykazovala aktivitu již od nejnižší testované koncentrace (250 nM). Mezi koncentracemi 250 nM a 500 nM došlo k mírnému nárůstu ubiquitinace proteinů, jež při koncentraci 1000 nM klesla pravděpodobně v důsledku přílišné cytotoxicity. Tomuto faktu napovídá také fragmentace proteinu PARP, která v tomto případě dosahuje nejvyšších hladin přesto, že detekovatelný je u všech testovaných koncentrací. Zároveň bylo u všech testovaných koncentrací možno detekovat zvýšenou hladinu proteinu p27.



Obrázek 32: Vliv studovaných sloučenin na vybrané buněčné proteiny. Experiment byl proveden na buněčné linii U266 po 24hodinové inkubaci s látkami **5815**, **7357**, **7359** v koncentrační řadě 250 nM – 500 nM- 1000 nM. Jako pozitivní kontrola byly použity proteasomálními inhibitory bortezomib a carfilzomib v koncentraci 10 nM. Detekce tubulinu byla provedena jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorku.

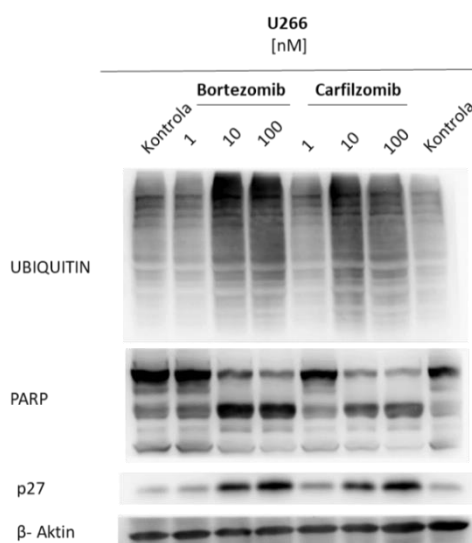
Jelikož látka **7359** vykazovala aktivitu již při nejnižší testované koncentraci, byla tato látka otestovaná v prodloužené koncentrační řadě: 31,25 nM; 62,5 nM; 125 nM; 250 nM a 500 nM (obrázek 33). Z výsledku je patrné, že ubiquitinace proteinů narůstá při nejnižší koncentraci pouze nevýznamně. K výraznější ubiquitinylaci proteinů dochází až od koncentrace 250 nM. Od této koncentrace je možné také pozorovat fragment proteinu PARP a zvýšenou hladinu proteinu p27.



*Obrázek 33: Vliv sloučeniny 7359 na vybrané buněčné proteiny. Experiment byl proveden na buněčné linii U266 po 24hodinové inkubaci s testovanou látkou v koncentrační řadě 31,25 nM – 62,5 nM- 125 nM – 250 nM- 500 nM. Jako pozitivní kontrola byly použity proteasomální inhibitory bortezomib a carfilzomib v koncentraci 10 nM. Detekce tubulinu byla provedena jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorku.*

Kontrolní experimenty byly provedeny s bortezomibem a carfilzomibem. V buňkách U266 docházelo k výraznému nárůstu ubiquitinace proteinů od koncentrace 10 nM (obrázek 34). Zároveň je u těchto koncentrací (10 nM, 100 nM) možno pozorovat také fragmentaci proteinu PARP, jež je výraznější u vzorků ovlivněných bortezomibem. Je možno pozorovat také nárůst hladiny proteinu p27. Naopak u nejnižší testované koncentrace (1 nM) není ani u jednoho ze standardů stejně jako u kontrolních vzorků možno pozorovat jak ubiquitinaci proteinů, tak štěpné fragmenty proteinu PARP a protein p27.



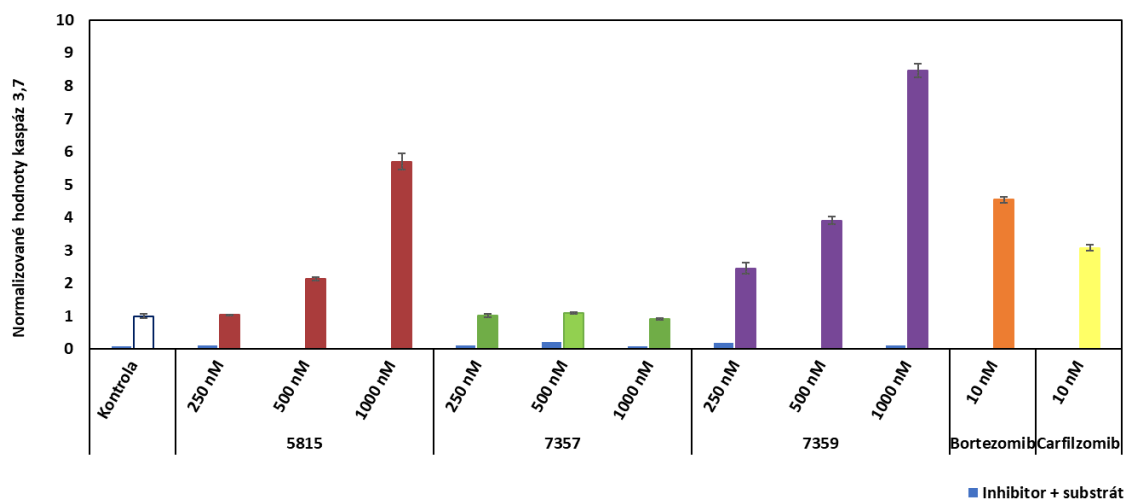


Obrázek 34: Vliv bortezomibu a carfilzomibu na vybrané buněčné proteiny. Experiment byl proveden na buněčné linii U266 ovlivněné 24 hod proteasomálními inhibitory bortezomibem a carfilzomibem v koncentrační řadě 1 nM -10 nM-100 nM. Detekce β-aktinu byla provedena jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorku.

#### 4.2.6 Stanovení aktivity kaspázy 3/7

Studium vlastností testovaných látek bylo doplněno o fluorimetrické stanovení aktivity kaspázy 3/7. Tato metoda je založena na hydrolýze peptidového substrátu (Ac-DAVD-AMC) kaspázami 3 a 7 za vzniku fluoreskujícího produktu AMC. Tento produkt po ozáření světlem o vlnové délce 346 nm emituje záření vlnové délky 442 nm. Získané hodnoty byly převedeny na relativní dle negativní kontroly (neovlivněné buňky).

Tímto experimentem byly potvrzeny proapoptotické vlastnosti látky **5815** a **7359** jakož i standardů bortezomibu a carfilzomibu. Látka **5815** aktivovala kaspázy 3 a 7 od koncentrace 500 nM a s rostoucí koncentrací aktivita kaspáz narůstala. Látka **7359** vykazovala aktivitu kaspáz již při nejnižší testované koncentraci (250 nM), s rostoucí koncentrací pak tato aktivita dále narůstala, přičemž dosahovala vyšších hodnot než u předchozí testované látky. Látka **7357** ani v tomto testu nevykazovala proapoptotické vlastnosti, což koreluje s předchozími výsledky.



Obrázek 35: Relativní aktivita kaspáz 3 a 7 v buněčné linii U266 po 24hodinové inkubaci s testovanými látkami 5815, 7357, 7359 v koncentrační řadě 50 nM – 500 nM- 1000 nM. Jako pozitivní kontrola byly použity standardní proteasomálními inhibitory bortezomib a carfilzomib v koncentraci 10 nM. Fluorescence byla měřena po 6-hodinové inkubaci ve tmě

### 4.3 Diskuze

Od schválení bortezomibu FDA pro léčbu mnohočetného myelomu v roce 2003 probíhá intenzivní výzkum a vývoj nových molekul zaměřených na proteasom s potenciálními protinádorovými účinky (Brown 2008). Velmi často tyto nové látky využívají již osvědčeného peptidového nebo pseudopeptidového motivu jakožto základní struktury, kterou dále modifikují tak, aby byly tyto molekuly schopny interagovat s katalytickými podjednotkami proteasomu. Jako primární cíl pro vývoj protinádorových sloučenin bývá popisována  $\beta 5$  podjednotka vykazující chymotrypsinovou aktivitu, jelikož hlavně ona je zapojena do degradace proteinů (Brown 2008). Tomu odpovídá také fakt, že na ni cílí většina současných inhibitorů (Cromm a Crews 2017). Zbývající dvě proteolytické podjednotky pak bývají považovány za cíle přidružené (Brown 2008). Společná inhibice podjednotky  $\beta 5$  spolu s podjednotkami  $\beta 2$  a  $\beta 1$  vede k maximální protinádorové odpovědi, a představuje tak optimální variantu pro vývoj nového léčiva.

Podobné sloučeniny jsou v současnosti vyvíjeny a studovány také v Laboratoři růstových regulátorů (Jorda *et al.* 2017 a 2020). V praktické části této práce byla nejprve optimalizována metoda pro fluorimetrické stanovení aktivity jednotlivých proteasomálních podjednotek a následně byly zkoumány sloučeniny **5815**, **7359**, **7359** pro jejich potenciální inhibiční účinky na proteasom. Na rozdíl od většiny publikovaných metod, kdy jsou používány předem připravené buněčné lyzáty, purifikovaný 20S lidský proteasom, nebo purifikovaný konstitutivní proteasom, lze aktivitu jednotlivých podjednotek stanovovat přímo v buněčném lyzátu po přidání pufru se substráty, bez nutnosti předchozí lyzace či použití purifikovaného proteasomu (Tello-Aburto *et al.* 2015, Yang *et al.* 2016, Di Giovanni *et al.* 2016, Yu *et al.* 2019, Lei *et al.* 2018, Bahrudin *et al.* 2017, Groll *et al.* 2015, Zhang *et al.* 2016, Jorda *et al.* 2017). Obecně tento postup nebývá příliš častý, vyjma případů, kdy jsou pro aktivity přímo v buňkách použity komerční kity. Celkem byly pro použití na buněčné linii U2OS testovány 4 pufrů. Cílem optimalizace bylo zvolit optimální množství buněk pro dosažení co nejlepších výsledků a vybrat optimálně jeden pufr, ve kterém by bylo možno měřit všechny tři proteolytické aktivity proteasomu.

Pufr A byl použitelný pro aktivitu chymotrypsinovou a kaspázovou, což odpovídá výsledkům z výchozího článku, ve kterém byly tyto aktivity měřeny v tomto pufru, zatímco aktivita trypsinová byla měřena v pufru B (Jorda *et al.* 2017). Pufr B nebylo možno použít pro stanovení ani jedné z aktivit, a to i přes to, že ve výchozím pufru v něm byla měřená trypsinová aktivita za použití substrátu Bz-VGR-AMC (Jorda *et al.* 2017). Tento rozdíl mohl být způsoben použitím odlišné buněčné linie. Zbývající dva pufrů (C, D) byly použitelné pro měření všech typů aktivit, přičemž u trypsinové aktivity bylo lepších výsledků dosaženo za použití substrátu Bz-VGR-AMC. Pufr C byl použitelný i přesto, že zde byly použity odlišné substráty pro aktivitu trypsinovou

a kaspázovou (Yoshida *et al.* 2018). Nicméně nárůst aktivity byl v tomto případě silnější než v případě pufru D a poměrně brzy docházelo k saturaci. Z tohoto důvodu byl pro následná měření používán pufr D.

Z výsledků stanovení aktivity proteasomálních podjednotek po aplikaci testovaných látek vyplývá, že látka **5815** vede k inhibici chymotrypsinové ( $IC_{50}$  2,082  $\mu$ M) a kaspázové podjednotky, zatímco na podjednotku trypsinovou se jeví jako neúčinná. Tato látka a její inhibiční účinky na proteasom již byly publikovány v roce 2017 (Jorda *et al.* 2017). Účinnost této látky na inhibici chymotrypsinové podjednotky však byla vyšší ( $IC_{50}$  =0,090  $\mu$ M), stejně tak jako byl popsán také inhibiční účinek na trypsinovou podjednotku; tyto rozdíly vznikly pravděpodobně v důsledku použití buněčné linie U266 odvozené od mnohočetného myelomu, zatím co zde byla použita buněčná linie U2OS odvozená od osteosarkomu. Látka **7359** vykazovala ještě lepší inhibiční účinky na podjednotku chymotrypsinovou ( $IC_{50}$  =0,649  $\mu$ M) přičemž patrný byl také inhibiční účinek na podjednotku kaspázovou a sledovat bylo možno také mírnou inhibici trypsinové podjednotky.

Účinek látek **5815** a **7359** jakožto proteasomálních inhibitorů byl potvrzen také v buňkách U2OS-GFP, které exprimují GFP modifikovaný degronem, tj. sekvencí, která vede k jeho rychlé proteasomálně-závislé degradaci. V těchto buňkách byla inhibice proteasomu prokázána akumulací zeleného fluorescenčního proteinu v buňkách. Ve vyšších koncentracích pak sice docházelo k poklesu signálu GFP, ale to může souviset s indukcí buněčné smrti. Tuto skutečnost indikovala i změna tvaru buněk na kulatý. Obdobný trend byl již v literatuře popsán a získaná data jsou tedy v souladu s těmito výsledky (Jorda *et al.* 2017). Podobné účinky měla také látka **7359**.

Za normálních okolností jsou polyubikvitinované proteiny rozpoznávány ubikvitinovými receptory proteasomu a slouží jako substráty proteolýzy (Roos-Mattjus a Sistonen 2004). Akumulace polyubikvitinovaných proteinů v buňce tedy může signalizovat inhibici proteasomu, která se ve výsledku projeví typickou šmouhou v oblasti blotovaných proteinů s vysokou molekulovou hmotností. Předchozí experimenty prokazující vliv látky **5815** a **7359** na inhibici proteasomu byly proto doplněny také o analýzu ubikvitinovaných proteinů a o detekci markeru apoptózy a proteinu p27, jelikož mikroskopická pozorování naznačovala možné odumírání buněk. V případě látky **5815** je možno tuto šmouhu jako typický znak sledovat od 500 nM koncentrace. Jako účinnější se pak jeví látka **7359**, u níž je možno tento nárůst sledovat již od koncentrace 250 nM.

Zablokování proteasomu je provázeno také zvýšenou stabilitou méně stabilních proteinů, je například protein p27. Protein p27 je důležitým regulátorem buněčného cyklu, kde řídí postup z G1 do S-fáze (Drexler 2003). Jedná se o inhibitor cyklin-dependentních kináz (CDK), který blokuje její aktivitu v G0 a časně G1 fázi. Má-li se buňka začít dělit, je nutno hladiny proteinu p27

snížit. K tomuto účelu slouží ubikvitin-proteasomální systém, jenž zajistí degradaci tohoto proteinu, nebo dochází k zablokování importu p27 do jádra a ten zůstane v cytoplazmě v inaktivovaném stavu (Liang *et al.* 2002) Apoptóza vyvolaná proteasomálními inhibitory bývá obecně doprovázena akumulací p27 (Drexler 2003). Akumulace p27 byla sledována například po použití bortezomibu, inhibitorů MG132, MG115, či haptapeptidových derivátů argyriu A a argyriu F (Drexler 2003, Fan *et al.* 2001, Kim *et al.* 2003, Robak a Robak 2019, Brown 2008). Z testovaných látek byla akumulace proteinu p27 byla pozorována u látky **5815** při nejvyšší testované koncentraci (1000 nM), zatím co u látky **7359** docházelo k akumulaci p27 již od koncentrace 250 nM. Efekt látky **5815** na akumulaci proteinu p27 byl již popsán, i když již při nižší koncentraci (Jorda *et al.* 2017). Dle předpokladu bylo zvýšené hladiny tohoto proteinu možno sledovat také v lyzátech buněk ovlivněných bortezomibem a carfilzomibem.

Běžným markerem probíhající apoptózy je specifická fragmentace proteinu PARP. Jedná se o jaderný enzym zahrnutý do oprav DNA při jejím poškození (Li, Darzynkiewicz 2000). Specifické štěpení tohoto proteinu, ke kterému dochází v časně apoptóze kaspázou 3, vede ke vzniku dvou fragmentů o velikosti 89 kDa a 24 kDa. Přítomnost těchto fragmentů je považována za jeden z hlavních znaků probíhající apoptózy. Fragment o velikosti 89 kDa byl detekován v lyzátech buněk ovlivněných látkami **5815** a **7359** již od koncentrací 250 nM a s rostoucí koncentrací je patrný další nárůst intenzity tohoto fragmentu. Lze tedy předpokládat, že v těchto buňkách dochází k apoptóze. Akumulace proteinu PARP byla u látky **5815** v koncentraci 250 nM opět již popsána (Jorda *et al.* 2017).

Kaspázy 3 a 7 patří mezi takzvané efektorové kaspázy, jež jsou po aktivaci zodpovědné za charakteristické morfologické změny, zahrnující například smršťování buněk, tvorbu apoptotických tělísek a fragmentaci chromosomální DNA (Van Opdenbosch, Lamkanfi 2019). Zvýšená aktivita kaspáz 3 a 7 byla potvrzena v lyzátech buněk ovlivněných látkami **5815** a **7359**, přičemž jako účinnější se jevila látka **7359**, kde byl nárůst aktivity patrný již při nejnižší testované koncentraci (250 nM), zatím co u látky **5815** docházelo k nárůstu aktivity až při 500nM koncentraci. Tento test tedy opět potvrdil proapoptické vlastnosti těchto látek. Aktivace kaspáz 3/7 byla v souvislosti s proteasomální inhibicí popsána také u dalších proteasomálních inhibitorů, mezi něž patří například bortezomib, carfilzomib, MG132 a lactacystin (Ludwig *et al.* 2005, Parlati *et al.* 2009, Fan *et al.* 2001, Wagenknecht *et al.* 2000, Almond *et al.* 2001)

## 5 Závěr

Několika různými metodami byl sledován vliv látek **5815**, **7357** a **7359** na buněčné linie U2OS, U2OS-PI-GFP a U266. Těmito pozorováními byl odhalen vliv látek **5815** a **7359** na proteasom a indukci apoptózy. Z dosažených výsledků vyplývá, že látky **5815** a **7359** vykazují inhibiční účinek vůči proteasomu, a to především vůči jeho podjednotce s chymotrypsinovou aktivitou, což bývá společnou vlastností většiny proteasomálních inhibitorů (Cromm a Crews 2017). Zároveň byly nezávislými experimenty potvrzeny proapoptotické vlastnosti těchto látek. Jakožto účinnější se jevil nově syntetizovaný derivát **7359**, který vykazoval lepší inhibiční účinky na proteasom a lepší proapoptotické vlastnosti než látka **5815**.

## 6 Zdroje

Adams, J. (2003). The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treatment Reviews*, 29, 3–9.

Adams, J. (2004). The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell*, 5(5), 417–421.

Akutsu, M., Dikic, I., Bremm, A. (2016). Ubiquitin chain diversity at a glance. *Journal of Cell Science*, 129(5), 875–880.

Almond, J. B., Snowden, R. T., Hunter, A., Dinsdale, D., Cain, K., Cohen, G. M. (2001). Proteasome inhibitor-induced apoptosis of B-chronic lymphocytic leukaemia cells involves cytochrome c release and caspase activation, accompanied by formation of an ~700 kDa Apaf-1 containing apoptosome complex. *Leukemia*, 15(9), 1388–1397.

Bahrudin, U., Unno, M., Nishio, K., Kita, A., Li, P., Kato, M., Inoue, M., Tsujitani, S., Murakami, T., Sugiyama, R., Saeki, Y., Obara, Y., Tanaka, K., Yamaguchi, H., Sakane, I., Kawata, Y., Itoh, T., Ninomiya, H., Hisatome, I., Morimoto, Y. (2017). Inhibitory effects of local anesthetics on the proteasome and their biological actions. *Scientific Reports*, 7(1), 1–9.

Bard, J. A. M., Goodall, E. A., Greene, E. R., Jonsson, E., Dong, K. C., Martin, A. (2018). Structure and Function of the 26S Proteasome, 87, 697-724.

Bedford, L., Paine, S., Sheppard, P. W., Mayer, R. J., Roelofs, J. (2010). Assembly, structure, and function of the 26S proteasome. *Trends in Cell Biology*, 20, 391–401.

Ben-Nissan, G., Sharon, M. (2014). Regulating the 20S proteasome ubiquitin-independent degradation pathway. *Biomolecules*, 4, 862–884.

Borissenko, L., Groll, M. (2007). 20S Proteasome and Its Inhibitors: Crystallographic Knowledge for Drug Development.

Brigle, K., Rogers, B. (2017). Pathobiology and Diagnosis of Multiple Myeloma. *Seminars in Oncology Nursing*, 33, 225–236.

Brown, T. (2008). Deisign thinking. *Harvard Business Review*, 86(6), 84–92.

Budenholzer, L., Cheng, C. L., Li, Y., Hochstrasser, M. (2017). Proteasome Structure and Assembly. *Journal of Molecular Biology*, 429(22), 3500–3524.

Burger, A. M., Seth, A. K. (2004). The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications. *European Journal of Cancer*, 40(15), 2217–2229.

Cejalvo, M. J., De La Rubia, J. (2015). Clinical treatment of newly diagnosed multiple myeloma. *Expert Review of Hematology*, 8(5), 595–611.

Cengiz Seval, G., Beksac, M. (2018). The safety of bortezomib for the treatment of multiple myeloma. *Expert Opinion on Drug Safety*, 17(9), 953–962.

Clague, M. J., Urbé, S. (2010, November 24). Ubiquitin: Same molecule, different degradation pathways. *Cell*, 143, 682–685.

Collins, G. A., Goldberg, A. L. (2017). Leading Edge The Logic of the 26S Proteasome. *Cell*, 169(5), 792–806.

Cromm, P. M., Crews, C. M. (2017). The Proteasome in Modern Drug Discovery: Second Life of a Highly Valuable Drug Target. *ACS Central Science*, 3(8), 830–838.

Dahlmann, B. (2016, February 1). Mammalian proteasome subtypes: Their diversity in structure and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 591, 132–140.

Dalton, W. S., Bergsagel, P. L., Kuehl, W. M., Anderson, K. C., Harousseau, J. L. (2001). Multiple myeloma. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology*. American Society of Hematology. Education Program, 157–177.

DeMartino, G. N., Gillette, T. G. (2007, May 18). Proteasomes: Machines for All Reasons. *Cell*, 129, 659–662.

Di Giovanni, C., Ettari, R., Sarno, S., Rotondo, A., Bitto, A., Squadrito, F., Altavilla, D., Schirmeister, T., Novellino, E., Grasso, S., Zappalà, M., Altavilla, D., Schirmeister, T., Novellino, E., Grasso, S., Zappalà, M., Lavecchia, A. (2016). Identification of noncovalent proteasome inhibitors with high selectivity for chymotrypsin-like activity by a multistep structure-based virtual screening. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 121, 578–591.

Drexler, H. C. (2003). The Role of p27 Kip1 in Proteasome Inhibitor Induced Apoptosis. *Cell Cycle* (October), 438–441.

Durairaj, G., Kaiser, P. (2014). The 26S proteasome and initiation of gene transcription. *Biomolecules*, 4, 827–847.

Ehlinger, A., Walters, K. J. (2013). Structural insights into proteasome activation by the 19S regulatory particle. *Biochemistry*, 52(21), 3618–3628.

Eskandari, S. K., Seelen, M. A. J., Lin, G., Azzi, J. R. (2017). The immunoproteasome: An old player with a novel and emerging role in alloimmunity. *American Journal of Transplantation*, 17(12), 3033–3039.



Fan, X. M., Wong, B. C. Y., Wang, W. P., Zhou, X. M., Cho, C. H., Yuen, S. T., Leung, S. Y., Lin, M. C., Kung, H. F., Lam, S. K. (2001). Inhibition of proteasome function induced apoptosis in gastric cancer. *International Journal of Cancer*, 93(4), 481–488.

Ferdous, A., Kodadek, T., Johnston, S. A. (2002). A nonproteolytic function of the 19S regulatory subunit of the 26S proteasome is required for efficient activated transcription by human RNA polymerase II. *Biochemistry*, 41(42), 12798–12805.

Fonseca, R., Bergsagel, P. L., Drach, J., Shaughnessy, J., Gutierrez, N., Stewart, A. K., Morgan, G., Van Ness, B., Chesi, M., Minvielle, S., Neri, A., Barlogie, B., Kuehl, W. M., Liebisch, P., Davies, F., Chen-Kiang, S., Durie, B. G., Carrasco, R., Sezer, O., Reiman, T., Pilarski, L., Avet-Loiseau, H. (2009). International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: Spotlight review. *Leukemia*, 23, 2210–2221.

Frankland-Searby, S., Bhaumik, S. R. (2012). The 26S proteasome complex: An attractive target for cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1825(1), 64–76.

Gentile, M., Recchia, A. G., Mazzone, C., Lucia, E., Vigna, E., Morabito, F. (2013). Perspectives in the treatment of multiple myeloma. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 13(SUPPL.1), 1–22.

Gerecke, C., Fuhrmann, S., Striffler, S., Schmidt-Hieber, M., Einsele, H., Knop, S. (2016) The Diagnosis and Treatment of Multiple Myeloma. *Dtsch Arztebl Int.* 113, 470–6.

Goldberg, A. L. (2012). Development of proteasome inhibitors as research tools and cancer drugs. *Journal of Cell Biology*, 199(4), 583–588.

Groen, K., Van de Donk, N. W. C. J., Stege, C. A. M., Zweegman, S., Nijhof, I. S. (2019). Carfilzomib for relapsed and refractory multiple myeloma. *Cancer Management and Research*, 11, 2663–2675.

Groll, M., Korotkov, V. S., Huber, E. M., De Meijere, A., Ludwig, A. (2015). A Minimal  $\beta$ -Lactone Fragment for Selective  $\beta$ 5c or  $\beta$ 5i Proteasome Inhibitors. *Angewandte Chemie - International Edition*, 54(27), 7810–7814.

Guo, H. M., Sun, L., Yang, L., Liu, X. J., Nie, Z. Y., Luo, J. M. (2018). Microvesicles shed from bortezomib-treated or lenalidomide-treated human myeloma cells inhibit angiogenesis in vitro. *Oncology Reports*, 39(6), 2873–2880.

Hájek R, Krejčí M, Pour L, Adam Z. (2011). Multiple Myeloma Mnohočetný myelom. In *Klin Onkol* (24).

Hideshima, T., Mitsiades, C., Akiyama, M., Hayashi, T., Chauhan, D., Richardson, P., Schlossman, R., Podar, K., Munshi, N.C., Mitsiades, N., Anderson, K. C. (2003). Molecular mechanisms mediating antitumor activity of proteasome inhibitor PS-341. *Blood*, 101(4), 1530–1534.

Hwang, J., Winkler, L., Kalejta, R. F. (2011). Ubiquitin-independent proteasomal degradation during oncogenic viral infections. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1816, 147–157.

Chari, A. (2010). Proteasome inhibition and its therapeutic potential in multiple myeloma. *Biologics: Targets & Therapy*, 4, 273.

Chen, Z. J., Sun, L. J. (2009, February 13). Nonproteolytic Functions of Ubiquitin in Cell Signaling. *Molecular Cell*, 33, 275–286.

Chng, W. J., Dispenzieri, A., Chim, C. S., Fonseca, R., Goldschmidt, H., Lentzsch, S., Munshi, N., Palumbo, A., Miguel, J.S., Sonneveld, P., Cavo, M., Usmani, S., Durie, B.G., Avet-Loiseau, H. (2014, February 26). IMWG consensus on risk stratification in multiple myeloma. *Leukemia*, 28, 269–277.

Chou, T. (2012). Multiple myeloma : recent progress in diagnosis and treatment. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology : JCEH*, 52(3), 149–159.

Imramovský, 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 of Medicinal Chemistry*, 68, 253–259.

Jorda, R., Dušek, J., Řezníčková, E., Pauk, K., Magar, P. P., Imramovský, A., Kryštof, V. (2017). Synthesis and antiproteasomal activity of novel O-benzyl salicylamide-based inhibitors built from leucine and phenylalanine. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 135, 142–158.

Jorda, R., Magar, P., Hendrychová, D., Pauk, K., Dibuš, M., Pilařová, E., Imramovský, A., Kryštof, V. (2020). Novel modified leucine and phenylalanine dipeptides modulate viability and attachment of cancer cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 188, 112036.

Kim, K. B., Crews, C. M. (2013). From epoxomicin to carfilzomib: Chemistry, biology, and medical outcomes. *Natural Product Reports*, 30(5), 600–604.

Kim, S. C., Rho, M. C., Lee, H. S., Kim, Y. K., Kim, K. (2003). Caspase-3-dependent apoptosis in vascular smooth muscle cell by proteasome inhibition. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 42(4), 554–560.

- Komander, D., Rape, M. (2012). The Ubiquitin Code. *Annual Review of Biochemistry*, 81(1), 203–229.
- Kortuem, K. M., Stewart, A. K. (2013). Carfilzomib. *Blood*, 121, 893–897.
- Kudriaeva, A. A., Belogurov, A. A. (2019, January 1). Proteasome: a Nanomachinery of Creative Destruction. *Biochemistry (Moscow)*, 84, 159–192.
- Kyle, R. A., Vincent Rajkumar, S. (2004). Multiple Myeloma. In *N Engl J Med* (18).
- Laubach, J., Richardson, P., Anderson, K. (2011). Multiple Myeloma. *Annual Review of Medicine*, 62(1), 249–264.
- Lei, M., Feng, H., Bai, E., Zhou, H., Wang, J., Shi, J., Wang, X., Hu, S., Liu, Z., Zhu, Y. (2018). Design, synthesis, in vitro and in vivo evaluation, and structure-activity relationship (SAR) discussion of novel dipeptidyl boronic acid proteasome inhibitors as orally available anti-cancer agents for the treatment of multiple myeloma and mechanism studies. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 26(14), 3975–3981.
- Li, X., Darzynkiewicz, Z. (2000). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase measured in situ in individual cells: Relationship to DNA fragmentation and cell cycle position during apoptosis. *Experimental Cell Research*, 255(1), 125–132.
- Li, X., Elmira, E., Rohondia, S., Wang, J., Liu, J., Dou, Q. P. (2018). A patent review of the ubiquitin ligase system: 2015–2018. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 28(12), 919–937.
- Liang, J., Zubovitz, J., Petrocelli, T., Kotchetkov, R., Connor, M. K., Han, K., Lee, J.H., Ciarallo, S., Catzavelos, C., Beniston, R., Franssen, E., Slingerland, J. M. (2002). PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nature Medicine*, 8(10), 1153–1160.
- Ludwig, H., Khayat, D., Giaccone, G., Facon, T. (2005). Proteasome inhibition and its clinical prospects in the treatment of hematologic and solid malignancies. *Cancer*, 104(9), 1794–1807.
- Manasanch, E. E., Orlowski, R. Z. (2017). Proteasome Inhibitors in Cancer Therapy HHS Public Access. *Nat Rev Clin Oncol*, 14(7), 417–433.
- Martin, T., Huff, C. A. (2019, May 1). Multiple Myeloma: Current Advances and Future Directions. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, 19, 255–263.
- Mehta, A. (2015). Multiple myeloma. *Hematology*, 20(1), 58–59.

Moreau, P., Richardson, P. G., Cavo, M., Orłowski, R. Z., San Miguel, J. F., Palumbo, A., Harousseau, J. L. (2012). Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 Years later. *Blood*, 120, 947–959.

Morgan, G. J., Walker, B. A., Davies, F. E. (2012, May). The genetic architecture of multiple myeloma. *Nature Reviews Cancer*, 12, 335–348.

Myung, J., Kim, K. B., Crews, C. M. (2001). The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, 21(4), 245–273. Retrieved from

Ōmura, S., Crump, A. (2019). Lactacystin: first-in-class proteasome inhibitor still excelling and an exemplar for future antibiotic research. *Journal of Antibiotics*, 72, 189–201.

Orłowski, M., Wilk, S. (2003). Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 415, 1–5.

Palumbo, A., Rajkumar, S. V., San Miguel, J. F., Larocca, A., Niesvizky, R., Morgan, G., Landgren, O., Hajek, R., Einsele, H., Anderson, K.C., Dimopoulos, M.A., Richardson, P.G., Cavo, M., Spencer, A., Stewart, A.K., Shimizu, K., Lonial, S., Sonneveld, P., Durie, B.G., Moreau, P., Orłowski, R.Z. (2014). International Myeloma Working Group consensus statement for the management, treatment, and supportive care of patients with myeloma not eligible for standard autologous stem-cell transplantation. *Journal of Clinical Oncology*, 32(6), 587–600.

Park, J. E., Miller, Z., Jun, Y., Lee, W., Kim, K. B. (2018, August 1). Next-generation proteasome inhibitors for cancer therapy. *Translational Research*, 198, 1–16.

Parlati, F., Lee, S. J., Aujay, M., Suzuki, E., Levitsky, K., Lorens, J. B., Micklem, D.R., Ruurs, P., Sylvain, C., Lu, Y., Shenk, K.D., Bennett, M. K. (2009). Carfilzomib can induce tumor cell death through selective inhibition of the chymotrypsin-like activity of the proteasome. *Blood*, 114(16), 3439–3447.

Pautasso, C., Brinthen, S., Cerrato, C., Magarotto, V., Palumbo, A. (2013). The mechanism of action, pharmacokinetics, and clinical efficacy of carfilzomib for the treatment of multiple myeloma. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 9(10), 1371–1379.

Pertesi, M., Went, M., Hansson, M., Hemminki, K., Houlston, R. S., Nilsson, B. (2020). Genetic predisposition for multiple myeloma. *Leukemia*.

Poulaki, V., Mitsiades, C. S., Kotoula, V., Negri, J., McMillin, D., Miller, J. W., Mitsiades, N. (2007). The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in human retinoblastoma cell lines in vitro. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(10), 4706–4719.

Raab, M. S., Podar, K., Breitkreutz, I., Richardson, P. G., Anderson, K. C. (2009). Multiple myeloma. *The Lancet*, 374, 324–339.

Rajkumar, S. V. (2016<sup>a</sup>). Updated Diagnostic Criteria and Staging System for Multiple Myeloma. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 36, e418–e423.

Rajkumar, S. V. (2016<sup>b</sup>). Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American Journal of Hematology*, 91(7), 719–734.

Rajkumar, S. V. (2019). Multiple myeloma: Every year a new standard? *Hematological Oncology*, 37(S1), 62–65.

Reed, S. H., Gillette, T. G. (2007). Nucleotide excision repair and the ubiquitin proteasome pathway-Do all roads lead to Rome? *DNA Repair*, 6, 149–156.

Robak, P., Robak, T. (2019). Bortezomib for the Treatment of Hematologic Malignancies: 15 Years Later. *Drugs in R and D*, 19, 73–92.

Roccaro, A. M., Hideshima, T., Raje, N., Kumar, S., Ishitsuka, K., Yasui, H., Shiraishi, N., Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., Dammacco, F., Richardson, P.G., Anderson, K. C. (2006). Bortezomib mediates antiangiogenesis in multiple myeloma via direct and indirect effects on endothelial cells. *Cancer Research*, 66(1), 184–191.

Röllig, C., Knop, S., Bornhäuser, M. (2015). Multiple myeloma. *The Lancet*, 385(9983), 2197–2208.

Roos-Mattjus, P., Sistonen, L. (2004). The ubiquitin-proteasome pathway. *Annals of Medicine*, 36(4), 285–295.

Rousseau, A., Bertolotti, A. (2018). Regulation of proteasome assembly and activity in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19, 697–712.

Sánchez-Lanzas, R., Castaño, J. G. (2014). Proteins directly interacting with mammalian 20S proteasomal subunits and ubiquitin-independent proteasomal degradation. *Biomolecules*, 4, 1140–1154.

Shank, B. R., Brown, V. T., Schwartz, R. N. (2015, February 8). Multiple myeloma maintenance therapy: A review of the pharmacologic treatment. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 21, 36–51.

Sharon, M., Taverner, T., Ambroggio, X. I., Deshaies, R. J., Robinson, C. V. (2006). Structural Organization of the 19S Proteasome Lid: Insights from MS of Intact Complexes. *PLoS Biology*, 4(8), 267.

Sorokin, A. V., Kim, E. R., Ovchinnikov, L. P. (2009). Proteasome system of protein degradation and processing. *Biochemistry (Moscow)*, 74(13), 1411–1442.

Tello-Aburto, R., Hallada, L. P., Niroula, D., Rogelj, S. (2015). Total synthesis and absolute stereochemistry of the proteasome inhibitors cystargolides A and B. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 13(40), 10127–10130.

Tsukamoto, S., Yokosawa, H. (2009). Targeting the proteasome pathway. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 13(5), 605–621.

Van Opdenbosch, N., Lamkanfi, M. (2019). Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity*, 50(6), 1352–1364.

Wagenknecht, B., Hermisson, M., Groscurth, P., Liston, P., Krammer, P. H., Weller, M. (2000). Proteasome inhibitor-induced apoptosis of glioma cells involves the processing of multiple caspases and cytochrome c release. *Journal of Neurochemistry*, 75(6), 2288–2297.

Wang, Y., Le W. D. (2019). *Autophagy: Biology and Diseases, Basic Science*. Springer Nature, Singapore. ISBN 978-981-15-0602-4.

Wang, X., Zhang, Z., Yao, C. (2012). Bortezomib inhibits the angiogenesis mediated by mesenchymal stem cells. *Cancer Investigation*, 30(9), 657–662.

Yang, L., Wang, W., Sun, Q., Xu, F., Niu, Y., Wang, C., ... Xu, P. (2016). Development of novel proteasome inhibitors based on phthalazinone scaffold. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 26(12), 2801–2805.

Yoshida, T., Ri, M., Kanamori, T., Aoki, S., Ashour, R., Kinoshita, S., Narita, T., Totani, H., Masaki, A., Ito, A., Kusumoto, S., Ishida, T., Komatsu, H., Kitahata, S., Chiba, T., Ichikawa, S., Iida, S. (2018). Potent anti-tumor activity of a syringolin analog in multiple myeloma: A dual inhibitor of proteasome activity targeting  $\beta 2$  and  $\beta 5$  subunits. *Oncotarget*, 9(11), 9975–9991.

Yu, J., Liu, J., Li, D., Xu, L., Hong, D., Chang, S., Xu, L., Li J., Liu, T., Zhou, Y. (2019). Exploration of novel macrocyclic dipeptide N-benzyl amides as proteasome inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 164, 423–439.

Zhang, X., Adwal, A., Turner, A. G., Callen, D. F., Abell, A. D. (2016). New Peptidomimetic Boronates for Selective Inhibition of the Chymotrypsin-like Activity of the 26S Proteasome. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 7(12), 1039–1043.

Zheng, N., Shabek, N. (2017). Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation. *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), 129–157.

## 6.1 Internetové zdroje

Informovanost o druhé nejčastější rakovině krve je mizivá: Vyhlášení národního dne myelomu - nemoci objevené před 130 lety v Praze, která rozkládá kosti zevnitř. In: Česká myelomová skupina [online]. Česká Republika, 22.3.2017 [cit. 2020-05-11]. Dostupné z: <https://www.myeloma.cz/index.php?pg=aktuality&aid=187>

What is Multiple Myeloma?: Multiple myeloma basics. In: Multiple Myeloma Research Foundation [online]. Norwalk [cit. 2020-05-11]. Dostupné z: <https://themmrf.org/multiple-myeloma/what-is-multiple-myeloma/>

Treatment Options: Supportive care. In: Multiple Myeloma Research Foundation [online]. Norwalk [cit. 2020-05-11]. Dostupné z: <https://themmrf.org/multiple-myeloma/treatment-options/supportive-care/>

## 7 Použité zkratky

Ac-DEVD-AMC	Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp7-amido-4-methylkumarin
Ac-DEVD-CHO	N-acetyl-L- $\alpha$ -aspartyl-L- $\alpha$ -glutamyl-N-(2-carboxyl-1-formylethyl)-L-valinamid
APS	Peroxodisíran amonný
BSA	Hovězí sérový albumin
Bz-VGR-AMC	Benzoyl-Val-Gly-Arg-(7-amido-4-methylkumarin
CRAB	Soubor kritérií popisující poškození orgánů související s myelomem
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DTT	Dithiothreitol
E1	Ubikvitin-aktivující enzym
E2	Ubikvitin konjugující enzym
E3	Ubikvitin ligáza
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
EGTA	Ethylenglykoltetraoctová kyselina
Fas	Fas receptor smrti na buněčném povrchu
FGFR3/MMSET	Receptor pro fibroblastový růstový faktor 3/ SET doména mnohočetného myelomu
GFP	Zelený fluorescenční protein
HbXY	(Hb: hydrofóbní; Y: tyrosin nebo fenylalanin; X: jakákoliv aminokyselina)
HECT	Homologní na E6-asociovaný protein karboxylový konec
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HLA	Hlavní histokompatibilní komplex
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát hydrát
IC50	Koncentrace při které byla aktivita proteasomální podjednotky 50%
IgA	Imunoglobulin třídy A
IgG	Imunoglobulin třídy G
IgH	Těžký řetězec imunoglobulinů
MAF	Transkripční faktor Maf
MAFB	Transkripční faktor MafB
MGUS	Monoklonální gamapatie neurčeného významu
miRNA	mikroRNA
MM	Mnohočetný myelom
NK	Přírozeně zabíjející "naturall killers"
N-Suc-LLVY-AMC	N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4-methylkumarin
PBS	Fosfátový pufr



PIPES	1,4-Piperazindiethansulfonová kyselina
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
Rpn	Non-ATPázová podjednotka proteasomu
Rpt	AAA-ATPázová podjednotka 26S proteasomu
SDS	dodecylsírán sodný
Sem1	Sem 1 podjednotka 26S proteasomu
SRC-3	Koaktivátor jaderný receptor 3
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Ubp6	Ubikvitin C-terminální hydroláza
UCH37	Ubikvitin C-terminální hydroláza
UHL5	Ubikvitin C-terminální hydroláza
UPS	Ubikvitin-proteasomální systém
USP14	Ubikvitin C-terminální hydroláza
Wnt	Signální dráha "Wingless-Type MMTV Integration Site Family"
Z-GGR-AMC	Z-Gly-Gly-Arg-(7-amido-4-methylkumarin)
Z-LLE-AMC	Z-Leu-Leu-Glu-7-amido-4-methylkumarin

## 8 Přílohy

### Příloha A: CD

Video 1: Exprese GFP fúzovaného s degonem v čase (1-48 hodin) v buněčné linii U2OS-PI-GFP, kontrolní buňky Zvětšeno 4x.

Video 2: Vliv látky **5815** při koncentraci 0,625  $\mu\text{M}$  na expresi GFP fúzovaného s degonem v čase (1-48 hodin) v buněčné linii U2OS-PI-GFP. Zvětšeno 4x.

Video 3: Vliv látky **5815** při koncentraci 1,25  $\mu\text{M}$  na expresi GFP fúzovaného s degonem v čase (1-48 hodin) v buněčné linii U2OS-PI-GFP. Zvětšeno 4x.

Video 4: Vliv látky **5815** při koncentraci 2,5  $\mu\text{M}$  na expresi GFP fúzovaného s degonem v čase (1-48 hodin) v buněčné linii U2OS-PI-GFP. Zvětšeno 4x.

Video 5: Vliv látky **5815** při koncentraci 5  $\mu\text{M}$  na expresi GFP fúzovaného s degonem v čase (1-48 hodin) v buněčné linii U2OS-PI-GFP. Zvětšeno 4x.

Video 6: Vliv látky **5815** při koncentraci 10  $\mu\text{M}$  na expresi GFP fúzovaného s degonem v čase (1-48 hodin) v buněčné linii U2OS-PI-GFP. Zvětšeno 4x.

Video 7: Vliv látky **7357** při koncentraci 0,625  $\mu\text{M}$  na expresi GFP fúzovaného s degonem v čase (1-48 hodin) v buněčné linii U2OS-PI-GFP. Zvětšeno 4x.

Video 8: Vliv látky **7357** při koncentraci 1,25  $\mu\text{M}$  na expresi GFP fúzovaného s degonem v čase (1-48 hodin) v buněčné linii U2OS-PI-GFP. Zvětšeno 4x.

Video 9: Vliv látky **7357** při koncentraci 2,5  $\mu\text{M}$  na expresi GFP fúzovaného s degonem v čase (1-48 hodin) v buněčné linii U2OS-PI-GFP. Zvětšeno 4x.

Video 10: Vliv látky **7357** při koncentraci 5  $\mu\text{M}$  na expresi GFP fúzovaného s degonem v čase (1-48 hodin) v buněčné linii U2OS-PI-GFP. Zvětšeno 4x.

Video 11: Vliv látky **7357** při koncentraci 10  $\mu\text{M}$  na expresi GFP fúzovaného s degonem v čase (1-48 hodin) v buněčné linii U2OS-PI-GFP. Zvětšeno 4x.

Video 12: Vliv látky **7359** při koncentraci 0,625  $\mu\text{M}$  na expresi GFP fúzovaného s degonem v čase (1-48 hodin) v buněčné linii U2OS-PI-GFP. Zvětšeno 4x.

Video 13: Vliv látky **7359** při koncentraci 1,25  $\mu\text{M}$  na expresi GFP fúzovaného s degonem v čase (1-48 hodin) v buněčné linii U2OS-PI-GFP. Zvětšeno 4x.

Video 14: Vliv látky **7359** při koncentraci 2,5  $\mu\text{M}$  na expresi GFP fúzovaného s degonem v čase (1-48 hodin) v buněčné linii U2OS-PI-GFP. Zvětšeno 4x.

Video 15: Vliv látky **7359** při koncentraci 5  $\mu\text{M}$  na expresi GFP fúzovaného s degronem v čase (1-48 hodin) v buněčné linii U2OS-PI-GFP. Zvětšeno 4x.

Video 16: Vliv látky **7359** při koncentraci 10  $\mu\text{M}$  na expresi GFP fúzovaného s degronem v čase (1-48 hodin) v buněčné linii U2OS-PI-GFP. Zvětšeno 4x.