

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2014

Kateřina Škarabellová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Lentivirové reportérové systémy jako nástroj
pro testování účinku potenciálních
protinádorových léčiv *in vitro***

Bakalářská práce

Kateřina Škarabellová

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2014

Vedoucí práce: Mgr. Ivo Frydrych, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s pomocí vedoucího práce Mgr. Iva Frydrycha, Ph.D. a za použití níže citovaných literárních zdrojů.

V Olomouci

Podpis

Souhrn

Transfekce patří již více než čtyři desetiletí k populárním výzkumným nástrojům pro objasňování genové struktury, regulace a funkce. K vložení cizorodé nukleové kyseliny do buňky lze obecně využít metody biochemické, fyzikální nebo biologické. Z posledně jmenovaných se velké oblibě těší především využití lentivirových vektorů. Tyto vektory se konstruují tak, aby se eliminovala rizika (inzerční mutageneze, onkogeneze) spojená s životním cyklem lentivirů a manipulace s nimi je pak zcela bezpečná. Jednou z řady možností využití lentivirových vektorů je studium buněčné signalizace. V tomto ohledu jsou běžně komerčně dostupné různé systémy umožňující monitoring různorodých signálních drah v buňce. Pro tyto účely jsou lentivirové vektory navrženy a konstruovány tak, že umožňují studium aktivace/inhibice klíčového transkripčního faktoru dané signální dráhy v buňce, kvantitativně měřitelnou prostřednictvím signálu reportéru, nejčastěji světluškové luciferázy. Úspěšné vpravení takto navržených vektorů do buňky umožňuje studovat mechanismus působení různých nízkomolekulárních látek či ligandů. V této práci jsem využila komerčně dostupný lentivirový vektor kódující inducibilní AP-1 (proteinový aktivátor 1) responsivní konstrukt exprimující luciferázu, který byl transdukován do linie potkaního glioblastomu za účelem monitoringu signální dráhy MAPK/JNK (mitogenem aktivovaná protein kináza/c-Jun N-terminální kináza). Tato dráha představuje jeden z downstream cílů RAGE (receptor for advanced glycation end product) signalizace. Na připravené senzorké buněčné linii byl testován účinek vybraných derivátů pyrimidinu jako potenciálních RAGE inhibitorů. RAGE receptor a jeho signalizace jsou zapojeny do patogeneze některých závažných onemocnění. Až na výjimky bývá exprese RAGE při těchto onemocněních zvýšená a proto představuje tento receptor zajímavý terapeutický cíl.

Summary

Transfection is a popular research tool for clarifying structure, regulation and function of genes. For insertion of foreign nucleic acid into a cell we can use biochemical, physical or biological methods. Very popular is the use of lentiviral vectors. These vectors are designed to eliminate risks associated with the life cycle of lentiviruses (insertional mutagenesis, oncogenesis), so the manipulation is completely safe. One of the many possibilities of using lentiviral vectors is the study of cell signaling. Currently, there are various commercially available systems, which enable monitoring of signal pathways in the cell. For these purposes, lentiviral vectors are designed and constructed to enable the study of activation or inhibition of a key transcription factor of the signaling pathway in the cell, which is quantitatively measurable through the signal of a reporter (mostly firefly luciferase). Successful insertion of these vectors into the cell allows us to study the mechanism of action of various small molecules or ligands. In this bachelor's thesis, I used commercially available lentiviral vector, which encodes inducible AP-1 (protein activator 1) responsive construct expressing the luciferase. This vector was transduced into rat glioblastoma cell line for monitoring of the MAPK/JNK (mitogen-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase) signaling pathway. This signaling pathway is a downstream target of the receptor RAGE (receptor for advanced glycation end products) signalization. The effect of two pyrimidine derivatives as potential RAGE inhibitors was tested on a prepared sensory cell line. RAGE and its signalization are involved in pathogenesis of some serious diseases. With a few exceptions, the expression of this receptor is increased during these diseases, so it is an interesting therapeutic target.

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala především svému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Ivovi Frydrychovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady během vypracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat zaměstnancům Laboratoře experimentální medicíny při Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské Fakulty v Olomouci, zejména Mgr. Jiřímu Řehulkovi a Renatě Buriánové, za pomoc při práci v laboratoři.

Infrastrukturální část projektu (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena Operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030)

Obsah

1. Úvod	8
2. Literární přehled	9
2.1 Transfekce	9
2.1.1 Fyzikální metody	9
2.1.2 Chemické metody	10
2.1.3 Virální metody	10
2.1.3.1 Lentivirové vektory	11
2.2 Reportérové geny a gene reporter assays	13
2.3 RAGE	15
2.3.1 Struktura a vlastnosti RAGE	15
2.3.2 RAGE a jeho ligandy	16
2.3.3 RAGE signalizace	18
2.3.3.1 MAPK/JNK signální dráha	18
2.3.4 Fyziologická funkce RAGE	21
2.3.5 Úloha RAGE v patogenezi onemocnění	22
2.3.5.1 Alzheimerova nemoc	22
2.3.5.2 Kardiovaskulární onemocnění	23
2.3.5.3 <i>Diabetes mellitus</i>	24
2.3.5.4 RAGE a nádorová onemocnění	24
2.3.6 RAGE jako potenciální terapeutický cíl	28
2.3.7 Inhibitory RAGE	29
2.3.7.1 Proteinové inhibitory RAGE	29
2.3.7.2 Nízkomolekulární inhibitory RAGE	30
3. Cíl práce	33
4. Materiál a metody	34
4.1 Použitý biologický materiál	34
4.2 Testované látky	35
4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení	36
4.4 Seznam použitých chemikálií	37
4.5 Seznam použitých roztoků	38
4.6 Použité metody	39

4.6.1 Kultivace buněčných linií.....	39
4.6.2 Ověření exprese receptoru RAGE v C6 buňkách.....	41
4.6.3 Transdukce	44
4.6.4. Test citlivosti C6 buněk k puromycinu	48
4.6.5 Stanovení hodnoty IC50 testovaných látek využitím MTT testu.....	48
4.6.6 Validace klonů C6 buněk transdukovaných AP-1 reportérem.....	50
4.6.7 Studium potenciálního inhibičního vlivu vybraných derivátů pyrimidinu na signální dráhu MAPK/JNK.....	50
5. Výsledky.....	52
5.1 Ověření exprese receptoru RAGE v C6 buňkách	52
5.2 Ověření úspěšnosti transdukce.....	53
5.3 Vyhodnocení testu citlivosti C6 buněk k puromycinu.....	54
5.4 Vyhodnocení MTT testu.....	55
5.5 Vyhodnocení validace klonů odvozených z C6 buněk transdukovaných AP-1 reportérem.....	57
5.6 Vyhodnocení potenciálního inhibičního vlivu látek LEM814 a 815 na signální dráhu MAPK/JNK	65
6. Diskuze	71
7. Závěr.....	73
8. Literatura	74
9. Seznam zkratk.....	80

1. Úvod

Nádorová onemocnění tvoří i přes pokroky v léčbě a diagnostice jednu z nejčastějších příčin úmrtí. I když současná klinicky používaná protinádorová léčiva dosahují značných úspěchů, je žádoucí vyvíjet nová léčiva, která budou mít například jiný mechanismus účinku či budou vykazovat nižší cytotoxicitu.

Zajímavým terapeutickým cílem pro léčbu některých typů nádorů je receptor RAGE (receptor for advanced glycation end products). Tento receptor vázající široké spektrum ligandů a jeho downstream signalizace hrají důležitou roli v patogenezi nejen nádorových onemocnění, ale i jiných závažných civilizačních chorob jako je *diabetes mellitus*, kardiovaskulární či Alzheimerovo onemocnění. Exprese RAGE bývá v tkáních dospělého člověka až na výjimky potlačena, bylo však zjištěno, že právě jeho zvýšená exprese je spojována s patogenezi výše jmenovaných onemocnění. Downregulace či inhibice tohoto receptoru se tedy zdá být jednou z možností, jak zabránit například metastázi nádorových buněk nebo rozvoji Alzheimerova či jiných onemocnění. Mnohé studie se soustředí na navrzení nízkomolekulárních látek schopných inhibovat přímo RAGE nebo některou komponentu downstream signálních drah či vyvazovat jeho ligandy. Žádná z látek experimentálně ověřených jako RAGE inhibitory však dosud neprošla úspěšně mašinerií klinického testování. Jako nadějně inhibitory RAGE se jeví deriváty pyrimidinu, z nichž vybrané 4,5,6-trisubstituované-2-aminopyrimidiny byly testovány na senzoričké linii odvozené z buněk krysího glioblastomu v rámci experimentální části této bakalářské práce.

Účinnou metodou, pomocí které můžeme studovat mechanismus působení těchto inhibitorů v buňce je transfekce (nevirální metody), respektive transdukce (virální metody). Transfekce, tedy proces vložení cizorodé nukleové kyseliny do buňky je významným vědeckým nástrojem pro kontrolu regulace, exprese či funkce genů a objasnění mechanismu působení různých látek či ligandů v buňkách.

2. Literární přehled

2.1 Transfekce

Transfekce je proces vložení cizorodé nukleové kyseliny do buněk. Termín „transfekce“ se používá pro označení metod využívajících jiné než virové vektory, tedy syntetické vektory. Naopak metody využívající virové vektory označujeme termínem „transdukce“. Účinnost obou metod se odvíjí od úspěšnosti vpravení nukleové kyseliny do buňky a následně úspěšnosti její exprese. (Luo *et* Saltzman, 2000) Transfekce se provádí pomocí různých fyzikálních či chemických metod. Transfekce nám umožňuje studovat expresi genů, transkripční faktory, promotory, transkripci, translaci či interakci proteinů. (Groskreutz *et* Schenborn, 1999)

2.1.1 Fyzikální metody

Z fyzikálních metod jsou nejrozšířenější elektroporace, mikroinjekce a „genové dělo“. Patrně nejvyužívanější z výše jmenovaných metod je elektroporace. Jedná se o metodu, kdy za využití pulzů o vysokém napětí dochází k dočasné propustnosti plazmatické membrány a tím je dosaženo zvýšené absorpce makromolekul, včetně nukleových kyselin. Při této metodě dochází k vyšší úmrtnosti buněk a proto je potřeba použít vyšší množství buněk a také vyšší koncentraci nukleových kyselin než například u chemických metod. Další variantou je elektrická permeabilizace, která využívá ke zvýšení absorpce elektrické pulzy o nízkém napětí ale vysoké frekvenci. (Luo *et* Saltzman, 2000)

Částicové bombardování nebo-li „genové dělo“ je metoda, při které jsou mikročástice tvořené nukleovou kyselinou a kovem, např. zlatem, přenášeny vysokou rychlostí do mnoha buněk zároveň. Při takto vysoké rychlosti procházejí částice i buněčnou stěnou rostlin. Tato metoda nachází uplatnění v *in vivo* i *in vitro* aplikacích. (Luo *et* Saltzman, 2000; Yang *et al.*, 1990)

Jednoduchou mechanickou metodou je přímá injekce DNA do jádra, tzv. mikroinjekce, kdy lze však najednou transfekovat pouze 1 buňku a není tedy vhodná pro studie vyžadující velké množství transfekovaných buněk. Pro vpravení nukleové kyseliny do buňky se využívá velmi tenká jehla o průměru cca 0,5 – 5 μm . (Luo *et* Saltzman, 2000; Davis *et al.*, 2000)

2.1.2 Chemické metody

DEAE-dextran (diethylaminoethyl-dextran) a fosforečnan vápenatý byly jedny z prvních chemikálií použitých k přenosu nukleových kyselin do buněk. Interagují s DNA a tvoří tak komplexy, které se endocytózou dostávají do buňky. Mechanismus působení spočívá v neutralizaci negativního náboje DNA vedoucí k usnadnění transportu přes buněčnou membránu. Jedná se o jednoduchou, efektivní a nenákladnou metodu, která je stále používaná pro *in vitro* transfekci. Hlavní nevýhodou bránící využití pro *in vivo* experimenty je cytotoxicita. (Luo *et al.*, 2000) DEAE-dextran navíc inhibuje buněčný růst a indukuje heterogenní morfologické změny v buňce. (Guilick, 2001)

Komplexace DNA s liposomy, což jsou sférické vezikuly tvořené fosfolipidovou dvojrůstvou, je jedna z nejpoužívanějších metod DNA transferu, která byla použita i v klinických studiích. Velkým pokrokem pro využití liposomů k transfekci bylo vytvoření syntetického kationtového lipidu. Kationtová skupina lipidu interaguje s negativně nabitým fosfátem DNA a tvoří tak komplex. (Felgner *et al.*, 1987) Použití liposomů je efektivní, bezpečné a aplikovatelné *in vitro* i *in vivo*. (Luo *et al.*, 2000)

Pro zvýšení absorpce DNA přes plazmatickou membránu lze využít kationních peptidů, např. poly-L-lysin (PLL). Značnou výhodou PLL konjugátů je možnost jejich chemické modifikace čímž lze docílit transfekce specifické pro daný typ buněk. (Wagner *et al.*, 1998)

Polyamidoaminové (PAMAM) dendrimery, vysoce rozvětvené kationní polymery, jsou s oblibou využívány z důvodu jejich mnohostranné využitelnosti a jednoduchosti transfekce. Tyto dendrimery jsou schopné dopravit kondenzovanou DNA do různých buněčných linií s minimální cytotoxicitou. (Kukowska-Latallo *et al.*, 1996)

2.1.3 Virální metody

Viry používané ke konstrukci virových vektorů dělíme do dvou skupin v závislosti na tom, zda svůj genom začleňují do chromatinu hostitelské buňky (onkoretroviry, lentiviry) nebo jejich genom přetrvává v buněčném jádře jako extrachromozomální jednotka (adenoviry, adeno-asociované viry, herpes simplex virus-1). (Thomas *et al.*, 2003) V případě přenosu nukleové kyseliny do hostitelské buňky pomocí virových vektorů hovoříme o transdukcii.

Virové vektory dosahují vysoké účinnosti přenosu, nicméně jsou limitovány potencialem toxicity, omezeným tropismem jen k určitým buněčným typům, omezenou

kapacitou pro přenášenou DNA, rekombinací a vysokou pořizovací cenou. (Luo *et* Saltzman, 2000)

2.1.3.1 Lentivirové vektory

Lentivirové vektory (LV) jsou odvozené od lentivirů patřících do čeledi *Retroviridae*. Jedná se o čeleď RNA virů, které se vyznačují schopností přepsat svou genetickou informaci do DNA pomocí enzymu reverzní transkriptázy a včlenit ji do genomu hostitelské buňky. Mezi hlavní přednosti, díky kterým jsou LV v současnosti jedny z nejpoužívanějších prostředků genového transferu jak v oblasti výzkumu, tak v oblasti genové terapie, patří schopnost stabilní integrace do dělicích se stejně jako nedělicích se buněk a dlouhotrvající transgenová exprese. (Pauwels *et al.*, 2009)

V současné době jsou nejpoužívanější vektory odvozené z viru lidské imunitní nedostatečnosti typu 1 (HIV-1), jelikož je tento virus velmi dobře prostudovaný. Vektory však byly vyvinuty i z jiných lentivirů zahrnujících například virus kočičí imunitní nedostatečnosti (FIV), virus koňské infekční anémie (EIAV), virus kravské imunitní nedostatečnosti (BIV) nebo virus lidské imunitní nedostatečnosti typu 2 (HIV-2). (Quinonez *et* Sutton, 2002)

Nepříznivé důsledky používání LV jsou spojovány s životním cyklem lentivirů, založeném na začlenění genetické informace viru do genomu hostitelské buňky. To přináší riziko v podobě inzerční mutageneze, transaktivace sousedících genových sekvencí či onkogeneze. Rizikem je také přenos a následné rozšíření vektorových částic do necílených buněk či tkání. (Pauwels *et al.*, 2009)

LV jsou tedy konstruovány tak, aby se zamezilo těmto rizikům a bylo dosaženo maximální účinnosti transdukce. Nahrazení původního HIV-1 obalu proteinem virové vezikulární stomatitidy G (VSV-G) je považováno za průlom ve vývoji lentivirových vektorů. (Cockrell *et* Kafri, 2007) Takto pozměněné LV je možno použít k transdukci prakticky všech typů savčích buněk a je znemožněna tvorba tzv. wild-type HIV. Tyto LV mohou být inaktivovány lidským sérem, pokud jsou produkovány v lidských buňkách. Zamezení rizika generování a množení replikace schopných lentivirů (RCL) je dosaženo odstraněním genů nepotřebných k transferu genů, ale odpovídajících za virulenci HIV-1. Zvýšení bezpečnosti bylo dosaženo rovněž eliminací *tat* genu kódujícího transkripční aktivátor Tat protein, který je zodpovědný za vysokou míru replikace HIV. Další strategií ke zvýšení bezpečnosti LV je delece promotorových a enhancerových elementů lokalizovaných na 3'LTR (dlouhé terminální repetice, long terminal repeats) U3 oblasti vektoru. Během reverzní transkripce

je tato delece kopírována z 3'LTR na 5'LTR a vznikají tak vektory s redukovanou (až na 10 %) promotorovou aktivitou. Vektory s touto delecí se nazývají SIN vektory (self-inactivating vectors). (Pauwels *et al.*, 2009)

HIV vektory nebyly původně konstruovány jako prostředky pro přenos genů, ale pro studium samotných HIV. Jako první byly úspěšně transdukovány přirozené cílové buňky pro HIV, tedy CD4⁺ buňky. (Quinonez *et Sutton*, 2002) Nyní jsou LV vektory využívány ve výzkumu *in vitro*, *in vivo* i v klinických aplikacích jako možné prostředky pro léčbu některých onemocnění.

Cignal Lenti Reporter Assays

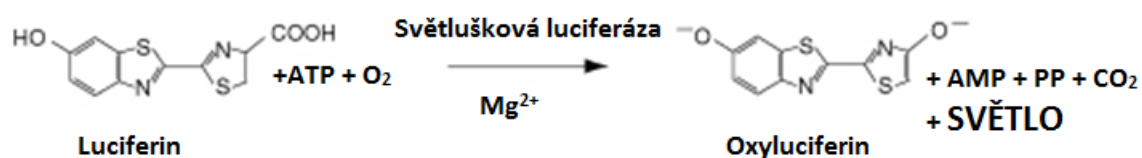
Cignal Lenti Reporter Assays jsou komerční lentivirové částice odvozené z HIV-1, které jsou pseudotypované VSV-G s potlačeným replikačním potenciálem. Využívají se k transdukcii prakticky všech typů buněk bez zjevné nespecifické stresové odpovědi. Jsou navrženy pro přesné, senzitivní a kvantitativní stanovení aktivace signálních drah v cílové buňce. Lentivirové částice exprimují reportérový konstrukt, který kóduje reportérový gen – luciferázu či GFP pod kontrolou bazální promotorové jednotky – TATA boxu, která je připojená k tandemovým repetičím specifického TRE (Transcriptional Response Element) cílového genu. Cignal Lenti Reporter Assay je účinný nástroj pro objasnění funkce genů, zjištění mechanismu účinku proteinů, peptidů, ligandů a nízkomolekulárních sloučenin v buňkách. (Cignal Lenti Reporter, handbook; 2012)

2.2 Reportérové geny a gene reporter assays

Při studiu účinku různých látek jako např. potenciálních léčiv v eukaryotních buňkách je mnohdy důležité sledovat průběh a regulaci genové exprese. Regulace genové exprese je zprostředkována vazbou transkripčního faktoru či receptoru do promotorové oblasti cílového genu, což vede ke spuštění či potlačení exprese genu a následné transkripce. Pomocí techniky *gene reporter assay* můžeme tuto expresi sledovat. Jedná se o univerzální a citlivou metodu studia různých cílů jako jsou transkripční faktory, promotory či enhancery. Předmětem studia jsou obvykle nádorové buněčné linie, které byly přechodně nebo trvale transfekovány reportérovým plasmidem. Ten má ve své struktuře zabudovanou promotorovou sekvenci specifickou pro studovaný receptor či transkripční faktor. Těsně za touto sekvencí se nachází reportérový gen. (Liu *et al.*, 2009)

Jako reportérové geny se volí takové geny, které udělí transfekovaným buňkám vlastnost, která se dá snadno identifikovat či měřit, pokud dojde k expresi tohoto genu. Můžeme tak stanovit transkripční aktivitu sledovaného receptoru či transkripčního faktoru, která koreluje s mírou exprese reportérového genu. Na reportérové geny jsou kladeny různé požadavky – nesmí být vůči buňce toxické, exprese reportérového genu musí nutně pocházet z plasmidu, nikoliv z DNA transfekované buňky a musí se dát snadno kvantifikovat. Mezi běžně využívané reportérové geny patří zelený fluorescenční protein GFP (green fluorescent protein), který po ozáření světlem modré barvy emituje zelenou fluorescenci. (Allard *et Kopish*, 2008)

Hojně využívaný je také enzym luciferáza, který katalyzuje reakci se substrátem (luciferin) produkující bioluminiscenci (Obr. 1). Nejpoužívanější je luciferáza světlušek (*Photinus pyralis*), tzv. firefly luciferáza. Katalytické schopnosti luciferázy je dosaženo ihned po uvolnění z ribozomu a proto luciferázový test poskytuje téměř okamžitou odezvu. Po treatmentu buněk můžeme studovat efekt biologického stimulu kvantifikací množství aktivní exprimované luciferázy. (Luciferase Assay System, Promega; handbook)



Obr. 1 – Luciferázová monooxygenace luciferinu za využití co-substrátů O₂ a ATP.

(Převzato a upraveno z Luciferase Assay System, Promega; handbook)

Značně rozšířeným reportérovým genem je také *LacZ* kódující enzym β -galaktosidázu. Tento enzym štěpí laktózu na glukózu a galaktózu. Kolonie bakterií, exprimujících tento enzym se při růstu na živném agarovém médiu obsahujícím substrát X-Gal zbarví modře, jelikož dojde k štěpení substrátu β -galaktosidázou. Pokud tento enzym neexprimují zůstanou krémově bílé. Tento proces se nazývá modro-bílá selekce.

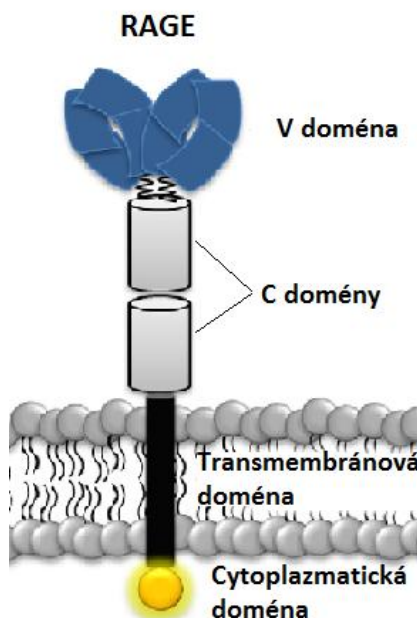
Chloramfenikol-acetyltransferáza – CAT je enzym přirozeně exprimovaný v prokaryotech, katalyzující přenos acetylových skupin na chloramfenikol. CAT je stabilní genový reportér vhodný spíše k přechodné transfekci eukaryotických buněk. (Van Dorst, 2012) Dalšími reportérovými geny využívanými u savčích buněk jsou červený fluorescenční protein RFP (red fluorescent protein), lidský růstový hormon hGH či sekretovaná alkalická fosfatáza SEAP (secreted alkaline phosphatase). Ve struktuře plazmidu bývá obvykle zabudován také gen rezistence vůči nějakému antibiotiku (např. puromycin), díky kterému můžeme po transfekci provést selekci tímto antibiotikem za účelem získání buněčné linie stabilně exprimující daný plazmid.

2.3 RAGE

RAGE (receptor for advanced glycation end products), je multifunkční receptor, který se nachází na povrchu cytoplazmatické membrány. Tento receptor váže široké spektrum ligandů a zprostředkovává odpověď na buněčné poškození a stresové podmínky. Interakce RAGE s jeho ligandy aktivuje různé buněčné procesy, jako je proliferace, apoptóza či migrace. RAGE hraje také roli v patogenezi řady onemocnění jako je rakovina, kardiovaskulární onemocnění, Alzheimerova nemoc či *diabetes mellitus*. (Lee *et Park*, 2013; Riehl *et al.*, 2009)

2.3.1 Struktura a vlastnosti RAGE

Receptor RAGE patří k nadčeledi imunoglobulinových receptorů (Fritz, 2011) a skládá se z 5 domén (obr. 2) – nestálá extracelulární V doména, která představuje hlavní vazebné místo pro ligandy; dvě stálé C domény mající důležitou roli ve stabilizaci V domény; krátká cytoplazmatická doména, která je klíčová v signalizaci a transmembránová doména ukotvující celý receptor v cytoplazmatické membráně. Obě C domény a V doména jsou imunoglobulinového typu. (Alexiou *et al.*, 2010; Deane *et al.*, 2012)



Obr. 2 – Struktura RAGE

(Převzato a upraveno z Lee *et Park*, 2013)

RAGE je klíčovou molekulou ve vývoji mnohých chronických patologických procesů, jako jsou například komplikace při diabetu, ateroskleróza, chronické záněty, neurodegenerativní onemocnění či nádorové bujení. (Fritz, 2011) RAGE je za fyziologických podmínek exprimován v mnoha buněčných typech a tkáních. Během embryonálního vývoje je exprimován konstitutivně, naopak v pozdějších stádiích vývoje je jeho exprese potlačena. U dospělého organismu je exprese RAGE spojena s patologickými stavy. Výjimku tvoří plíce, kde je za fyziologických podmínek exprese vysoká a naopak snížená exprese RAGE je spojována s karcinogenezí. (Bierhaus *et al.*, 2005; Logsdon *et al.*, 2007)

2.3.2 RAGE a jeho ligandy

RAGE byl primárně objeven jako receptor na povrchu buňky vázající AGEs (advanced glycation end products), které jsou produkovány ve zvýšené míře při hyperglykemických podmínkách. S100 proteiny, známé svou rolí při zánětech, byly první alternativní ligandy pro RAGE. Počet ligandů pro RAGE se poté dále rozšířil například o další S100 proteiny, HMGB1 (high mobility group box 1), β -amyloid a amyloidové fibrily. Kromě β -amyloidu a amyloidových fibril, které se účastní nervových onemocnění, jsou všechny tyto ligandy spojovány s nádorovým bujením. (Logsdon *et al.*, 2007)

AGEs

AGEs představují heterogenní skupinu molekul vznikající kondenzací a oxidací mezi proteiny (peptidy) a cukry. Prvním krokem tvorby AGEs je reakce aldehydové skupiny cukru s aminovou nebo guanidinovou skupinou lysinu či argininu. Tento neenzymatický proces je zakončen glykací a ovlivňuje mnoho proteinů. Zvýšená míra glykace proteinů je pozorována u stárnoucích jedinců a především u diabetických pacientů. Řada diabetických komplikací jako je ateroskleróza, kardiovaskulární onemocnění, chronické záněty či nefropatie je spojována s aktivací RAGE prostřednictvím AGEs, které se váží k V doméně receptoru. (Fritz, 2011)

S100 proteiny

S100 proteiny tvoří rodinu fyziologických RAGE ligandů vázajících se k V a C₁ doméně receptoru. (Alexiou *et al.*, 2010) Jedná se o malé signální molekuly vázající vápník

a nacházející se jak v intracelulárním tak v extracelulárním prostoru. Jako intracelulární signální nebo ochranné proteiny hrají roli v buněčném cyklu, buněčné diferenciaci či mobilitě. Někteří zástupci z rodiny S100 proteinů (např. S100P; S100A4) jsou zapleteny do procesu vývoje nádoru. Na zvířecích modelech byla prokázána korelace mezi expresí S100P v nádorových buňkách a zvýšeným růstem nádoru slinivky. Potlačení exprese S100P naopak vedlo ke snížení růstu nádoru. (Arumugam *et al.*, 2005) Ligand S100A4 je považován za metastáze indukující molekulu. (Garrett *et al.*, 2006) S100B je vysoce exprimován v melanomech a je potenciálním nádorovým biomarkerem. U pacientů s normální hladinou S100B bývá přežití značně delší než u pacientů se zvýšenou hladinou cirkulujícího S100B. (Harpio *et Einarsson*, 2004) Ne všechny S100 proteiny přispívají k rakovině, například u S100A2 byla zjištěna protinádorová funkce u spinocelulárního karcinomu. (Logsdon *et al.*, 2007)

HMGB1

HMGB1 (amphoterin) je dalším fyziologickým ligandem RAGE. (Alexiou *et al.*, 2010) HMGB1 působí v jádře jako DNA vázající protein, má také extracelulární regulační funkci a působí jako prozánětlivý aktivátor. HMGB1 je složen z 2 N-terminálních domén, které jsou podstatné pro vázání DNA a C-terminální oblasti složené z kyselých aminokyselinových reziduí, které řídí vazbu k RAGE. HMGB1 s navázanou DNA se váže na RAGE a Toll-like receptor 9 (TLR9) a tím se formuje HMGB1-RAGE-TLR9 komplex aktivující autoreaktivní B buňky. (Fritz, 2011) HMGB1 také zvyšuje agresivitu nádorů transkripce mnoha genů zapojených do různých kroků metastatické kaskády a tím stimuluje tvorbu metastáz. HMGB1 rovněž potlačuje apoptózu u nádorových buněk snížením exprese pro-apoptotických genů a naopak zvýšením hladiny genů anti-apoptotických. Bylo zjištěno, že inhibice signalizace mezi HMGB1 a RAGE vede ke zpomalení růstu nádoru a metastázování gliomových buněk. (Logsdon *et al.*, 2007) HMGB1 je rovněž sekretován v odpovědi na infekci nebo poranění tkáně. (Rojas, 2011)

β -Amyloid

Jedním z hlavních znaků Alzheimerovy choroby je extracelulární tvorba amyloidových plaků v mozkové tkáni pacienta. K tvorbě těchto plaků dochází proteolytickým štěpením prekurzoru amyloidu ve dvou isoformách o velikosti 40 a 42 aminokyselinových zbytků, přičemž obě mají sklon k agregaci a tvorbě amyloidových vláken a později plaků.

Na myších modelech bylo prokázáno, že se β -amyloid váže k V doméně RAGE a jeho prostřednictvím je transportován přes krevní mozkovou bariéru, tj. z krevního řečiště do centrálního nervového systému. (Fritz, 2011)

2.3.3 RAGE signalizace

RAGE je známý svou schopností interagovat se širokým spektrem extracelulárních ligandů a jeho signalizace je poměrně komplexní. Obsazení RAGE jeho ligandy vede k aktivaci řady signálních drah jako např. Erk 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2), p38 MAPK/JNK (mitogen-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase), JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription) či Rac/Cdc42 (Ras related C3 botulinum toxin substrate/cell division cycle 42). (Win *et al.*, 2012; Obr. 3) Na úrovni transkripční regulace působí NF- κ B (nuclear factor κ B), AP-1 (activator protein-1) a Stat3 (signal transducer and activator of transcription) jako klíčové cíle RAGE signalizace, nicméně zde mohou působit i další alternativní transkripční faktory (Obr. 3). Aktivace výše zmíněných transkripčních faktorů spouští expresi genů, které mají centrální úlohu především v regulaci imunitní odpovědi a zánětu. Patrně klíčovou úlohu plní transkripční faktor NF- κ B.

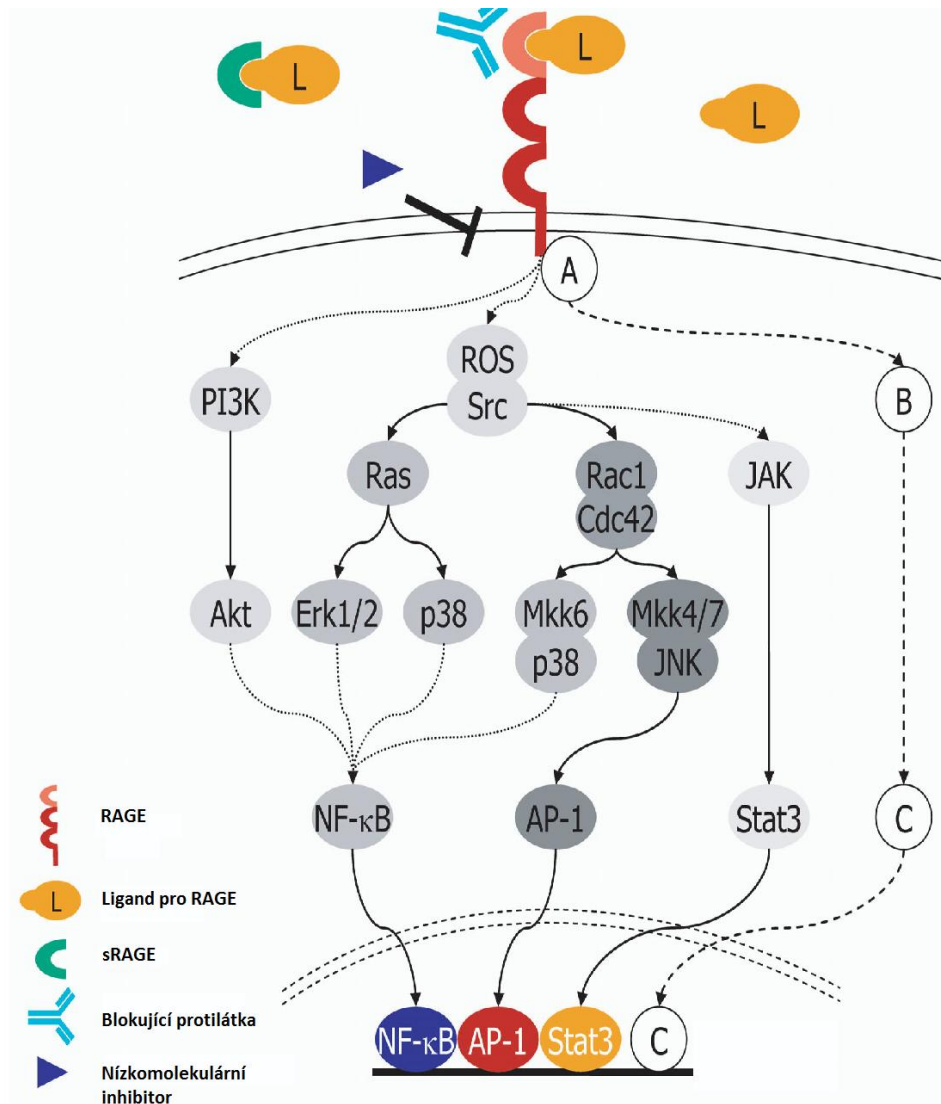
2.3.3.1 MAPK/JNK signální dráha

JNKs známé také jako stresem aktivované protein kinázy (SAPKs) jsou členy široké rodiny mitogeny aktivovaných protein kináz (MAPKs). (Zine *et Van De Water*, 2004) MAPKs fosforylují specifické seriny a threoniny cílových proteinových substrátů čímž regulují různorodé buněčné procesy, jako je genová exprese, metabolismus a programovaná buněčná smrt. (Johnson *et Lapadat*, 2002)

Typické MAPK signální dráhy zahrnují kaskádu tří po sobě následujících fosforylačních kroků, ve kterých jsou zapojeny MAPK kinázy kinázy (MAPKKKs), MAPK kinázy (MAPKKs) a MAPKs. MAPKs poté fosforylují neproteinové kinázové substráty nebo další protein kinázy. (Gerits *et al.*, 2008)

JNK proteiny jsou kódovány MAPK8, MAPK9 a MAPK10 a tvoří deset různých isoform odvozených ze tří genů: JNK1 (čtyři isoformy), JNK2 (čtyři isoformy) a JNK3 (dvě isoformy). JNK1 a JNK2 jsou exprimovány téměř ve všech buněčných typech, kdežto JNK3 převážně v mozku. JNKs mohou být aktivovány pomocí MAPKK4 a 7. Hlavním cílem aktivovaných JNKs je transkripční faktor AP-1, který je zapojený

do zánětlivého procesu provázejícího diabet či rakovinu. (Rojas *et al.*, 2011) JNK signální dráhy regulují aktivitu a expresi klíčových zánětlivých mediátorů, jako jsou cytokiny a proteázy, které významným způsobem ovlivňují proces nádorového bujení. Role signálních drah MAPK/JNK byla testována *in vivo* na transgenních myších modelech, což vedlo k prokázání jejich významu v procesu tumorigeneze v různých orgánech. Bylo prokázáno, že JNKs mohou plnit funkce onkogenní a rovněž tumor supresivní. Mutace v JNKs signálních drahách mohou být zapojeny ve vývoji nádoru – například ztráta funkce JNK3 podporuje progresi nádoru. Výsledky dosažené na myších modelech rovněž prokázaly spoluúčast MAPK/JNK signálních drah u celé řady onemocnění, jako např. revmatoidní artritida nebo ateroskleróza. (Wagner *et Nebreda*, 2009)



Obr. 3 – RAGE signalizace

(Převzato a upraveno z Riehl *et al.*, 2009)

Legenda: AP-1 (activator protein 1) – proteinový aktivátor 1, Cdc42 (cell division cycle 42) – protein regulující dělení buněk, Erk 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) – extracelulární signál-regulující kináza 1/2, JAK (Janus kinase) – Janusova kináza, JNK (c-Jun N-terminal kinase) – c-Jun N-terminální kináza, MAPK (mitogen-activated protein kinase) – mitogenem aktivovaná protein kináza, MKK (mitogen-activated protein kinase kinase) – mitogenem aktivovaná protein kináza kináza, NF-κB (nuclear factor kappa B) – nukleární faktor kappa B, PI3K (phosphoinositide 3-kinase) – fosfatidylinositol-3-kináza, Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) – Ras-příbuzný C3 botulotoxin substrát 1, ROS (reactive oxygen species) – reaktivní formy kyslíku, Stat3 (signal transducer and activator of transcription 3) – přenašeč signálu a aktivátor transkripce 3.

2.3.4 Fyziologická funkce RAGE

RAGE nehraje roli pouze v patogenezi onemocnění, signalizace RAGE se podílí také na homeostáze a regeneraci některých tkání. Během embryonálního vývoje je RAGE vysoce exprimován (především v nervové soustavě), v pozdějších stádiích vývoje je však jeho exprese potlačena. (Rojas *et al.*, 2011) Ve stáří se exprese RAGE opět zvyšuje, nicméně není známo, zda díky akumulaci RAGE ligandů nebo jako kompenzační mechanismus, který chrání stárnoucí buňky před buněčnou smrtí. Aktivace RAGE prostřednictvím HMGB1 nebo S100s totiž podporuje přežití buněk zvýšenou expresí anti-apoptického genu *Bcl-2* (B-cell lymphoma 2).

RAGE je za fyziologických podmínek exprimován v malém množství v neuronech a mikroglíích mozku. (Sorci *et al.*, 2013) Interkace RAGE s HMGB1 pravděpodobně doprovází tvorbu axonů při vývoji neuronů. Bylo také zjištěno, že inhibice RAGE prostřednictvím sRAGE (soluble RAGE, rozpustný RAGE) nebo F(ab')₂ fragmenty protilátek vede ke snížené schopnosti regenerace periferního nervu.

V plicní tkáni je exprese RAGE i v dospělosti poměrně vysoká (hlavně v alveolárním epitelu) a hraje důležitou roli v plicní homeostáze. Naopak downregulace tohoto receptoru je charakteristická při nemalobuněčném karcinomu plic. (Bierhaus *et al.*, 2005; Bartling *et al.*, 2005) Ztráta exprese RAGE je také spojována s rozvojem idiopatické plicní fibrózy. (Alexiou *et al.*, 2010)

RAGE je konstitutivně exprimován i v buňkách endotelu. Indukuje zde expresi endotelového růstového faktoru a tím napomáhá tvorbě nových krevních kapilár, např. při zánětlivých procesech. (Riehl *et al.*, 2009)

RAGE je exprimován také ve vláknech hladkého a kosterního svalstva, přičemž jeho exprese vývojově klesá a v dospělé svalové tkáni chybí úplně. RAGE je exprimován i v myoblastech a interakce s HMGB1 stimuluje jejich diferenciaci. Tento fakt poukazuje na úlohu RAGE ve vývoji kosterního svalstva, kdy pravděpodobně dochází ke spolupráci RAGE a HMGB1 v rámci prenatalní i postnatalní myogeneze. RAGE se rovněž podílí na zrání osteoklastů a kostní přestavbě. (Alexiou *et al.*, 2010)

2.3.5 Úloha RAGE v patogenezi onemocnění

Kromě důležité funkce RAGE ve fyziologických procesech se tento receptor podílí na vývoji celé řady patologických stavů. V mnoha buněčných typech jako jsou makrofágy, endotelové buňky, buňky hladkého svalstva, fibroblasty nebo neurony je exprese RAGE za fyziologických podmínek nízká. Jeho zvýšená exprese však může být indukována v situacích, kdy dochází k akumulaci RAGE ligandů nebo aktivaci transkripčních faktorů RAGE signalizace. Patogeneze onemocnění je důsledkem interakce RAGE s nefyziologickými ligandy (AGEs) nebo fyziologickými ligandy při jejich dysregulaci za stresových podmínek nebo při onemocnění. RAGE ligandy se akumulují především v prozánětlivém prostředí doprovázejícím např. *diabetes mellitus*, aterosklerózu, chronické onemocnění ledvin, neurodegenerativní či nádorové onemocnění. (Alexiou *et al.*, 2010; Bierhaus *et al.*, 2005)

K ověření úlohy RAGE v patogenezi onemocnění byl použit sRAGE, který funguje jako návnada zabraňující interakci ligandů s RAGE. Na modelu hlodavců zabránil sRAGE rozvoji mikrovaskulárního a makrovaskulárního onemocnění, což poukázalo na roli RAGE ve vývoji chronických cévních poruch. Stejně tak sRAGE ochránil hlodavce před rozvojem komplikací u indukovaného diabetu, před metastázemi tumoru a růstem primárního tumoru. sRAGE navíc potlačil projevy spojené s patogenezí Alzheimerova onemocnění u transgenních hlodavčích modelů a omezil transport β -amyloidu přes krevní mozkovou bariéru. Tyto výsledky poukázaly na RAGE jako na možný terapeutický cíl. (Bierhaus *et al.*, 2005)

2.3.5.1 Alzheimerova nemoc

Alzheimerova nemoc (AN) je neurodegenerativní onemocnění projevující se akumulací β -amyloidu ($A\beta$) ve formě plaků v mozku. AN je charakteristická postupným úpadkem kognitivních funkcí, jako jsou ztráta paměti a změna osobnosti. (Deane *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2012) $A\beta$ je neurotoxický peptid, jehož akumulací dochází k buněčnému poškození, které zahrnuje narušení funkce mitochondrií, oxidativní stres, synaptické selhání či neurodegeneraci. Akumulace $A\beta$ vedoucí k synaptické dysfunkce a odumírání neuronů hraje klíčovou roli ve vývoji AN. (Yan *et al.*, 2012)

V AN hraje RAGE důležitou roli jako membránový receptor pro $A\beta$. Jejich interakcí v neuronech, mikroglíích a endotelu mozku dochází k akceleraci a amplifikaci škodlivých efektů na nervovou a synaptickou funkci. V endotelu mozku zprostředkovává RAGE

transport cirkulujících A β do mozku, v neuronech zprostředkovává A β -indukovaný oxidativní stres a transport A β vedoucí k narušení funkce mitochondrií. V mikroglíích RAGE zase potencuje zánětlivou odpověď zprostředkovanou A β . Exprese RAGE je v mozkovém endotelu a neuronech značně zvýšena v místech s vysokou koncentrací A β . Interakce A β s RAGE, indukuje oxidativní stres a vede k aktivaci NF- κ B projevující se produkcí prozánětlivých cytokinů v krevní mozkové bariéře. Rovněž je popsáno, že signální dráha p38 MAPK přispívá ke zvýšené produkci cytokinů a neurodegenerativním projevům typickým pro AN. Aktivace p38 MAPK byla nalezena v raných stádiích AN u myších modelů. (Deane *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2012)

V patogenezi AN hrají roli i další RAGE ligandy. V astrocytech mozku postiženého AN byly nalezeny kromě A β také AGEs společně s RAGE, což poukazuje na jejich potenciální zapojení v progresi AN. AGEs mohou také zvyšovat toxicitu A β modulací exprese vazebných míst pro A β . (Sasaki *et al.*, 2001; Alexiou *et al.*, 2010)

S100s a především S100B jsou rovněž hojně exprimovány v nervovém systému. Díky zvýšeným hladinám S100B RAGE nejspíš také přispívá k neurotoxicitě. (Huttunen *et al.*, 2000) S100B stimuluje transkripční aktivitu NF- κ B v mikroglíích. (Alexiou *et al.*, 2010)

2.3.5.2 Kardiovaskulární onemocnění

RAGE a jeho ligandy hrají podstatnou roli v patogenezi vaskulárních dysfunkcí. Kromě aterosklerózy má interakce RAGE s jeho ligandy vliv i na srdeční dysfunkci. RAGE je exprimován ve vysoce důležitých buněčných typech: v buňkách endotelu, v monocitech/makrofágích a v buňkách hladkého svalstva. (Yan *et al.*, 2009)

V patogenezi aterosklerózy ovlivňuje interakce AGEs s RAGE eflux cholesterolu z makrofágů. Podobný efekt byl popsán také pro ligandy S100A12, S100B a HMGB1. (Yan *et al.*, 2009; Alexiou *et al.*, 2010)

Exprese RAGE úzce souvisí se srdeční dysfunkcí a srdečním selháním. Interakce AGEs s RAGE vede k fibróze a ovlivňuje metabolismus vápníku v srdečních myocytech. To vede k diastolické, systolické a cévní dysfunkci, které mohou nakonec vést až k selhání srdce. (Alexiou *et al.*, 2010) Na transgenních myších modelech s nadměrně exprimovaným RAGE v srdeční tkáni bylo simulováno experimentální selhání srdce. Nadměrná exprese RAGE snížila systolickou a diastolickou intracelulární koncentraci vápníku a způsobila tak značné zpoždění zpětného vychytávání vápníku. Výsledkem byla delší doba polarizační fáze srdeční kontrakce vedoucí k diastolické dysfunkci. (Petrova *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2009)

2.3.5.3 *Diabetes mellitus*

Pro pacienty trpící diabetem je charakteristická prodloužená doba hyperglykémie, která vede k masivní intracelulární a extracelulární tvorbě AGEs a jejich akumulaci v cirkulující krvi a různých tkáních. (Barlovic *et al.*, 2011; Yamamoto *et al.*, 2001) Kromě AGEs jsou v diabetických tkáních ve zvýšených hladinách rovněž přítomny ligandy S100s, především S100A12 a HMGB1. (Alexiou *et al.*, 2010)

Ateroskleróza, nefropatie, neuropatie a retinopatie jsou jedny z dlouhodobých komplikací diabetu. Nefropatie je život ohrožující diabetická komplikace charakteristická například zvětšením ledvin, glomerulární hypertrofií a albuminurií. Častější je výskyt u myšího modelu s diabetem a nadměrnou expresí RAGE v cévách, ale u myší postrádajících RAGE byla redukována. (Bierhaus *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2001)

Diabetická retinopatie je častou mikrovaskulární komplikací při diabetu způsobující až oslepnutí. Tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS) následkem interakce AGEs s RAGE se podílí na ztrátě pericytů v časně fázi diabetické retinopatie. (Yamagishi *et al.*, 2008)

Další dlouhodobou komplikací při diabetu je neuropatie a ztráta citlivosti k bolesti. Aktivace NF- κ B a zvýšená genová exprese jeho cílů v periferních nervech diabetických myší byla vyvolána pomocí AGEs a inhibice RAGE vedla k potlačení tohoto projevu. Bylo zjištěno, že RAGE se exprimuje v periferním nervstvu ve Schwannových a endotelových buňkách a interakcí s AGEs přispívá k endoneuronální dysfunkci vedoucí k mikroangiopatii v periferním nervstvu. (Alexiou *et al.*, 2010)

2.3.5.4 *RAGE a nádorová onemocnění*

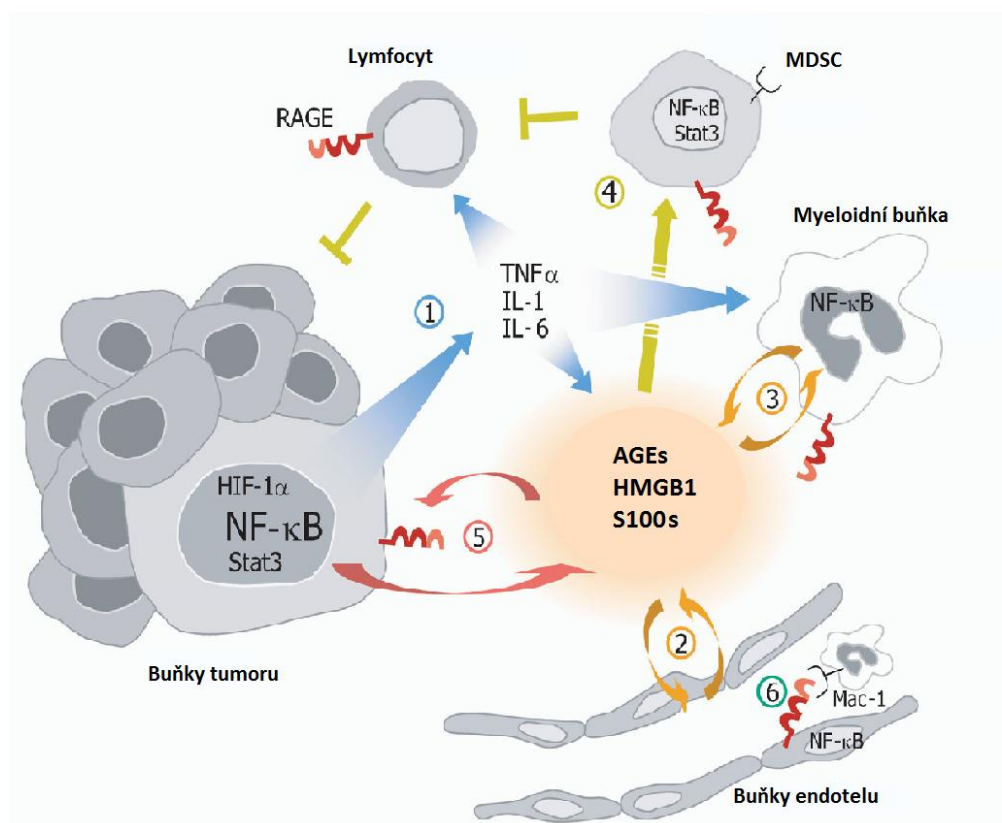
Expese RAGE byla detekována v různých typech lidských nádorů zahrnujících nádory mozku, prsu, tlustého střeva a konečníku, prostaty, plic, lymfomy či melanomy. Výsledky *in vitro* experimentů, studie na myších modelech a stejně tak klinická data poukazují na přímé spojení mezi aktivací RAGE a proliferací, přežitím, migrací a invazivitou nádorových buněk. (Riehl *et al.*, 2009) Rovněž RAGE ligandy (AGEs; HMGB1; S100s) hrají v nádorových onemocněních důležitou roli. (Alexiou *et al.*, 2010)

Bylo prokázáno, že chronický zánět a procesy při něm probíhající přispívají k vývoji nádoru. (Riehl *et al.*, 2009) RAGE hraje důležitou roli v jednom z těchto procesů – angiogenezi, kdy indukuje expresi endotelového růstového faktoru a tím zvyšuje počet buněk endotelu. Dochází k tvorbě nových krevních kapilár a nádorové buňky jsou tak

dostatečně okysličovány a vyživovány. Aktivace RAGE také zvyšuje permeabilitu endotelu pro makromolekuly, která je běžně pozorována u tumorů. Vytvoření mikroprostředí pro růst nádoru závisí na aktivaci několika transkripčních faktorů, zejména NF- κ B, ke které dochází po stimulaci RAGE. Mnoho transkripčních cílů RAGE signalizace pravděpodobně přispívá k interakci mezi buňkami nádoru a cévním endotelem, což může podporovat tvorbu metastáz. (Logsdon *et al.*, 2007)

RAGE signalizace a karcinogeneze

RAGE je exprimován ve všech buněčných typech zapojených do procesu vývoje nádoru. Jedná se o buňky vlastního nádoru, endotelové buňky, myeloidní buňky, supresorové buňky odvozené z myeloidních buněk (MDSCs, myeloid derived suppressor cells) a lymfocyty. Signální dráhy downstream RAGE jsou aktivovány po akumulaci ligandů (AGEs, HMGB1, S100s) v mikroprostředí nádoru a regulují buněčné interakce v průběhu nádorové transformace a progresu (Obr. 4). Tvorba mikroprostředí nádoru závisí na aktivaci několika transkripčních faktorů, zejména NF- κ B, Stat3 a HIF-1 α (hypoxický indukční faktor; hypoxia inducible factor-1) a je utvářeno sekrecí důležitých cytokinů, jako jsou tumor nekrotizující faktor α (TNF α , tumour necrosis factor α), interleukin-1 a interleukin-6 (IL-1, IL6). RAGE a jeho ligandy aktivují endotelové a myeloidní buňky, což vede k akumulaci dalších typů myeloidních buněk (MDSCs), které inhibují T a NK (natural killers) buňky a výsledkem je tolerance T buněk a narušení protinádorové imunity. Aktivace RAGE ligandy a následná signalizace také podporují proliferaci a přežití buněk nádoru pomocí autokrinního a parakrinního zpětného působení. (Riehl *et al.*, 2009)



Obr. 4 – Signální dráhy RAGE a karcinogeneze

(Převzato a upraveno z Riehl *et al.*, 2009)

Legenda: AGEs, HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1) – hypoxický indukční faktor 1, HMGB1 (high mobility group box 1) – amfoterin, IL-1 – interleukin 1, IL-6 – interleukin 6, MDSCs (myeloid derived suppressor cells) – supresorové buňky odvozené z myeloidních buněk, NF- κ B (nuclear factor kappa B) – nukleární faktor kappa B, S100s (S100 proteins) – S100 proteiny, Stat3, TNF α (tumour necrosis factor α) – tumor nekrotizující faktor.

V následujícím textu uvádím příklady některých typů nádorů, v jejichž patogenezi hraje RAGE důležitou roli.

Glioblastom

Exprese RAGE a HMGB1 byla pomocí Western blottingu nalezena také v liniích lidských gliomových buněk. HMGB1 působí jako autokrinní faktor a po jeho navázání na RAGE dochází ke zvýšení proliferace a migraci buněk. Gliomové buňky obsahují HMGB1 převážně v jádře a nemohou jej sekretovat konstitutivně nebo následkem stimulace, nicméně nekrotické gliomové buňky mohou uvolňovat HMGB1 po translokaci z jádra do cytosolu. HMGB1 tedy může hrát důležitou roli ve vztahu mezi nekrózou a malignitou

v glioblastomech tím, že působí jako autokrinní faktor, který je schopný podporovat růst a migraci nádorových buněk. (Alexiou *et al.*, 2010; Bassi *et al.*, 2008)

Nádory plic

Nádory plic představují ve srovnání s nádory jiných orgánů či tkání výjimku v expresi RAGE. U nemalobuněčného karcinomu plic je exprese RAGE silně potlačena v porovnání s expresí ve fyziologické plicní tkáni. Potlačení exprese RAGE vede k vyšším stádiím tumoru, zatímco zvýšená exprese RAGE v plicních nádorových buňkách způsobuje za určitých podmínek zpomalení růstu nádoru. Potlačení exprese RAGE lze tedy považovat za rozhodující faktor přispívající k reorganizaci buněk a tvorbě plicních nádorů. Snížení exprese RAGE bylo popsáno rovněž u spinocelulárního karcinomu a adenokarcinomu plic. (Bartling *et al.*, 2005) RAGE ligandy S100P a S100A4 jsou nadměrně exprimovány u nemalobuněčného karcinomu plic což souvisí s nízkým přežitím. (Logsdon *et al.*, 2007)

Nádory tlustého střeva

U nádorů tlustého střeva je RAGE spojován s invazivitou a metastázováním nádorových buněk. Invazivní aktivita buněk je přisuzována interakci RAGE s HMGB1, která je rovněž spojována se zhoubným potenciálem kolorektálního adenomu. Další RAGE ligandy, které hrají důležitou roli u nádorů tlustého střeva, jsou z rodiny S100 proteinů. Bylo popsáno, že interakce S100P s RAGE zvyšuje růstový potenciál buněk, migraci a aktivaci NF- κ B *in-vitro*. Aktivace RAGE prostřednictvím S100A8 a S100A9 vede k RAGE signalizaci zapojené do karcinogeneze sdružené s kolitidou. (Alexiou *et al.*, 2010) RAGE nejspíš také působí na rozhraní mezi zánětem a karcinogenezí v tlustém střevě. (Logsdon *et al.*, 2007)

Nádory slinivky

RAGE je exprimován také nádorovými buňkami slinivky břišní a jeho interakce s AGEs stimuluje růstový potenciál těchto buněk. Ligand S100P je exprimován ve více než 90 % nádorových buněk slinivky a ovlivňuje růst, mobilitu, invazivitu a přežití těchto buněk *in vitro*. V *in vivo* podmínkách ovlivňuje přímou interakcí s RAGE růst a metastázování tumorů. (Alexiou *et al.*, 2010)

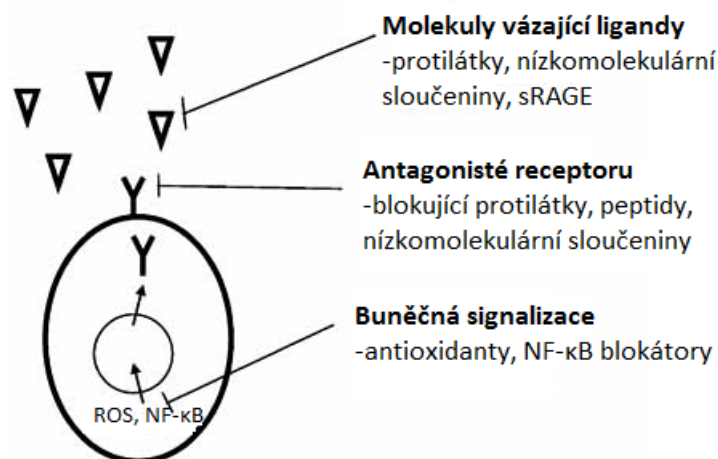
Melanom

Zvýšená exprese RAGE byla detekována v cytoplazmě buněk lidského melanomu. Po vystavení AGEs byly tyto buňky stimulovány k proliferaci a migraci. V buňkách melanomu jsou exprimovány také ligandy HMGB1, S100A4, S100A6 a S100B. (Logsdon *et al.*, 2007; Alexiou *et al.*, 2010)

2.3.6 RAGE jako potenciální terapeutický cíl

Skutečnost, že vystavení buněk nadměrně exprimujících RAGE rozpustné formě tohoto receptoru – sRAGE, který blokuje interakci RAGE s jeho ligandy, vede k utlumení či zmírnění příznaků patogeneze různých typů onemocnění, poukazuje na RAGE jako na potenciální terapeutický cíl.

Kromě zapojení RAGE do patologických procesů má tato molekula rovněž důležité fyziologické funkce podílející se na homeostáze. V případě vážných onemocnění jako je rakovina jsou však potenciální negativní důsledky inhibice RAGE v normálních tkáních převáženy pozitivy plynoucími z jeho inhibice v tkáních postižených. Je tedy žádoucí vynalézt prostředky interferující s aktivitou RAGE. Působení na RAGE jako na terapeutický cíl může probíhat na několika úrovních (Obr. 5). Některé molekuly se mohou přímo vázat na RAGE nebo vyvazovat jeho ligandy. Tímto mechanismem působí protilátky, nízkomolekulární sloučeniny či sRAGE. Další molekuly mohou působit jako antagonisté receptoru a to ve formě blokujících protilátek, peptidů nebo nízkomolekulárních sloučenin. Také pozitivní zpětnovazebný systém zodpovědný za zvýšenou expresi RAGE by mohl být dobrým terapeutickým cílem. Na této úrovni mohou působit antioxidanty či NF- κ B blokátory. (Logsdon *et al.*, 2007)



Obr. 5 – Cílení na RAGE jako potenciální terapeutický cíl.

(Převzato a upraveno z Logsdon *et al.*, 2007)

2.3.7 Inhibitory RAGE

2.3.7.1 Proteinové inhibitory RAGE

sRAGE

sRAGE je rozpustná forma RAGE přirozeně se vyskytující u lidí, která vzniká alternativním sestřihem intronu 9 či exonu 10 genu RAGE. *sRAGE* postrádá transmembránovou doménu a proto působí jako návnada RAGE ligandů, díky čemuž představuje atraktivní farmaceutický cíl. V celé řadě patologických stavů se koncentrace *sRAGE* snižuje. Mnoho studií na zvířecích modelech poukazuje na fakt, že působení *sRAGE* zabraňuje například rozvoji cévních komplikací při diabetu, potlačuje růst nádoru a tvorbu metastáz a také brání rozvoji Alzheimerova onemocnění. Je popsáno, že některá léčiva používaná v klinické praxi (např. pioglitazon; atrovastatin) zvyšují koncentraci *sRAGE*. (Alexiou *et al.*, 2010)

Protilátky proti RAGE

Další cestou k zamezení interakce RAGE s jeho ligandy je použití protilátek proti RAGE. Na lidských buňkách melanomu bylo prokázáno, že protilátky proti RAGE inhibují formování nádoru a rovněž metastázování těchto buněk do plic. (Abe *et al.*, 2004) Použití

monoklonálních myších protilátek k léčbě lidských onemocnění je limitováno krátkou životností, neschopností vyvolat efekt v lidském organismu či indukci lidské anti-myší imunitní odpovědi a ke zlepšení terapeutického potenciálu je proto nezbytná jejich humanizace. (Alexiou *et al.*, 2010)

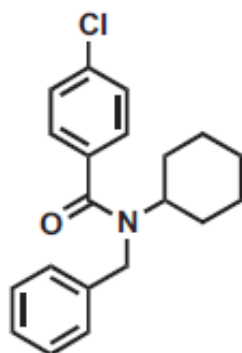
2.3.7.2 Nízkomolekulární inhibitory RAGE

Dosud popsaných nízkomolekulárních inhibitorů RAGE je velmi omezený počet a pouze PF-04494700 a FPS-ZM1, dosáhly 2. fáze klinického testování. Většina nízkomolekulárních inhibitorů cílí na interakci RAGE – β -amyloid, klíčovou při Alzheimerově chorobě a jiných neurodegenerativních onemocněních.

FPS-ZM1

FPS-ZM1, který účinkuje jako RAGE antagonist, je vysoce afinitní inhibitor RAGE, který se specificky váže k jeho V doméně. Vzhledem k tomu, že $A\beta$ se váže k V doméně, nikoliv k C doménám RAGE, FPS-ZM1 tuto vazbu blokuje. Vazba na RAGE zamezí přítoku cirkulujícího $A\beta$ do mozku. FPS-ZM1, jehož chemická struktura je znázorněna na obr. 6, prochází krevní mozkovou bariérou a inhibuje buněčný stres indukovaný $A\beta$ v buňkách exprimujících RAGE *in vitro* a v myším mozku *in vivo*. FPS-ZM1 také významně snižuje expresi některých prozánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-1 β , IL-6) v kortexu a hipokampu na úrovni mRNA i proteinu. Z toxikologického hlediska nevykazuje FPS-ZM1 toxicitu ani ve velmi vysokých koncentracích.

Testování na myších modelech prokázala vysokou efektivitu FPS-ZM1 u progredujících nemocí mozku způsobených akumulací $A\beta$ a přidružených neurovaskulárních a kognitivních dysfunkcí u myši s plně vyvinutou $A\beta$ patologií. FPS-ZM1 také blokuje vazbu dalších RAGE ligandů, jako jsou S100B, AGE a HMGB1, které přispívají k dlouhodobým poškozením tkání u různých onemocnění. (Deane *et al.*, 2012; Ross *et al.*, 2013) FPS-ZM1 dosáhl 2. fáze klinického testování, z důvodů vysoké toxicity bylo však přerušeno.



Obr. 6 – Chemická struktura FPS-ZM1 (N-Benzyl-4-chloro-N-cyclohexylbenzamid)
(Převzato z Ross *et al.*, 2013)

Pyrazol-5-karboxamidy

Y. T. Han a kolegové ve své studii popsali skupinu pyrazol-5-karboxamidů jako inhibitorů RAGE. Reprezentativní analog N-(2-butoxy-4-(3-diethylamino)propoxy)fenyl)-3-(4-(4-fluorofenoxy)fenyl)-1-methyl-1H-pyrazol-5-karboxamid vykazoval vysokou inhibiční aktivitu (79,3 %) *in vitro*, což je pravděpodobně způsobeno přímou interakcí analogu s RAGE. Byl také prokázán účinek tohoto analogu na snížení vtoku A β do mozku, kdy byl po intraperitoneálním podání myším zaznamenán pokles hladiny A β v mozkové tkáni téměř o 40 %. Vysoká rozpustnost tohoto analogu navíc usnadňuje jeho případné terapeutické použití. (Han *et al.*, 2014)

PF-04494700

PF-04494700 je nízkomolekulární inhibitor RAGE, který byl vyvinut jako potenciální léčivo Alzheimerovy choroby a je jedním ze 2 inhibitorů, které dosáhly klinického testování (2. fáze). D. Galasko a kolegové v nedávné studii testovali jeho účinnost, bezpečnost a toleranci u mírné až středně těžké formy Alzheimerovy choroby. Celkem 399 osob bylo náhodně rozděleno do 3 skupin. První skupina užívala vysokou dávku léčiva: 60 mg/den po dobu 6 dnů, poté 20 mg/den; druhá skupina užívala nízkou dávku: 15 mg/den a poté 5 mg/den a třetí skupina užívala placebo. Testování probíhalo 18 měsíců. Analýza skupiny užívající vysokou dávku PF-00494700 ukázala po 6 měsících vyšší míru vedlejších účinků a pokles kognitivních funkcí. Druhá analýza porovnávala po 12 měsících skupinu užívající nízkou dávku inhibitoru a skupinu užívající placebo. Jelikož nebyly zaznamenány žádné

významné rozdíly, bylo testování přerušeno. Avšak analýza po 18 měsících odhalila zmírnění poklesu kognitivních funkcí u skupiny užívající nízkou dávku inhibitoru, která vykazovala také dobrý bezpečnostní profil. (Galasko *et al.*, 2014)

Deriváty pyrimidinu

K návrhu pyrimidinových inhibitorů RAGE posloužil jako předloha argpyrimidin, monomerní forma AGE. Důvodem je jeho snadná syntéza a vlastnosti velmi blízké léčivu na rozdíl od jiných monomerních forem AGEs. Ve studii publikované Hanem a kolegy v roce 2012 vykazoval analog pyrimidinu 4-(4-(2-Cyklohexylethoxy)fenyl)-N-(3-(2-(diethylamino)ethoxy)-fenyl)-6-methylpyrimidin-2-amin (A), 4,6-Bis(4-chlorofenyl)-N-(3-(2-(diethylamino)ethoxy)fenyl)-pyrimidin-2-amin (B) a 4,6-Bis(4-chlorofenyl)-N-(2-(2-(diethylamino)ethoxy)fenyl)-pyrimidin-2-amin (C) nejvyšší *in vitro* RAGE inhibiční aktivitu ze skupiny 60ti testovaných 2-aminopyrimidinů odvozených od argpyrimidinu. (Han *et al.*, 2012) Na C6 gliomových buňkách bylo prokázáno, že aktivace NF- κ B indukovaná β -amyloidem ($A\beta$) byla potlačena všemi třemi analogy bez patrné cytotoxicity.

Tyto analogy byly rovněž testovány v *in vivo* studiích. Byl zhotoven myší model s vyvolaným Alzheimerovým onemocněním, na kterém se testoval inhibiční efekt třech nejúčinnějších látek na vstup $A\beta$ do mozku. Každá ze tří látek byla aplikována intraperitoneálně wild-type myším a následně byla aplikována injekce lidského $A\beta$. Poté se zjišťovala inhibiční aktivita těchto látek jako míra hladiny $A\beta$ v mozku myší. Všechny tři látky způsobovaly snížení hladiny $A\beta$ v mozku zatímco množství periferního $A\beta$ nebylo významně změněno. Tyto výsledky podporují teorii, že vstup $A\beta$ do mozku byl způsoben inhibicí RAGE analogy pyrimidinu.

Analog "B" prokázal největší inhibiční potenciál, kdy zredukoval výskyt $A\beta$ v mozku přibližně o 34 %. Orální podávání tohoto analogu Alzheimerovským myším po dobu 3 měsíců vedlo k efektivnímu snížení akumulace $A\beta$ a zlepšení kognitivní funkce bez významných vedlejších účinků jako je toxicita. Byla rovněž prokázána přímá interakce analogu B s RAGE. (Han *et al.*, 2012)

3. Cíl práce

Cílem práce bylo vypracování literární rešerše zabývající se charakteristikou a významem receptoru RAGE a jeho dosud popsányi inhibitory a dále pak metodami transfekce, se zaměřením na lentivirové vektory a genové reportéry. Cílem praktické části bakalářské práce bylo připravit senzorkou buněčnou linii odvozenou od buněk krysího glioblastomu (C6) pro monitoring signální dráhy MAPK/JNK a na funkčních klonech pak otestovat vybrané deriváty pyrimidinu jako potenciální inhibitory RAGE receptoru.

4. Materiál a metody

4.1 Použitý biologický materiál

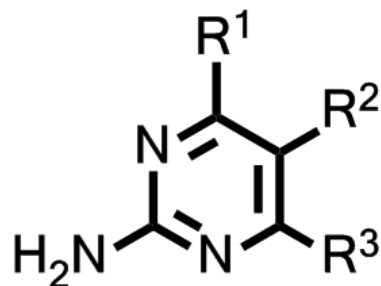
Veškeré experimenty byly prováděny na nádorové buněčné linii C6, odvozené z glioblastomu potkana obecného (*Rattus norvegicus*), pocházející z americké sbírky tkáňových kultur (ATCC).

Při ověřování exprese receptoru RAGE v C6 buňkách, byla jako negativní kontrola použita linie CHO odvozená z vaječníku křečka čínského (*Cricetulus griseus*) a jako pozitivní kontrola linie A549 odvozená z lidského karcinomu plic. Obě linie pocházejí rovněž z ATCC.

K transdukci byly použity komerční lentivirové částice Cignal Lenti Reporter Assays (SABiosciences).

4.2 Testované látky

- Deriváty pyrimidinu s kódovým označením LEM 814 a LEM 815 byly syntetizovány a poskytnuty Dr. Kolmanem z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR. Strukturně se jedná o 4,5,6-trisubstituované-2-aminopyrimidiny (Obr. 7)



Obr. 7 – Obecná struktura testovaných derivátů pyrimidinu.

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- detekční systém Odyssey Fc (Li-Cor, USA)
- automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- automatický čítač buněk – Vi-CELL XR Cell Viability Analyzer (Beckman Coulter, USA)
- blotovací zařízení – Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, USA)
- centrifuga – Rotina 420 R (Hettich, Německo)
- fluorescenční mikroskop – Axio Observer D1 (Zeiss, Německo)
- flowbox s laminárním prouděním – MSC-Advantage (ThermoScientific, USA)
- inkubátor s atmosférou CO₂ – HERAcell 150i (ThermoScientific, USA)
- inverzní mikroskop – IX51 (Olympus, USA)
- magnetická míchačka – RCT Basic Safety control (IKA, Německo)
- multikanálové pipety (Eppendorf, Německo)
- sestava pro elektroforézu – mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, USA)
- spektrofotometr – EnSpire (Perkin Elmer, USA)
- spektrofotometr – iEMS Reader MF (Labsystems, Finsko)
- termoblok – Bio TDB-100 (BioSan, Lotyšsko)
- třepačka orbitální – Unimax 1010 (Heidolph, Německo)
- vortex – V-1 plus (BioSan, Lotyšsko)
- zdroj pro elektroforézu a western blot – PowerPac HC (Bio-Rad, USA)

4.4 Seznam použitých chemikálií

- 2-merkaptoethanol – Sigma-Aldrich
- Acryl/Bis 37,5:1 40% (w/v) – Amresco
- AGE-BSA – Millipore
- APS (persíran amonný) – Sigma-Aldrich
- β -amyloid – rPeptide
- BSA (hovězí sérový albumin) – Sigma-Aldrich
- Coomassie Brilliant Blue – Bio-Rad
- činidlo Bradfordové – Sigma-Aldrich
- DMSO (Dimethylsulfoxid) – Sigma-Aldrich
- FCS (fetální telecí sérum) – Sigma-Aldrich
- luciferázový pufr – Promega
- chemiluminiscenční substrát (Luminata Forte Western HRP Substrate) – Millipore
- lyofilizovaný substrát luciferázy – Promega
- lyzační pufr (Cell Culture Lysis Reagent) – Promega
- lyzační pufr (Reporter Lysis Buffer) – Promega
- proteinový marker (Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard) – Invitrogen
- kultivační médium DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium) – Sigma-Aldrich
- methanol – Lach:NER
- MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) – Sigma-Aldrich
- Ponceau S – Sigma-Aldrich
- Puromycin – Sigma-Aldrich
- S100B – Sigma-Aldrich
- SDS (dodecylsulfát sodný) – Sigma-Aldrich
- TEMED – Sigma-Aldrich
- transdukční reagentie SureENTRY – SABioscience
- Tryple – Gibco
- Tris – Sigma-Aldrich
- Tween 20 – Sigma-Aldrich

4.5 Seznam použitých roztoků

- 1x PBS (1000 ml): v 800 ml H₂O rozpustit 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄; 0,24 g KH₂PO₄; upravit pH na 7,4; doplnit do 1000 ml H₂O
- 1x TBS + Tween (1001 ml): 100 ml 10x TBS + 900 ml H₂O + 1 ml Tween 20, dát míchat na magnetickou míchačku
- 4x Tris/SDS, pH 6,8: 45,5 g 1,5 mol/l Tris + 1 g 0,4% SDS rozpustit v deionizované H₂O, upravit pH a doplnit do 250 ml H₂O
- 4x Tris/SDS, pH 8,8: 15,13 g 0,5 mol/l Tris + 1 g 0,4% SDS rozpustit v deionizované H₂O, upravit pH a doplnit do 250 ml H₂O
- 10x TBS (1000 ml): v 800 ml H₂O rozpustit 60,6 g Tris; 87,6 g NaCl; pomocí 1 mmol/l HCl upravit pH na 7,6 a doplnit do 1000 ml H₂O
- 10x TG: 25 mmol/l Tris; 192 mmol/l glycin; pH 8,3 (Bio-Rad)
- 10x TGS: 25 mmol/l Tris; 192 mmol/l glycin; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,3 (Bio-Rad)
- APS 10%: 0,1 g APS + 1 ml H₂O
- blokovací pufr (5% roztok odtučněného sušeného mléka): 200 ml roztoku 1x TBS + Tween + 10 g sušeného mléka, dát míchat na magnetickou míchačku
- blotovací pufr (500 ml): 50 ml TG smíchat s trochou H₂O, poté přidat 100 ml methanolu a doplnit do 500 ml H₂O
- ELFO pufr (1000 ml): 100 ml 10xTGS + 900 ml H₂O
- fyziologický roztok (1000 ml): 9 g NaCl + 991 ml H₂O
- kultivační médium DMEM (500 ml): sterilně přidat 50 ml FCS k 450 ml média DMEM, přefiltrovat
- Laemmli pufr: 625 mmol/l TRIS-HCl pH 6,8; 10% glycerol; 1% LDS; 0,005% bromfenolová modř (Bio-Rad)
- RIPA lyzační pufr: 1% NP-40; 0,1% SDS; 50 mmol/l Tris-HCl pH 7,4; 150 mmol/l NaCl; 0,5% deoxycholát sodný; 1 mmol/l EDTA (Sigma-Aldrich)
- zamrazovací médium (40 ml): 37,2 ml FCS + 2,8 ml DMSO, přefiltrovat

4.6 Použité metody

4.6.1 Kultivace buněčných linií

Všechny experimenty jsem prováděla na nádorové adherentní buněčné linii C6 odvozené z glioblastomu potkana obecného (*Rattus norvegicus*).

C6 buňky byly kultivovány v růstovém médiu DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium) obsahujícím 10 % fetálního telecího séra (FCS). Tento suplement se do média přidává z důvodu vysokého obsahu růstových faktorů a nízkého obsahu protilátek. Další složkou je L-glutamin a fenolová červeň, což je acidobazický indikátor. Buňky byly kultivovány za standardních podmínek v inkubátoru při 37 °C a v atmosféře 5% CO₂.

Rozmražení buněk

Buněčné linie se dlouhodobě uchovávají zamražené v kryoprotektivním médiu v parách kapalného dusíku (-180 °C).

- 1) Zkumavku se zamraženou buněčnou suspenzí jsem ponechala několik minut v dlani do úplného rozpuštění jejího obsahu.
- 2) Rozmraženou buněčnou suspenzi jsem resuspendovala a přenesla do 10 ml předehřátého média.
- 3) Falkonu jsem 3 x obrátila a nechala 3 minuty stát.
- 4) Následně jsem falkonu centrifugovala 5 minut při 1500 otáčkách.
- 5) Supernatant jsem slila, odsála pipetou a přidala 8 ml média, ve kterém jsem peletu rozsuspendovala.
- 6) Vzniklou suspenzi jsem přenesla do malé kultivační láhve a dala inkubovat.

Pasážování buněčných linií

C6 buňky s kterými jsem pracovala, jsou adherentní buňky, které postupně porůstají dno kultivační láhve. Aby nedocházelo k jejich přerůstání, což může mít podstatný vliv na výsledky experimentů, je zapotřebí provádět pravidelné pasážování buněk. Pasážování C6 buněk jsem prováděla jednou za 2 – 3 dny na koncentraci přibližně 50 000/ml. Buňky byly udržovány v koncentračním rozmezí 50 000 – 500 000/ml.

- 1) Médium z malé kultivační láhve jsem slila a buňky 2 x opláchla roztokem PBS.
- 2) Přidala jsem 0,5 ml Tryple reagentie, která způsobuje uvolnění buněk z povrchu láhve a nechala 5 minut inkubovat.
- 3) Po uplynutí doby inkubace jsem zkontrolovala pod mikroskopem, zda jsou buňky dostatečně oddělené.
- 4) Přídavkem malého množství média jsem zastavila působení Tryplu a buňky naředila na požadovanou hustotu.

Stanovení počtu a viability buněk

Ke stanovení koncentrace a viability buněk jsem používala automatický čítač buněk *ViCell*, který analyzuje buňky na základě barvitelnosti Trypanovou modří.

- 1) Z kultivační láhve jsem odebrala 0,5 ml buněčné suspenze do speciální zkumavky k přístroji *ViCell*.
- 2) Zkumavku jsem vložila do *ViCell* analyzátoru a spustila měření.
- 3) Na základě zjištěné koncentrace byly buňky vyředěny na požadovanou výslednou koncentraci čerstvým kultivačním médiem.

Zamražení buněk

Aby nedošlo při zamražení k poškození buněk krystaly vody, je třeba použít kryoprotektivum, např. dimethylsulfoxid. Zamrazovací médium, které jsem používala, se tedy skládalo z čistého fetálního telecího séra (FCS) a dimethylsulfoxidu (DMSO) v poměru 93:7.

- 1) Kompletně nebo téměř kompletně porostlou malou láhev jsem pomocí Tryple reagentie přenesla do 5 ml média.
- 2) Tuto buněčnou suspenzi jsem centrifugovala 5 minut při 1500 otáčkách.
- 3) Supernatant jsem slila a zbytek média odsála pipetou.
- 4) Peletu jsem rozsuspendovala ve vhodném objemu zamrazovacího média.
- 5) Vzniklou buněčnou suspenzi jsem rozpipetovala po 1 ml do kryozkumavek a dala zamrazit do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.6.2 Ověření exprese receptoru RAGE v C6 buňkách

K ověření exprese receptoru RAGE byla použita metoda Western blotu, běžně používaná k detekci proteinu zájmu ve směsi jiných proteinů.

Prvním krokem byla SDS-PAGE elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného, pomocí které se rozdělily proteiny podle jejich molekulové hmotnosti. V dalším kroku byly proteiny přebíjeny z gelu na nitrocelulózu membránu, na kterou byla po vyblokování aplikována primární protilátka a sekundární protilátka s navázanou křenuvou peroxidázou. Detekce chemiluminiscenčního signálu proběhla pomocí přístroje Odyssey Fc (Li-Cor).

Příprava lyzátu

- 1) Médium z kultivační misky (10 cm) jsem slila a zbytek odsála pipetou.
- 2) Misku jsem ponechala na ledu a 2x opláchla roztokem PBS. Zbytek PBS jsem pokaždé odsála pipetou.
- 3) Na misku jsem napipetovala 800 μ l směsi RIPA lyzačního pufru s koktejlem inhibitorů proteáz a fosfatáz.
- 4) Lyzační pufr jsem nechala působit po dobu 20 minut, po tuto dobu byla miska stále na ledu. Vždy po 5 minutách jsem misku zvortexovala.
- 5) Poté jsem buňky na misce pomocí škrabky seškrabala a přepipetovala do vychlazené mikrozkušavky. Tu jsem dala centrifugovat do vychlazené centrifugy na 4 °C na dobu 10 minut při 14 000 otáčkách.
- 6) Odebrala jsem 600 μ l supernatantu do další vychlazené mikrozkušavky a 20 μ l pro stanovení koncentrace proteinů.
- 7) V mikrozkušavce jsem smíchala 360 μ l 4x koncentrovaného Laemmli pufru a 40 μ l 2-merkaptoethanolu. 200 μ l této směsi jsem přidala do mikrozkušavky s 600 μ l odebraného supernatantu.
- 8) Mikrozkušavku jsem dala povařit na 5 minut v 95 °C.
- 9) Takto připravený lyzát jsem dala zamrazit na -20°C.

Stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové

Metoda Bradfordové je založena na tvorbě komplexu mezi proteiny a barvivem Coomasie Brilliant Blue, kdy vzniká modré zbarvení. Čím je ve vzorku více proteinu, tím je modré zbarvení intenzivnější. Vzniklý komplex mezi proteinem a barvivem má absorpční maximum při 595 nm.

A) Stanovení koncentrace proteinů v lyzátu pro Western blot.

- 1) Pomocí standardního roztoku BSA ve fyziologickém roztoku (2mg/ml; Sigma) jsem si připravila koncentrační řadu v rozmezí 0,00125 až 0,04 mg/ml. Jako blank jsem použila fyziologický roztok (0,9% NaCl v H₂O).
- 2) Poté jsem napipetovala 1 µl roztoku každé koncentrace na 96-jamkový panel ve třech opakováních, postupně od nejnižší koncentrace po nejvyšší.
- 3) Jako poslední jsem ve 3 opakováních pipetovala neznámý vzorek.
- 4) Do každé jamky jsem přidala 200 µl činidla Bradfordové a nechala inkubovat přibližně 10 minut. Poté jsem změřila absorbanci na spektrofotometru (EnSpire; Perkin Elmer) při 595 nm.
- 5) Z regresní rovnice kalibrační křivky jsem na základě naměřené absorbance vypočítala koncentraci proteinů v připravených lyzátech.

B) Stanovení koncentrace proteinů pro normalizaci hodnot relativní luciferázové aktivity u testovaných derivátů pyrimidinu.

- 1) Jamky s přisedlými buňkami jsem promyla 200 µl 1x PBS a odsála.
- 2) Do každé jamky jsem napipetovala 20 µl lyzačního pufu (Reporter Lysis Buffer; Promega) a dala zmrazit, aby došlo k lýze buněk.
- 3) Následující den jsem odebrala 2 µl rozmraženého lyzátu a přidala 100 µl činidla Bradfordové. Nechala jsem inkubovat 10 minut a poté změřila absorbanci při 595 nm na spektrofotometru (EnSpire; Perkin Elmer).

SDS-PAGE elektroforéza

- 1) Standardním postupem jsem připravila dva 10% polyakrylamidové gely o tloušťce 0,75 mm.
- 2) Držák s gely jsem dala do elektroforetické vany a zalila elektroforetickým pufrem.
- 3) Do jamek jsem nanasla vzorky a marker molekulových hmotností (10 μ l). Úhrnné množství proteinu v jednotlivých jamkách činilo 20 μ g.
- 4) Gely byly podrobeny elektroforéze za konstantního napětí 80 V při průchodu proteinů zaostřovacím gelem a 120 V při průchodu dělicím gelem.
- 5) Po ukončení elektroforézy jsem uvolnila gel ze skel a oddělila zaostřovací gel.

Blotování

- 1) Blotovací „sendvič“ se skládal z chromatografického papíru (Whatman 3 MM), nitrocelulóзовé membrány o porozitě 0,2 μ m (Bio-Rad), gelu a chromatografického papíru. Chromatografické papíry a nitrocelulóзовé membrány byly po dobu 1 hodiny ponořeny v blotovacím pufru, gel byl ponořen pouze několik sekund.
- 2) Blotování probíhalo za konstantního proudu 300 mA (150 mA/membránu) po dobu 30 minut.

Imunodetekce

- 1) Membrány s přenesenými proteiny jsem obarvila pomocí Ponceau S pro ověření účinnosti blotování a poté opláchla deionizovanou vodou. Membrány jsem promývala v 1x TBS až do úplného odbarvení.
- 2) Následovalo blokování pro zamezení nespecifické vazby protilátek na membránu. Membrány jsem ponechala v blokovacím pufru na třepačce po dobu 1 hodiny.
- 3) Na membrány jsem aplikovala primární protilátky naředěné v blokovacím pufru a nechala přes noc inkubovat v lednici (4°C).
- 4) Další den jsem membrány promyla 4 x v nadbytku 1x TBS + Tween a poté 1x TBS.
- 5) Aplikovala jsem sekundární protilátky a nechala inkubovat 45 minut při pokojové teplotě.
- 6) Poté jsem membrány promývala stejným způsobem jako po aplikaci primárních protilátek.

Pro vyvolání chemiluminiscenční reakce jsem použila reagensii Luminata Forte (Millipore), kterou jsem aplikovala na membrány a nechala působit 5 minut. K následné detekci signálu byl použit přístroj Odyssey Fc (Li-Cor) a doba expozice byla 2 min.

Použité primární protilátky a jejich ředění:

- králičí anti RAGE (Sigma Aldrich), ředění: 1:1000
- myší anti TUBULIN (Cell Signaling), ředění: 1:1000

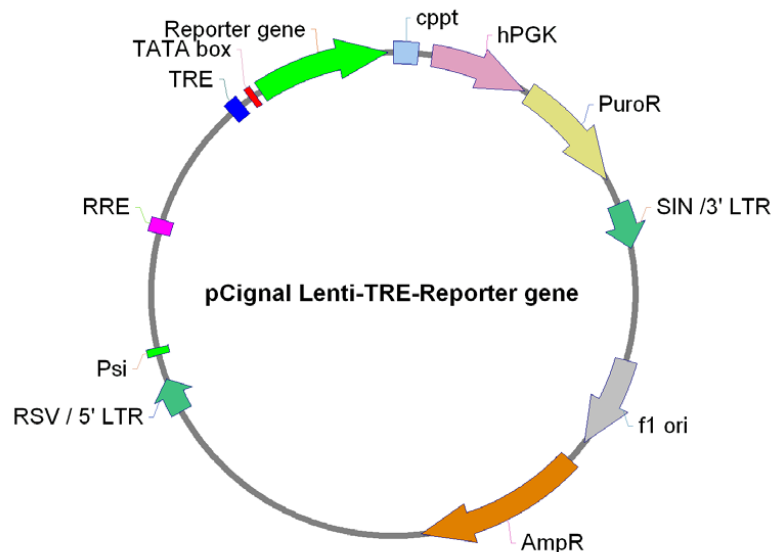
Použité sekundární protilátky a jejich ředění:

- anti králičí (Sigma Aldrich), ředění: 1:10 000
- anti myší (Sigma Aldrich), ředění: 1:10 000

4.6.3 Transdukce

Pro studium aktivace/inhibice signální dráhy MAPK/JNK byly použity komerčně dostupné lentivirové částice (Cignal Lenti Reporter Assays; SABiosciences) kodující inducibilní AP-1 responsivní konstrukt exprimující luciferázu pod kontrolou promotorové jednotky – TATA boxu. Ten je připojený k tandemovým repetičím specifické jednotky TRE (Transcription Response Element). Aktivace/inhibice signální dráhy působením látek vede k modulaci aktivity luciferázového reportéru což lze kvantitativně a rychle měřit.

Použité lentivirové vektory mají však i jiné důležité komponenty (Obr. 8). Centrální polypurinový úsek (cppt) se podílí na translokaci a integraci transdukovaného virového genomu v jádře. Funkce lidské fosfoglycerát kinázy (hPGK) jako eukaryotického promotoru spočívá v umožnění vysoké míry exprese savčího selekčního markeru – puromycinu. Gen rezistence k puromycinu (PuroR) umožňuje selekci savčích buněk, gen rezistence k ampicilinu (AmpR) umožňuje selekci plazmidu v *E. coli*. 3' autoinaktivující se dlouhá terminální repetice (SIN/3'LTR) bývá obecně součástí vektoru z důvodu biologické bezpečnosti. fl počátek replikace (fl ori) je místem, kde se začíná replikovat DNA pro bakteriofága fl. Hybridní „Rous sarcoma Virus“ zesilovač/promotor-U5 LTR (RSV-5'LTR) umožňuje obalení viru a reverzní transkripci virové mRNA. Psi signál umožňuje obalení viru. Jednotka RRE (Rev response element) je zapojená do obalení virového transkriptu. (Cignal Lenti Reporter, handbook; 2012)



Obr. 8 – Struktura lentivirového vektoru použitého k transdukci.
(Převzato z Cignal Lenti Reporter, handbook; 2012)

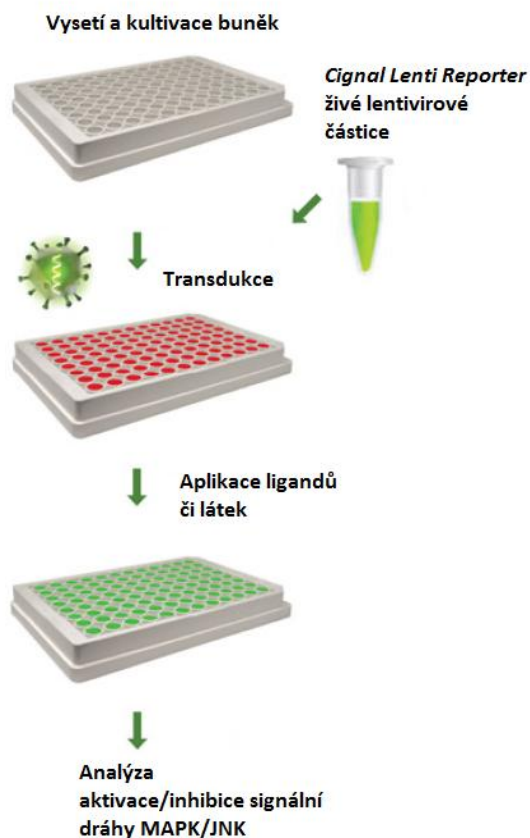
Transdukce se prováděla na 12-jamkovém panelu. Do 3 jamek jsem den před transdukci napipetovala 1 ml buněčné suspenze o koncentraci přibližně 10 000/ml. Vzhledem k proliferační aktivitě C6 buněk se dalo předpokládat, že se počet buněk přibližně zdvojnásobil a jejich koncentrace v den transdukce činila přibližně 20 000/ml.

Pro zjištění úspěšnosti transdukce byla jako pozitivní kontrola paralelně provedena transdukce lentivirálními částicemi konstitutivně exprimujícími zelený fluorescenční protein (GFP). Přesný objem přidané suspenze lentivirových částic jsem vypočítala vzhledem k rozdílným titrům zvláště pro pozitivní kontrolu a AP-1 reporter a dle doporučení výrobce zvolila 2 různé hodnoty multiplicity infekce (MOI) – 10 a 20. MOI udává počet lentivirových částic na buňku.

Transdukce byla provedena v přítomnosti SureENTRY reagentie, což je malá pozitivně nabitá molekula, která se váže na buněčný povrch a neutralizuje tak povrchový náboj buňky a tím zvyšuje účinnost transdukce.

- 1) Ze tří jamek 12-jamkového panelu jsem odpipetovala médium a přidala jsem suspenzi lentivirových částic v předem vypočítaných objemech pro pozitivní kontrolu a AP-1 při MOI 20 a 10, následně jsem přidala 0,5 ml růstového média a SureENTRY reagentii (výsledná koncentrace 8 µg/ml) a jemně propipetovala.

- 2) Další den jsem vyměnila médium za nové. K buňkám transdukovaným AP-1 reportérem (MOI 10 a MOI 20) jsem přidala puromycin o výsledné koncentraci 2 $\mu\text{mol/l}$ pro získání homogenní populace transdukovaných buněk.
- 3) Po 3 dnech selekce jsem provedla limitní ředění za účelem získání jednotlivých klonů. Pro limitní ředění byla vybrána jamka s MOI 20. Po uvolnění buněk jsem připravila suspenzi o hustotě 40 buněk/ml. Do každé jamky 96-jamkového panelu jsem napipetovala 20 μl této buněčné suspenze a 180 μl média (výsledná koncentrace 0,8 buňky/jamku). Celkem jsem takto připravila šest 96-jamkových panelů.
- 4) Postupně jsem vybírala klony. V jamkách kde konfluence dosáhla minimálně 50 % jsem buňky po uvolnění dále expandovala nejdříve na 12-jamkových panelech poté na malých kultivačních lahvích. Takto jsem vybrala celkem 31 klonů. Buňky v malé láhvi jsem nechala dorůst do téměř 100% konfluence a poté je zamrazila v zamrazovacím médiu.
- 5) Funkčnost jednotlivých klonů byla ověřena pomocí vybraných RAGE ligandů (β -amyloid; S100B; AGE-BSA). Klony s nejlepší odezvou byly finálně použity k testování potenciálního inhibičního vlivu derivátů pyrimidinu na signální dráhu MAPK/JNK (viz dále).



Obr. 9 – Schéma experimentu pro monitoring aktivace/inhibice signální dráhy MAPK/JNK v buňkách.

(Převzato a upraveno z Cignal Lenti Reporter, handbook; 2012)

Výpočty objemů suspenze lentivirových částic pro transdukci:

- Pozitivní kontrola pro MOI = 20:
 - Titr (počet lentivirových částic/ml) = $2,6 \times 10^7$
 - Přibližný počet buněk v jamce = 20 000 -> $20\,000 \times 20 = 400\,000$
 - $2,6 \times 10^7$ 1000 μl
 - $400\,000$ $x_1 \mu\text{l}$
 - $x_1 = 15,38 \mu\text{l}$

- AP-1 reporter pro MOI = 10:
 - Titr = $3,1 \times 10^7$
 - $20\ 000 \times 10 = 200\ 000$
 - $3,1 \times 10^7 \dots\dots\dots 1000\ \mu\text{l}$
 $\frac{200\ 000 \dots\dots\dots x_2\ \mu\text{l}}{x_2 = 6,5\ \mu\text{l}}$
- AP-1 reporter pro MOI = 20:
 - Titr = $3,1 \times 10^7$
 - $20\ 000 \times 20 = 400\ 000$
 - $3,1 \times 10^7 \dots\dots\dots 1000\ \mu\text{l}$
 $\frac{400\ 000 \dots\dots\dots x_3\ \mu\text{l}}{x_3 = 12,9\ \mu\text{l}}$

4.6.4. Test citlivosti C6 buněk k puromycinu

Test citlivosti C6 buněk k puromycinu byl proveden za účelem nalezení koncentrace puromycinu vhodné pro selekce pozitivních buněk po transdukci. Cílem bylo zjištění nejnižší koncentrace puromycinu, která po 3 dnech kultivace usmrtí všechny buňky. Testovala jsem 3 koncentrace puromycinu (1 $\mu\text{mol/l}$, 2 $\mu\text{mol/l}$ a 4 $\mu\text{mol/l}$) a 1 jamka bez přídavku puromycinu sloužila jako kontrola. Výchozí koncentrace buněk v jamkách byla 20 000/ml. Po 3 dnech jsem zhodnotila mikroskopický obraz v jednotlivých jamkách a zvolila vhodnou koncentraci pro selekci.

4.6.5 Stanovení hodnoty IC50 testovaných látek využitím MTT testu

MTT tetrazoliový test se standardně používá ke stanovení buněčné proliferace a viability buněk. (Mosmann, 1983) Tato metoda se využívá ke zjištění citlivosti buněčných linií k různým chemickým látkám, kdy získáváme hodnotu IC50. Tato hodnota udává takovou koncentraci testované látky, která sníží počet živých buněk na polovinu oproti kontrolním buňkám bez přidané látky.

Tento test vychází ze skutečnosti, že v živé buňce mitochondriální dehydrogenázy fungují, zatímco v buňce mrtvé nebo poškozené nikoliv. Buňky se kultivují s roztokem žluté methyltetrazoliové soli, která je působením dehydrogenáz metabolicky aktivních buněk

redukována na fialový formazán. Míra konverze MTT na fialový produkt přímo odráží aktivitu mitochondriálních dehydrogenáz buněk, tedy jejich životnost.

- 1) Do každé jamky 96-jamkového panelu jsem vysela 3000 buněk v objemu 80 μ l. První sloupec, do kterého jsem napipetovala 80 μ l čistého média sloužil jako blank. Okrajové jamky jsem zakapala sterilní vodou. Panel jsem dala přes noc inkubovat.
- 2) Další den jsem k buňkám přidala 20 μ l roztoků 2 testovaných látek v DMSO. Testované látky jsem nanášela celkem v 9 koncentracích a každou z nich v triplikátu. Nejvyšší koncentrace látek byla 300 μ mol/l a faktor ředění 3x. Do kontrolních jamek jsem pipetovala 20 μ l DMSO (Obr. 10).
- 3) Po třech dnech působení látek jsem přidala do každé jamky 10 μ l roztoku MTT (0,5% v PBS) a nechala přibližně 3 hodiny v inkubátoru.
- 4) Působení roztoku MTT jsem zastavila přidáním 100 μ l dodecylsulfátu sodného (SDS). Nechala jsem přes noc inkubovat.
- 5) Následující den jsem změřila absorpenci na spektrofotometru (iEMS Reader MF; Labsystems) při 540 nm a pomocí programu Chemorezist určila hodnotu IC50.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B			300	300	300	0,41	0,41	0,41	11,1	11,1	11,1	
C			100	100	100	0,14	0,14	0,14	3,7	3,7	3,7	
D			33,3	33,3	33,3	0,04	0,04	0,04	1,23	1,23	1,23	
E			11,1	11,1	11,1	300	300	300	0,41	0,41	0,41	
F			3,7	3,7	3,7	100	100	100	0,14	0,14	0,14	
G			1,23	1,23	1,23	33,3	33,3	33,3	0,04	0,04	0,04	
H												

Obr. 10 – Schéma uspořádání 96-jamkového panelu včetně jednotlivých koncentrací látek (μ mol/l).

Legenda: barva zelená – blank, fialová – kontrola, modrá – sterilní H₂O, žlutá – testovaná látka LEM 814, červená – testovaná látka LEM 815.

4.6.6 Validace klonů C6 buněk transdukovaných AP-1 reportérem

Funkčnost jednotlivých klonů byla ověřována aplikací třech různých ligandů (β -amyloid, S100B, AGE-BSA) RAGE receptoru. Vzhledem k odlišné kinetice působení jednotlivých ligandů (není ukázáno) byly zvoleny pro měření dva různé časové intervaly – 6 hodin a 24 hodin. Zvolené koncentrace ligandů vykazovaly maximální nárůst aktivity při studiu kinetiky působení na C6 buňkách exprimujících NF- κ B reportér (není ukázáno).

- 1) Jednotlivé klony byly vysety na 96-jamkový panel v koncentraci 100 000/ml (80 μ l/jamku). Následující den byly aplikovány roztoky ligandů v výsledných koncentracích – 2,5 μ mol/l β -amyloid; 0,05 mg/ml S100B; 0,05 mg/ml AGE-BSA. Objem přidaných roztoků ligandů byl 20 μ l. Do kontrolních jamek jsem napipetovala 20 μ l média.
- 2) Po 6 hodinách od aplikace ligandů jsem z panelu určeného pro měření po 6 hodinách odsála médium a jamky promyla 200 μ l roztoku 1 x PBS. Po odsátí jsem přidala do jamek 20 μ l lyzačního pufru, připraveného smícháním 4 dílů H₂O a 1 dílu lyzačního pufru (Cell Culture Lysis Reagent; Promega) a panel dala na 5 minut na třepačku. Nakonec jsem do jamek aplikovala 100 μ l luciferázové směsi připravené přidáním 10 ml luciferázového pufru (Promega) do lahvičky s lyofilizovaným substrátem luciferázy (Promega) a ihned změřila luminiscenci na přístroji EnSpire. Stejným způsobem jsem zpracovala panel pro časový interval 24h.

4.6.7 Studium potenciálního inhibičního vlivu vybraných derivátů pyrimidinu na signální dráhu MAPK/JNK

Pro studium inhibičního vlivu derivátů pyrimidinu na signální dráhu MAPK/JNK byly vybrány klony, které po aplikaci ligandů vykazovaly nejvyšší nárůst aktivity. Buňky jsem ředila na koncentraci 100 000/ml a po 80 μ l nanasla na 96-jamkový panel. K buňkám jsem pipetovala ligandy (β -amyloid; S100B; AGE-BSA) ve stejných koncentracích, které byly použity při validaci klonů. Testované deriváty pyrimidinu s vnitřním označením LEM 814 a LEM 815 byly ředěny v médiu na výslednou koncentraci odpovídající hodnotě 1x, resp. 5x IC₅₀ a aplikovány vždy 30 minut před přidáním ligandu. Schéma experimentu znázorňuje obrázek 11. Testování probíhalo opět ve 2 časových intervalech – 6 hodin a 24 hodin a procedura zpracování panelů byla totožná jako u validace klonů.

Kontrola (10 μ l média)				10 μ l LEM 814 1x IC50				10 μ l LEM 814 5x IC50			
10 μ l LEM 815 1x IC50				10 μ l LEM 815 5x IC50							

Obr. 11 – Schéma experimentu.

Legenda: žlutá barva – přidavek 10 μ l média; červená barva – přidavek 10 μ l β -amyloidu (výsledná koncentrace 2,5 μ mol/l); zelená barva – přidavek 10 μ l S100B (0,05 mg/ml); modrá barva – přidavek 10 μ l AGE-BSA (0,05 mg/ml)

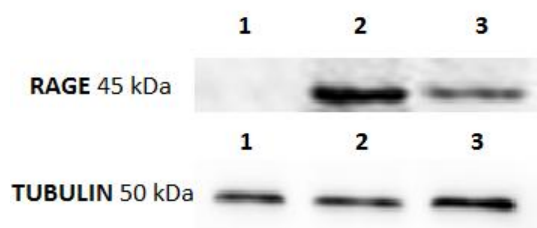
5. Výsledky

5.1 Ověření exprese receptoru RAGE v C6 buňkách

Pro ověření exprese receptoru RAGE v C6 buňkách byla použita metoda Western blotu. K imunodetekci byla použita králičí anti RAGE (Sigma-Aldrich) ředěná v poměru 1:1000 a pro normalizaci myší anti Tubulin (Cell Signaling) ředěný taktéž 1:1000. Sekundární protilátky proti anti-rabbit anti-mouse značené křenovou peroxidázou (obě Sigma-Aldrich) byly ředěny v poměru 1:10 000. Všechny protilátky jsem ředila v blokovacím pufru.

Na akrylamidový gel jsem nanášela 3 vzorky – lyzát z CHO, A549 a C6 buněk. CHO buňky neexprimují receptor RAGE a sloužily tedy jako negativní kontrola, A549 buňky naopak receptor RAGE exprimují a sloužily tedy jako pozitivní kontrola. Všechny tři vzorky byly lyzovány v RIPA pufru a stabilizovány povařením v Laemmliho pufru s 2-merkaptoethanolem.

Výsledky potvrdily expresi RAGE v C6 buňkách (Obr. 12) na základě přítomnosti bandu odpovídající velikosti (45 kDa). Expresi proteinů jsem detekovala pomocí přístroje Odyssey Fc (Li-Cor) jako chemiluminiscenční signál rezultující z reakce křenové peroxidázy a luminiscenčního substrátu (Millipore) přidaného na membránu.

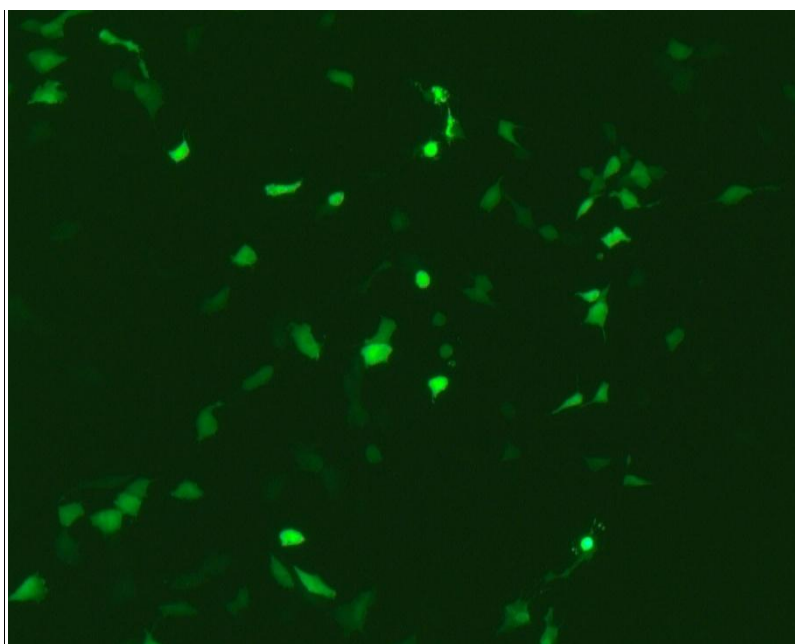


Obr. 12 – Western blot analýza exprese RAGE v buněčných lyzátech.

- 1 – CHO buňky
- 2 – A549 buňky
- 3 – C6 buňky

5.2 Ověření úspěšnosti transdukce

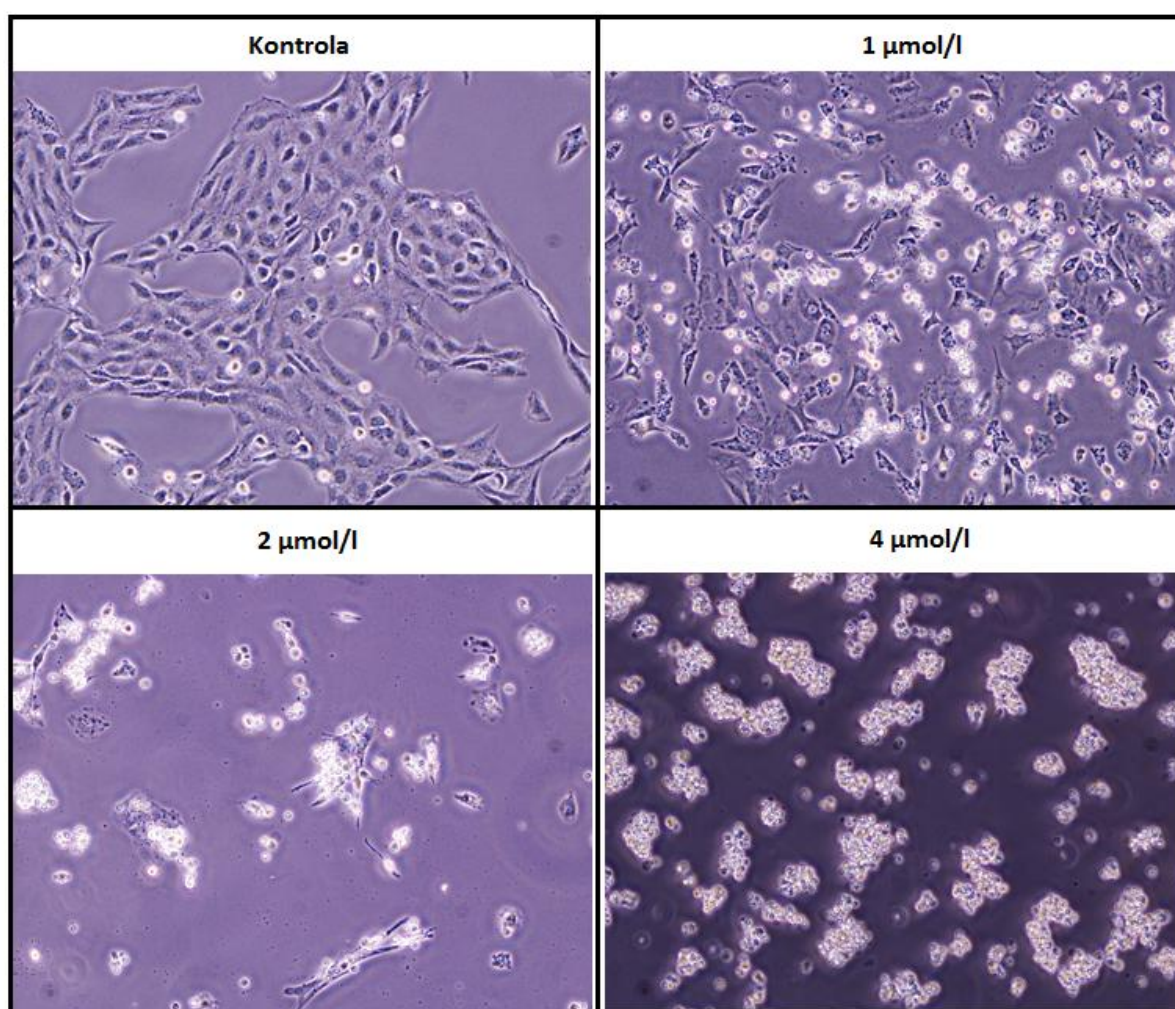
K transdukci byly použity komerčně dostupné lentivirové částice (SABiosciences) kódující indukibilní AP-1 responsivní konstrukt exprimující luciferázu. K ověření úspěšnosti transdukce byla paralelně provedena transdukce lentivirovými částicemi konstitutivně exprimujícími zelený fluorescenční protein (GFP), sloužící tedy jako pozitivní kontrola (Obr. 7). Takto transdukované buňky jsme po 48 hodinách prohlédli pod mikroskopem Axio Observer D1 (Zeiss) použitím odpovídajícího filtru pro GFP. Transdukované buňky vykazovaly zelenou fluorescenci díky expresi GFP a jejich počet se blížil 100 % (Obr. 13). Tím byla potvrzena úspěšnost a vysoká efektivita transdukce.



Obr. 13 – Mikroskopický obraz C6 buněk transdukovaných lentivirovými částicemi exprimujícími zelený fluorescenční protein (GFP) po 48 hodinách (pozitivní kontrola).

5.3 Vyhodnocení testu citlivosti C6 buněk k puromycinu

Test citlivosti C6 buněk k puromycinu jsem provedla za účelem selekce pozitivních buněk po transdukci. Testovala jsem celkem 3 koncentrace puromycinu (1 $\mu\text{mol/l}$, 2 $\mu\text{mol/l}$, 4 $\mu\text{mol/l}$) a výchozí koncentrace buněk byla 20 000/ml. Cílem bylo nalezení nejnižší koncentrace puromycinu, která způsobí po 3 dnech kultivace smrt všech nebo téměř všech buněk. Po 3 dnech kultivace jsem zhodnotila mikroskopický obraz buněk (Obr. 14) a na jeho základě zvolila pro selekci koncentraci 2 $\mu\text{mol/l}$, při které došlo k usmrcení téměř 100 % buněk.



Obr. 14 – Mikroskopický obraz buněk 3 dny po aplikaci puromycinu v koncentracích 1 $\mu\text{mol/l}$, 2 $\mu\text{mol/l}$ a 4 $\mu\text{mol/l}$.

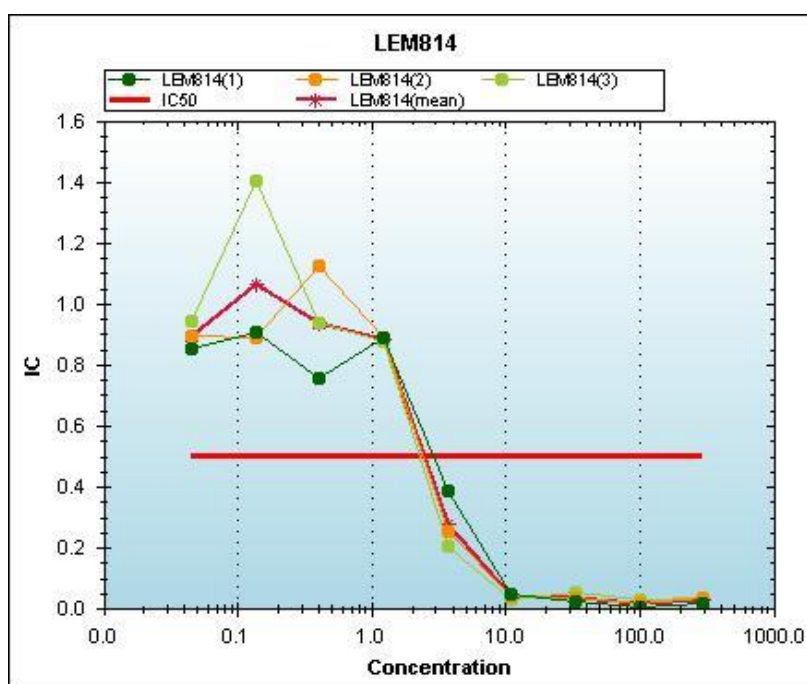
5.4 Vyhodnocení MTT testu

MTT test jsem použila za účelem zjištění hodnot IC₅₀ u testovaných látek (LEM 814 a LEM 815) na buněčné linii C6. Z výchozích 10 mmol/l roztoků látek v DMSO byla připravena ředící řada s faktorem ředění 3 celkem pro 9 koncentrací v rozmezí 300 – 0,04 μmol/l. Všechny koncentrace byly testovány v triplicátech. Hodnoty IC₅₀ vypočtené pomocí programu Chemorezist jsou uvedeny v Tab. I.

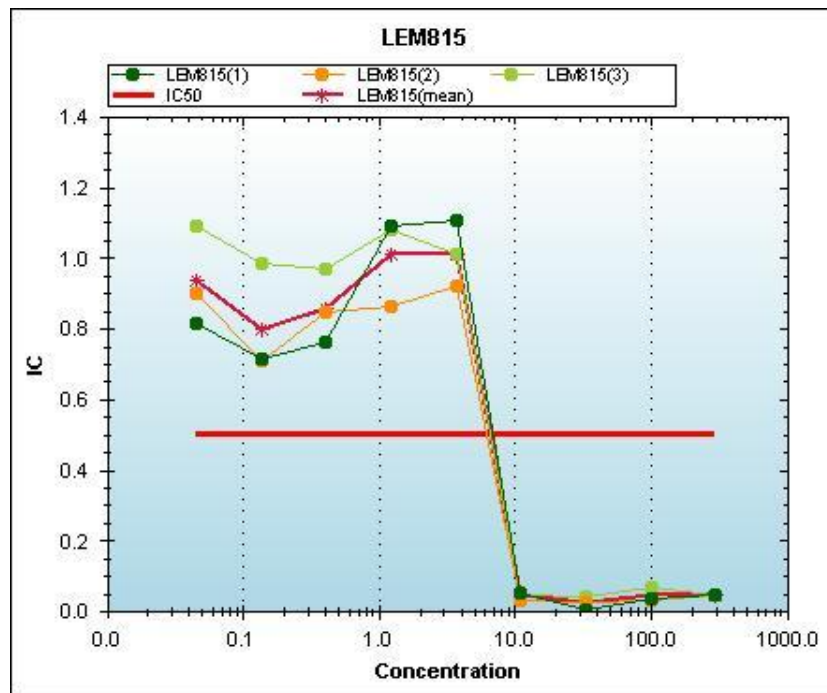
Tab. I – Hodnoty IC₅₀ zjištěné pomocí MTT testu pro testované látky LEM 814 a LEM 815 na buněčné linii C6.

Buněčná linie	Látka	IC ₅₀ (μmol/l)
C6	LEM 814	2,83
	LEM 815	7,59

Grafy znázorňující závislost viability buněk na koncentraci testovaných látek jsou na obrázku 15 a 16. Fialová čára zde znázorňuje průměrné hodnoty ze 3 opakování, červená pak hodnotu absorbance odpovídající 1/2 průměrné hodnoty absorbance u neovlivněných buněk. Hodnota koncentrace odpovídající IC₅₀ byla kalkulována z průniku těchto čar promítnutých na osu x.



Obr. 15 – Graf závislosti viability buněk na koncentraci testované látky LEM 814.



Obr. 16 – Graf závislosti viability buněk na koncentraci testované látky LEM 815.

5.5 Vyhodnocení validace klonů odvozených z C6 buněk transdukovaných AP-1 reportérem

Ověření funkčnosti jednotlivých klonů jsem provedla pomocí ligandů pro receptor RAGE (AGE-BSA; β -amyloid; S100B). Jelikož mají tyto ligandy odlišnou kinetiku působení, byly zvoleny dva časové intervaly měření – 6 a 24 hodin. Všechny ligandy byly testovány ve čtyřech opakováních. Relativní luciferázová aktivita (RLA) odpovídá hodnotám luminiscence naměřeným na spektrofotometru EnSpire. Cílem bylo nalézt klony odpovídající na aplikaci jednotlivých ligandů nárůstem RLA ve srovnání s nestimulovanými buňkami a na těchto klonech poté testovat potenciální inhibiční vliv derivátů pyrimidinu na signální dráhu MAPK/JNK.

Z hodnot RLA pro jednotlivá opakování jsem vypočítala průměrnou hodnotu RLA a směrodatnou odchylku (SMODCH) pro všechny testované klony v časových intervalech 6 a 24 hodin od aplikace jednotlivých ligandů (Tab. II; Tab. III). Jednotlivé klony byly pro přehlednost rozděleny do skupin podle bazálních hodnot RLA u nestimulovaných buněk a graficky znázorněny (Obr. 17 – 26).

Tab. II – Průměrné hodnoty relativní luciferázové aktivity (RLA) včetně směrodatných odchylek (SMODCH) jednotlivých klonů naměřené po 6 hodinách od aplikace ligandů.

Klon	6 hodin							
	RLA (a.u.)				SMODCH			
	Kontrola	β -amyloid	S100B	AGE-BSA	Kontrola	β -amyloid	S100B	AGE-BSA
N. B.	5,79E+03	2,00E+03	2,73E+03	2,27E+03	6,08E+02	1,00E+02	2,22E+02	3,15E+02
1	5,38E+05	5,08E+05	3,90E+05	4,76E+05	2,82E+04	5,65E+04	3,17E+04	5,44E+04
2	8,30E+05	5,92E+05	5,78E+05	5,68E+05	6,17E+04	7,05E+04	7,16E+04	5,37E+04
3	1,98E+06	1,83E+06	1,65E+06	1,76E+06	1,53E+05	2,60E+05	3,07E+05	2,60E+05
4	2,63E+05	2,80E+05	3,05E+05	3,57E+05	6,14E+04	2,80E+04	2,77E+04	7,03E+04
5	1,14E+06	1,12E+06	1,20E+06	1,30E+06	3,56E+04	1,85E+05	1,29E+05	7,84E+04
6	7,73E+04	5,53E+04	3,80E+04	8,85E+04	7,30E+03	3,09E+03	4,85E+03	4,84E+03
7	2,55E+02	2,00E+02	1,70E+02	1,45E+02	5,50E+01	2,30E+01	1,40E+01	2,90E+01
10	5,14E+04	4,64E+04	6,13E+04	5,13E+04	1,50E+04	2,18E+03	6,28E+03	1,02E+04
11	5,91E+03	8,76E+03	8,47E+03	8,01E+03	6,25E+02	1,26E+03	1,40E+03	8,05E+02
12	1,09E+04	1,40E+04	1,87E+04	1,37E+04	1,26E+03	4,53E+02	3,47E+03	9,37E+02
13	8,04E+05	5,61E+05	7,60E+05	6,03E+05	2,78E+04	2,49E+04	3,32E+04	9,78E+03
14	1,31E+06	1,26E+06	1,15E+06	1,41E+06	1,90E+05	1,44E+05	2,38E+05	2,86E+05
15	2,05E+06	1,72E+06	1,89E+06	2,37E+06	1,58E+05	1,70E+04	1,86E+05	2,15E+05
16	2,64E+05	2,86E+05	2,38E+05	2,70E+05	3,81E+04	1,29E+04	3,68E+04	4,65E+04
17	2,92E+04	3,77E+04	3,05E+04	2,31E+04	1,81E+03	4,73E+03	1,58E+03	2,84E+03
18	3,67E+04	1,56E+04	2,62E+04	1,63E+04	2,02E+03	9,17E+02	1,69E+03	1,36E+03
20	2,54E+05	2,25E+05	2,39E+05	2,34E+05	2,20E+04	2,03E+04	1,33E+04	1,76E+04
21	3,47E+05	2,27E+05	3,91E+05	2,13E+06	1,00E+05	9,60E+03	1,15E+05	9,19E+05
22	3,83E+05	2,30E+05	3,83E+05	4,06E+05	5,10E+04	1,45E+04	2,40E+05	1,47E+04
23	8,18E+04	6,40E+04	9,77E+04	8,84E+04	9,23E+03	5,89E+03	4,46E+03	1,22E+04
24	1,39E+05	5,40E+04	4,19E+04	4,21E+04	2,20E+04	5,60E+03	9,18E+03	3,60E+02
25	2,51E+03	1,17E+03	1,99E+03	1,37E+03	3,28E+02	2,30E+02	1,92E+02	3,05E+02
26	2,88E+05	4,90E+05	3,78E+05	3,57E+05	6,94E+04	2,21E+04	8,00E+03	2,87E+04
27	3,89E+05	1,53E+05	2,48E+05	2,66E+05	1,66E+04	3,45E+04	5,84E+04	3,78E+04
28	1,30E+05	1,28E+05	1,80E+05	1,49E+05	1,63E+04	7,07E+03	1,39E+04	2,72E+04
29	8,89E+04	5,26E+04	1,08E+05	6,78E+04	5,96E+03	9,56E+03	1,89E+04	6,78E+03
30	3,90E+05	2,88E+05	4,08E+05	4,09E+05	4,36E+04	1,19E+04	1,29E+05	4,19E+04
31	6,72E+04	7,85E+04	1,08E+05	7,00E+04	1,89E+04	2,47E+04	1,92E+04	2,15E+04

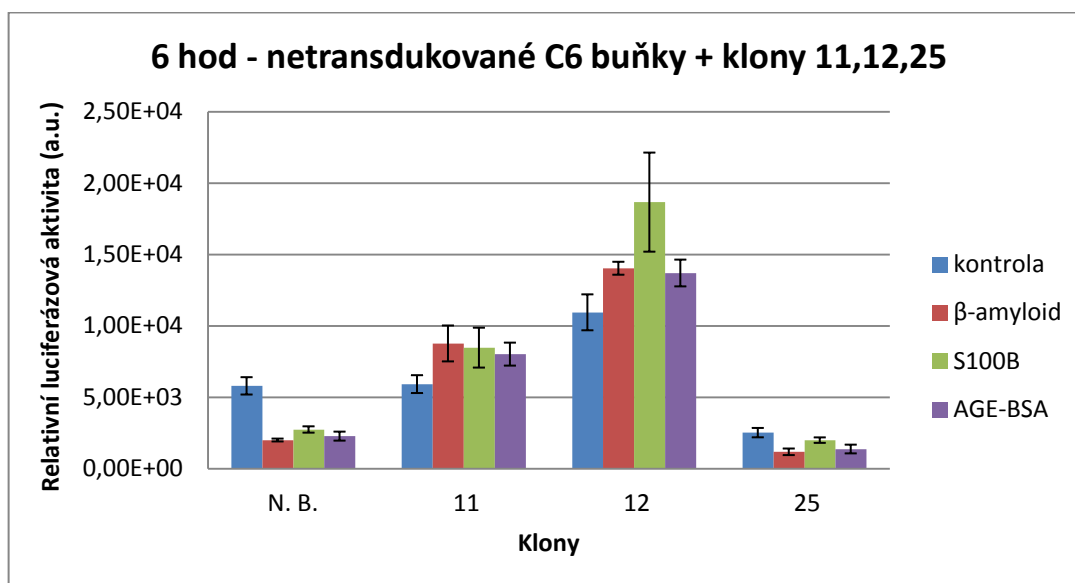
Legenda: N. B. = netransdukovávané C6 buňky.

Tab. III – Průměrné hodnoty relativní luciferázové aktivity (RLA) včetně směrodatných odchylek (SMODCH) jednotlivých klonů naměřené po 24 hodinách od aplikace ligandů.

Klon	24 hodin							
	RLA (a.u.)				SMODCH			
	Kontrola	β -amyloid	S100B	AGE-BSA	Kontrola	β -amyloid	S100B	AGE-BSA
N. B.	6,89E+03	2,44E+03	1,90E+03	2,12E+03	1,35E+03	4,61E+02	2,64E+02	1,88E+02
1	1,10E+06	1,07E+06	1,12E+06	1,12E+06	3,49E+04	2,35E+04	5,67E+04	1,10E+05
2	1,89E+06	1,54E+06	1,76E+06	2,01E+06	8,07E+04	3,20E+04	1,89E+04	8,61E+04
3	4,28E+06	5,10E+06	7,27E+06	4,86E+06	2,70E+05	9,00E+04	7,04E+05	1,64E+05
4	1,18E+06	3,72E+06	2,05E+06	1,64E+06	2,10E+05	8,54E+05	5,93E+04	8,50E+04
5	2,37E+06	2,92E+06	2,38E+06	2,35E+06	7,71E+04	1,51E+05	1,27E+05	9,09E+04
6	3,53E+04	1,41E+05	7,55E+04	1,31E+05	4,22E+03	8,64E+02	1,73E+04	3,10E+04
7	2,63E+02	2,80E+02	2,03E+02	2,03E+02	3,30E+01	6,20E+01	2,50E+01	2,60E+01
10	4,19E+04	3,64E+04	9,57E+04	1,04E+05	1,37E+04	6,99E+03	1,58E+04	4,92E+03
11	5,83E+03	1,14E+04	1,05E+04	1,19E+04	7,96E+02	2,01E+03	1,94E+03	9,16E+02
12	2,25E+04	1,31E+04	2,24E+04	2,13E+04	2,81E+03	1,70E+03	1,73E+03	3,37E+03
13	2,51E+06	2,10E+06	1,78E+06	2,26E+06	1,31E+05	3,00E+04	3,66E+05	6,16E+04
14	4,23E+06	3,04E+06	4,30E+06	2,50E+06	5,41E+05	3,15E+05	4,28E+05	1,95E+05
15	2,93E+06	4,91E+06	3,64E+06	3,18E+06	3,11E+05	4,90E+05	4,96E+05	1,78E+05
16	7,40E+05	5,65E+05	6,60E+05	6,24E+05	3,01E+04	1,08E+05	6,44E+04	4,72E+04
17	4,63E+04	3,54E+04	4,97E+04	4,69E+04	2,70E+03	6,62E+03	6,76E+03	1,62E+03
18	6,99E+04	1,85E+04	4,24E+04	4,88E+04	5,84E+03	3,03E+03	5,24E+03	9,70E+03
20	2,63E+05	3,65E+05	3,23E+05	3,04E+05	1,09E+04	3,15E+04	2,23E+04	4,36E+04
21	1,62E+06	1,97E+06	1,09E+06	1,09E+06	2,19E+05	7,66E+05	2,69E+05	2,18E+05
22	1,56E+06	9,95E+05	1,23E+06	9,92E+05	1,86E+05	1,62E+05	8,20E+04	1,78E+05
23	1,10E+05	4,38E+04	7,49E+04	6,36E+04	1,38E+04	4,88E+03	6,69E+03	1,15E+04
24	1,18E+05	1,04E+05	1,31E+05	1,15E+05	9,84E+03	4,76E+03	2,31E+04	1,05E+04
25	5,07E+03	2,44E+03	4,31E+03	3,53E+03	1,46E+03	1,76E+02	5,55E+02	6,58E+02
26	1,00E+06	7,12E+05	9,56E+05	7,23E+05	1,80E+05	8,87E+04	1,51E+05	6,97E+04
27	5,22E+05	3,50E+05	4,65E+05	4,28E+05	5,51E+04	1,75E+04	3,96E+04	6,15E+04
28	3,11E+05	2,48E+05	8,76E+04	9,52E+04	4,13E+04	1,67E+04	3,35E+03	9,31E+03
29	2,49E+05	4,31E+05	3,08E+05	2,24E+05	2,51E+04	8,63E+04	9,50E+03	2,67E+04
30	9,38E+05	5,75E+05	1,08E+06	9,55E+05	6,10E+04	1,68E+04	1,78E+05	4,86E+04
31	1,32E+05	2,07E+05	1,01E+05	8,86E+04	5,05E+03	1,72E+04	3,90E+02	1,60E+04

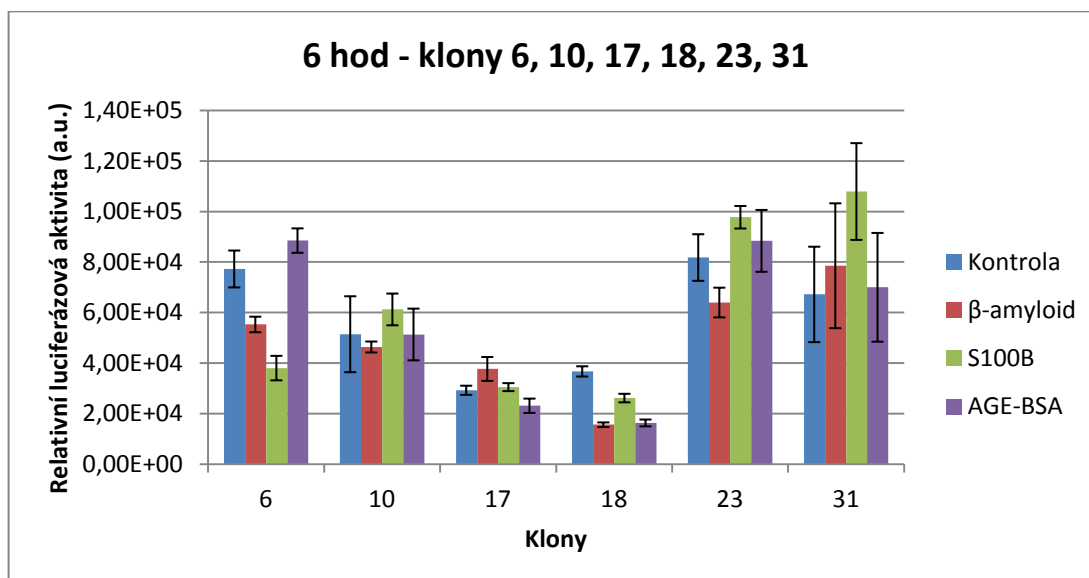
Legenda: N. B. = netransdukovávané C6 buňky.

Po 6ti hodinové stimulaci nevykazoval žádný klon významný nárůst hodnoty RLA po aplikaci testovaných ligandů. Klon 21 vykazoval výrazně zvýšenou hodnotu RLA po aplikaci AGE-BSA, avšak tato hodnota je zatížena vysokou SMODCH.

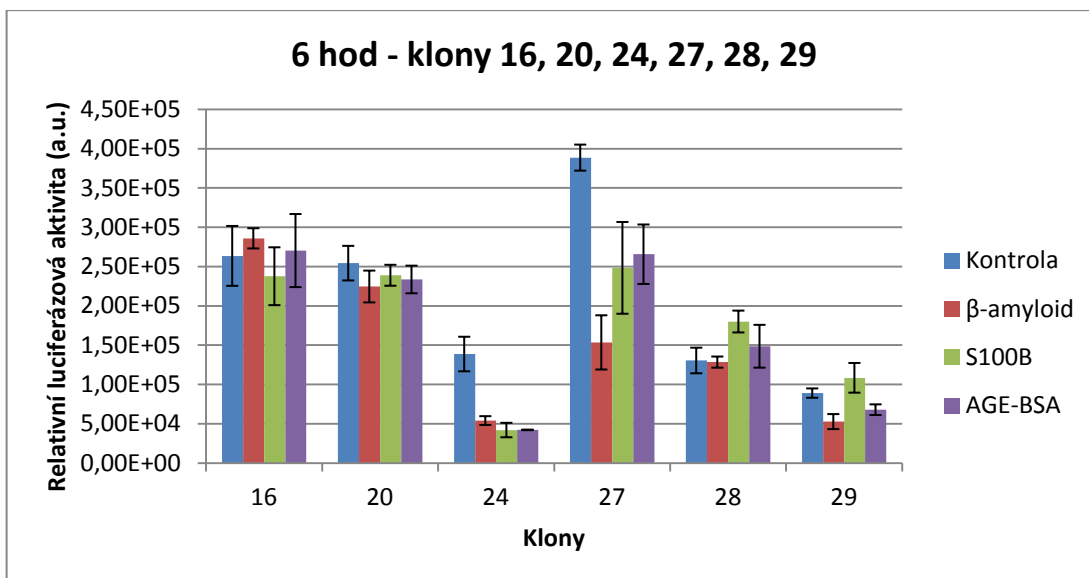


Obr. 17 – Netransdukované C6 buňky a klony 11, 12 a 25; 6 hod – graf znázorňující změny relativní luciferázové aktivity po aplikaci ligandů.

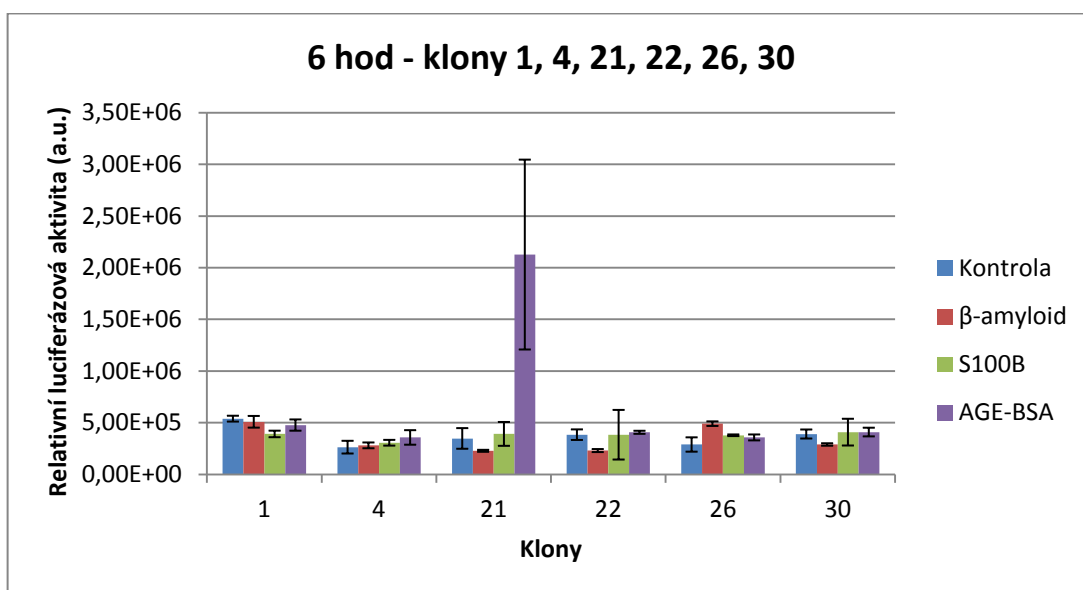
Legenda: N. B. = netransdukované C6 buňky.



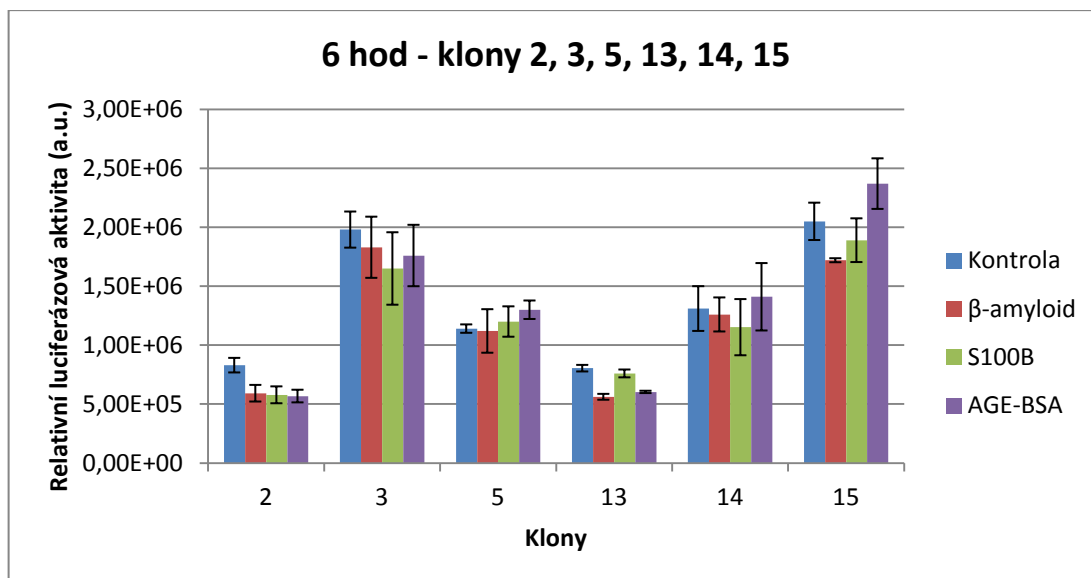
Obr. 18 – Klony 6, 10, 17, 18, 23 a 31; 6 hod – graf znázorňující změny relativní luciferázové aktivity po aplikaci ligandů.



Obr. 19 – Klony 16, 20, 24, 27, 28 a 29; 6 hod – graf znázorňující změny relativní luciferázové aktivity po aplikaci ligandů.

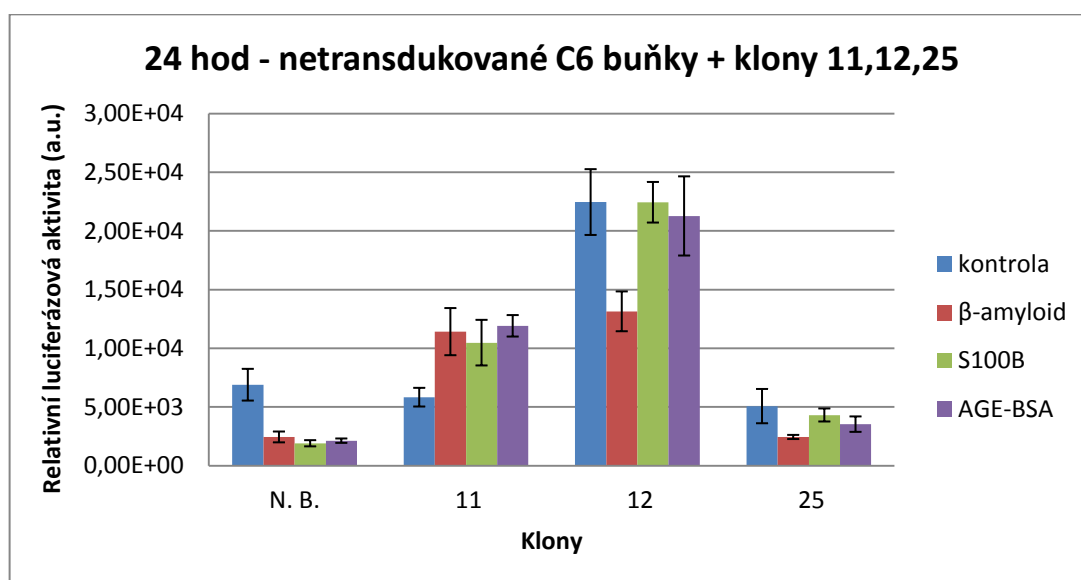


Obr. 20 – Klony 1, 4, 21, 22, 26 a 30; 6 hod – graf znázorňující změny relativní luciferázové aktivity po aplikaci ligandů.



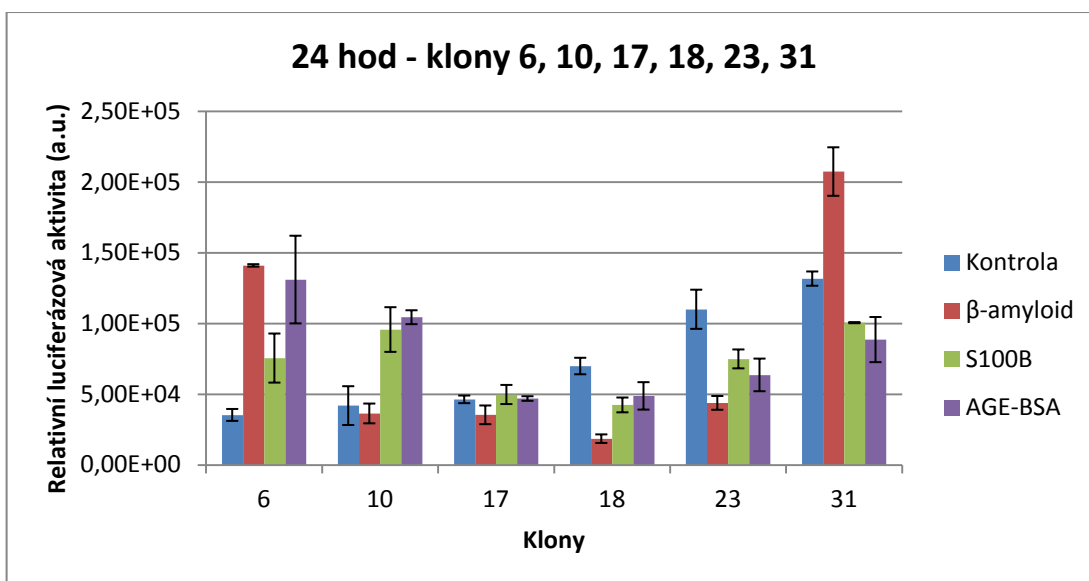
Obr. 21 – Klony 2, 3, 5, 13, 14 a 15; 6 hod – graf znázorňující změny relativní luciferázové aktivity po aplikaci ligandů.

V intervalu 24 hodin vykazovaly nejvyšší odezvu na aplikaci všech testovaných ligandů klony 4 a 6 a ve všech případech se jedná o významné nárůsty RLA. (Obr. 17; Obr. 19). Klon 7 jsem do grafů nezařadila vzhledem k velmi nízkým hodnotám RLA, patně v důsledku neúspěšné transdukce a přežití pod puromycinovým tlakem.

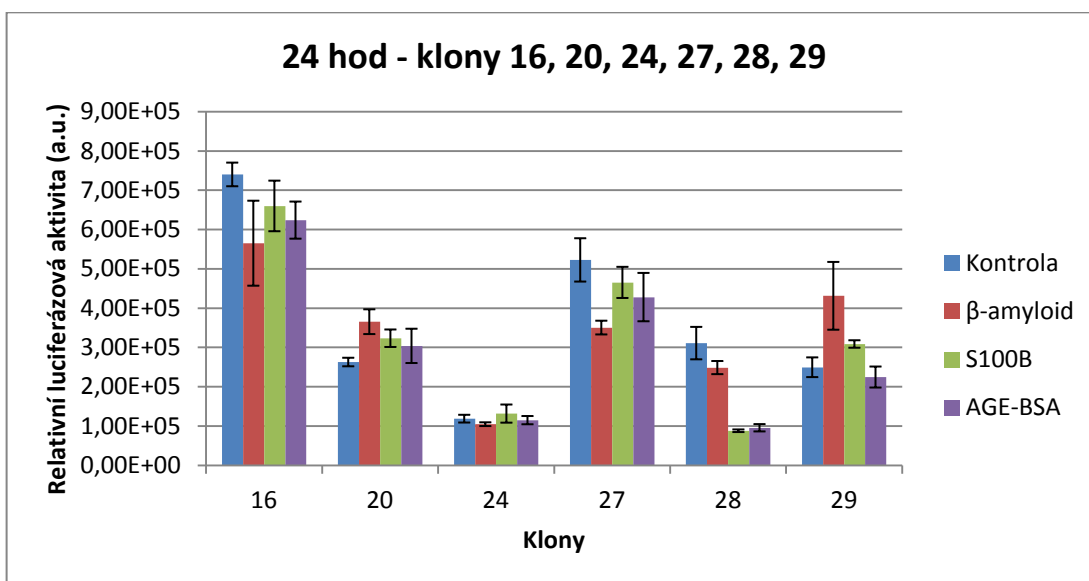


Obr. 22 – Netransdukované C6 buňky a klony 11, 12 a 25; 24 hod – graf znázorňující změny relativní luciferázové aktivity po aplikaci ligandů.

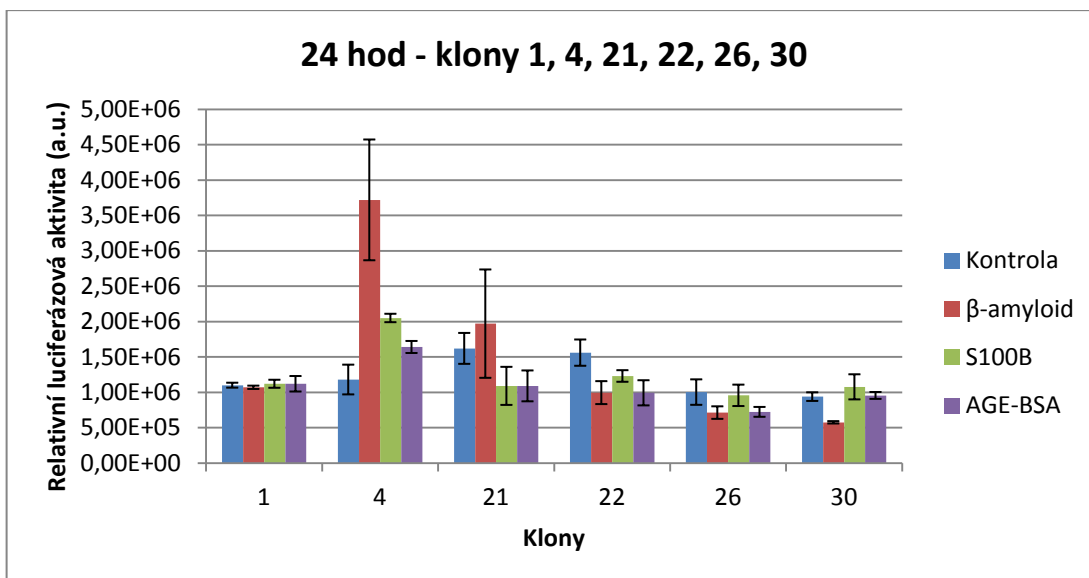
Legenda: N. B. = netransdukované C6 buňky



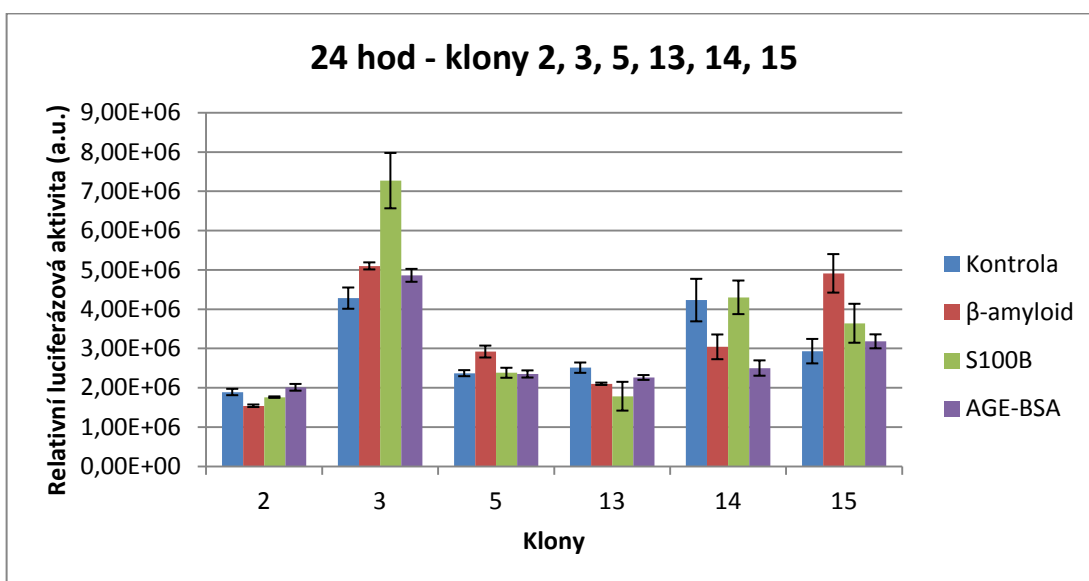
Obr. 23 – Klony 6, 10, 17, 18, 23 a 31; 24 hod – graf znázorňující změny relativní luciferázové aktivity po aplikaci ligandů.



Obr. 24 – Klony 16, 20, 24, 27, 28 a 29; 24 hod – graf znázorňující změny relativní luciferázové aktivity po aplikaci ligandů.



Obr. 25 – Klony 1, 4, 21, 22, 26, a 30; 24 hod – graf znázorňující změny relativní luciferázové aktivity po aplikaci ligandů.



Obr. 26 – Klony 2, 3, 5, 13, 14 a 15; 24 hod – graf znázorňující změny relativní luciferázové aktivity po aplikaci ligandů.

5.6 Vyhodnocení potenciálního inhibičního vlivu látek LEM814 a 815 na signální dráhu MAPK/JNK

Pro testování byly vybrány klony 4 a 6, které vykazovaly nejvýraznější odezvu po aplikaci všech RAGE ligandů. Měření RLA probíhalo opět ve 2 časových intervalech – 6 hodin a 24 hodin. Z naměřených hodnot RLA pro 4 jednotlivá opakování jsem vypočetla průměrné hodnoty a směrodatné odchylky pro každý klon (Tab. IV a Tab. VI).

Tab. IV – Výsledky kombinovaného působení RAGE ligandů a látek LEM 814 a 815 u klonů 4 a 6 v časovém intervalu 6 hod.

Klon	Látky	6 hodin							
		RLA				SMODCH			
		Kontrola	β -amyloid	S100B	AGE-BSA	Kontrola	β -amyloid	S100B	AGE-BSA
4	Kontrola	2,03E+05	3,44E+05	3,66E+05	3,67E+05	6,22E+03	8,06E+03	5,08E+03	6,68E+03
	LEM 814 1x IC50	2,19E+05	2,60E+05	2,90E+05	2,48E+05	9,90E+03	9,12E+03	1,91E+04	2,85E+04
	LEM 814 5x IC50	1,96E+05	2,41E+05	2,21E+05	1,91E+05	1,26E+04	1,44E+04	1,32E+04	6,06E+03
	LEM 815 1x IC50	1,98E+05	2,88E+05	3,04E+05	2,78E+05	7,22E+03	1,08E+04	2,70E+02	8,50E+01
	LEM 815 5x IC50	1,91E+05	1,89E+05	2,31E+05	2,06E+05	2,12E+03	3,78E+03	9,64E+03	1,01E+04
6	Kontrola	3,81E+04	3,68E+04	4,93E+04	4,71E+04	2,49E+03	2,68E+03	7,32E+03	2,59E+03
	LEM 814 1x IC50	4,59E+04	3,11E+04	4,37E+04	3,78E+04	3,06E+03	1,80E+03	4,52E+02	6,88E+03
	LEM 814 5x IC50	4,06E+04	3,36E+04	3,66E+04	4,46E+04	1,33E+03	3,26E+03	2,29E+03	1,33E+03
	LEM 815 1x IC50	4,01E+04	3,34E+04	4,71E+04	4,03E+04	1,77E+03	4,13E+03	4,10E+03	2,07E+03
	LEM 815 5x IC50	3,91E+04	3,27E+04	4,25E+04	3,75E+04	2,68E+03	1,58E+03	3,03E+03	2,58E+03

Obě látky LEM 814 a LEM 815 v koncentraci 5x IC50 v čase 24 hodin významně inhibují proliferaci, ale nezpůsobují buněčnou smrt, což bylo zjištěno na základě mikroskopického obrazu. Bylo tedy nutné naměřené hodnoty RLA normalizovat. K normalizaci byly použity hodnoty absorbance naměřené v buněčných lyzátech neovlivněných buněk a buněk ovlivněných oběma látkami v koncentracích 1x resp. 5x IC50 smíchaných s činidlem Bradfordové. Normalizace byla provedena pouze pro interval 24 hodin, jelikož po 6 hodinách nebyla na základě mikroskopického obrazu inhibice proliferace zřejmá. Naměřená hodnota absorbance koreluje s počtem buněk v jamce. Vzhledem k tomu, že ligandy sami o sobě nemají žádný nebo pouze minimální vliv

na proliferaci buněk, byly pro normalizaci hodnot RLA u kombinovaného působení látky a ligandu použity hodnoty absorbance naměřené v lyzátech po působení látky samotné.

Z naměřených hodnot absorbance jsem nejprve odečetla blank, vynásobila faktorem 100 a získanou hodnotou podělila RLA pro odpovídající kombinace působení, čímž došlo k normalizaci hodnot na obsah proteinu (počet buněk; Tab. V a VI).

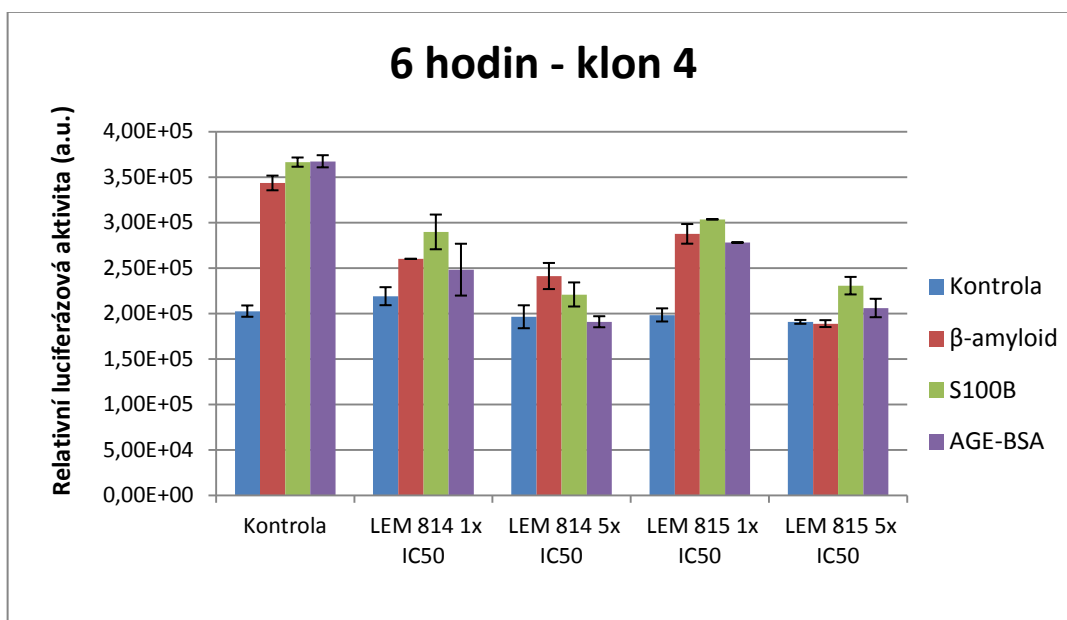
Tab. V – Normalizační faktory pro látky LEM 814 a 815 vypočtené z hodnot absorbance naměřených v buněčných lyzátech

	Kontrola	LEM 814 1x IC50	LEM 814 5x IC50	LEM 815 1x IC50	LEM 815 5x IC50
Absorbance (A₅₉₅)	0,175	0,179	0,171	0,180	0,171
odečet blanku (0,155)	0,020	0,024	0,016	0,025	0,016
Normalizační faktor (x 100)	2	2,4	1,6	2,5	1,6

Tab. VI – Výsledky kombinovaného působení RAGE ligandů a látek LEM 814 a 815 u klonů 4 a 6 v časovém intervalu 24 hod po normalizaci na obsah proteinu.

Klon	Látky	24 hodin							
		RLA				SMODCH			
		Kontrola	β -amyloid	S100B	AGE-BSA	Kontrola	β -amyloid	S100B	AGE-BSA
4	Kontrola	3,32E+05	4,67E+05	6,74E+05	6,54E+05	3,83E+04	2,71E+04	3,72E+04	5,78E+04
	LEM 814 1x IC50	2,95E+05	3,01E+05	2,84E+05	2,96E+05	4,31E+04	2,06E+04	4,04E+04	1,22E+04
	LEM 814 5x IC50	3,55E+05	3,69E+05	3,62E+05	3,63E+05	2,82E+03	3,55E+03	1,61E+03	2,98E+03
	LEM 815 1x IC50	3,03E+05	3,54E+05	3,07E+05	3,00E+05	9,14E+03	2,46E+04	3,10E+04	3,41E+04
	LEM 815 5x IC50	3,86E+05	3,54E+05	3,92E+05	3,87E+05	3,23E+04	1,22E+04	1,40E+04	1,14E+04
6	Kontrola	4,89E+04	5,04E+04	1,17E+05	1,11E+05	2,70E+03	8,49E+02	1,58E+03	1,30E+03
	LEM 814 1x IC50	4,36E+04	4,20E+04	4,29E+04	4,39E+04	4,19E+03	7,52E+02	2,47E+03	2,65E+03
	LEM 814 5x IC50	4,60E+04	4,06E+04	4,04E+04	4,29E+04	2,38E+03	3,10E+03	8,08E+02	1,44E+03
	LEM 815 1x IC50	5,03E+04	4,69E+04	5,16E+04	5,57E+04	4,05E+03	2,25E+03	1,97E+03	1,00E+03
	LEM 815 5x IC50	6,48E+04	5,55E+04	6,96E+04	7,72E+04	4,33E+03	4,57E+03	4,71E+03	1,71E+04

V případě klonu 4 v intervalu 6 hodin způsobovaly obě látky v testovaných koncentracích pokles RLA u buněk stimulovaných ligandy (Obr. 27). V případě β -amyloidu došlo ke snížení RLA na hodnoty v rozmezí 63,6 % až -1,34 %, u buněk aktivovaných S100B na 64,16 % až 14,97 % a u buněk aktivovaných AGE-BSA na 48,33 % až -3,31 % rozílu hodnot RLA stimulovaných a nestimulovaných buněk (100 %). (Tab. VII).



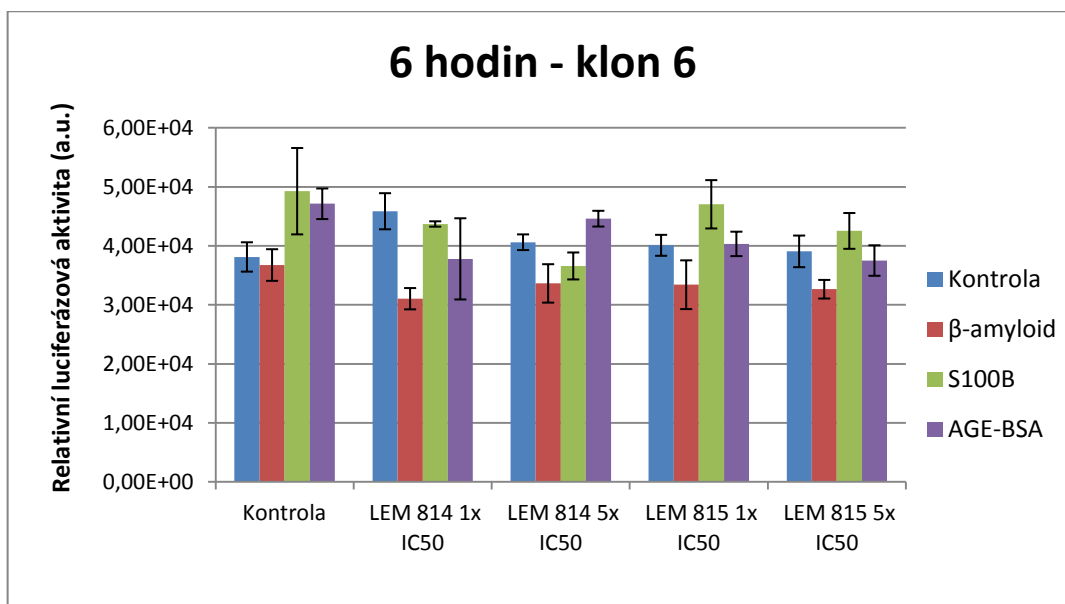
Obr. 27 – Klon 4; 6 hod – graf znázorňující změny relativní luciferázové aktivity po aplikaci ligandů a kombinovaním působení ligandů s látkami.

Tab. VII – Klon 4; 6 hod – pokles relativní luciferázové aktivity (%) u stimulovaných buněk po působení látek LEM 814 a 815.

		Kontrola	LEM 814 1x IC50	LEM 814 5x IC50	LEM 815 1x IC50	LEM 815 5x IC50
RLA (%)	β -amyloid	100	29,15	31,80	63,60	-1,34
	S100B	100	43,14	14,97	64,16	24,30
	AGE-BSA	100	17,70	-3,31	48,33	9,25

U klonu 6 nebyl v intervalu 6 hodin zaznamenán významný nárůst RLA po aplikaci ligandů, v případě β -amyloidu nedošlo vůbec k aktivaci (Obr. 28). Inhibiční efekt obou látek v testovaných koncentracích snížil u buněk aktivovaných S100B hodnotu RLA na 62,37 % až -36,06 %, a u AGE-BSA na hodnoty v rozmezí 44,31 % až -89,59 % oproti

aktivovaným kontrolním buňkám (Tab. VIII). V případě β -amyloidu jsem inhibici nestanovovala, jelikož nezpůsobil aktivaci.

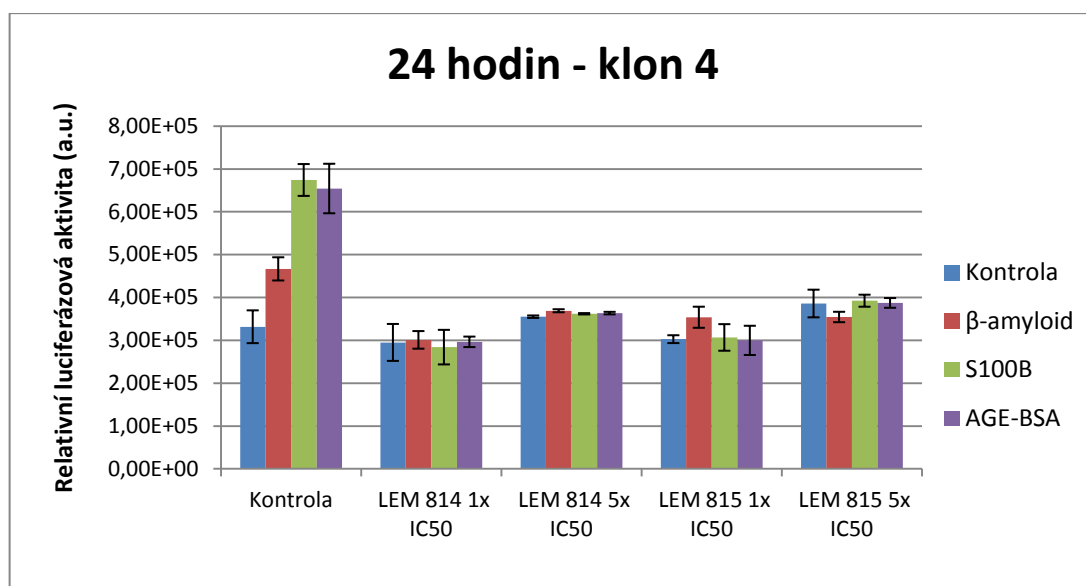


Obr. 28 – Klon 6; 6 hod – graf znázorňující změny relativní luciferázové aktivity po aplikaci ligandů a kombinovaním působení ligandů s látkami.

Tab. VIII – Klon 6; 6 hod – pokles relativní luciferázové aktivity (%) u stimulovaných buněk po působení látek LEM 814 a 815.

		Kontrola	LEM 814 1x IC50	LEM 814 5x IC50	LEM 815 1x IC50	LEM 815 5x IC50
RLA (%)	S100B	100	-19,38	-36,06	62,37	31,11
	AGE-BSA	100	-89,59	44,31	2,66	-17,24

V případě klonu 4 v intervalu 24 hodin došlo po aplikaci ligandů (především S100B a AGE-BSA) k výraznému nárůstu RLA a to až o 100 % oproti buňkám neaktivovaným (Obr. 29). Obě látky v testovaných koncentracích prokázaly značný inhibiční efekt. Konkrétně v případě aktivace β -amyloidem byla hodnota RLA snížena na 37,88 % až -23,29 %, u S100B na 1,98 % až -3,21 % a v případě aktivace AGE-BSA na 2,58 % až -0,88 % oproti aktivovaným kontrolním buňkám (Tab. IX).

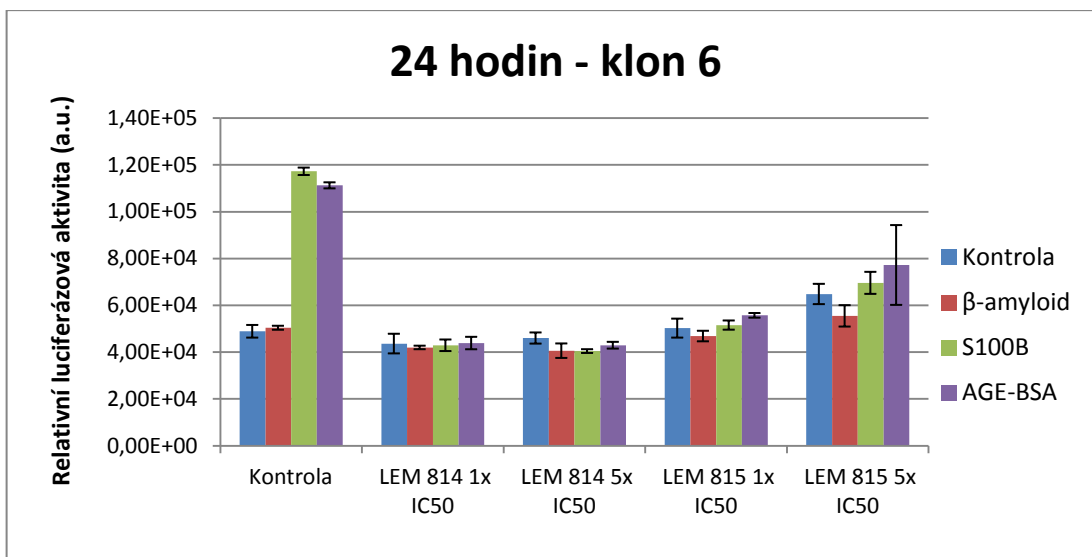


Obr. 29 – Klon 4; 24 hod – graf znázorňující změny relativní luciferázové aktivity po aplikaci ligandů a kombinovaním působení ligandů s látkami.

Tab. IX – Klon 4; 24 hod – pokles relativní luciferázové aktivity (%) u stimulovaných buněk po působení látek LEM 814 a 815.

		Kontrola	LEM 814 1x IC50	LEM 814 5x IC50	LEM 815 1x IC50	LEM 815 5x IC50
RLA (%)	β -amyloid	100	4,39	10,26	37,88	-23,29
	S100B	100	-3,21	1,98	1,17	1,90
	AGE-BSA	100	0,42	2,58	-0,88	0,43

V případě klonu 6 v intervalu 24 hodin byl zaznamenán více než 100% nárůst RLA po aplikaci ligandů S100B a AGE-BSA (Obr. 30). Obě látky v testovaných koncentracích opět prokázaly značný inhibiční efekt, v případě S100B poklesla hodnota RLA na 6,96 % až -8,16 % a v případě AGE-BSA na 19,88 % až -4,92 % ve srovnání s aktivovanými kontrolními buňkami (Tab. X). Ligand β -amyloid nezpůsobil téměř žádný nárůst RLA, tudíž v jeho případě nemělo význam určovat inhibiční efekt látek.



Obr. 30 – Klon 6; 24 hod – graf znázorňující změny relativní luciferázové aktivity po aplikaci ligandů a kombinovaním působení ligandů s látkami.

Tab. X – Klon 6; 24 hod – pokles relativní luciferázové aktivity (%) u stimulovaných buněk po působení látek LEM 814 a 815.

		Kontrola	LEM 814 1x IC50	LEM 814 5x IC50	LEM 815 1x IC50	LEM 815 5x IC50
RLA (%)	S100B	100	-1,05	-8,16	1,90	6,96
	AGE-BSA	100	0,37	-4,92	8,76	19,88

6. Diskuze

Receptor RAGE představuje díky své spoluúčasti na vzniku řady lidských onemocnění jako je například rakovina či Alzheimerova nemoc zajímavý terapeutický cíl. Vzhledem k faktu, že z dosud literárně popsaných inhibitorů RAGE dosáhly pouze dva klinického testování, je velmi motivující hledat další potenciální inhibitory.

Na Ústavu molekulární a translační medicíny LF UP byla testována skupina celkem 21 látek, strukturně odvozených od pyrimidinu (4,5,6-trisubstituované-2-aminopyrimidiny) a syntetizovaných Dr. Kolmanem na pražském ÚOCHABu, jako potenciálních inhibitorů RAGE receptoru. Inspirací k testování těchto látek byla studie korejského týmu vědců (Han *et al.*, 2012), kteří syntetizovali skupinu 4,6-disubstituovaných derivátů pyrimidinu, u nichž prokázali inhibiční vliv na receptor RAGE *in vitro* a rovněž *in vivo* na myších modelech. Na základě výsledků testování celé skupiny 4,5,6-trisubstituovaných-2-aminopyrimidinů na sensorické linii monitorující signální dráhu NF κ B, která je v rámci RAGE signalizace patrně klíčová, byly vyselektovány 2 deriváty (LEM 814 a LEM 815), které vykazovaly nejvýraznější inhibiční efekt. K nepřímému potvrzení interakce těchto látek s RAGE receptorem jsme se rozhodli studovat jejich možný inhibiční vliv na další signální dráhu downstream RAGE – MAPK/JNK, což bylo hlavním cílem této bakalářské práce. Za tímto účelem byla připravena sensorická buněčná linie odvozená od C6 buněk exprimujících RAGE receptor.

C6 buňky byly transdukovány komerčními lentivirovými částicemi (Cignal Lenti Reporter Assays; SABiosciences) kódujícími inducibilní AP-1 responsivní konstrukt exprimující luciferázu. Po selekci byla homogenní populace pozitivních buněk rozklonována za účelem získání individuálních klonů. Vyseletovala jsem celkem 31 klonů, jejichž funkčnost jsem testovala stimulací 3 různými RAGE ligandy (β -amyloid; S100B; AGE-BSA) v časových intervalech 6 a 24h vzhledem k odlišné kinetice působení jednotlivých ligandů. Cílem bylo najít takové klony, u nichž došlo k nejvýraznější aktivaci AP-1 transkripčního faktoru po stimulaci jednotlivými RAGE ligandy. U některých klonů nebyl pozorován žádný nárůst aktivity, u jiných byl nárůst nepatrný nebo byla aktivita zvýšená stimulací jen jednoho ligandu. Pro testování účinku pyrimidinů na MAPK/JNK signalizaci jsem vybrala 2 klony, které vykazovaly nejvyšší nárůst aktivity alespoň u dvou RAGE ligandů. Klon 4 vykazoval přibližně trojnásobný nárůst aktivity oproti kontrole po stimulaci β -amyloidem a téměř dvojnásobný nárůst po stimulaci S100B. Klon 6 vykazoval více než trojnásobný

nárůst aktivace oproti kontrole po aplikaci β -amyloidu a AGE-BSA a více než dvojnásobný nárůst po aplikaci ligandu S100B. U obou klonů bylo maximální aktivace dosaženo v časovém intervalu 24 hodin.

Pro testování potenciálního inhibičního účinku látek LEM 814 a LEM 815 jsem zvolila koncentrace odpovídající hodnotám 1x, resp. 5x IC₅₀ zjištěným MTT testem. Výsledky prokázaly významný inhibiční vliv látek na signální dráhu MAPK/JNK a to v obou testovaných koncentracích. Inhibice byla nejvýraznější v intervalu 24 hodin, kdy po stimulaci ligandy S100B a AGE-BSA obě látky prakticky zcela inhibovaly aktivaci AP-1 na úroveň nestimulovaných buněk. V intervalu 6 hodin nebyly efekty tak významné, přesto však u klonu 4 došlo k redukci aktivace AP-1 na přibližně 60 – 5 % hodnoty aktivace stimulovaných buněk v závislosti na použitém ligandu. Klon 6 v intervalu 6 hodin nevykazoval významný nárůst aktivace po stimulaci žádného z ligandů, proto je zde hodnocení inhibičního vlivu látek bezpředmětné.

Obecně vykazovaly obě látky výraznější efekty v koncentraci 5x IC₅₀, kdy však vzhledem k patrné inhibici proliferace byla nutná normalizace naměřených hodnot na koncentraci proteinu. Dosažené výsledky jednoznačně prokázaly inhibiční vliv 4,5,6-trisubstituovaných-2-aminopyrimidinů – LEM 814 a LEM 815 na signální dráhu MAPK/JNK, čímž došlo nepřímo k potvrzení jejich interakce s RAGE receptorem.

7. Závěr

Cílem této práce bylo prokázat potenciální inhibiční vliv vybraných 4,5,6-trisubstituovaných-2-aminopyrimidinů na signální dráhu MAPK/JNK, která představuje významnou komponentu RAGE signalizace. Buňky nádorové linie C6 byly transdukovány lentivirovými částicemi kódujícími inducibilní AP-1 responsivní konstrukt exprimující luciferázu. Poté proběhla selekce klonů a jejich validace využitím RAGE ligandů a na 2 vybraných klonech, u kterých byl zaznamenán nejvýraznější nárůst aktivity byl testován inhibiční vliv látek LEM 814 a LEM 815. Obě látky prokázaly významný inhibiční efekt především v intervalu 24 hodin, kdy u obou klonů prakticky zcela inhibovaly aktivaci transkripčního faktoru AP-1 na úroveň nestimulovaných buněk. Tímto byly beze zbytku naplněny cíle vytyčené v rámci této bakalářské práce.

8. Literatura

- Abe, R., Shimizu, T., Sugawara, H., Watanabe, H., Nakamura, H., Choei, H., Sasaki, N., Yamagishi, S., Takeuchi, M., Shimizu, H. (2004): Regulation of Human Melanoma Growth and Metastasis by AGE-AGE Receptor Interactions. *Journal of Investigative Dermatology*, 122, 461-467.
- Alexiou, P., Chatzopoulou, M., Pegklidou, K., Demopoulos, V. J. (2010): RAGE: A Multi-Ligand Receptor Unveiling Novel Insights in Health and Disease. *Current Medicinal Chemistry*, 17(21), 2232-2252.
- Allard, S., Kopish, K.; Promega Corporation (2008): Luciferase reporter assays: Powerful, adaptable tools for cell biology research. *Cell Notes*, 21, 23-26.
- Arumugam, T., Simeone, D. M., Van Golen, M., Logsdon, C D. (2005): S100P Promotes Pancreatic Cancer Growth, Survival and Invasion. *Clinical Cancer Research*, 11(15), 5356-5364.
- Barlovic, D., Soro-Paavonen, A., Jandeleit-Dahm, K. (2011): RAGE biology, atherosclerosis and diabetes. *Clinical science*, 121, 43-55.
- Bartling, B., Hofmann, H. S., Weigle, B., Silber, R. E., Simm, A. (2005): Down-regulation of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) supports non-small cell lung carcinoma. *Carcinogenesis*, 26(2), 293-301.
- Bassi, R., Giussani, P., Anelli, V., Colleoni, T., Pedrazzi, M., Patrone, M., Viani, P., Sparatore, B., Melloni, E., Riboni, L. (2008): HMGB1 as an autocrine stimulus in human T98G glioblastoma cells: role in cell growth and migration. *Journal of neuro-oncology*, 87(1), 23-33.
- Bierhaus, A., Humpert, P. M., Morcos, M., Morcos, M., Wendt, T., Chavakis, T., Arnold, B., Stern, D. M., Nawroth, P. P. (2005): Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *Journal of Molecular Medicine*, 83, 876-886.
- Cockrell, A. S., Kafri, T. (2007): Gene delivery by lentivirus vectors. *Molecular Biotechnology*, 36, 184-204.

- Davis, B. R., Yannariello-Brown, J., Prokopishyn, N. L., Luo, Z., Smith, M. R., Wang, J., Carsrud, N. D., Brown, D. B. (2000): Glass needle-mediated microinjection of macromolecules and transgenes into primary human blood stem/progenitor cells. *Blood*, 95(2), 437-444.
- Deane, R., Singh, I., Sagare, A. P., Bell, R. D., Ross, N. T., Larue, B., Love, R., Perry, S., Paquette, N., Deane, R. J., Thiagarajan, M., Zarcone, T., Fritz G., Friedman, A. E., Miller, B. J., Zlokovic, B. V. (2012): A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid β -mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(4), 1377-1392.
- Felgner, P. J., gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. F., Ringlod, G. M., Danielsen, M. (1987): Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(21), 7413-7417.
- Fritz, G. (2011): RAGE: a single receptor fits multiple ligands. *Trends in biochemical sciences*, 36(12), 625-632.
- Galasko, D., Bell, J., Mancuso, J. Y., Kupiec, J. W., Sabbagh, M. N., van Dyck, C., Thomas, R. G., Aisen, P. S. (2014): Clinical trial of an inhibitor of RAGE-A β interactions in Alzheimer disease. *Neurology*.
- Garrett, S. C., Varney, K. M., Weber, D. J., Bresnick, A. R. (2006): S100A4, a Mediator of Metastasis. *Journal of Biological Chemistry*, 281(2), 677-680.
- Gerits, N., Kostenko, S., Shiryaev, A., Johannessen, M., Moens, U. (2008): Relationship between the mitogen-activated protein kinase and the cAMP-dependent protein kinase pathways: Comradeship and hostility. *Cellular signalling*, 20, 1592-1607.
- Groskreutz, D., Schenborn, E. T. (1999): Reporter gene vectors and assays. *Molecular Biotechnology*, 13(1), 29-44.
- Guilick, T. (2001): Transfection using DEAE-dextran. *Current Protocols in Molecular Biology*, 40.
- Han, Y. T., Choi, G. I., Son, D., Kim, N. J., Yun, H., Lee, S., Chang, D. J., Hong, H. S., Kim, H., Ha, H. J., Kim, Y. H., Park, H. J., Lee, J., Suh, Y. G. (2012): Ligand-Based Design,

- Synthesis, and Biological Evaluation of 2-Aminopyrimidines, a Novel Series of Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55, 9120-9135.
- Han, Y. T., Kim, K., Choi, G. I., An, H., Son, D., Kim, H., Ha, H. J., Son, J. H., Chung, S. J., Park, H. J., Lee, J., Suh, Y. G. (2014): Pyrazole-5-carboxamides , novel inhibitors of receptor for advanced glycation end products (RAGE). *European Journal of Medicinal Chemistry*, 79, 128-142.
- Harpio, R., Einarsson, R. (2004): S100 proteins as cancer biomarkers with focus on S100B in malignant melanoma. *Clinical Biochemistry*, 37(7), 512-528.
- Huttunen, H. J., Kuja-Panula, J., Sorci, G., Agneletti, A. L., Donato, R., Rauvala, H. (2000): Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(51), 40096-40105.
- Johnson, G. L., Lapadat, R. (2002): Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK and p38 Protein Kinases. *Science*, 298, 1911-1912.
- Kukowska-Latallo, J. F., Bielinska, A. U., Johnson, J., Spindler, R., Tomalia, D. A., Baker, J. R. (1996): Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 4897-4902.
- Lee, E. J., Park, J. H. (2013): Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE), Its Ligands, and Soluble RAGE: Potential Biomarkers for Diagnosis and Therapeutic Targets for Human Renal Diseases. *Genomics and Informatics*, 11(4), 224-229.
- Liu, A. M., New, D. C., Lo, R. K., Wong, Y. H. (2009): Reporter Gene Assays. *Methods in Molecular Biology*, 486, 109-123.
- Logsdon, C. D., Fuentes, M. K., Huang, E. H., Arumugam, T. (2007): RAGE and RAGE Ligands in Cancer. *Current Molecular Medicine*, 7(8), 777-789.
- Luo, D.; Saltzman, W. M. (2000): Synthetic DNA delivery systems. *Nature Biotechnology*, 18, 33-37.

- Mosmann T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.
- Pauwels, K., Gijssbers, R., Toelen, J., Schambach, A., Willard-Gallo, K., Verheust, C., Debyser, Z., Herman, P. (2009): State-of-the-Art Lentiviral Vectors for Research Use: Risk Assessment and Biosafety Recommendations. *Current Gene Therapy*, 9(6), 459-474.
- Petrova, R., Yamamoto, Y., Muraki, K., Yonekura, H., Sakurai, S., Watanabe, T., Hui, L., Takeuchi, M., Makita, Z., Kato, I., Takasawa, S., Okamoto, H., Imaizumi, Y., Yamamoto, H. (2002): Advanced Glycation Endproduct-Induced Calcium Handling Impairment in Mouse Cardiac Myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34(10), 1425-1431.
- Quinonez, R., Sutton, R. (2002): Lentiviral Vectors for Gene Delivery into Cells. *DNA and Cell Biology*, 21(12), 937-951.
- Riehl, A., Németh, J., Angel, P., Hess J. (2009): The receptor RAGE: Bridging inflammation and cancer. *Cell communication and signaling*, 7(12).
- Rojas, A., Gonzáles, I., Morales, E., Pérez-Castro, R., Romero, J., Figueora, H. (2011): Diabetes and cancer: Looking at the multiligand/RAGE axis. *World Journal of Diabetes*, 2(7), 108-113.
- Ross, N. T., Deane, R., Perry, S., Miller, B. L. (2013): Structure-activity relationships of small molecule inhibitors of RAGE-A β binding. *Tetrahedron*, 69, 7653-7658.
- Sasaki, N., Toki, S., Chowei, H., Saito, T., Nakano, N., Hayashi, Y., Takeuchi, M., Makita, Z. (2001): Immunohistochemical distribution of the receptor for advanced glycation end products in neurons and astrocytes in Alzheimer's disease. *Brain research*, 888, 256-262.
- Sorci, G., Riuzzi, F., Giambanco, I., Donato, R. (2013): RAGE in tissue homeostasis, repair and regeneration. *Biochimica et Biophysica Acta*, 101-109.
- Thomas, C. E., Ehrhardt, A., Kay, M. A. (2003): Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature*, 4, 346-358.

- Thu Thu Win, M., Yamamoto, Y., Munesue, S., Saito, H., Han, D., Motoyoshi, S., Kamal, T., Ohara, T., Watanabe, T., Yamamoto, H. (2012): Regulation of RAGE for Attenuating Progression of Diabetic Vascular Complications. *Experimental diabetes research*, special section, 1-8.
- Van Dorst, B., Mehta, J., Rouah-Martin, E., Backeljau, J., De Coen, W., Eeckhout, D., De Jaeger, G., Blust, R., Robbens, J. (2012): Selection of scFv phages specific for chloramphenicol acetyl transferase (CAT) as alternatives for antibodies in CAT detection assays. *Journal of applied toxicology*, 32(10), 783-789.
- Wagner, E., Ogris, M., Zauner, W. (1998): Polylysine-based transfection systems utilizing receptor-mediated delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 30, 97-113.
- Wagner, E. F., Nebreda, A. R. (2009): Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature*, 9, 537-549.
- Yamagishi, S., Ueda, S., Matsui, T., Nakamura, K., Okuda, S. (2008): Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in diabetic retinopathy. *Current pharmaceutical design*, 14, 962-968.
- Yamamoto, Y., Kato, I., Doi, T., Yonekura, H., Ohashi, S., Takeuchi, M., Watanabe, T., Yamagishi, S., Sakurai, S., Takasawa, S., Okamoto, H., Yamamoto, H. (2001): Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE-overexpressing mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 108(2), 261-268.
- Yan, S., Ramasamy, R., Schmidt, A. (2009): The receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and cardiovascular disease. *Expert reviews in molecular medicine*, 11.
- Yan, S. S., Chen, D., Yan, S., Guo, L., Chen, J. X. (2012): RAGE is key cellular target for A β -induced perturbation in Alzheimer's disease. *Front Biosci*, 4, 240-250.
- Yang, N. S., Burkholder, Roberts, B., Martinell, B., McCabe, D. (1990): In vitro and in vivo gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 87, 9568-9572.
- Zine, A., Van De Water, T. R. (2004): The MAPK/JNK Signalling Pathway Offers Potential Therapeutics Targets for the Prevention of Acquired Deafness. *Current Drug Targets – CNS & Neurological Disorders*, 3(4), 325-332.

Internetové zdroje

- http://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=cz
- <https://worldwide.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/0/Luciferase%20Assay%20System%20Protocol.pdf>
- <http://www.sabiosciences.com/Manual/1073762.pdf>

9. Seznam zkratek

AGEs	advanced glycation end products; první objevené ligandy pro receptor RAGE
AmpR	ampicilin resistance gene; gen rezistence k ampicilinu
AP-1	activator protein 1; proteinový aktivátor 1
ATCC	American Type Culture Collection; americká sbírka tkáňových a buněčných kultur
APS	ammonium persulfate; persíran amonný
ATP	adenosintrifosfát
A β	β -amyloid
Bcl-2	B-cell lymphoma 2; anti-apoptotický gen
BIV	bovine immunodeficiency virus; virus kravské imunitní nedostatečnosti
BSA	bovine serum albumin; hovězí sérový albumin
CAT	chloramphenicol acetyltransferase; chloramfenikol-acetyltransferáza
Cdc42	cell division cycle 42; protein zapojený do regulace buněčného cyklu
Cppt	central polypurine tract; centrální polypurinový úsek na lentivirovém vektoru
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid; deoxyribonukleová kyselina
EIAV	equine infectious anemia virus; virus koňské infekční anémie
Erk1/2	extracellular signal-regulated kinase 1/2; extracelulární signál-regulující kináza 1/2
FCS	fetal calf serum; fetální telecí sérum
FIV	feline immunodeficiency virus; virus kočičí imunitní nedostatečnosti
GFP	green fluorescent protein; zelený fluorescenční protein
HDL	high density lipoprotein; lipoprotein s vysokou denzitou
hGH	human growth hormone; lidský růstový hormon
HIF-1 α	hypoxia-inducible factor 1; hypoxií indukovaný faktor 1
HIV	human immunodeficiency virus; virus lidské imunitní nedostatečnosti
HMGB1	high mobility group box 1; amphoterin
hPGK	human phosphoglycerate kinase; lidská fosfoglycerát kináza

IC50	polovina maximální inhibiční koncentrace
IL	interleukin
JAK	Janus kinase; Janusova kináza
JNK	c-Jun N-terminal kinase; c-Jun N-terminální kináza
LTR	long terminal repeats; dlouhé terminální repetice
lacZ	gen kódující enzym β -galaktosidázu
MAPK	mitogen-activated protein kinase; mitogenem aktivovaná protein kináza
MAPKKs	MAPK kinases; MAPK kinázy
MAPKKKs	MAPK kinase kinases; MAPK kináza kinázy
MDSCs	myeloid derived suppressor cells; supresorové buňky odvozené z buněk myeloidních
MKK	mitogen-activated protein kinase kinases; mitogenem aktivovaná protein kináza kinázy
MOI	multiplicity of infection; multiplicita infekce
mRNA	messenger RNA; mediátorová RNA
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
NF- κ B	nuclear factor kappa B; nukleární faktor kappa B
PAMAM	polyamidoamine dendrimers; polyamidoaminové dendrimery
PBS	phosphate buffered saline; fosfátový pufr
PI3K	phosphoinositide 3-kinase; fosfatidylinositol 3-kináza
PLL	poly-L-lysin
PPAR	peroxisome-proliferator activated receptor; receptor aktivovaný peroxizómovým proliferátorem
Psi	packaging signal; signál k obalení virů
PuroR	puromycine resistance gene; gen rezistence k puromycinu
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1; s Ras související C3 botulotoxin substrát 1
RAGE	receptor for advanced glycation end products; receptor pro AGEs
RCL	replication-competent lentiviruses; replikace schopné lentiviry
RFP	red fluorescent protein; červený fluorescenční protein
RIPA buffer	Radio-immunoprecipitation assay buffer; lyzační pufr používaný k přípravě lyzátu pro Western blot
RLA	relative luciferase activity; relativní luciferázová aktivita
RNA	ribonucleic acid; ribonukleová kyselina

ROS	reactive oxygen species; reaktivní formy kyslíku
RRE	Rev response element; jednotka lentivirového vektoru podílející se na obalení virového transkriptu
RSV	Rous sarcoma virus; virus způsobující Rousův sarkom
SAPKs	stress-activated protein kinases; stresem aktivované protein kinázy
SDS	sodium dodecyl sulphate; dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis; elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
SEAP	secreted alkaline phosphatase; sekretovaná alkalická fosfatáza
SIN vectors	self-inactivated vectors; samoinaktivovatelné vektory
SMODCH	směrodatná odchylka
sRAGE	soluble RAGE; rozpustný RAGE
Stat3	signal transducer and activator of transcription 3; přenašeč signálu a aktivátor transkripce 3
TBS	Tris-buffered saline; Tris pufr obsahující chlorid sodný
TEMED	tetramethylethyldiamin
TLR9	Toll-like receptor 9
TNF α	tumour necrosis factor α ; faktor nádorové nekrózy α
TRE	transcriptional response element; jednotka transkripční odpovědi
VSV-G	vesicular stomatitis virus glycoprotein; glykoprotein viru vezikulární stomatitidy
X-Gal	substrát využívaný k testování přítomnosti enzymu β -galaktosidázy