

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



Raf kinasy jako potenciální cíle protinádorové léčby

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Kristýna Nováková
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Hendrychová Denisa, Mgr., Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2022

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Kristýna Nováková
Název práce	Raf kinasy jako potenciální cíle protinádorové léčby
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Hendrychová Denisa, Mgr., Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022
Abstrakt	<p>RAF kinázy jsou serin/threoninové kinázy účastníci se přenosu signálu v kaskádě RAS-RAF-MEK-ERK. Tato signální dráha byla upozorována a popsána jako klíčová pro rozvoj maligního melanomu. Až u poloviny pacientů trpících tímto onemocněním se vyskytuje mutace genu <i>BRAF</i>, která je zodpovědná za konstitutivní aktivaci kinázy. Inhibice RAF kináz prostřednictvím nízkomolekulárních inhibitorů, které potlačují enzymatickou aktivitu těchto kináz, patří mezi jeden z možných přístupů cílené léčby těchto maligních tumorů.</p> <p>V teoretické části bakalářské práce byla popsána základní patofyziologie nádorových onemocnění se zaměřením na signální dráhu RAF kináz a na farmakologické působení nízkomolekulárních inhibitorů RAF. V praktické části bakalářské práce byla provedena experimentální analýza biologických účinků několika inhibitorů, které byly navrženy jako potenciální inhibitory RAF kináz, a dále bylo ověřeno, zda se účinek těchto látek shoduje s inhibicí RAF.</p>
Klíčová slova	RAF kinázy, RAF inhibitory, maligní melanom
Počet stran	55
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Kristýna Nováková
Title of thesis	Raf kinases as potential targets of anticancer therapy
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Hendrychová Denisa, Mgr., Ph.D.
The year of presentation	2022
Abstract	<p>RAF kinases are serine/threonine kinases involved in signal transduction in the RAS-RAF-MEK-ERK cascade. This signaling pathway has been observed and described as crucial for the development of malignant melanoma. Up to half of patients suffering from this disease has a BRAF gene mutation, which is responsible for the constitutive activation of the kinase. Inhibition of RAF kinases by low-molecular-weight inhibitors that suppress the enzymatic activity of these kinases is one of the possible approaches for the targeted treatment of these malignant tumors. In the theoretical part of the bachelor's thesis, the basic pathophysiology of cancer disease was described, focusing on the signaling pathway of RAF kinases and on the pharmacological action of low-molecular-weight RAF inhibitors. In the practical part of the thesis, an experimental analysis of the biological effects of several inhibitors, which were proposed as potential inhibitors of RAF kinases, was performed, and it was further verified whether the effect of these substances coincides with the inhibition of RAF.</p>
Keywords	RAF kinases, RAF inhibitors, malignant melanoma
Number of pages	55
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod odborným vedením Ph.D., Mgr. Hendrychové Denisy, za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 28.7 2022

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své vedoucí Ph.D., Mgr, Denise Hendrychové za odborné vedení, pomoc se zpracováním a v neposlední řadě za cenné rady a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu Katedry experimentální biologie za veškerou pomoc a vstřícnost.

Seznam použitých zkratek

AKT	Protein kinase B
ARID2	AT-Rich Interaction Domain 2
ATP	Adenosine triphosphate
BCR-ABL	Consequence of fusion between the Abelson tyrosine kinase gene and break point cluster
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
Cip/Kip	CDK interacting protein/kinase inhibitory protein
CCND1	Encodes the cyclin D1 protein
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase A2
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4
DMEM	Dulbecco s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
ECL	Electrochemiluminescence detection
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	Ethylenglycoltetraacetic acid
ERBB	Ethylenediamine tetraacetic acid
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FDA	Food and Drug Administration
FS	Fetal Bovine Serum
HRAS	Harvey Rat sarcoma virus
KRAS	Kirsten rat sarcoma virus
LCK	Lymphocyte-specific kinase
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MYC	Proto-oncogene located in the region 8q24.12-q24.13
NF1	Neurofibromatosis type 1
NRAS	Neuroblastoma RAS viral oncogene
P16INK4A	Cyclin-dependent kinase inhibitors

PARP-1	Poly(ADP-ribose) polymerase 1
PBS	Phosphate buffered saline
PBS	Phosphate buffered saline
PGDFR β	Platelet-derived growth factor receptor alpha
PI3K	Phosphatidylinositide 3-kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PTEN	Phosphatase and tensin
RAF	Receptor serine/threonine kinases
RAS	Rat sarcoma virus
RB	Retinoblastoma protein
RIPA	Radioimmunoprecipitation buffer
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RTK	Receptor tyrosine kinases
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SWI/SWF	SWItch/Sucrose Non-Fermentable
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TP53	Provides instructions for making a protein called tumor protein p53
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
VEGFR	Vascular endothelial growth factor

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Teoretická část práce.....	3
2.1. Patofyziologie rakovinového onemocnění.....	3
2.1.1. Aktivace onkogenů.....	5
2.1.2. Tumor supresorové geny.....	7
2.2. Melanomy.....	8
2.2.1. Molekulární podstata vzniku melanomů.....	9
2.2.2. Možnosti léčby melanomu.....	12
2.3. RAF kináza a její signalizace.....	13
2.4. Inhibitory RAF kináz.....	16
3. Praktická část práce.....	21
3.1. Materiál.....	21
3.1.1. Přístrojové vybavení.....	21
3.1.2. Použité chemikálie.....	22
3.1.3. Použité roztoky.....	24
3.1.4. Použité protilátky.....	25
3.1.5. Použité buněčné linie.....	26
3.1.6. Testované inhibitory.....	27
3.1.7. Programy.....	27
3.2. Metody.....	28
3.2.1. Kultivace, ovlivnění buněčné linie, sklizení.....	28
3.2.2. Lyzace.....	29
3.2.3. Elektroforéza, western blotting, imunodetekce.....	29
3.2.4. Stanovení cytotoxicity.....	30
3.2.5. Cytometrická analýza.....	31
3.2.6. Stanovení aktivity kaspáz.....	32
4. Výsledky a diskuse.....	33
4.1. Stanovení cytotoxických účinků testovaných inhibitorů.....	33
4.2. Cytometrická analýza buněčného cyklu.....	34
4.3. Imunodetekce vybraných proteinů.....	37
4.4. Stanovení aktivity kaspázy 3 a 7.....	39
5. Závěr.....	40
Použitá literatura.....	42

1. Úvod

Nádorové onemocnění představuje jednu z nejčastějších, a současně i nejobávanějších, příčin úmrtí v rámci lidské populace. Toto onemocnění může zasahovat různé tkáně lidského organismu a může vznikat z odlišných příčin, což významně komplikuje léčbu. I přes probíhající intenzivní výzkum a vývoj nových terapeutických přístupů se mortalita nádorových onemocnění vyznačuje stále vysokou úrovní, kdy například v České republice v důsledku nádorového bujení umírá ročně až 30 000 pacientů (Dušek a kolektiv 2020).

Melanom představuje vysoce zhoubný novotvar, který je odvozen z pigmentových buněk, derivátů neurální lišty (NCI 2011). Tento typ nádorového onemocnění postihuje především oblasti kůže. Přestože se nejedná o nejčastější typ rakoviny kůže, patří k těm nejvíce agresivním formám, které způsobují nejvyšší počet úmrtí v rámci tohoto typu nádorových onemocnění (NCI 2017). Jedná se o multifaktoriální onemocnění vznikající interakcí mezi genetickou náchylností a vlivem životního prostředí, kdy nejvýznamnějším rizikovým faktorem je UV záření. Efektivně léčen může být pouze, pokud je časně diagnostikován, a to prostřednictvím komplexních konvenčních přístupů jako je radioterapie, chemoterapie a chirurgie. Nicméně v posledních letech se pozornost zaměřuje i na léčbu pacientů s pokročilým melanomem. V tomto ohledu hrají významnou roli inhibitory RAF kináz.

RAF kinázy zahrnují tři serin/threonin-specifické proteinkinázy, ARAF, BRAF a CRAF, a další pseudokinázy, účastníci se kaskády přenosu signálu RAS-RAF-MEK-ERK. Tato signální kaskáda byla zpozorována a popsána jako klíčová pro bujení mnoha nádorových onemocnění, jelikož právě v ní se nejčastěji vyskytují mutace vedoucí ke vzniku nádoru. Inhibitory RAF kináz jsou látky, které jsou schopny cíleně inhibovat mutovanou formu kinázy, a zabránit tak dalšímu růstu a proliferaci rakovinných buněk (Rommel a kolektiv 2009, Roskoski 2010).

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo popsat základní patofyziologii nádorových onemocnění se zaměřením na signální dráhu RAF kináz a na farmakologické působení nízkomolekulárních inhibitorů RAF. Typickým nádorem, u kterého hraje deregulace RAF kinázové dráhy klíčovou roli, představuje právě *maligní melanom*. Z tohoto důvodu se práce zaměřuje na charakteristiku tohoto agresivního nádorového onemocnění a na cílenou terapii pacientů trpících touto formou rakoviny, u kterých právě RAF kinázy představují jeden z hlavních cílů pro léčbu.

Pro sepsání teoretické části bakalářské práce byla využita široká škála odborných zdrojů, kdy se jednalo zejména o nejnovější poznatky z anglicky psaných vědeckých článků publikovaných v rámci vědeckých databází *Web of Science* a *Scopus*. Ty byly doplněny o články českých odborníků umístěné v databázi *pubmed* a o další knižní zdroje.

Cílem praktické části bakalářské práce bylo provést experimentální analýzu biologických účinků několika inhibitorů, které byly navrženy jako potenciální inhibitory RAF kináz, a ověřit, zda se účinek těchto látek shoduje s inhibicí RAF. K tomu bylo využito několik vybraných molekulárních a biochemických metod a získané výsledky byly následně vyhodnoceny a zpracovány.

2. Teoretická část práce

2.1. Patofyziologie rakovinového onemocnění

Nádorové onemocnění představuje různorodou skupinu chorob, které spojují dvě společné vlastnosti, a to abnormální a nekontrolovaný růst a proliferace. Z biologického hlediska lze pro nádor použít pojem *neoplazie*, který označuje růst nové tkáně. Nádorová tkáň však na rozdíl od zdravé tkáně proliferuje mnohem rychleji a nekontrolovaně. Vznikají tak abnormální buňky, které nejsou schopny spolu řádně komunikovat a spolupracovat, vymykají se kontrole, a v důsledku toho nejsou správně diferencovány, koordinovány ani uspořádány. Pro porovnání, v lidském organismu nejrychleji proliferují buňky střevní sliznice, zatímco rakovinné buňky se mohou množit až desetinásobně rychleji, a vytvářet tak neoplazie, které mohou významně ohrožovat život jedince (Uhříková 2016, Cullen a kolektiv 2002).

Karcinogeneze představuje několikastupňový proces, který spočívá v postupné kumulaci genetických a epigenetických změn v rámci genomu (DNA) normální, zdravé buňky organismu v průběhu jeho života. Obvykle je pro transformaci v buňku nádorovou zapotřebí mutace několika kritických genů, která následně poskytuje selekční výhodu oproti nenádorovým buňkám, a dalších změn, které podporují maligní transformaci a které buňku nevratně přemění v maligní fenotyp (Cullen a kolektiv 2002, Uhříková 2016).

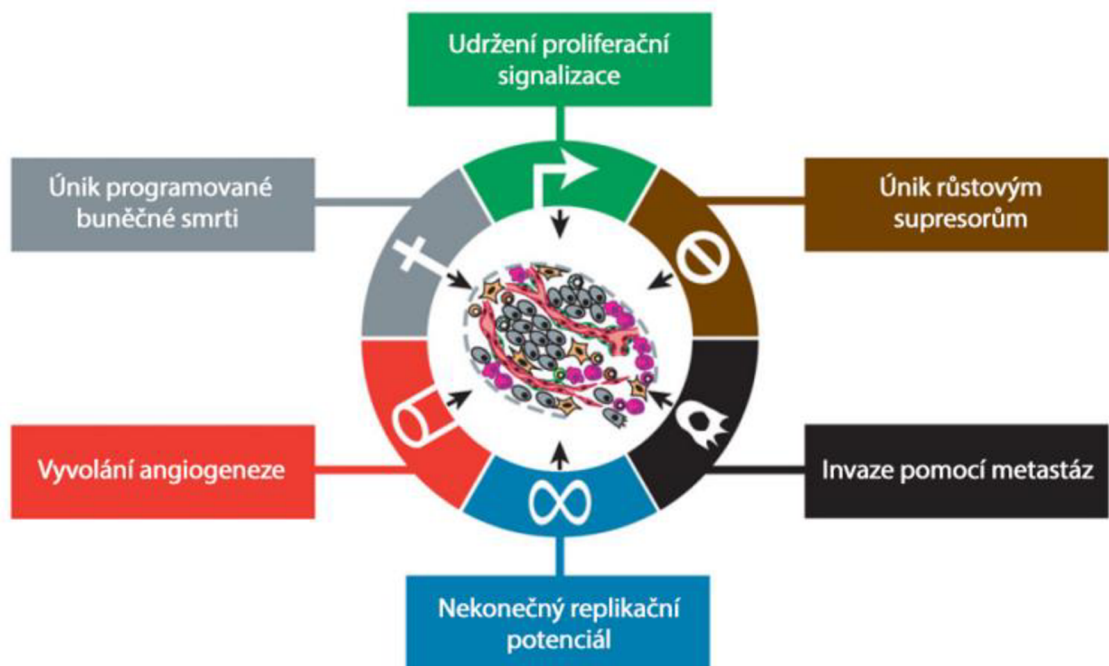
Mezi takové kritické geny patří právě *protoonkogeny* a *nádorové supresory*, jejichž produkty za fyziologických podmínek zodpovídají za normální fungování a homeostázu tkání. Jejich mutace však vede k narušení klíčových signálních drah buňky a k získání jedinečných fenotypových vlastností typických pro nádorové buňky (Croce 2008).

K mutaci však může dojít nejen v somatických buňkách v průběhu života jedince, ale může nastat i v zárodečných buňkách, kdy je pohlavními buňkami přenesena na potomka, u kterého se následně bude vyskytovat všech jeho buňkách. Tento jedinec si tak nese genetickou predispozici pro vznik nádorového onemocnění s vysokým rizikem. Nicméně pouze u některých typů rakoviny je její přenos takto dědičně podmíněn, týká se to asi 5–10 % nádorových onemocnění (Foretová 2015).

Jinými slovy, v případě nádorových onemocnění se většinou nejedná o zatížení, které by bylo geneticky děděno. Častěji k výskytu mutací dochází až v průběhu života jedince v somatických buňkách, které je způsobeno stárnutím organismu. Riziko a pravděpodobnost vzniku mutace však bývá často „popohnáno“ také vlivem vnějších biologických – viry,

parazity, hormony; chemických – azbestem; nebo fyzikálních – radiací, UV zářením, RTG zářením – faktorů, které jsou obvykle označovány jako *karcinogenní* (Uhříková 2011).

V roce 2011 bylo popsáno šest základních charakteristických znaků rakoviny, které umožňují růst nádoru a jeho metastatické šíření (Hanahan a Weinberg 2011). Mezi tyto znaky patří, viz Obr. 1:



Obr. 1: Základní znaky rakovinových buněk.

Zdroj: Hanahan a Weinberg 2011.

- Udržení proliferační signalizace. Rakovinové buňky disponují schopností udržovat chronickou proliferaci. Normální buňky pečlivě kontrolují produkci a uvolňování signálů podporujících růst, čímž zajišťují homeostázu počtu buněk a tím i udržení normální architektury a funkce tkáně. Rakovinové buňky dokážou tyto signály deregulovat a podporovat tak neustálý buněčný růst (tj. zvětšování velikosti buněk).

- Únik růstovým supresorům. Kromě schopnosti rakovinných buněk vyvolat a udržet pozitivně působící signály stimulující růst, jsou rakovinné buňky schopné obejít programy, které naopak negativně regulují buněčnou proliferaci. Mnoho z těchto programů závisí na působení tumor supresorových genů.
- Invaze pomocí metastáz. Nádor má schopnost tvořit metastázy neboli vytvářet progresivně rostoucí sekundární nádorové útvary v místech, které nejsou přímo propojena s primárním nádorem.
- Nekonečný replikační potenciál. Rakovinné buňky jsou na rozdíl od normálních buněk schopné neomezeného růstu a dělení.
- Vyvolání angiogeneze. Angiogeneze je proces, při kterém se tvoří nové krevní cévy. Rakovinné buňky jsou schopny nastartovat tento proces a zajistit si nepřetržitý přísun kyslíku a dalších živin.
- Únik programované buněčné smrti. Apoptóza je přirozeně využívána pro správný růst a vývoj organismu, pro udržení tkání a je také zahájena, když je buňka poškozena nebo infikována pro její odstranění. Rakovinné buňky jsou však schopny programované buněčné smrti unikát, a i přesto že se vyznačují řadou abnormalit, nedochází k jejich apoptóze.

2.1.1. Aktivace onkogenů

První významnou skupinou genů účastnících se nádorové transformace jsou *onkogeny*. Jedná se o mutované verze normálních v genomu běžně se vyskytujících buněčných protoonkogenů, jejichž produkty se účastní stimulace dělení buňky a dalších procesů, a to zejména v ohledu jejího růstu a přenosu vnitřních signálů, inhibice diferenciaci a apoptózy. Mutace těchto genů bývá označována jako „aktivace protoonkogenů“. Tato změna je dominantního charakteru, tzn. že k aktivaci postačuje pouze mutace jedné alely. V důsledku ní pak dochází deregulaci buněčného růstu, imortalizaci a k transformaci buňky v nádorovou. Mezi onkogeny patří např. mutované *SIS*, *ERBB*, *SRC*, *RAS*, *BCR-ABL* nebo *FOS*. Produkty těchto mutovaných genů jsou označovány jako *onkoproteiny* (Heisterkamp a kolektiv 1985, Hofmanová 2013).

Onkogeny mohou být děleny do několika různých skupin, které se od sebe navzájem odlišují na základě buněčné lokalizace nebo fyziologické funkce jejich produktů. Konkrétně se pak jedná např. o geny kódující mutované formy (Cullen a kolektiv 2002, Croce 2008):

- 1) *Růstových faktorů*, které stimulují buňky k jejich růstu a dělení.
- 2) *Receptorů pro růstové faktory*, které mohou např. podporovat růst a dělení buněk i bez přítomnosti růstového faktoru.
- 3) *Přenašečů signálů*, které např. nepřiměřeně aktivují podřízené signální dráhy stimulující dělení, ačkoliv skutečný signál k dělení není přítomen.
- 4) *Transkripčních faktorů*, které vedou k abnormální expresi cílových genů.
- 5) *Regulátorů apoptózy*, které mohou inhibovat buněčnou smrt.
- 6) *Inaktivátorů nádorových supresorů* a další.

Existuje několik základních genetických mechanismů, jakými mohou být protoonkogeny aktivovány na onkogeny, kdy mezi ty nejčastější se řadí bodové mutace, chromozomální translokace nebo genové amplifikace. Obecně je lze rozdělit na (Blume-Jensen a Hunter 2001):

- 1) *kvantitativní změny* spočívající v narušení genové exprese vedoucí k nadměrné produkci proteinů.
- 2) *kvalitativní změny* genové struktury vedoucí k produkci poškozených proteinů s narušenou funkcí.

Takto mutované formy jsou pak produkovány v nádorových buňkách, a právě jejich exprese je zodpovědná za celou řadu různých a vesměs negativních vlastností nádorů, jako je právě abnormálně vysoká proliferace, ale i vysoká invazivní schopnost nebo schopnost nádoru šířit se prostřednictvím metastáz (Hofmanová 2013).

2.1.2. Tumor supresorové geny

V procesu nádorové transformace vystupují také tzv. tumor supresorové geny, nazývané také jako *antionkogeny*, *recesivní onkogeny* nebo *nádorové supresory*. Stejně jako onkogeny jsou tyto geny přítomné v každé normální buňce a nesou odpovědnost za stabilitu genomu. Docilují toho tím, že účinně zabraňují růstu a proliferaci buněk, a naopak podporují diferenciaci a apoptózu. Jejich další významnou funkcí je, že brání replikaci poškozené DNA. Mají tedy opačnou funkci k protoonkogenům, kdy za normálních okolností jsou to právě tumor-supresorové geny, které chrání před vznikem nádorových onemocnění. Zabraňují tomu, aby se jakákoliv poškozená buňka dále množila a tím udržují v organismu pouze normální nenádorové buňky (Knudson 2002, Chial 2008).

Jejich mutace mají inaktivační a recesivní charakter, tzn. že je nutná mutace obou alel genu k úplné ztrátě jejich funkce a k maligní transformaci. Právě tyto geny jsou také odpovědné za vrozené predispozice k určitým typům nádorových onemocnění, protože mutace jedné alely tumor-supresorového genu může děděna. Mohou se tedy vyskytovat nejen v somatických, ale i zárodečných buňkách na rozdíl od mutací protoonkogenů (Kodet a Lacina 2018).

V somatických buňkách lidského organismu se vyskytuje zhruba 40 tumor supresorových genů, které mají v rámci buňky různé funkce. Mezi dva nejznámější tumorsupresorové geny, které jsou spojovány s rakovinou, jsou konkrétně (Burkhart a Sage 2008, Kodet a Lacina 2018):

- *RB* = retinoblastomový gen (*RBI* gen) produkující RB-protein (pRB), který má za úkol regulovat buněčný cyklus dělení. Pokud v buňce chybí nebo je poškozen, dochází ke ztrátě regulace buněčného cyklu a k nekontrolované proliferaci i za nepřítomnosti mitogenních signálů nebo při poškození DNA.
- *TP53* = kóduje protein p53 označovaný jako strážce genomu, který má za úkol signalizovat nebezpečí v podobě poškozené DNA, onkogenní aktivace nebo jiného buněčného stresu, právě jeho nefunkčnost je zodpovědná za rozvoj mnoha různých nádorových onemocnění, a který se nachází na krátkém raménku chromozomu 17. Tento gen patří k nejčastěji mutovanému tumor-supresorovým genům v nádorové biologii.

2.2. Melanomy

Melanom představuje zhoubné nádorové onemocnění, které představuje nejzávažnější a nejagresivnější formu rakoviny kůže a způsobuje většinu úmrtí souvisejících právě s rakovinou kůže. Ačkoliv se mortalitou nejedná o tak fatální nádorová onemocnění, prevalence melanomů se za posledních několik let dramaticky zvyšuje, a to více než u kterákoliv jiné solidní nebo krevní malignity. Je dokázáno, že se jeho incidence každých 10-14 let zdvojnásobuje (Mandalá a Voit 2013).

Odhadovaný počet nových případů melanomu v roce 2022 je až 100 000, což představuje 5,2 % ze všech nově diagnostikovaných případů rakoviny na světě. Odhadovaný počet úmrtí je v roce 2022 až 8000 pacientů (NCI 2022).

V České republice bylo kupříkladu v roce 2018 diagnostikováno toto onemocnění u více než 2000 pacientů a příčinou smrti byl melanom později uveden u zhruba 400 těchto jedinců (Ferlay a kolektiv 2018). Co se týče výskytu melanomu v rámci pohlaví, postihuje toto onemocnění obě pohlaví stejně, avšak v poslední době se incidence zvyšuje mírně u mužů (Stucci a kolektiv 2017).

Melanom je považován za multifaktoriální onemocnění vznikající interakcí mezi genetickou náchylností a vlivem životního prostředí. Nejvýznamnějším a potenciálně modifikovatelným environmentálním rizikovým faktorem pro vznik maligního melanomu je vystavení UV záření kvůli jeho genotoxickému účinku (Sera a kolektiv 2005). Mezi významné rizikové etiologické faktory vzniku melanomu tedy patří intermitentní a intenzivní nárazové slunění nebo spálení kůže a pravidelné navštěvování solárií. Vysoké riziko vzniku se týká především jedinců, kteří disponují světlou kůží a mnohočetnými melanocytárními névy. Také bylo zjištěno, že zvýšené riziko výskytu melanomu může způsobit i fototerapie, která je kupříkladu používána pro léčbu lupénky (Stern 2001).

Nejdůležitějším rizikovým faktorem však zůstává počet melanocytárních névů v těle konkrétního jedince a genetická náchylnost (Bevona a kolektiv 2003). Je třeba poznamenat, že až 20–40 % melanomů vzniká z existujících névů, zatímco zbývající vznikají *de novo* (Lo a Fisher 2014).

Čím dříve je melanom rozpoznán, tím je jeho léčba efektivnější. Základním diagnostickým vyšetřením podezřelého útvaru je vyšetření kožního povrchu při dostatečném osvětlení. Počínající melanom je charakterizován akronymem ABCDE, kdy (Dummer a kolektiv 2001):

- A (Asymetry) označuje asymetrii zkoumaného útvaru,
- B (Border) označuje nepravidelnost okrajů podezřelého tvaru,
- C (Color) skvrnitou pigmentaci,
- D (Diameter) popisuje velikost útvaru 5–6 mm,
- E (Enlargement, popřípadě Evolution) poukazuje na zvětšování ložiska.

Útvary, které nesplňují body ABC pak jsou většinou označeny za benigní. Za podezřelé jsou považovány všechny léze, které se výrazným způsobem odlišují od ostatních pacientových projevů. U podstatné části melanomů však není jejich přítomnost možné rozpoznat pouze prostřednictvím klinického vyšetření. U takových případů je pro včasné rozpoznání melanomu nutné vyšetření dermatoskopem, který umožní vizualizovat rysy typické pro melanom, které nejsou viditelné pouhým okem. Dermatoskop je stále častěji nahrazován digitální dermatoskopií, která umožňuje sledování útvarů v čase, a porovnávání jejich vývoje. V případě, že si ošetřující lékař není jistý, je doporučováno vyšetření dermatoskopem doplněné o histologické ověření (Thomas a Puig 2017).

2.2.1. Molekulární podstata vzniku melanomů

Zhoubný melanom vzniká v důsledku maligní přeměny buněk melanocytů, které jsou zodpovědné za produkci melaninu, fotoprotektivního pigmentu. Melanom má nejvyšší mutační zátěž ze všech typů rakoviny v důsledku poškození DNA indukovaného UV zářením a/nebo chyb replikace DNA (Alexandrov a kolektiv 2013).

Za vznik melanomů jsou zodpovědné a podílí se na něm velké množství různých genů s odlišnou mutační frekvencí. Existují však opakující se mutace, které se často objevují u všech typů melanomů. Jedná se o tzv. *driving* mutace vyskytující se především v genech signálních drah, které regulují proliferaci (*BRAF*, *NRAS*, *NF1*), růst a metabolismus (*PTEN*, *KIT*), rezistenci vůči apoptóze (*TP53*), replikativní nesmrtelnost (*TERT*), buněčnou identitu (*ARID2*) nebo buněčný cyklus (*CDK4*, *CDKN2A*, *CCND1*) (Scolyer a kolektiv 2011, Horn a kolektiv 2013, Rebecca a Sondak 2013).

Přibližně 5-12 % případů je dědičných, přičemž tyto dědičné melanomy mívají odlišné mutační profily než nedědičné formy (Rebecca a Sondak 2013).

Normální melanocyt nejprve získává iniciační řídicí mutaci, která vede k hyperplazii melanocytů a rozvoji névů. Tyto kroky jsou známé jako „průlomová fáze“, která je specifická nízkou mutační zátěží a změnami počtu kopií. Běžné mutace nalezené v melanocytových névech jsou nejčastěji *BRAF* mutace (Bauer a kolektiv 2017, Sensi a kolektiv 2006, Vogelstein a Kinzler 2015).

Dále následuje „expanzní fáze“, kdy některé melanocytární névy progredují do intermediálních lézí a časem se vyvinou v melanom, který je typicky doprovázen vznikem mutací v promotoru *TERT* s vysokou mutační zátěží. Gen *TERT* kóduje telomerázovou reverzní transkriptázu, katalytickou složku telomerázy, enzymu potřebného pro udržení telomer. Aberantní exprese telomerázy umožňuje melanomovým buňkám stát se replikativně nesmrtelnými. Po nahromadění dalších mutací v genech jako *CDKN2A*, *TP53*, *PTEN* a genů kódujících podjednotky komplexu remodelace chromatinu SWI/SWF se primární melanom dostává do „invazivní fáze“, kdy se stává maligním (Chiba a kolektiv 2017, Shain a Bastian 2016).

Jednou z nejčastěji mutovaných drah je právě signální dráha RAS-RAF-MEK-ERK kináz, která si získala v posledních letech velký zájem z důvodu jejího využití pro terapeutické účely. Odhaduje se, že zhruba až 80 % maligních melanomů nese mutace v rámci této signální dráhy, z nichž nejčastější jsou mutace genů *RAS* a *RAF* (Long a kolektiv 2011).

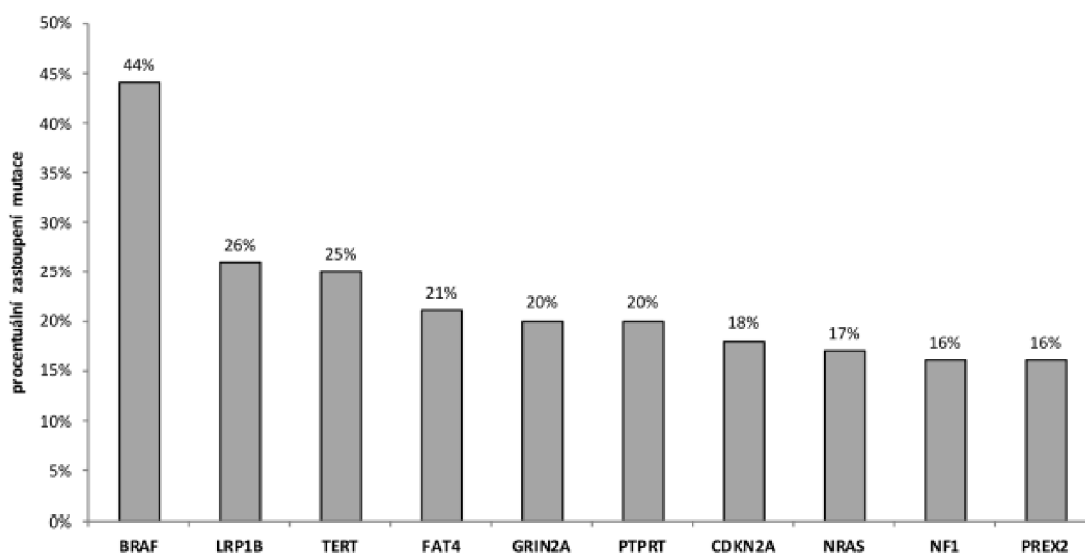
RAS geny se vyskytují v genomu ve třech izoformách, a to *HRAS*, *KRAS* a *NRAS*, přičemž nejčastější je mutace *NRAS*, která se vyskytuje až u 15–20 % melanomů (Krajsová a Bauer 2017, Long a kolektiv 2011).

U přibližně poloviny pacientů s maligním melanomem je mutován gen *BRAF*. Nejčastější je mutace V600E, která spočívá v záměně valinu za kyselinu glutamovou, to až v 90 % případů (Obr. 2). Aktivita $BRAF^{V600E}$ je zvýšena až několiksetkrát oproti její nemutované formě. Nádory, u kterých se vyskytuje právě tato mutace, jsou typické svojí agresivitou, a vysokou mortalitou jejich nositelů. Ve zbývajících případech se pak jedná například o V600K, u které dochází k nahrazení valinu lysinem, nebo vzácnou mutaci V600R či V600D (Krajsová a Bauer 2017, Long a kolektiv 2011).

Zajímavostí je, že tyto jednotlivé typy jsou k nalezení v různých poměrech v různých geografických oblastech. Mutace V600K se vyskytuje v zhruba 10 % v zemích severní Evropy, zatímco ve Spojených státech amerických nebo v Austrálii až u 30 % maligních melanomů. To je podle odborníků způsobeno především intenzitou UV záření (Long a kolektiv 2011).

Mutace *BRAF* vedou k trvalé aktivaci podřízených členů celé MAP kinazové dráhy a přímo podporují proliferaci nádorových buněk (Ribas a kolektiv 2011, Prahallad a kolektiv

2012, Krajsová a Bauer 2017). Právě MAP kinázová dráha se totiž podílí na kontrole proliferace a přežívání v reakci na růstové faktory a mutace v ní způsobují konstitutivní aktivaci, v jejímž důsledku buňky nekontrolovaně rostou. Jedná se tedy o zvláště významnou onkogenní dráhu, což ji činí primárním cílem pro terapeutickou intervenci cílenými léčivy.



Obr. 2: Procentuální zastoupení nejhojněji mutovaných genů u maligního melanomu.

Zdroj: Kubová, 2019.

Další významnou signální drahou v patofyziologii melanomů je fosfatidylinositol-3-kinázová (PI3K) dráha, která je zodpovědná především za antiapoptotickou signalizaci a je rozhodující pro rozvoj rezistence melanomu na inhibitory BRAF/MEK (Tran a kolektiv 2021). Dráha MAPK aktivněji souvisí s proliferací a invazí, a dráha PI3K je zodpovědná hlavně za anabolismus (Paluncic 2016).

Mezi nejčastější mutace vyskytující se v zárodečných buňkách patří mutace v genech *CDKN2A*, *RBI*, *CDK4* nebo *TP53*. Mutace *CDK2NA* genu se vyskytují až u 40 % familiárních melanomových syndromů, nicméně sporadicky se vyskytují i jako somatické. Rodiny nesoucí tuto mutaci mají sklon k vysokému počtu klinicky atypických névů (ale benigních) a k rodinné anamnéze melanomu. Mutovaný gen produkuje defektní proteiny p14ARF a p16INK4A, které jsou důležitými nádorovými supresory regulujícími buněčný cyklus (Mehnert a Kluger 2012). Většina melanomů však vzniká jako důsledek nashromážděných somatických mutací v průběhu života jedince.

2.2.2. Možnosti léčby melanomu

Maligní melanom byl ještě do nedávna léčen prostřednictvím chirurgického odstranění primárního nádorového ložiska. Postupem let však bylo zjištěno, že chirurgická léčba je úspěšná pouze u pacientů, kteří trpí časným stádiem této nemoci. Další možností je radioterapie, tedy léčba ozařováním místa nádoru prostřednictvím ionizujícího světla, které usmrcuje nádorové buňky (Krajsová 2017). Pokud je však nádorové onemocnění diagnostikováno až v pokročilejší fázi, nemůže chirurgické odstranění nádoru nebo radioterapie zabránit růstu již v té době existujících metastatických ložisek (Heneberg 2012).

V takových případech již není dostačující přistupovat pouze k těmto typům terapie, proto bývají využívány i další možnosti konvenční léčby jako je chemoterapie, tedy léčba využívající léčiva ze skupiny cytostatik, které postihují především buňky nádorové, současně však i některé zdravé buňky. Na tento typ léčby pozitivně reaguje 18-64 % pacientů, nicméně je doprovázen řadou nežádoucích vedlejších účinků, které snižují kvalitu života jedince. Další z možností je imunoterapie s použitím léčiv, které posilují reakci imunitního systému v boji proti rakovinovým buňkám, na kterou však úspěšně reaguje méně než 20 % pacientů (Ives a kolektiv 2007, Heneberg 2012).

Problémem konvenčně využívaných terapeutických metod je také délka odpovědi organismu na ně, která nepřekračuje období jednoho roku. Maligní melanom, který již metastazuje, je z toho důvodu odborníky považován za chemicko – i radio – rezistentní chorobu, díky čemuž se řadí k jednomu z nejhůře léčitelných onemocnění (Heneberg 2012).

Jedním z nejslibnějších terapeutických přístupů je cílená biologická léčba, která využívá léčiv cíleně působících jako "vypínače" nebo "přepínače" pochodů, které podporují nádorové bujení, a to specificky v nádorových buňkách. Značnou výhodou této léčby je podstatně nižší výskyt zatěžujících a nežádoucích vedlejších účinků oproti konvenční terapii (Krajsová 2006). Na základě specifík signálního mechanismu, který mají léčebné látky ovlivnit, aby zabránily rakovinovému bujení, lze rozdělit cílená léčiva na (Knudson 2002):

- monoklonální protilátky, které přilnou na molekuly přítomné na povrchu nádorové buňky
- nízkomolekulární inhibitory, které jsou schopny proniknou skrze membránu buňky, kde mají za úkol blokovat signální dráhy podporující proliferaci, především inhibitory proteinových kináz

- inhibitory proteazomu, které blokovat proteazom neboli specifické součásti buňky, které likvidují bílkoviny, které splnily svoji funkci a jsou nepotřebné.

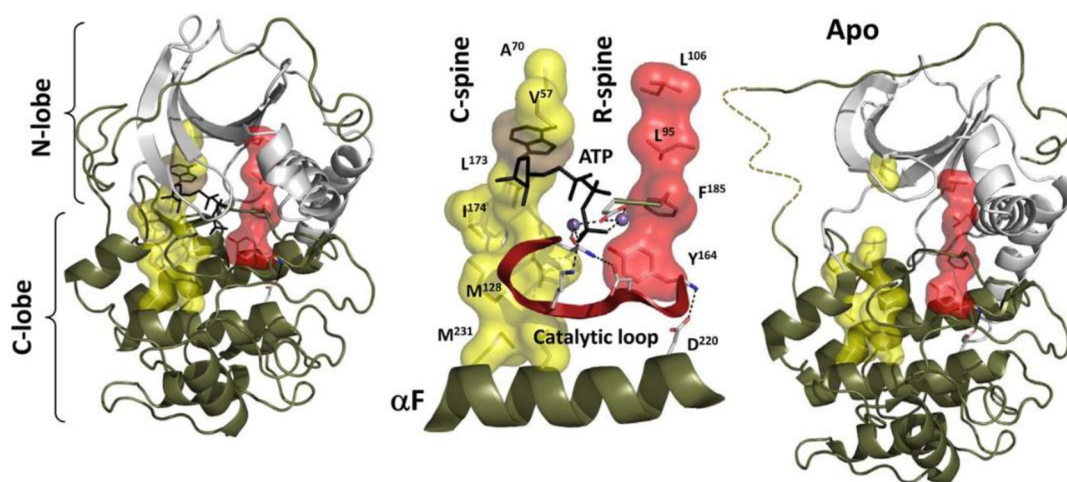
Tento typ cílené léčby však vyžaduje znalost základních molekulárních mechanismů melanomových onemocnění a identifikaci specifických mutací signálních drah u jednotlivých subtypů melanomů, aby bylo možné navrhnout vhodná a účinná léčiva. V současné době existuje několik léčebných přístupů založených na nízkomolekulárních inhibitech kinázy BRAF (vemurafenib, dabrafenib, encorafenib) nebo MEK kinázy (trametinib, cobimetinib), ale i kinázy C-KIT (imatinib). Kromě nízkomolekulárních inhibitorů je však využívána také imunoterapie, která je založena např. na použití monoklonální protilátky proti CTLA-4 (ipilimumab) (Balch a kolektiv 2009, Wolchok a kolektiv 2011, Heneberg 2012, King a kolektiv 2013, Robert a kolektiv 2015).

2.3. RAF kináza a její signalizace

RAF kinázy (anglicky *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*) patří do skupiny proteinových kináz. Proteinové kinázy hrají důležitou roli v regulaci většiny biologických procesů v eukaryotických buňkách, včetně buněčného růstu, diferenciaci, buněčné smrti a metabolismu, a jejich dysfunkce je spojena s mnoha onemocněními. Katalyzují přenos fosfátu z ATP na proteinové substráty (Reese a kolektiv 2011).

Fosforylace proteinů může obecně modulovat aktivitu široké škály enzymů a také řídit specifické protein-proteinové interakce. O jejich důležitosti svědčí skutečnost, že savčí kinom obsahuje přes 500 různých proteinkináz, které tvoří asi 2 % všech proteinů kódovaných genomem (Manning a kolektiv 2002). Jsou to vysoce dynamické molekulární spínače, které se rychle vypínají a zapínají v reakci na různé intracelulární a extracelulární podněty (Reese a kolektiv 2011).

RAF kinázová skupina zahrnuje tři serin/threonin-specifické proteinkinázy, ARAF, RAF a CRAF, a další pseudokinázy, které jsou příbuzné retrovirovým onkogenům. Účastní se kaskády přenosu signálu RAS-RAF-MEK-ERK, která je také označována jako „kaskáda mitogenem aktivovaných proteinkináz“ neboli MAP kinázová dráha (Shaw a kolektiv 2014, Roskoski 2010). Struktura RAF kinázy znázorněna níže, na Obr. 3.



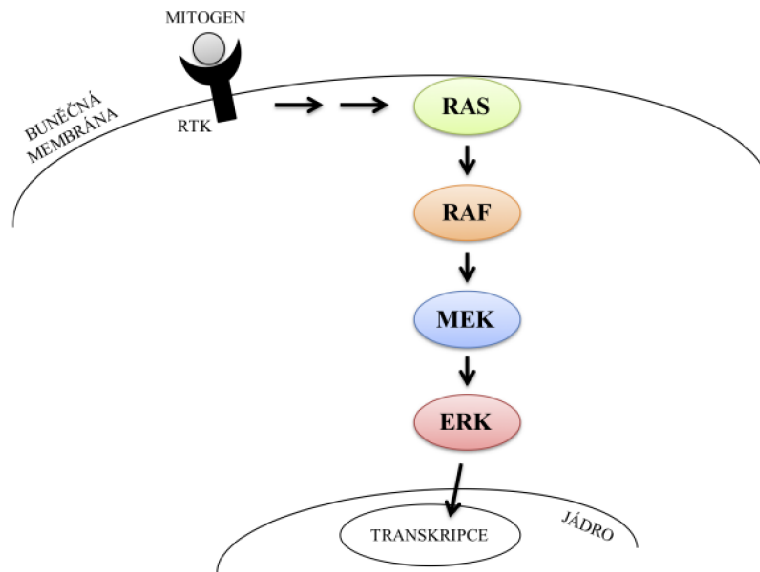
Obr. 3: Struktura serin/threoninové kinázy RAF.

Zdroj: Shaw a kolektiv 2014.

Na počátku MAP kinázové signální dráhy dochází k navázání mitogenu (konkrétního signálu) na receptor buněčné membrány, čímž dochází k aktivaci některé z podřízených receptorových tyrosin kináz (RTK), které se nacházejí v cytoplazmatické membráně (viz Obr. 4), (Raman a kolektiv 2007).

Na základě přítomnosti mitogenu na membráně buňky dochází ke spojení dvou receptorových molekul, čímž vzniká enzymaticky aktivní dimer RTK kinázy. Přítomnost dimeru má na svědomí spuštění celé vnitrobuněčné kaskády dějů, jejichž výsledkem je přenos signálu z cytoplazmatické membrány buňky do buněčného jádra. Aktivovaná RTK kináza poté aktivuje RAS protein, který se do té doby nacházel vypnutý na vnitřní straně cytoplazmatické membrány (Raman a kolektiv 2007).

Takto aktivovaný RAS protein je schopen aktivovat hned několik různých vnitrobuněčných signálních drah. Jednou z nich je právě signální dráha RAF-MEK-ERK, kdy je RAS proteinem nejprve aktivována RAF kináza. Ta má za úkol následně aktivovat kinázu MEK, která disponuje vlivem na terminální kinázu ERK. ERK představuje hlavní výkonný článek celé signální dráhy, a je enzymem, který dokáže působit na celé široké spektrum buněčných procesů, zejména na řízení růstu a proliferace, diferenciace, migrace, přežívání, senescence a apoptózy, a dokáže vyjádřit konkrétní signál, který se k němu kaskádou dějů dostal z povrchu buňky (Raman a kolektiv 2007).



Obr. 4: Přenos vnějšího signálu do jádra buňky prostřednictvím RAS-RAF-MEK-ERK signální dráhy.

Zdroj: Kubová, 2019.

Jak již bylo zmíněno, RAS-RAF-MEK-ERK signální dráha patří mezi na mutace nejvíce zatíženou dráhu v rámci lidských nádorových onemocnění (Raman a kolektiv 2007). U přibližně poloviny pacientů s maligním melanomem je mutován právě gen *BRAF*. Doposud bylo pouze v rámci tohoto genu rozpoznáno více než tři sta různých bodových mutací. Většina mutací se týká zaměněných aminokyselinových zbytků, které se nejčastěji vyskytují v blízkosti aktivační nebo fosfát vázající smyčky. Interakce těchto smyček je významná pro udržení stability a správné konformace proteinu. Pokud se v jejich blízkosti objeví mutace, může dojít k narušení jejich vzájemné interakce, v důsledku čehož smyčky již nadále nejsou schopné vzájemné spolupráce. Díky tomu zůstává protein neustále aktivní, což způsobuje aktivaci celé signální dráhy RAS-RAF-MEK-ERK, což vede k nekontrolovatelné proliferaci buněk (Davies a kolektiv 2002, Wan a kolektiv 2004).

Mutace v RAS-RAF-MEK-ERK dráze se nevyskytují pouze u melanomů, ale i přibližně u 10 % ovarálních nádorů, 8 % karcinomů prostaty, 3 % karcinomů plic, 25 % mediastinálních nádorů ze zárodečných buněk, 10 % kolorektálních tumorů a 40 % nádorů štítné žlázy (Arenberg a Puzanov 2014). Tato skutečnost vedla k intenzivnímu výzkumu a vývoji léčiv cílících právě tuto mutovanou formu proteinové kinázy.

2.4. Inhibitory RAF kináz

Nízkomolekulární inhibitory RAF kináz představují látky, které jsou schopny cíleně inhibovat mutovanou formu kinázy, a zabránit tak dalšímu růstu a proliferaci rakovinných buněk (Rommel a kolektiv 2009, Sale a kolektiv 2019). V současné době již existuje značné množství inhibitorů RAF kináz. Prvním FDA (Food and drug administration) schváleným inhibitorem RAF kináz se stal v roce 2011 vemurafenib pro léčbu BRAF^{V600E} mutovaných metastatických melanomů. Schválení vemurafenibu změnilo současný trend péče a prognózu pacientů. Preklinické i klinické studie prokázaly účinnost selektivního cílení BRAF. Ačkoli vemurafenib dramaticky změnil léčebné možnosti pro pacienty, je třeba zmínit, že vemurafenib se zřídka používá jako monoterapie. Častěji je používán v kombinované terapii s inhibitory MEK kináz, kdy tato kombinace dosahuje lepších léčebných výsledků (Sanchez a kolektiv 2018).

Po schválení vemurafenibu pak následoval v roce 2013 dabrafenib (Ballantyne a Garnock-Jones 2013) a v roce 2018 encorafenib (Shirley 2018). Všechny tři látky jsou perorálně dostupnými nízkomolekulárními, selektivními inhibitory BRAF kinázy. Inhibicí BRAF interferují do signální dráhy RAS-RAF-MEK-ERK, která reguluje proliferaci a přežití melanomových buněk (Proietti a kolektiv 2020).

Všechny zmíněné inhibitory vykazují vysokou specifitu pro BRAF^{V600} mutantní buněčné linie, přičemž tato specifita je považována za důsledek preferenční inhibice aktivní konformace BRAF, dosažené kompetitivním obsazením ATP vazebné kapsy, která stabilizuje kinázu v její aktivní konformaci (Proietti a kolektiv 2020).

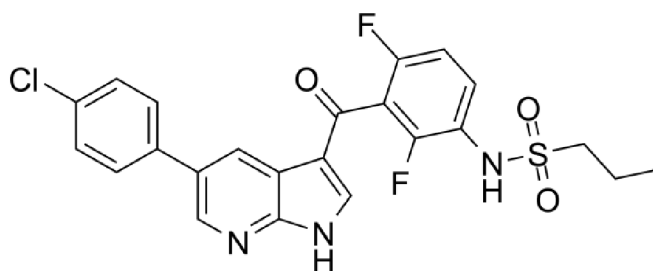
Preklinické studie prokázaly, že vemurafenib a dabrafenib poskytují silnou selektivní inhibici kinázové aktivity v BRAF^{V600} mutovaných buněčných liniích melanomu, blokují fosforylaci ERK, buněčnou proliferaci a indukují zástavu buněčného cyklu v G1 fázi, stejně tak jako indukují apoptózu (Yang a kolektiv 2010, Gentilcore a kolektiv 2013, King a kolektiv 2013).

U vemurafenibu byla potvrzena aktivita vůči BRAF mutovaným formám V600E, V600D a V600R (Yang a kolektiv 2010), u dabrafenibu navíc i vůči V600K (King a kolektiv 2013). Inhibice však nebyla u těchto dvou inhibitorů pozorována pro buňky, které exprimují přirozený nemutovaný typ BRAF nebo u buněk s jiným typem mutace, než je V600 (Yang a kolektiv 2010, King a kolektiv 2013). Oproti tomu encorafenib, který je primárně zaměřen na mutace typu V600E a V600K, také vykazuje jistý inhibiční účinek i u nemutovaného typu BRAF (Delord a kolektiv 2017).

V xenograftových modelech melanomu exprimujícího mutaci BRAFV600E podávání těchto látek inhibovalo růst nádoru a ve vyšších dávkách indukovalo regresi nádoru (Yang a kolektiv 2010, King a kolektiv 2013).

Co se týče snášenlivosti inhibitorů proteinů BRAF, pak jsou pacienti všeobecně dobře snášeny, oproti snášenlivosti a vedlejším účinkům pramenícím z podstupování radioterapie nebo chemoterapie. Nežádoucí účinky popsala zhruba polovina pacientů, která léčbu inhibitory podstoupila. Na škále snesitelnosti jsou tyto vedlejší účinky nejčastěji popisovány jako „bezproblémové“, „mírně problematické“, a pouze v ojedinělých případech jsou musí být léčba inhibitory ukončena (Krajsová 2014).

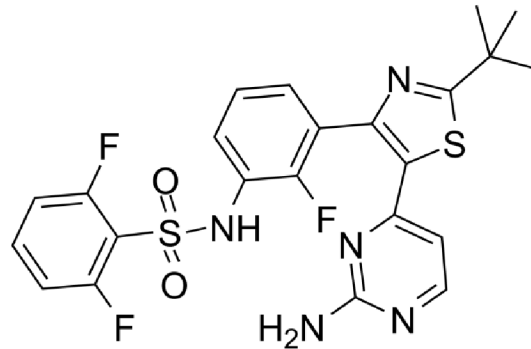
- Vemurafenib je inhibitorem vyvinutým společností Plexxikon a Genentech, který byl roku 2011 schválen FDA a roku 2012 Evropskou komisí pro léčbu BRAF^{V600E} mutovaného melanomu v pozdním stádiu. Tento reverzibilní nízkomolekulární inhibitor je podáván perorálně a způsobuje apoptózu buněk melanomu selektivním zacílením na mutace BRAF^{V600} (Holderfield a kolektiv 2013) (Obr. 5).



Obr. 5: Struktura inhibitoru vemurafenib.

Zdroj: scbt.com

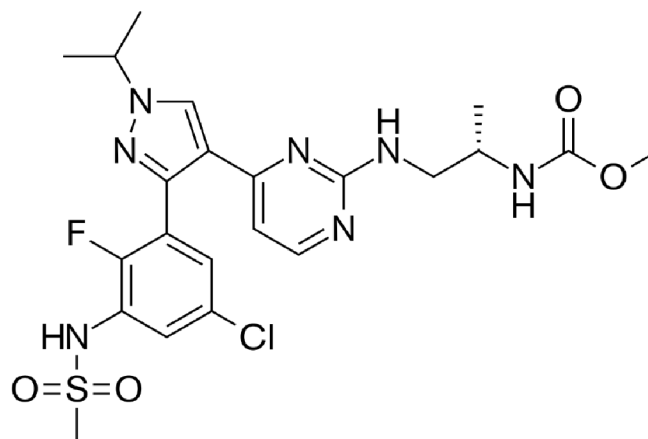
- Dafrafenib je reverzibilním a nízkomolekulárním inhibitorem vyvinutým společností GlaxoSmithKline, který byl, jak FDA, tak i Evropskou unií schválen pro použití u neresekovatelného nebo metastazujícího melanomu s mutací typu BRAF^{V600E} nebo BRAF^{V600K} roku 2013 (Ascierto a kolektiv 2013) (Obr. 6).



Obr. 6: Struktura inhibitoru dafrafenib.

Zdroj: scbt.com

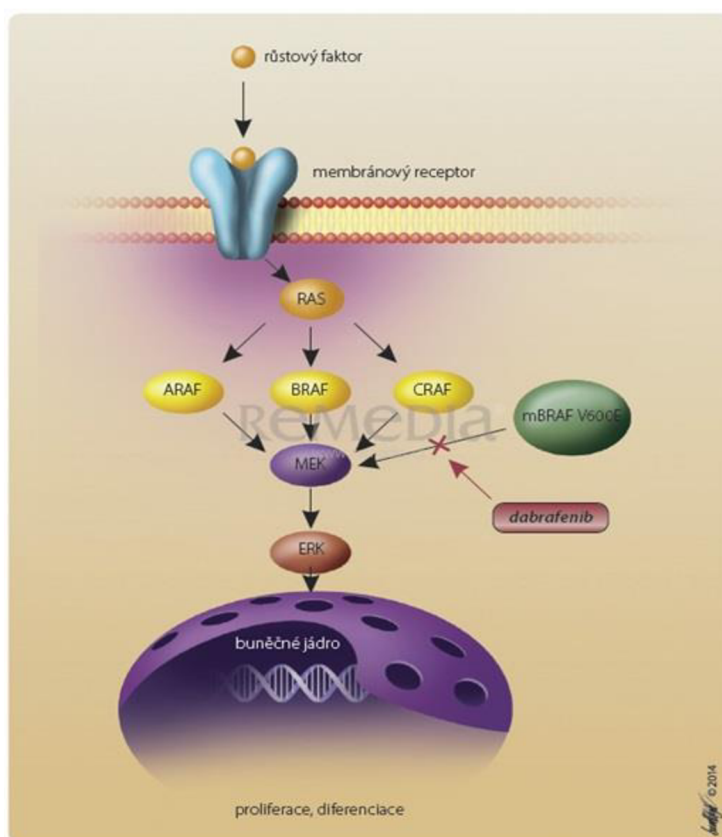
- Encorafenib vyvinutý společností Novartis představuje selektivní inhibitor mutace BRAF^{V600E}, který byl schválen roku 2018 pro použití v kombinaci s inhibitorem MEK pro BRAF mutovaný melanom (Delord a kolektiv 2017) (Obr. 7).



Obr. 7: Struktura inhibitoru encorafenib.

Zdroj: scbt.com

Inhibítorem, do kterého jsou vkládány zásadní terapeutické účinky, je dabrafenib, který obsahuje thiazolovou skupinu s navázaným benzensulfonamidem (na pozici 2) a 2-aminopyrimidinem (na pozici 5). Mechanismus jeho účinku spočívá v reverzibilní kompetici o vazebné místo na kináze B-RAF s ATP (Heneberg 2012), viz Obr. 8. První klinické studie dabrafenibu poukazovaly na dobrou snášenlivost a efektivní odpověď u pacientů, kteří reagovali na podávaný lék až v 50 % případů. U většiny pacientů, kterým byl podáván lék dabrafenib, došlo přinejmenším k částečnému zmenšení metastáz či došlo k prodloužení jejich přežití bez další progresse onemocnění (Krajsová 2014).



Obr. 8: Působení dabrafenibu.

Zdroj: Krajsová, 2014.

Vemurafenib byl schválen primárně pro léčbu melanomu, nicméně může být použit i u dalších nádorových onemocnění, ve kterých sehrává klíčovou roli mutace na kináze BRAF. Jedná se až o 8 % všech nádorů, zejména ovariálních nádorů, karcinomů prostaty, nádorů plic nebo štítné žlázy (Greenman a kolektiv 2007). Výzkum, který byl proveden na pacientech trpících BRAF mutovaným metastatickým melanomem, poukázal na to, že 82 % pacientů

léčených vemurafenibem mělo pozitivní léčebnou odpověď. Lék za poměrně krátkou dobu (1 až 2 týdny) způsobil rychlý ústup symptomů a byl pacienty dobře tolerován, až na občasný výskyt únavy či kožní vyrážky (Flaherty a kolektiv 2010). Medián období do progresse onemocnění byl 6,8 měsíce. Medián celkového přežití byl 15,9 měsíce, což představuje bezprecedentní prodloužení ve srovnání s 8–10 měsíci dosaženými inhibitory první generace v minulosti. Výskyt celkového přežití v 6 měsících byl 77 % a ve 12 měsících 58 % (Flaherty a kolektiv 2010).

Encorafenib sdílí stejnou selektivitu pro mutantní BRAF kinázy s výše uvedenými inhibitory, disponuje navíc některými jedinečnými vlastnostmi, které jej odlišují od jiných inhibitorů BRAF, a poskytují potenciální terapeutický přínos. Předklinické údaje ukazují, že encorafenib je nejen účinnější než jeho protějšky (vemurafenib a dabrafenib), ale má také delší poločas rozpadu. Kromě toho léčba encorafenibem vede ke snížení výskytu závažných nežádoucích účinků, jaké byly pozorovány u léčby prostřednictvím vemurafenibu a dabrafenibu, včetně výskytu sekundárních kožních nádorů. Zjištění, že encorafenib je účinnější, má delší poločas rozpadu, a menší výskyt sekundárních kožních nádorů, z něj činí slibný lék (Delord a kolektiv 2017).

Závěrem lze říci, že inhibitory RAF kináz představují slibné terapeutické prostředky pro léčbu melanomů. Je však zapotřebí neustále zkoumat a vyvíjet nové látky, které by byly účinnější nežli stávající. U mnoha pacientů léčených prozatímními inhibitory nebo kombinací inhibitorů totiž nakonec dochází k progresi melanomu a ke vzniku rezistence na léčbu.

3. Praktická část práce

3.1. Materiál

3.1.1. Přístrojové vybavení

K experimentální části byly využity tyto následující přístroje:

- flowbox s vertikálním prouděním vzduchu (Alpina, Polsko)
- CO₂ inkubátor (Sanyo, Japonsko)
- odsávací pumpa FTA2i (Biosan, Lotyšsko)
- optický mikroskop Nikon TMS (Nikon, Japonsko)
- vodní lázeň (GFL, Německo)
- centrifuga BR4i (Jouan, USA)
- centrifuga 5702 (Eppendorf, Německo)
- minicentrifuga 5702R (Eppendorf, Německo)
- pipetor (BrandTech Scientific, USA)
- pH metr se skleněnou elektrodou (XS instruments, Itálie)
- ultrazvukový homogenizátor Sonopuls HD2200 (Bandelin)
- třepačka vířivá Vortex mix (Velp Scientifics, Itálie)
- třepačka s kývavým pohybem MiniRocker MR-1 (Biosan, Lotyšsko)
- zdroj pro elektroforézu a western blotting (E-C Apparatus Corporation, USA)
- souprava pro vertikální elektroforézu: Mini Protean Tetra Cell (BioRad, USA)
- souprava pro western blotting: Mini Trans-Blot Module (BioRad, USA)
- termostat blokový (Kleinfeld laborotechnik, Německo)
- předvážky laboratorní (Kern, Německo)
- chemiluminiscenční vyvolávací automat LAS4000 (FujiFilm, Japonsko)
- fluorescenční reader pro mikrotitrační destičky Fluoroskan Ascent (Thermo Labsystems, Finsko)
- průtokový cytometr Cell Lab QuantaTM SC-MPL (Beckman Coulter, USA)
- UV-VIS spektrofotometr UV-1800 (Shimadzu, Japonsko)

3.1.2. Použité chemikálie

K experimentální části byly využity tyto následující chemikálie:

- 2-merkptoethanol 97% (Serva, Německo)
- akrylamid (VWR, USA)
- aprotinin (Sigma-Aldrich, USA)
- bovinní sérový albumin: BSA (VWR, USA)
- bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, Rakousko)
- Coomassie-brilliant blue (Sigma–Aldrich, USA)
- dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema, ČR)
- dimethylsulfoxid: DMSO (PanReach AppliChem, Německo)
- dithiothreitol: DTT (Roche, Německo)
- dodecylsírán sodný: SDS (Lach-Ner, ČR)
- ECL substrát (Thermo Fisher Scientific, USA)
- ethanol 96% (Lach-Ner, ČR)
- fenylmethylsulfonylfluorid: PMSF (Sigma–Aldrich, Čína)
- fetální bovinní sérum: FS (Biowest, Francie)
- fluorid sodný (Lach-Ner, ČR)
- glycerol (Lach-Ner, ČR)
- glycin (Sigma–Aldrich, USA)
- hydrogenfosforečnan sodný (Penta, ČR)
- hydroxid sodný (Penta, ČR)
- chlorid draselný (Lachema, ČR)
- chlorid sodný (Penta, ČR)

- kultivační médium RPMI 1640 (Biowest, Francie)
- kultivační médium DMEM (Sigma–Aldrich, USA)
- kyselina ethylendiamintetraoctová: EDTA (Sigma–Aldrich, Čína)
- kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová: EGTA (Sigma–Aldrich, USA)
- kyselina chlorovodíková 35% (Lach-Ner, ČR)
- kyselina trihydrogenfosforečná 85% (Penta, ČR) 30
- kyselina octová 99% (Lach-Ner, ČR)
- L-glutamin (Sigma–Aldrich, USA)
- leupeptin (Sigma–Aldrich, USA)
- n-butanol (Lach-Ner, ČR)
- N',N',N',N'-tetramethylethylendiamin: TEMED (BioRad, USA)
- N',N'-metylenbisakrylamid (Sigma–Aldrich, Čína)
- nonidet: P 40 (Fluka, Švýcarsko)
- orthovanadičnan sodný (Sigma–Aldrich, USA)
- penicilin (Sigma–Aldrich, USA)
- peroxodisíran amonný (BioRad, USA)
- propidium jodid (Sigma–Aldrich, USA)
- proteinový detekční marker: Spectra Multicolor Broad PageRuler Prestained Protein Ladder 10-180 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Ponceau S (Serva, Německo)
- streptomycin (Sigma–Aldrich, USA)
- tris(hydroxymethyl)aminomethan: TRIS (Serva, Německo)
- tween-20: polyoxyethylensorbitanmonolaurát (Sigma–Aldrich, USA)

3.1.3. Použité roztoky

K experimentální části byly využity tyto následující roztoky:

- blokovací pufr: 5% BSA, 0,1% Tween 20 v TBS
- blotovací pufr: 25 mmol·l⁻¹ TRIS, 192 mmol·l⁻¹ glycin v dH₂O
- Bradfordovo činidlo: 0,01% Coomasie-Brilliant blue, 4,7% ethanol, 8,5% kyselina fosforečná v dH₂O
- ECL roztok: 1:1 luminol a H₂O₂
- elektroforetický roztok: 25 mmol·l⁻¹ TRIS, 192 mmol·l⁻¹ glycin, 0,1% SDS v dH₂O
- lyzační pufr W: 20 mmol·l⁻¹ TRIS (pH 7,4), 100 mmol·l⁻¹ NaCl, 5 mmol·l⁻¹ EDTA, 2 mmol·l⁻¹ EGTA, 2 mmol·l⁻¹ NaF, 0,2% nonidet P 40 (pH 7,4) 1 mmol·l⁻¹ PMSF, 1 mmol·l⁻¹ DTT, 10 µg·ml⁻¹ leupeptin, 10 µg·ml⁻¹ aprotinin, 1 mmol·l⁻¹ vanadičnan sodný v dH₂O
- promývací roztok PBS: 137 mmol·l⁻¹ NaCl, 2,7 mmol·l⁻¹ KCl, 10 mmol·l⁻¹ Na₂HPO₄, 2 mmol·l⁻¹ KHPO₄ (pH 7,4) v dH₂O
- Ponceau S: 0,2% Ponceau S, 1% kyselina octová v dH₂O 31
- SDS vzorkovací pufr: 0,3 mol·l⁻¹ TRIS (pH 6,8), 50% glycerol, 10% SDS, 5% 2-metkaptoethanol, 0,05% bromfenolová modř v dH₂O
- TBS: 137 mmol·l⁻¹ NaCl, 20 mmol·l⁻¹ TRIS (pH 6,8) v dH₂O
- TBS-T 20: 137 mmol·l⁻¹ NaCl, 20 mmol·l⁻¹ TRIS, 0,1% Tween 20 v dH₂O
- reakční substrát: 25 mM PIPES/KOH, pH 7,3; 2mM EGTA, 2 mM MgCl₂
- fluorescenčně značený peptidový substrát: Ac-DEVD-AMC

3.1.4. Použité protilátky

K experimentální části byly využity tyto následující primární protilátky (R = králíčí, M = myší, p = phosphorylated):

Protein	Molekulová hmotnost (kDa)	Protilátka	Typ	Výrobce	Typ ředění
pMEK$\frac{1}{2}$ (Ser217/221)	45	anti-pMEK 1/2 S217/221	R	Cell Signaling (USA)	1:500
MEK $\frac{1}{2}$	45	anti-MEK1/2	R	Cell Signaling (USA)	1:500
pERK$\frac{1}{2}$ (Thr202/Tyr204)	42, 44	anti-ERK1/2	R	Cell Signaling (USA)	1:250
ERK $\frac{1}{2}$	42,44	anti-pERK 1/2 T202/Y204	R	Cell Signaling (USA)	1:500
pAKT (Ser473)	60	anti-pAKT S473	R	Cell Signaling (USA)	1:500
AKT	60	Anti-AKT	R	Cell Signaling (USA)	1:1000
c-MYC	57-65	anti-c-MYC	R	Cell Signaling (USA)	1:500
BCL-2	26	anti-BCL-2	M	Cell Signaling (USA)	1:500
Kaspáza7 zymogen	17 fr.	anti-kaspáza 7 zymogen	R	Cell Signaling (USA)	1:500
Kaspáza7 fragment	17 fr.	anti-kaspáza 7 fragment	R	Cell Signaling (USA)	1:500
PARP-1	100, 85	anti-PARP-1	R	Cell Signaling (USA)	1:500
β-aktin	42	anti- β -aktin	M	Santa Cruz Biotechnology (USA)	1:1000

K experimentální části byly využity tyto následující sekundární protilátky:

Protilátka	Typ	Výrobce	Typ ředění
anti-Rabbit (SWAR/Px)	swine anti-rabbit Ig polyklonální	Cell signaling technology, USA	1:1000
anti-Mouse (RAM/Px)	rabbit anti-mouse Ig polyklonální	Cell signaling technology, USA	1:1000

3.1.5. Použité buněčné linie

K experimentální části byly využity tyto následující buněčné linie kultivované v inkubátoru při teplotě 37 °C a v atmosféře s obsahem 5 % oxidu uhličitého:

- MV411 (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Německo) lidská nádorová linie odvozená od akutní monocytární leukémie. Linie byla kultivována v médiu RPMI 1640 s 10% telecím fetálním sérem, streptomycinem (0,1 mg/ml), penicilinem (100 U/ml) a L-glutaminem (2 mM)
- K562 (The European Collection of Authenticated Cell Cultures, Velká Británie) lidská nádorová linie odvozená od chronické myeloidní leukémie. Linie byla kultivována v médiu DMEM s 10% telecím fetálním sérem, streptomycinem (0,1 mg/ml), penicilinem (100 U/ml) a L-glutaminem (2 mM).
- G361 (The European Collection of Authenticated Cell Cultures, Velká Británie) nádorová linie odvozená od lidského maligního melanomu. Linie byla kultivována v médiu DMEM s 10% telecím fetálním sérem, streptomycinem (0,1 mg/ml), penicilinem (100 U/ml) a L-glutaminem (2 mM).

3.1.6. Testované inhibitory

K experimentální části byly využity tyto následující testované inhibitory:

- **8046, 8047, 8048, 8067:** byly nasyntetizovány výzkumnou skupinou dr. Majeed z Jihoafrické republiky. Strukturní vzorce těchto látek nebyly zveřejněny. Testované látky byly před použitím připraveny jako zásobní roztoky v DMSO o koncentracích 5 μM , 10 μM a 20 μM .
- **Vemurafenib:** komerčně dostupný inhibitor enzymu B-RAF (Med Chem Express) byl použit jako standard. Látka byla připravena jako zásobní roztoky v DMSO o koncentracích 0,1 μM , 1 μM a 10 μM .

Vytvořené zásobní roztoky testovaných látek byly následně uskladněny v lednici a před samotným použitím byly naředěny v kultivačním médiu tak, aby byla koncentrace v DMSO nižší než 0,1 %.

3.1.7. Programy

K experimentální části byly využity tyto následující programy:

- BD FACSuite™ Software (Becton-Dickinson Company, USA)
- ModFit LT 5.0 (Verity Software House, USA)
- Multi Gauge Image Reader LAS-4000 3.2 (FujiFilm, Japonsko)
- Origin 6.0 (OriginLab Corporation, USA)

3.2. Metody

3.2.1. Kultivace, ovlivnění buněčné linie, sklizení

Nádorové buněčné linie G361, MV411 a K562 byly kultivovány v inkubátoru při teplotě 37 °C. Atmosféra v inkubátoru obsahovala 5 % CO₂, dále byla udržována relativní vlhkost atmosféry kolem 90 %. Buňky byly kultivovány v kultivačních nádobách (Petriho miskách), které obsahovaly příslušné médium. Ke kultivaci buněčné linie G361 a K562 bylo použito médium DMEM s přidavkem 10% fetálního bovinního séra. Ke kultivaci buněčné linie MV411 bylo použito médium RPMI s přidavkem 10% fetálního bovinního séra. Veškerá manipulace s živými kulturami probíhala v laminárním boxu. Dle rychlosti růstu byly kultury pasážovány 2- 3x týdně tak, že v případě suspenzních buněk byla buněčná suspenze nejprve přenesena do sterilní zkumavky a centrifugována po dobu 5 minut při 1000 rpm. V případě buněk adherentních bylo nejprve potřeba buňky opláchnout roztokem EDTA a následně ztrypsinizovat a až poté je spolu s médiem určeným na oplach přenést do sterilní zkumavky a centrifugovat. Pelet buněk byl poté rozsuspendován v médiu o požadovaném objemu. V případě založení experimentu byl stanoven počet buněk pod mikroskopem pomocí Bürkerovy komůrky, buněčná suspenze byla poté zředěna podle potřeb experimentu a vysazena do kultivačních nádob.

Pro ovlivnění buněk byly testované látky a standard nejprve naředěny do roztoku DMSO tak, aby byla vytvořena požadovaná koncentrační řada. Takto naředěné látky byly napipetovány do zkumavek s příslušným objemem kultivačního média. Poté bylo buňkám kultivační médium vyměněno za médium obsahující naředěnou testovanou látku. Buňky byly inkubovány s testovanými látkami v inkubátoru požadovanou dobu v závislosti na použitých liniích a experimentu.

Buňky určené pro analýzu metodou western blotting a metodou stanovení aktivity kaspáz byly sklizeny pomocí plastových škrabek do zkumavek. Poté byly dvakrát promyty v PBS a centrifugovány 8 minut při 1000 g a 4 °C. Po odstranění supernatantu byl buněčný pelet uchován v 1,5 ml mikrozkušavkách v mrazáku při teplotě -80 °C.

Buňky určené pro cytometrickou analýzu byly sklizeny pomocí trypsinizace, aby došlo k jejich odlepení ze dna kultivačních nádob. Nejprve bylo kultivační médium odpipetováno do zkumavky, poté byl na oplach buněk použit roztok EDTA a následně buňky byly ztrypsinizovány. Po uvolnění buněk ze dna kultivační nádoby byly buňky opláchnuty kultivačním médiem a celý obsah byl přepipetován do zkumavky. Zkumavky byly centrifugovány 8 minut při 1000 g a teplotě 4 °C. Supernatant byl odstraněn a vzniklý pelet byl resuspendován v 1 ml filtrovaného PBS. Po opětovné centrifugaci byl pelet resuspendován v 100 µl filtrovaného PBS a buňky byly zafixovány pomocí vychlazeného 70% ethanolu za mírného vortexování. Takto připravené vzorky byly uchovány v mrazáku při teplotě – 20 °C.

3.2.2. Lyzace

Sklizené vzorky určené pro analýzu metodou western blotting a metodou stanovení aktivity kaspáz byly nejprve ponechány rozmraznout na ledu a poté byly rozsuspendovány v lyzačním pufru RIPA s inhibitory proteáz, fosfatáz a DTT. Následně byly vzorky inkubovány 30 minut na ledu a každých 5-10 minut byly rozsuspendovány a nakonec sonikovány pomocí ultrazvukového homogenizátoru. Poté byly vzorky centrifugovány po dobu 30 minut, při 14 000 rpm a 4 °C. Supernatanty byly přeneseny do mikrozskumavek a byla stanovena koncentrace proteinů pomocí spektrofotometrické metody podle Bradforda (Bradford 1976). Vzorky byly následny naředěny pomocí RIPA pufru tak, aby byla vyrovnána koncentrace ve všech vzorcích na stejnou hladinu. Pro analýzu metodou western blottingu byl k lyzátům navíc přidán 5x SDS vzorkovací pufr a lyzáty byly poté denaturovány po dobu 5 minut při teplotě 95 °C. Takto připravené vzorky byly uchovány v mrazáku při teplotě – 20 °C.

3.2.3. Elektroforéza, western blotting, imunodetekce

Western blotting s následnou imunodetekcí je technika, která umožňuje detekci hladiny proteinů. Imunodetekce je založena na tvorbě komplexu protein-protilátka pomocí specifického vázání protilátek k proteinům imobilizovaným na membráně.

Pro separaci proteinů ve vzorku byla využita gelová elektroforéza, kde byly použity 5% zaostřovací gely spolu s 10 % či 12,5 % dělicími gely v závislosti na molekulových hmotnostech námi sledovaných proteinů. Separace probíhala zpočátku přibližně 30 min při napětí 80 V, v okamžiku, kdy vzorky pronikly do dělicího gelu, bylo napětí zvýšeno na 120 V.

Po separaci byly proteiny přeneseny na nitrocelulóзовou membránu pomocí metody western blotting za použití proudu 270 mA a stálého chlazení ledem po dobu 3 hodin. Poté byla membrána nabarvena pomocí barviva PONCEAU. Z nitrocelulóзовé membrány byly následně vyřezány menší oblasti na základě molekulové velikosti proteinů, které měly být detekovány. V dalším kroku byly membrány odbarveny v roztoku TBS a následně blokovány po dobu 1 hodiny v blokačním roztoku (4% roztok BSA v 1x TBS s 0,1 % Tweenem), který zabraňuje nespecifické vazbě primárních protilátek v místech membrány, kde nejsou navázány proteiny. Po zablokování byly membrány osušeny a přeneseny na destičku s parafilmem. Na jednotlivé membrány byly nanесeny příslušné primární protilátky, se kterými byly inkubovány přes noc při 4 °C. Poté byly promyty roztoky TBS a TBS s Tweenem pro odstranění přebytečných nenavázaných molekul protilátky. Poté byly na membrány nanесeny odpovídající sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou po dobu 1 hodiny. Po inkubaci byly membrány opět promyty v TBS a TBS s Tweenem.

Následně byla aplikována na membrány přenesené na destičku s parafilmem detekční směs ECL v poměru 1:1 (luminol: peroxid). Po přidání substrátu luminolu došlo v alkalickém prostředí v přítomnosti peroxidu vodíku k oxidaci luminolu peroxidázou a bylo emitováno záření, které bylo následně detekováno kamerou LAS4000 (FujiFilm). Získané obrázky byly zpracovány v programu Multi Gauge Image Reader 2.2.

3.2.4. Stanovení cytotoxicity

Pro stanovení cytotoxických účinků testovaných látek byly buňky vysazeny do objemu 80 μ l média do 96-jamkové desky a následně byly buňky ponechány po dobu 24 hodin v inkubátoru. Před samotným ovlivněním byla do ředící mikrotitrační destičky připravena požadovaná šesti bodová koncentrační řada, kdy byly testované látky ředěny postupně ve vodě s ředícím faktorem 3x. Připravené buněčné linie v 96-jamkových deskách byly následně ovlivněny takto připravenou koncentrační řadou, a to přidáním 20 μ l vyředěné látky k 80 μ l buněčné suspenze. Látky byly testovány vždy v triplicátu po dobu 72 hodin.

Cytotoxické účinky vybraných látek byly následně stanoveny za použití alamarové modři neboli resazurinu, který je sám nefluoreskující, ale metabolicky aktivními buňkami je redukován na fluorescenční produkt resorufin, který lze následně detekovat pomocí fluorescenčního readru Fluoroskan Ascent (Thermo Labsystems). Ze získaných hodnot byla za pomocí programu Origin vyhodnocena hodnota GI₅₀, představující koncentraci látky, která je nezbytná pro usmrcení 50 % populace.

3.2.5. Cytometrická analýza

Tato metoda umožňuje analýzu fyzikálně-chemických vlastností částic, které prochází jedna za druhou v úzkém paprsku světla o určité vlnové délce v průtokovém cytometru. Při dopadu paprsku na částici dochází k jeho lomu a rozptylu. Přímý rozptyl koreluje s velikostí částice, zatímco boční rozptyl granularitě či struktuře. Pokud vzorky obsahují fluorescenční značku, dochází po ozáření paprskem k její excitaci a následné emisi záření, které je detekováno. V této práci byl jako fluorescenční značka použit propidium jodid (PI), který se inkorporuje do DNA a po excitaci zářením o vlnové délce 488 nm vydává emisní spektrum o intenzitě 610 nm, které je detekováno průtokovým cytometrem.

Nejprve byly buňky zafixované v 70 % ethanolu centrifugovány po dobu 8 minut při 1000 g a teplotě 4 °C. Buněčný pelet byl následně rehydratován v 1 ml PBS a poté opět zcentrifugován. Po odsátí supernatantu byl pelet rozsuspendován v roztoku 50 µl PBS. Ke každému vzorku byl po kapkách za mírného míchání přidán 1 ml 2M HCl s 0,5 % tritonem X-100. Poté byly vzorky inkubovány za mírného promíchávání po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby inkubace byl buňky zcentrifugovány, supernatant odstraněn a pelet byl rozsuspendován v 0,1M Na₂B₄O₇·10 H₂O (pH = 8,5) a opět byly vzorky znovu centrifugovány. Poté byl pelet rozsuspendován v 600 µl filtrovaného PBS a přenesen do cytometrických zkumavek. K takto připraveným vzorkům bylo přidáno 6 µl propidium jodidu, aby jeho výsledná koncentrace byla 100 µg/ml. Zkumavky byly inkubovány po dobu 30 minut při laboratorní teplotě ve tmě za průběžného promíchávání.

Za použití průtokového cytometru BD FACS Verse s BD FACSuite Software s použitím excitačního laseru o vlnové délce 488 nm byla provedena cytometrická analýza buněčného cyklu jednotlivých vzorků. Výstupem analýzy byl histogram zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu, který byl zpracován pomocí programu Mod Fit LT 5.0 (Verity Software house).

3.2.6. Stanovení aktivity kaspáz

Metoda měření aktivity kaspáz je založena na proteolytickém štěpení peptidového substrátu Ac-DEVD-AMC (Acetyl-AspGlu-Val-Asp-7amido-4-methylkumarin) kaspázami 3 a 7. Výsledný produktem hydrolýzy je 7-amino-4-methylkumarin (AMC), který po excitaci zářením o vlnové délce 346 nm emituje fluorescenční záření o vlnové délce 422 nm, které je následně detekováno.

Buněčné lyzáty, které byly uchovávány v mrazáku při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ byly nejprve ponechány rozmraznout na ledu a poté bylo napipetováno 15 μg vzorků do jamek mikrotitrační destičky v duplikátu. Do každé jamky bylo napipetováno 100 μl reakčního pufru s fluorescenčně značeným peptidovým substrátem. Mikrotitrační destička byla následně inkubována ve tmě při laboratorní teplotě. V pravidelných hodinových intervalech byla měřena fluorescence při ex/em 346/442 nm pomocí fluorescenčního readru Fluoroskan Ascent (Thermo Labsystems).

4. Výsledky a diskuse

4.1. Stanovení cytotoxických účinků testovaných inhibitorů

Cytotoxické účinky látek **8046**, **8047**, **8048**, **8067** a vemurafenibu byly studovány na buněčných liniích G361 odvozené od lidského maligního melanomu, MV411 odvozené od akutní monocytární leukémii a K562 odvozené od chronické myeloidní leukémie, které byly ovlivněny po dobu 72 hodin. Na základě získaných výsledků byla stanovena hodnota GI_{50} , která odpovídá koncentraci látky, jež je nezbytná pro usmrcení 50 % populace.

Vemurafenib byl při experimentální analýze použit jako standardní BRAF inhibitor pro srovnání s buněčnými účinky testovaných látek. Koncentrace vemurafenibu nezbytná k 50% inhibici růstu melanomových buněk G361, nesoucích mutaci BRAF^{V600E}, činila $1,78 \pm 0,05 \mu\text{M}$. Leukémické linie MV411 a K562 byly vůči vemurafenibu necitlivé s hodnotami GI_{50} vyššími než $15 \mu\text{M}$, jelikož se nevyznačují mutací BRAF. Tyto výsledky korespondují s daty publikovanými Roh a kolektiv 2015, kdy vemurafenib dosahoval hodnoty $GI_{50} = 0,52 \mu\text{M}$ na linii G361. V publikaci Yang a kolektiv 2015 rovněž studovali míru cytotoxicity vemurafenibu na melanomové linii A375 nesoucí tutéž mutaci, kde hodnota GI_{50} činila $3,32 \mu\text{M}$, zatímco u jiných liniích, které se nevyznačovaly BRAF mutací dosahovaly hodnoty GI_{50} více než $10 \mu\text{M}$. Podobných hodnot na linii G361 dosahoval také dabrafenib, další z klinicky používaných BRAF inhibitorů, v publikaci Long GV a kolektiv 2017 a to $GI_{50} = 0,39 \mu\text{M}$.

Testované látky **8046**, **8047**, **8048** se vyznačovaly nejvyšší účinností vůči linii G361, a to s hodnotami GI_{50} v mikromolárních koncentracích, zatímco vůči liniím MV411 a K562 byly tyto látky podstatně méně účinné, což odpovídá účinkům vemurafenibu a poukazuje na možnou inhibici BRAF. Linie G361 byla nejcitlivější vůči působení testované látky **8067**, jejíž hodnota GI_{50} činila $6,30 \pm 0,92 \mu\text{M}$. Nicméně tato látka se vyznačovala účinností i vůči linii MV411, což značí odlišný mechanismus účinku od selektivní inhibice BRAF, proto tato látka nebyla vybrána pro další podrobnější studium. Z testovaných inhibitorů nejnižší hodnoty GI_{50} dosáhla látka **8046**, a to $7,33 \pm 1,70 \mu\text{M}$. Na základě těchto výsledků lze říci, že testované inhibitory se vyznačují nižšími cytotoxickými účinky vůči melanomové linii ve srovnání s jinými léčivými používanými v klinice.

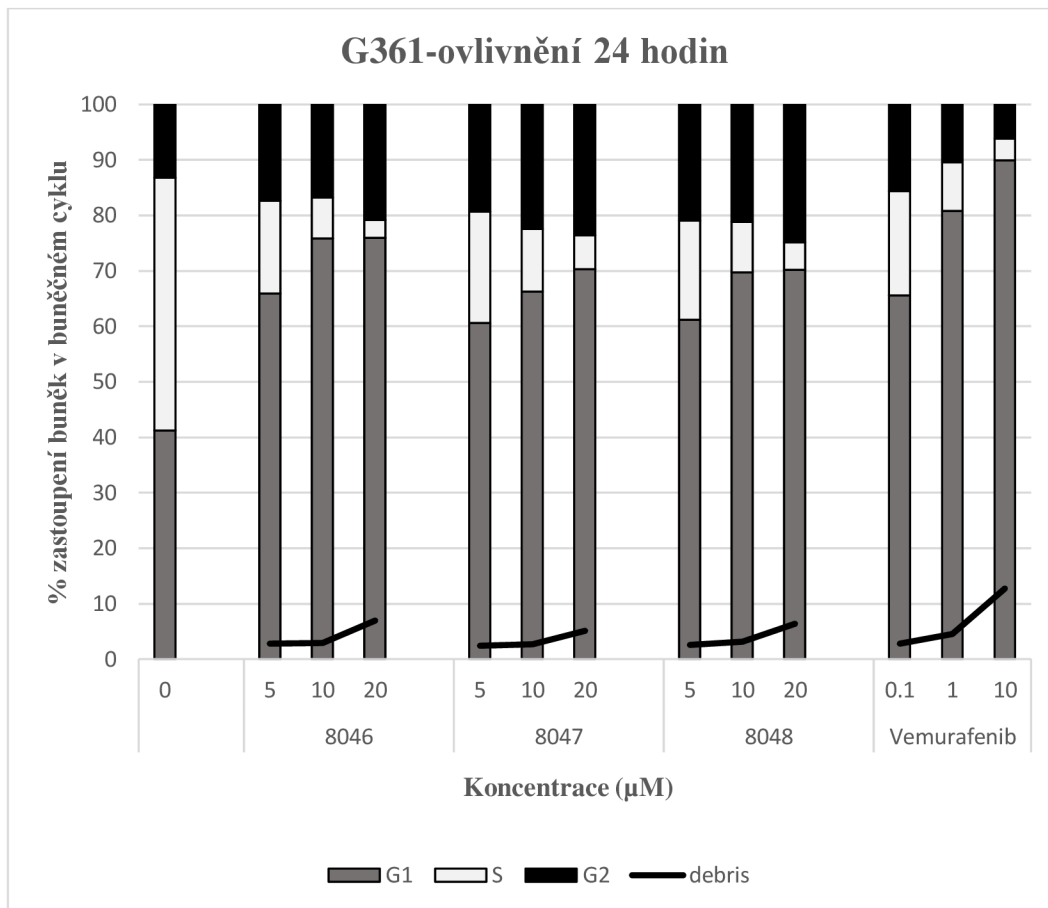
Tab. 1.: Cytotoxicita studovaných látek vyjádřena hodnotami GI₅₀ [μM].

	Buněčná linie					
	G361		MV411		K562	
	GI ₅₀ [μM] ± SD		GI ₅₀ [μM] ± SD		GI ₅₀ [μM] ± SD	
8046	7,33	1,70	17,41	0,73	>25	
8047	10,66	2,20	>25		>25	
8048	8,48	0,43	>25		22,17	0,18
8067	6,30	0,92	4,35	1,14	21,53	1,73
VEMURAFENIB	1,78	0,05	15,15	1,12	>25	

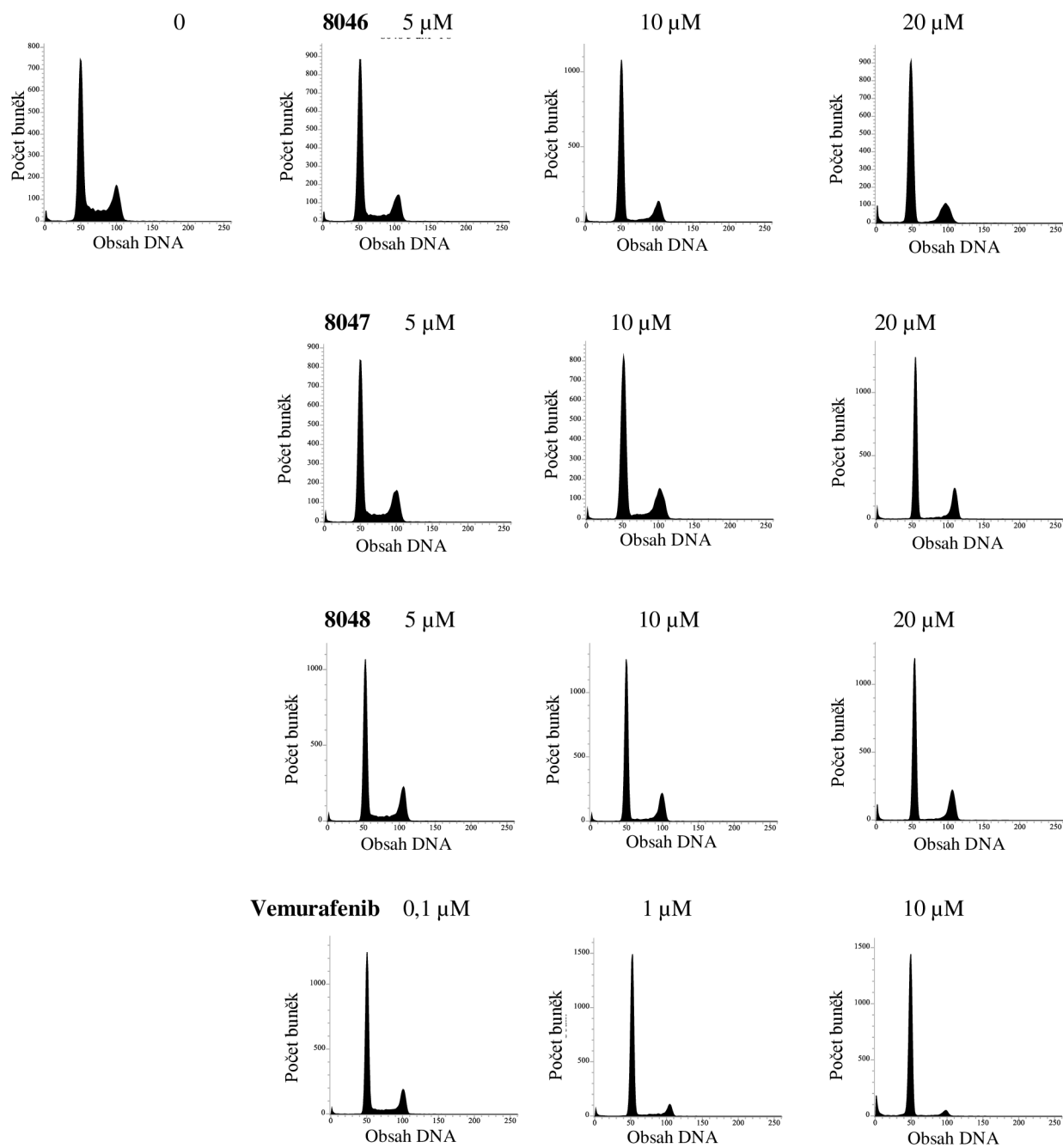
4.2. Cytometrická analýza buněčného cyklu

Cytometrickou analýzou byly sledovány změny v distribuci buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu (G0/G1, S a G2/M) po 24hodinovém působení testovaných látek **8046**, **8047** a **8048** na linii G361. Látky byly testovány ve třech koncentracích 5, 10 a 20 μM, které byly vybrány na základě předchozího stanovení cytotoxických účinků. Pro srovnání buněčného efektu byl analyzován také vliv vemurafenibu a to v koncentraci 0,1; 1 a 10 μM.

Kontrolní histogram cytometrické analýzy neovlivněných buněk zobrazuje standardní rozložení buněk v buněčném cyklu. Bylo prokázáno, že všechny testované látky jsou schopny zablockovat buněčný cyklus v G1 fázi. S rostoucí koncentrací byl pozorován výrazný pokles S-fázových buněk a také snížení počtu buněk v G2/M fázi, a to již v nejnižší testované koncentraci 5 μM. V nejvyšší 20 μM koncentraci se v S fázi vyskytovalo méně než 5 % buněk a zároveň docházelo také k mírnému nárůstu apoptotických buněk. Tento efekt koresponduje s účinkem vemurafenibu, který však byl výraznější s vyšším nárůstem apoptotických buněk (Obr .9, Graf.1). Stejně účinky byly prokázány také v publikaci Niehr a kolektiv 2011, kde vemurafenib způsoboval G1 blok ve třech buněčných liniích nesoucích mutaci BRAF^{V600E}. Článek Petrella a kolektiv 2020 poukazuje také na G1 blok i u dalších inhibitorů mutované kinázy BRAF, a to dabrafenibu a encorafenibu. Souhrnně by zablockování buněčného cyklu látkami 8046, 8047 a 8048 mohlo být považováno za možný důsledek inhibice BRAF, který koresponduje s publikovanými daty.



Graf 1: Analýza buněčného cyklu linie G361 po ovlivnění 8046, 8047, 8048 a vemurafenibem po dobu 24 hodin – procentuální zastoupení v jednotlivých fázích buněčného cyklu.



Obr. 9: Analýza buněčného cyklu linie G361 po ovlivnění 8046, 8047, 8048 a vemurafenibem po dobu 24 hodin – histogramy zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu

4.3. Imunodetekce vybraných proteinů

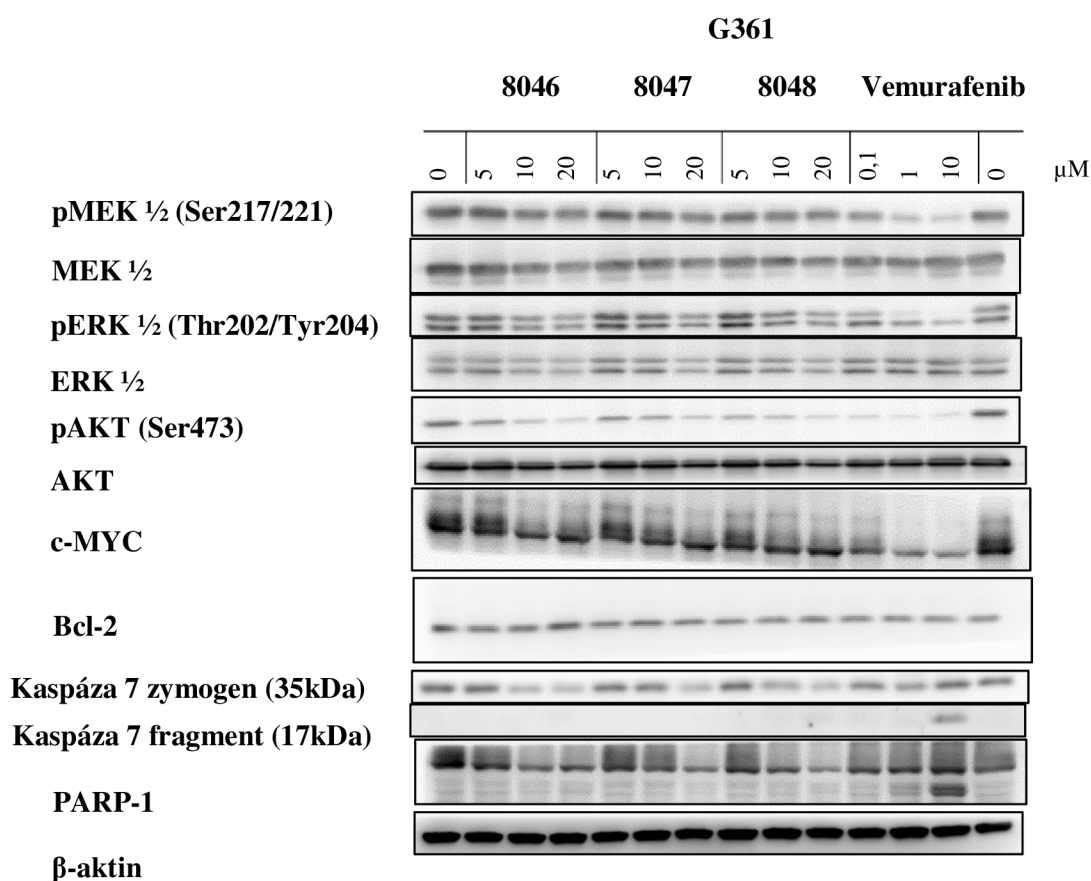
Po provedení analýzy buněčného cyklu a na základě naměřených hodnot GI_{50} byly detekovány změny v hladinách nebo fosforylaci vybraných proteinů pro potvrzení specifického inhibičního účinku látek na signální dráhu RAF kinázy. Nádorová buněčné linie G361 byla ovlivněna látkami **8046**, **8047** a **8048** v koncentrační řadě 5, 10 a 20 μM po dobu 24 hodin a jejich účinky byly opět srovnány s vemurafenibem při použitých koncentracích 0,1; 1 a 10 μM .

Nejprve byla analyzována hladina a fosforylace členů MAP kinázové signální dráhy, které jsou podřízenými, které jsou podřízenými signálními molekulami RAF, a to MEK $\frac{1}{2}$, ERK $\frac{1}{2}$ (Sakkiah a kolektiv 2017). Z výsledků je patrné, že vemurafenib výrazně inhiboval nejen fosforylaci pMEK $\frac{1}{2}$ (Ser217/221), ale i hladiny pERK $\frac{1}{2}$. (Ser217/221) již v 1 μM koncentraci, což odpovídá inhibici BRAF a také publikovaným datům. Haferkamp a kolektiv 2013 detekovali pokles hladiny pMEK $\frac{1}{2}$ i pERK $\frac{1}{2}$ u citlivé linie WMM1175 odvozené od lidského maligního melanomu. Testované látky obdobně jako vemurafenib způsobily poměrně výrazný pokles hladiny fosforylace ERK již v koncentraci 10 μM , zatímco v případě MEK pouze mírný pokles v nejvyšší použité koncentraci. Nejsilnější efekt byl přitom pozorován u látky **8046**, což koresponduje s výsledky stanovení cytotoxických účinků. Takový buněčný efekt by mohl potenciálně odpovídat inhibici BRAF, který je však slabší než v případě vemurafenibu. Dále byla sledována hladina fosforylace AKT (Ser473). Dráha AKT kinázy se uplatňuje při regulaci metabolických pochodů buněk a je stejně jako dráha RAF aktivovaná prostřednictvím proteinu RAS (Vanhaesebroeck a kolektiv 1997). U všech testovaných látek byl detekován pokles pAKT, který byl koncentračně závislý.

Signální dráha MAP kináz řízených RAF kinázou aktivuje transkripci genů časné odpovědi, mezi které patří transkripční faktory zahrnující například FOS a c-MYC. Tyto transkripční faktory iniciují expresi genů opožděné odpovědi, které se podílejí na regulaci buněčného růstu a cyklu. V dalším kroku tedy byla detekována hladina c-MYC a podle očekávání došlo u vemurafenibem ovlivněných buněk k výraznému poklesu jeho hladiny již v koncentraci 1 μM . Tento pokles nastal také v případě látky 8046 a již v koncentraci 10 μM , což korespondovalo s poklesem hladiny fosforylace ERK a MEK. Nicméně látky 8047 a 8048 neměly žádný vliv na hladinu c-MYC.

Vzhledem k předchozím zaznamenaným proapoptotickým účinkům vemurafenibu byl detekován štěpný protein PARP-1, který je při apoptóze aktivovanými kaspázami štěpen na menší fragment o velikosti 89 kDa. Jeho přítomnost značí, že testované látky navozují v

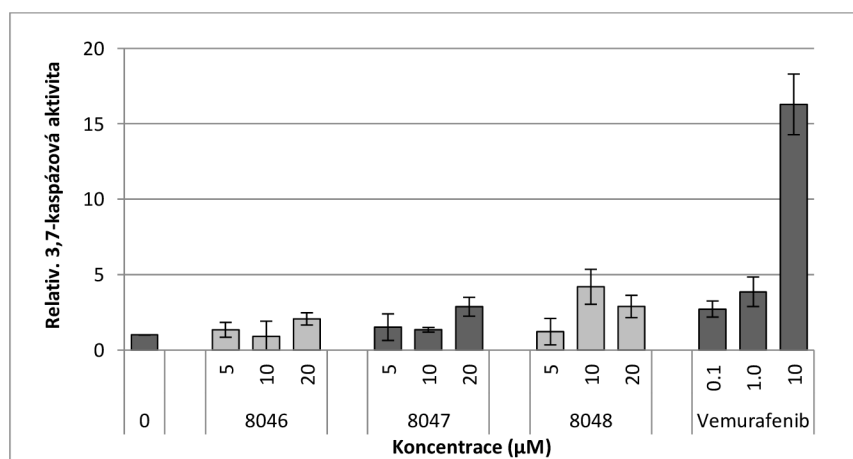
buňkách programovanou buněčnou smrt (Chaitanya a kolektiv 2010). Tento štěpný fragment byl však detekován pouze v nejvyšší koncentraci vemurafenibu, což také odpovídá publikaci Peh a kolektiv 2016, ve které byla vemurafenibem ovlivněna buněčná linie A375. Dále byla také detekována hladina neaktivní formy kaspázy 7 (zymogen), která je v apoptotických buňkách proteolyticky štěpena za vzniku aktivního fragmentu (Shi 2002). Tento fragment byl však opětovně detekován pouze v případě vemurafenibu v koncentraci 10 μM , zatímco hladina proapoptického proteinu Bcl-2 zůstala nezměněna. Vemurafenib se tedy vyznačuje proapoptickými účinky, zatímco testované látky apoptózu zřejmě nezpůsobovaly a vyznačují se odlišným mechanismem účinku. Dle studií Lee a kolektiv 2010 a Tap a kolektiv 2010, účinek vemurafenibu na melanomové buňky exprimující BRAF^{V600E} se shoduje se získanými výsledky v této bakalářské práci. Obdobných buněčných efektů bylo dosaženo také v případě dalšího schváleného inhibitoru BRAF kinázy, dabrafenibu, v publikaci Choi YS a kolektiv 2022.



Obr. 10: Imunodetekce vybraných proteinů po ovlivnění buněčné linie G361 látkami 8046, 8047, 8048 a vemurafenibem po dobu 24 hodin.

4.4. Stanovení aktivity kaspázy 3 a 7

Proapoptické účinky testovaných látek **8046**, **8047**, **8048** a standardu vemurafenibu na buněčné linii G361 byly stanoveny metodou fluorimetrického stanovení aktivity kaspázy 3 a 7. Na základě tohoto experimentu bylo zjištěno, že nejvyšší relativní kaspázové aktivity dosáhl vemurafenib při koncentraci 10 μM , a to až 15x vyšší oproti kontrolní buňkám. K mírnému nárůstu aktivity došlo již v koncentraci 0,1 μM a s rostoucí koncentrací aktivita kaspáz narůstala. U testovaných látek **8046**, **8047** a **8048** bylo dosaženo nejvyšších proapoptických účinků u látky **8048**, která však zvyšovala aktivitu kaspáz pouze čtyřnásobně, zatímco látka **8046** a **8047** kaspázy téměř neaktivovala (Obr. 11). Tyto výsledky korespondují společně s daty z cytometrické analýzy, kdy pouze vemurafenib výrazněji zvyšoval počet apoptotických buněk, a také se štěpením kaspázy 7 na 17 kDa aktivní fragment, který byl detekován pouze po ovlivnění vemurafenibem, nikoliv testovaných látek. Na základě těchto výsledků lze říci, že vemurafenib se na rozdíl od testovaných látek vyznačuje proapoptickými účinky.



Obr. 11: Relativní aktivita kaspáz 3 a 7 po 24hodinovém ovlivnění linie G361 testovanými látkami 8046, 8047, 8048 a vemurafenibem. Hladina fluorescence byla měřena po 3 hodinách inkubace.

5. Závěr

Melanom představuje jednu z nejzávažnějších a nejagresivnějších forem rakoviny kůže, jejíž incidence se v posledních letech dramaticky zvyšuje. Jednou z nejčastěji mutovaných drah je právě signální dráha RAS-RAF-MEK-ERK kináz, která byla popsána jako klíčová pro bujení mnoha nádorových onemocnění. Až u poloviny pacientů trpících maligním melanomem se vyskytuje mutace genu BRAF, nejčastěji V600E, která způsobuje konstitutivní aktivaci této signální dráhy, což má za následek nekontrolovaný růst a proliferaci buněk. Inhibice RAF kináz prostřednictvím nízkomolekulárních inhibitorů, které potlačují enzymatickou aktivitu těchto kinas, patří mezi jeden z možných přístupů cílené léčby těchto maligních tumorů. V současné době byly již tři léčiva schválena FDA pro léčbu metastatických melanomů a to vemurafenib, encorafenib a dabrafenib, přičemž řada dalších je vyvíjena. U mnoha pacientů léčených prozatímními inhibitory nebo kombinací inhibitorů totiž nakonec dochází k progresi melanomu a ke vzniku rezistence na léčbu. Proto je tedy nezbytné neustále zkoumat a vyvíjet nové látky, které by byly účinnější nežli stávající. Cílem praktické části bakalářské práce bylo provést experimentální analýzu biologických účinků několika inhibitorů, které byly navrženy jako potenciální inhibitory RAF kináz, a ověřit, zda se účinek těchto látek shoduje s inhibicí RAF.

V rámci praktické části práce byly testovány celkem čtyři nové nízkomolekulární inhibitory a to látky **8046**, **8047**, **8048** a **8067**, které byly navrženy jako potencionální inhibitory RAF kináz. Účinky těchto látek byly porovnány se schváleným selektivním ATP-kompetitivním inhibitorem BRAF kinázy, vemurafenibem, který byl použit jako standard.

Všechny testované látky se na linii G361 nesoucí mutaci *BRAF* vyznačovaly mikromolárními hodnotami GI_{50} , zatímco vůči liniím MV411 a K562 s nemutovaným *BRAF* byly tyto látky podstatně méně účinné, což odpovídá účinkům vemurafenibu. Jediná látka **8067** se vyznačovala účinností i vůči linii MV411, což značí mechanismus účinku odlišný od selektivní inhibice BRAF. Na základě cytometrické analýzy bylo prokázáno, že testované látky **8046**, **8047** a **8048** jsou schopny zablokovat buněčný cyklus v G1 fázi s výrazným poklesem S-fázových buněk. Tento efekt opět korespondoval s účinky vemurafenibu, které však byly prokazatelně silnější. Na základě imunodetekce hladin či fosforylace proteinů zapojených do dráhy RAF kinázy bylo zjištěno, že tyto látky nejspíše působí odlišným mechanismem účinku, který pouze částečně koresponduje s účinky selektivního RAF inhibitoru, vemurafenibu, jehož stanovení bude vyžadovat další podrobnější studie. Vemurafenib se vyznačoval proapoptickými účinky, zatímco testované látky apoptózu zřejmě nezpůsobovaly, což bylo

potvrzeno pomocí fluorimetrického stanovení aktivity kaspáz a imunodetekcí proapoptotických markerů.

že testované inhibitory se vyznačují Všechny tři testované látky způsobují koncentračně závislý pokles S a G2/M fázových buněk, což koresponduje s buněčným účinkem vemurafenibu. Nicméně na základě detekce hladin studovaných proteinů bylo zjištěno, že tyto látky působí odlišným mechanismem účinku, který nekorresponduje s účinky selektivního RAF inhibitoru vemurafenibu jehož stanovení bude vyžadovat další podrobnější studie.

Na základě získaných výsledků z několika molekulárních a biochemických metod lze říct, že testované látky 8046, 8047 a 8048 tedy nepatří mezi selektivní inhibitory BRAF, nicméně se vyznačují relativně silnými cytotoxickými účinky specifickými vůči melanomové nádorové linii G361. Jejich buněčný účinek částečně odpovídá inhibici BRAF, nejspíše ale inhibují také některé další kinázy z kinomu, které jsou odpovědné za odlišné buněčné účinky v porovnání s vemurafenibem. Pomocí dalších studií selektivity by bylo možné stanovit, které z dalších případných kináz inhibují a bylo by možné dále podrobněji studovat jejich mechanismus účinku. Tyto látky by v budoucnu mohly také posloužit pro návrh dalších strukturních motivů pro syntézu nových účinnějších inhibitorů.

Použitá literatura

- Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, et al. 2013. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 500(7463):415–21.
- Arenberg, M, Puzanov, I. 2012. Mutace BRAF: nový přístup k cílené léčbě melanomu. *Klin Onkol* 2012; 25(5): 323–328.
- Ascierto PA, Minor D, Ribas A, et al. Phase II trial (BREAK-2) of the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436) in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 2013;31(26):3205–11.
- Balch CM, Gershenwald JE, Soong S-J, et al. 2009. AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*. 27: 6199-6206.
- Ballantyne, AD, Garnock-Jones, KP. 2013. Dabrafenib: First Global Approval. *Drugs* volume 73, pages 1367–1376.
- Bevona C, Goggins W, Quinn T, Fullerton J and Tsao. 2003. Cutaneous melanomas associated with nevi. *Arch Dermatol*. 139: 1620-1624.
- Blume-Jensen, P, Hunter, T. 2001. Oncogenic Kinase Signalling. *Nature*, pp 355–365.
- Burkhardt, DL, Sage, J. 2008. Cellular Mechanisms of Tumour Suppression by the Retinoblastoma Gene. *Nature Reviews Cancer*. pp 671–682.
- Collado, M, and Serrano, M. 2010. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat. Rev. Cancer* 10, 51–57.
- Croce, CM. 2008. Oncogenes and Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2008, pp 502–511.
- Cullen, JM, Page, R, Misdrop, W. 2002. An overview of cancer pathogenesis, diagnosis and management. In: Meuten DJ. *Tumors in domestic animals*. 4th Ed, Iowa, Iowa State Press 2002, pp. 3-44. ISBN 0-8138-2652-7.
- Davies, H, Bignell, GR, Cox, C. 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949–954.
- Davies, M.A., and Samuels, Y. 2010. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene* 29, 5545–5555.
- Delord J.P., Robert C., Nyakas M., McArthur G.A., Kudchakar R., Mahipal A., Yamada Y., Sullivan R., Arance A., Kefford R.F., et al. Phase I dose-escalation and -expansion study of the BRAF inhibitor encorafenib (LGX818) in metastatic BRAF-mutant melanoma. *Clin Cancer Res*. 2017;23:5339–5348.
- Dummer, R, Ascierto, PA, Gogas, HJ, Arance, A, Mandala, M, Gutzmer, R, Chiarion-Sileni, V. 2018. Encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib in patients with

BRAF-mutant melanoma (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.*

Dummer, R., Guggenheim, M, Arnold, AW. 2011. Updated Swiss guidelines for the treatment and follow up of cutaneous melanoma. *Swiss Med. Wkly.*, 2011,141, p. 13320.

Dušek, L, Mužík, J, Gelnarová, E. 2010. Incidence a mortalita nádorových onemocnění v České republice. 2010. *Klinická onkologie*. Brno: Medica Healthworld, 2010, roč. 23, č. 5, s. 311–324. ISSN 0862-495X.

Ferguson, FM, Gray, NS. 2018. Kinase inhibitors: the road ahead. *Nature Reviews Drug Discovery* volume 17, pages353–377.

Ferlay, J, Shin, HR, Bray, H. 2018. GLOBOCAN: Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase [online]. Dostupné z: : <http://globocan.iarc.fr>

Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB. 2010. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363(9): 809–819.

Gentilcore G., Madonna G., Mozzillo N., Ribas A., Cossu A., Palmieri G., Ascierto P.A. Effect of dabrafenib on melanoma cell lines harbouring the BRAF(V600D/R) mutations. *BMC Cancer*. 2013;13:17.

Greenman C, Stephens P, Smith R. 2007. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 2007; 446(7132): 153–158

Haferkamp, S, Borst, A, Adam, C, Becker, TM, Motschenbacher, S, Windhövel, S, Hufnagel, AL, Houben, R, Meierjohann, S. 2013. Vemurafenib induces senescence features in melanoma cells. *J Invest Dermatol*.

Hanahan, D, Weinberg, RA. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 144:646-674.

Heisterkamp, N.; Stam, K.; Groffen, J.; De Klein, A.; Grosveld, G. 1985. Structural Organization of the Bcr Gene and Its Role in the Ph' Translocation. *Nature* 1985, 315 (6022), 758–761.

Heneberg, P. 2011. Pokroky v klinické léčbě zhoubného melanomu: inhibice kinázy B-RAF. *Klinická Onkologie*. 24(4): 256-264.

Heneberg, P. 2012. Dabrafenib: nový inhibitor hyperaktivní kinázy B-RAF. *Klinická Onkologie*. 25(5): 333–339.

Hofmanová, J. 2013. Molekulární základy nádorového onemocnění [online]. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/03_molekul.html

Holderfield M, Merritt H, Chan J, et al. RAF inhibitors active the MAPK pathway by relieving inhibitory autophosphorylation. *Cell*. 2013;23(5):594–602.

Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, Kadel S, Moll I, Nagore E, Hemminki K, et al. 2013. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science*. 339(6122):959–961.

- Chaitanya, GV, Steven, AJ, Babu, PP. 2010. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell death proteases in neurodegeneration. *Cell communication and signaling*, 8, 3
- Chial, H. 2008. Tumor Suppressor (TS) Genes and the Two-Hit Hypothesis. *Nat. Educ.* 1, 1–5.
- Chiba K, Lorbeer FK, Shain AH, McSwiggen DT, Schruf E, Oh A, et al. 2017. Mutations in the promoter of the telomerase gene TERT contribute to tumorigenesis by a two-step mechanism. *Science*. 357:1416–20.
- Choi, YS, Kwon, H, You, MH, Kim, TY, Kim, WB, Shong, YK. 2022. Effects of dabrafenib and erlotinib combination treatment on anaplastic thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer*. 29(6):307-319.
- Ives, NJ, Stowe, RL, Lorigan, P. 2007. Chemotherapy compared with biochemotherapy for the treatment of metastatic melanoma: a meta analysis of 18 trials involving 2,621 patients. *J. Clin. Oncol.*, 2007, 25, p. 5426–5434.
- King AJ, Arnone MR, Bleam MR. 2013. Dabrafenib; preclinical characterization, increased efficacy when combined with trametinib, while BRAF/MEK tool combination reduced skin lesions. *PLoS One* 2013; 8:675-83.
- Knudson, AG. 2002. Cancer genetics. *American Journal of Medical Genetics*. 111(1): 96–102.
- Kodet, O, Lacina, L. 2018. Základy molekulární biologie nádorů pro praxi. *Čes-slov Derm*, 92(6): 245-261
- Krajsová, I Melanom: [klasifikace, diagnostika, terapie, prevence]. Praha: Maxdorf, c2006, 332 s. Jessenius. ISBN: 80-7345-096.
- Krajsová, I, Bauer, J. Melanom: imunoterapie a cílená léčba. Praha: Maxdorf, 2017, 381 s. Jessenius. ISBN 978-80-7345-515-6.
- Krajsová, I. 2014. Dabrafenib v léčbě metastazujícího melanomu. *Remedia*. 3(1): 215-219.
- Krajsová, I. Diagnostika melanomu a současná doporučení pro léčbu a sledování. *Čes-slov Derm*, 93, 2018, No. 1, p. 4-16
- Krajsová, I. Maligní kožní nádory: průvodce diagnostikou a léčbou nemelanomových kožních nádorů a melanomů. 1 vydání, Praha: Mladá fronta, 2017, 288 s. Edice postgraduální medicíny. ISBN 978-80-204-4186-7.
- Lee, JT, Li, L, Brafford, PA. 2010. PLX4032, a potent inhibitor of the B-Raf V600E oncogene, selectively inhibits V600E-positive melanomas. *Pigment Cell Melanoma Res*, 23, pp. 820-827.
- Linkos Onkologická prevence. Dědičnost zhoubných nádorů. Foretová L. 2015. [online]. Dostupné z <https://www.linkos.cz/onkologicka-prevence/geneticka-rizika-vzniku-nadoru/>
- Lo JA, Fisher DE. The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. *Science* 2014;346(6212):945–9

- Long, GV, Hauschild, A, Santinami, M, Atkinson, V, Mandalà, M, Chiarion-Sileni, V, Larkin, J. 2011. Combination therapy with vemurafenib (PLX4032/RG7204) and metformin in melanoma cell lines with distinct driver mutations. *J Transl Med* 9, 76.
- Long, GV, Menzies, AM, Nagrial, AM. 2011. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 29(10): 1239–1246.
- Mandalà M, Voit C. 2013. Targeting BRAF in melanoma: biological and clinical challenges. *Crit Rev Oncol Hematol* 87(3):239–255.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912–1934.
- Masopust, J. Patobiochemie buňky. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, 2003. 344 s. ISBN 80-239-1011-6.
- Mehnert JM, Kluger HM. 2012. Driver mutations in melanoma: lessons learned from bench-to-bedside studies. *Curr Oncol Rep.* 14(5):449–457.
- NCI. 2017. Cancer Stat Facts: Melanoma of the Skin [online]. Dostupné z: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>
- NCI. 2022. Cancer Stat Facts: Melanoma of the Skin [online]. Dostupné z: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>
- Paluncic J., Kovacevic Z., Jansson P.J., Kalinowski D., Merlot A.M., Huang M.L.-H., Lok H.C., Sahni S., Lane D.J.R., Richardson D.R. Roads to Melanoma: Key Pathways and Emerging Players in Melanoma Progression and Oncogenic Signaling. *Biochim. Et Biophys. Acta BBA-Mol. Cell Res.* 2016;1863:770–784.
- Peh, J, Fan, TM, Wycislo, KL, Roth, HS, Hergenrother, PJ. 2016. The Combination of Vemurafenib and Procaspace-3 Activation Is Synergistic in Mutant BRAF Melanomas. *Mol Cancer Ther.*15(8):1859-69.
- Petrella, TM, Fletcher, GG, Knight, G, McWhirter, E, Rajagopal, S, Song, X, Baetz, TD. 2020. Systemic adjuvant therapy for adult patients at high risk for recurrent cutaneous or mucosal melanoma: an Ontario Health (Cancer Care Ontario) clinical practice guideline. *Curr Oncol.*
- Prahallad A, Sun C, Huang S et al. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature* 2012; 483(7387): 100–103.
- Proietti, I.; Skroza, N.; Bernardini, N.; Tolino, E.; Balduzzi, V.; Marchesiello, A.; Michelini, S.; Volpe, S.; Mambrin, A.; Mangino, G.; Romeo, G.; Maddalena, P.; Rees, C.; Potenza, C. Mechanisms of Acquired BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma: A Systematic Review. *Cancers* **2020** , *12* , 2801.
- Raman, M. 2007. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene.* 2007, 26(22) s. 3100-3112.
- Rebecca VW, Sondak VK, KSMS. A brief history of melanoma : from mummies to mutations. *Melanoma Res.* 2013;22(2):114–122.

- Reese ML, Zeiner GM, Saeij JP, Boothroyd JC, Boyle JP. 2011. Polymorphic family of injected pseudokinases is paramount in toxoplasma virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:9625–9630.
- Ribas A, Kim KB, Schuchter LM et al. BRIM-2: an open label multicenter phase 2 study of vemurafenib in previously treated patients with BRAF V600E mutation-positive metastatic melanoma. Abstract 8509. *J Clin Oncol* 2011; 29: 15S.
- Robert C, Karaszewska B, Schachter J, et al. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med* 2015; 372:30–39.
- Roh, MR, Kim, JM, Lee, SH, Jang, HS, Park, KH. 2015. Low-concentration vemurafenib induces the proliferation and invasion of human HaCaT keratinocytes through mitogen-activated protein kinase pathway activation. *J Dermatol*, 42: 881–888.
- Rommel, C.; Clarke, B.A.; Zimmermann, S.; Nuñez, L.; Rossman, R.; Reid, K.; Moelling, K.; Yancopoulos, G.D.; Glass, D.J. Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science* 1999, 286, 1738–1741.
- Roskoski, R. 2010. RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 399 (3): 313–317.
- Sakkiah, S., Cao, G., Gupta, S. a Lee, K. (2017). Overview of the Structure and Function of Protein Kinases. *Current Enzyme Inhibition*, 13(2).
- Sale, M.J.; Balmanno, K.; Saxena, J.; Ozono, E.; Wojdyla, K.; McIntyre, R.E.; Gilley, R.; Woroniuk, A.; Howarth, K.D.; Hughes, G.; et al. MEK1/2 inhibitor withdrawal reverses acquired resistance driven by BRAF(V600E) amplification whereas KRAS(G13D) amplification promotes EMT-chemoresistance. *Nat. Commun.* 2019, 10, 2030.
- Sanchez, JN, To Wang, MD, Cohen, MS. 2018. BRAF and MEK Inhibitors: Use and Resistance in BRAF-Mutated Cancers. *Drugs*. 2018 Apr; 78(5): 549–566.
- Scolyer RA, Long GV, Thompson JF. 2011. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. *Mol Oncol*. 5(2):124–136.
- Sensi M, Nicolini G, (2006) 25(24):3357–64.
- Sera F, Gandini S, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P and Melchi CF: Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer* 41: 45-60, 2015.
- Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer* (2016) 16(6):345–58.
- Shaw, AP, Kornev, AP, JU, K. 2015. Kinases and Pseudokinases: Lessons from RAF. *ASM Journals. Molecular and Cellular Biology*. Vol. 34, No. 9.
- Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*. 2002 Mar;9(3):459-70.
- Shirley, M. 2018. Encorafenib and Binimetinib: First Global Approvals. *Drugs* volume 78, pages1277–1284 .

- Stern RS: The risk of melanoma in association with long-term exposure to PUVA. *J Am Acad Dermatol* 44: 755-761, 2001.
- Stucci, S., Palmirota, R., Passareli, A. 2017. Immune-related adverse events during anticancer immunotherapy: pathogenesis and management (review). *Oncology Letters*, 2017, 14, p. 5671–5680.
- Tap, WD, Gong, KW, Dering, J. 2010. Pharmacodynamic characterization of the efficacy signals due to selective BRAF inhibition with PLX4032 in malignant melanoma. *Neoplasia*, 12, pp. 637-649.
- Thomas, L, Puig, S. Dermoscopy, digital dermoscopy and other digital tools in the early detection of melanoma and follow up of high risk cancer patients. *Acta Derm. Venereol.*, 2017, Suppl 218, p. 14–21.
- Tran K.B., Kolekar S., Javed A., Jaynes P., Shih J.-H., Wang Q., Flanagan J.U., Rewcastle G.W., Baguley B.C., Shepherd P.R. Diverse Mechanisms Activate the PI 3-Kinase/MTOR Pathway in Melanomas: Implications for the Use of PI 3-Kinase Inhibitors to Overcome Resistance to Inhibitors of BRAF and MEK. *BMC Cancer*. 2021;21:136.
- Uhříková, I. 2016. Patofyziologie a biologie nádorového růstu [online]. Dostupné z: <https://www.cavlmz.cz/sekce/onkologicka-sekce/obecna-veterinarni-onkologie/patofyziologie-vzniku-nadorovych-onemocneni/>
- Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Panayotou G, Waterfield MD. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci*. 1997 Jul;22(7):267-72.
- Vogelstein B, Kinzler KW. The Path to Cancer –Three Strikes and You’re Out. *N Engl J Med* (2015) 373(20):1895–8.
- Wan P. T., Garnett J., Roe M., Lee S., Niculescu-Duvaz D., Good M., Jones M., Marshall J., Springer J., Barford D., Marais R. 2004. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116: 855-867.
- Wertz, I.E., and Dixit, V.M. (2010). Regulation of death receptor signaling by the ubiquitin system. *Cell Death Differ*. 17, 14–24.
- Wolchok JD, Thomas L, Bondarenko IN. 2011. A phase 3 randomized study of ipilimumab (IPI) plus dacarbazine (DTIC) versus DTIC alone as first-line treatment in patients with unresectable stage III or IV melanoma. *J Clin Oncol*. 29:LBA5-LBA5.
- Yang H., Higgins B., Kolinsky K., Packman K., Go Z., Iyer R., Kolis S., Zhao S., Lee R., Grippo J.F., et al. RG7204 (PLX4032), a selective BRAFV600E inhibitor, displays potent antitumor activity in preclinical melanoma models. *Cancer Res*. 2010;70:5518–5527.
- Yang W, Chen Y, Zhou X, Gu Y, Qian W, Zhang F, Han W, Lu T, Tang W. Design, synthesis and biological evaluation of bis-aryl ureas and amides based on 2-amino-3-purinylpyridine scaffold as DFG-out B-Raf kinase inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2015 Jan 7;89:581-96.
- Zhao, L, Juo, K. 2022. Discovery of Raf Family Is a Milestone in Deciphering the Ras-Mediated Intracellular Signaling Pathway. *Int. J. Mol. Sci*. 2022, 23, 5158.