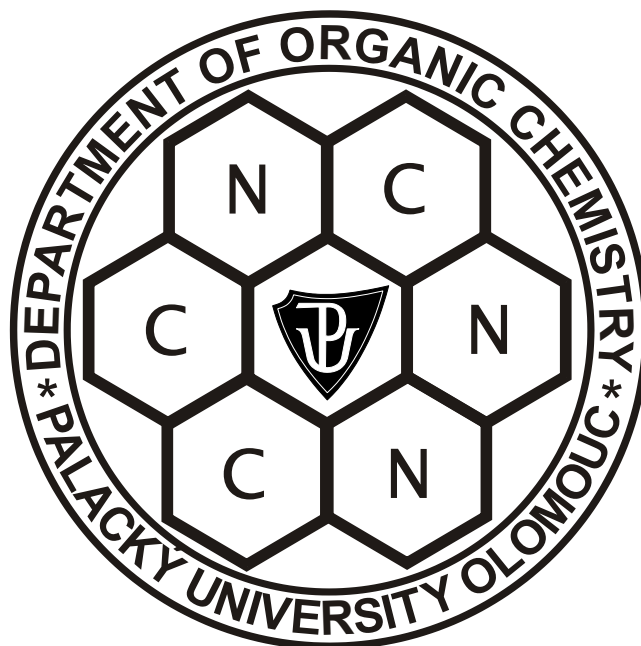


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Katedra organické chemie



Hodnocení mitochondriálních funkcí na izolovaných mitochondriích po treatmentu kyselinou betulinovou a jejími deriváty

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Veronika Slabá
Studijní program:	B1407 Chemie
Studijní obor:	Bioorganická chemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	MUDr. Petr Džubák, Ph.D.
Termín odevzdání:	29.4.2011

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Olomouci, 27. 4. 2011

.....

Podpis

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat především vedoucímu mé bakalářské práce MUDr. Petru Džubákovi, Ph.D. za odborné vedení, předané zkušenosti, připomínky a cenné rady, které mi při tvorbě práce poskytl. Dále mé díky patří Mgr. Ivovi Frydrychovi za ochotu, vstřícnost a trpělivost a také všem zaměstnancům Laboratoře experimentální medicíny při Ústavu Molekulární a Translační Medicíny, Lékařské Fakulty Univerzity Palackého a Fakultní Nemocnice v Olomouci za pomoc v laboratoři. Tato práce by nevznikla bez podpory rodiny a přítele, kterým patří také mé poděkování.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení	Veronika Slabá
Název práce	Hodnocení mitochondriálních funkcí na izolovaných mitochondriích po treatmentu kyselinou betulínovou a jejími deriváty
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř experimentální medicíny, Ústav Molekulární a Translační Medicíny LF UP a FN Olomouc
Vedoucí práce	MUDr. Petr Džubák, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2011
Abstrakt	<p>Počet pacientů, kterým bylo diagnostikováno nádorové onemocnění, se neustále zvyšuje. Z toho důvodu je vyvíjeno úsilí hledat nová léčiva vykazující protinádorovou aktivitu a identifikovat jejich molekulární cíle. Předmětem této práce je monitorování účinku derivátů kyseliny betulínové na izolovaných mitochondriích a sledování vlivu na jejich integritu a funkční stav. Kyselina betulínová patří mezi přírodní triterpeny, u kterých je prokázána vysoká cytotoxická aktivita vůči nádorovým buňkám. Rada pracovišť se tedy snaží o syntézu biologicky lépe dostupných a účinnějších derivátů s nižšími nežádoucími účinky. V naší práci jsme testovali deriváty kyseliny betulínové, které byly připraveny RNDr. Šarkem na katedře Organické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého. Tyto deriváty vykazovaly v našich předchozích testech protinádorovou aktivitu a měly také vliv na buněčný cyklus.</p>
Klíčová slova	Mitochondrie, membránový potenciál, integrita mitochondriální membrány, apoptosa, betulínová kyselina
Počet stran	70
Počet příloh	0
Jazyk	český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname	Veronika Slabá
Title	Functional evaluation of isolated mitochondria following the betulinic acid derivatives treatment
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and dentistry, Palacký University and Faculty Hospital in Olomouc
Supervisor	MUDr. Petr Džubák, Ph.D.
The year of presentation	2011
Abstrakt	<p>The number of patients who were diagnosed with cancer disease is still increasing. For this reason new potentially antitumour derivatives should be tested and analysed to identify their molecular targets. The aim of this work is to monitor the effect of derivatives of betulinic acid on isolated mitochondria and monitor their effect on integrity and functional status. Betulinic acid is natural triterpenoid compound with described high cytotoxic activity against tumor cells. Due to its poor solubility and bioavailability the different research teams are trying to synthesize more soluble and effective compounds. In our work we tested derivatives of betulinic acid which have been synthesized by Dr. Šarkem at Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc. These derivatives showed antitumour activity and effect on cell cycle in our previous tests.</p>
Keywords	Mitochondria, membrane potential, integrity of mitochondrial membrane, apoptosis, betulinic acid
Number of pages	70
Number of appendices	0
Language	Czech

Seznam zkratek

A498	buněčná linie karcinomu ledviny
AIF	apoptosu indukující faktor
Akt	protein kinasa B
Apaf-1	apoptosu aktivující faktor
ATP	adenosintrifosfát
Bad	člen rodiny Bcl-2
Bak	člen rodiny Bcl-2
Bax	člen rodiny Bcl-2
Bcl-2	protoonkogen (B buňky leukemie/lymfoma 2)
Bcl-B	člen rodiny Bcl-2
Bcl-w	člen rodiny Bcl-2
Bcl-XL	člen rodiny Bcl-2
BetA	kyselina betulínová
Bfl1/A-1	člen rodiny Bcl-2
BH1-4	členy rodiny Bcl-2 (homologní domény)
Bid	člen rodiny Bcl-2
Bim	člen rodiny Bcl-2
Bok	člen rodiny Bcl-2
BSA	hovězí sérový albumin
CAD	kaspasou aktivovaná deoxyribonukleasa
cyt c	cytochrom c
cyt c ox	cytochrom c oxidasa
CRL1420	buněčná linie karcinomu pankreatu
CTL/NK	cytotoxické T lymfocyty/přirozené zabíječe
CV-1	nenádorové fibroblasty
CX-1	buněčná linie karcinomu tlustého střeva
DDM	n-dodecyl β -D-maltosid
DF45/ICAD	podjednotka DNA fragmentačního faktoru (inhibitor Dnasy)
DISC	komplex signalizující indukci apoptosy
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNA-PK	DNA dependentní protein kinasa
DNP	2,4-dinitrofenol
DTNB	kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová (Ellmanovo činidlo)
DTT	dithiotreitol
DU145	buněčná linie karcinomu prostaty
EGTA	kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová
EJ	buněčná linie karcinomu močového měchýře

EPD	enzym potenciován desenzibilizací
FCCP	trifluorokarbonylkyanid fenylylhydrazin
FAD	flavinadenindinukleotid
GTP	guanosintrifosfát
HL-60	buněčná nádorová linie lidské promyelocytární leukémie
HEPES	kyselina N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonová
IAP	inhibitory apoptotických proteinů
IKKB	člen rodiny kináz IκB
IκB (IKK)	inhibitor NF-κB
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidkarbokyanin jodid
LNCaP	buněčná linie karcinomu prostaty
LOX	buněčná nádorová linie melanomu
MCF-7	buněčná linie karcinomu prsu
Mcl-1	člen rodiny Bcl-2
MEF	buněčná linie odvozená z myších embryonálních fibroblastů
MOPS	kyselina 3-(N-morfolino)propan sulfonová
MPP	mitochondriální procesující proteasa
MPTP	mitochondriální permeabilní pór
mRNA	mediátorová RNA
mtDNA	mitochondriální deoxyribonukleová kyselina
mTOR	Ser/Thr kinasa regulující translaci
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
nDNA	jaderná deoxyribonukleová kyselina
NF-κB	nukleární faktor kappa B
Noxa	člen rodiny Bcl-2
NUMA	jaderný protein mitotického aparátu
PAM	translokasa presekvence proteinu
PC-3	buněčná linie karcinomu prostaty
PPAR γ	receptory aktivované peroxisomovým proliferátorem
Puma	člen rodiny Bcl-2
RNA	řibonukleová kyselina
RPM	počet otáček za minutu
ROS	reaktivní formy kyslíku
RXR	retinoidní X receptor
S13	3-(terc-butyl)-5-chloro-N-(2-chloro-4-nitrofenyl)-2-hydroxybenzamid
SDS	dodecylsíran sodný
SH-SY5Y	buněčná nádorová linie neuroblastomu
Smac/DIABLO	proapoptotický faktor
TIM	transportní protein vnitřní mitochondriální membrány

TNB	5-thio-2-nitrobenzoové kyseliny
TNF- α	nádorový nekrotický faktor α
TOM	transportní protein vnější mitochondriální membrány
topo II	topoisomerasa II
Triton X-100	polyoxyethylenový detergent s alkylfenolovými skupinami
TTFB	4,5,6,7-tetrachloro-2-trifluoromethylbenzimidazol

Obsah

Cíle práce	11
1. Teoretická část	12
1.1 Mitochondrie	13
1.1.1 Evoluční původ mitochondrií	13
1.1.2 Struktura mitochondrií	14
1.1.3 Transport mitochondriálních proteinů	15
1.1.4 Metabolismus mitochondrií	16
1.1.4.1 Krebsův cyklus	16
1.1.4.2 Oxidativní fosforylace a membránový potenciál	17
1.1.4.2.1 ROS	19
1.1.4.2.2 Tvorba ROS	20
1.1.4.2.3 Rozpojovače dýchacího řetězce	23
1.1.4.2.3.1 Využití vlastnosti rozpojovačů jako potenciálních léčiv	25
1.2 Buněčná smrt	27
1.2.1 Nekrosa	27
1.2.2 Anoikis	27
1.2.3 Apoptosa	27
1.2.3.1 Mechanismus apoptosy	28
1.2.3.2 Vnitřní mitochondriální dráha	29
1.2.3.2.1 Regulace mitochondriální dráhy	30
1.2.3.2.2 Inhibitory Bcl-2	31
1.2.4 Dráha granzymu B	34
1.2.4.1 Substráty granzymu B	34
1.3 Triterpeny	35
1.3.1 Betulinová kyselina a betulin	36
1.3.2 Indukce apoptosy BetA	37
1.3.3 Regulace apoptosy indukované BetA	37
1.3.4 BetA a změna aktivity NF- κ B	38

1.3.5 Syntetické triterpeny	38
2. Experimentální část	40
2.1 Chemikálie, roztoky, spotřební materiál, přístrojové vybavení	42
2.2 Příprava derivátů BetA	44
2.3 Stanovení celkových proteinů – Bradfordova metoda	44
2.3.1 Postup	45
2.4 Izolace mitochondrií	45
2.4.1 Postup	45
2.5 Membránový potenciál	46
2.5.1 Postup	47
2.6 Integrita vnější mitochondriální membrány	48
2.6.1 Postup	49
2.7 Integrita vnitřní mitochondriální membrány	50
2.7.1 Postup	51
2.8 Výsledky	52
2.8.1 Hodnocení mitochondriálního potenciálu	52
2.8.2 Integrita vnější mitochondriální membrány	55
2.8.3 Integrita vnitřní mitochondriální membrány	59
2.9 Diskuze	60
3. Závěr	62
Seznam literatury	63

Cíle práce:

- 1) Zavedení metody izolace mitochondrií pro jejich použití k dalším funkčním testům.
- 2) Funkční testy na izolovaných mitochondriích - hodnocení integrity vnitřní/vnější mitochondriální membrány a funkčního stavu mitochondrií.

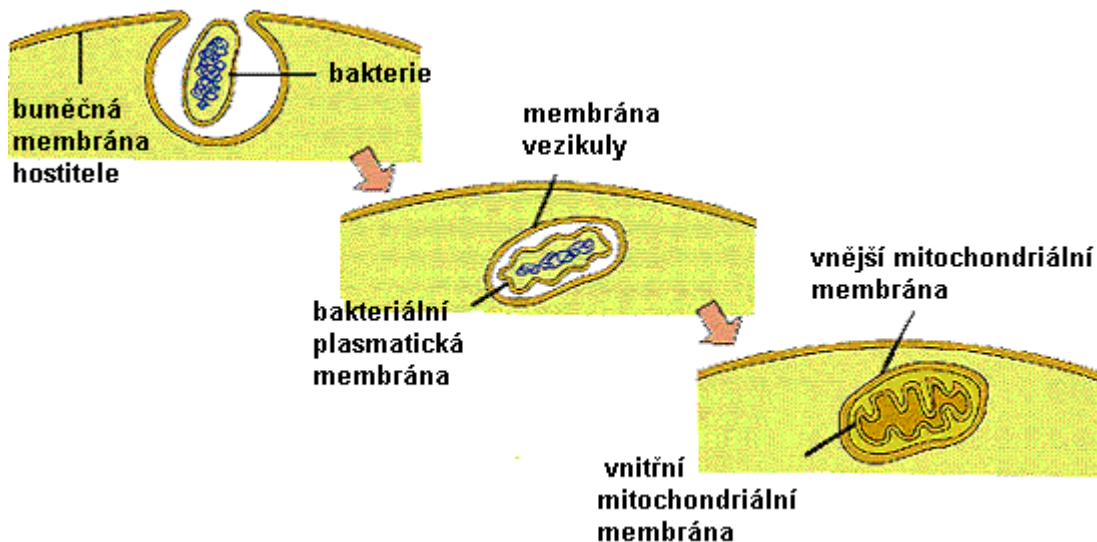
1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Mitochondrie

Mitochondrie patří k nejnápadnějším organelám v cytoplasmě a jsou přítomny prakticky ve všech eukaryotních buňkách. Jsou místem oxidačního metabolismu eukaryot. Obsahují enzymy podílející se na těchto pochodech, tj. pyruvátdehydrogenasu, enzymy citrátového cyklu, enzymy katalyzující oxidaci mastných kyselin a také enzymy a redoxní proteiny podílející se na transportu elektronů a oxidační fosforylaci. Z těchto důvodů se mitochondrie přirovnávají k buněčné elektrárně (Alberts, 2005; Voet, 1995). V posledních letech je zřejmé, že mají také důležitou roli v buněčné smrti. Tuto úlohu mitochondrií nelze považovat jako „ztrátu funkce“ v důsledku energetického deficitu, ale chápeme ji jako aktivní proces, který je vysoce regulován. Díky tomu se mitochondrie stávají atraktivním cílem pro léčbu rakoviny (Bernardi, 1999; Gogvadze, 2009).

1.1.1 Evoluční původ mitochondrií

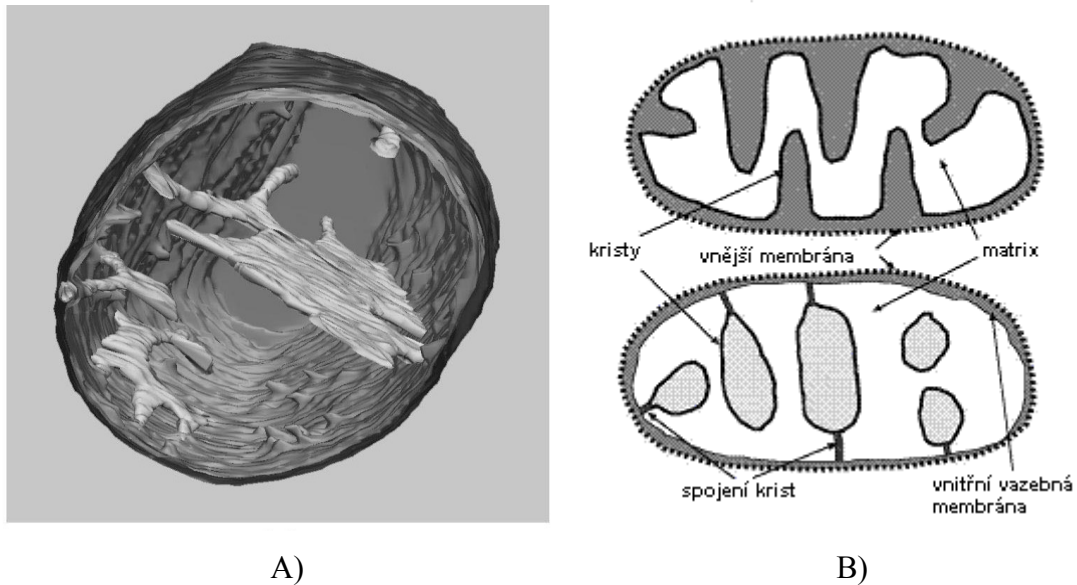
V mnoha ohledech se mitochondrie podobají bakteriím, především způsobem, jakým se dělí. Předpokládá se, že mitochondrie vznikly endosymbiózou mezi anaerobní primitivní eukaryotní buňkou nebo archebakterií a aerobní α -proteobakterií (Obr. 1). Endosymbiotický původ mitochondrií se odráží i v jejich struktuře. Mitochondrie jsou obaleny dvojitou membránou, mají vlastní DNA a RNA a proteosyntetický aparát (Kříváková, 2005; Alberts, 2005). V důsledku endosymbiosy došlo ke ztrátě přebytečných genů a k přenosu genů z prokaryot do jádra eukarot. Dnešní mitochondrie již nejsou autonomní, ale jsou zcela závislé na svém hostiteli. Mitochondriální genom zůstal velmi stabilní a to i s ohledem na genový obsah a uspořádání genů do kruhové mtDNA. Nicméně došlo ke změně sekvencí jednotlivých genů kódujících proteiny. Tyto proteiny jsou obsaženy v komplexech vnitřní mitochondriální membrány a musí interagovat s proteiny, které jsou kódovány nDNA. Výsledkem toho je, že mitochondrie jednoho druhu nezůstanou funkční s jádrem jiného druhu (Scheffler, 2001).



Obr. 1: Původ mitochondrií (upraveno dle *IUPUI Department of biology*).

1.1.2 Struktura mitochondrií

Každá lidská buňka obsahuje 5-2000 mitochondrií. Jejich tvar je buď kulovitý nebo oválný. Mitochondrie kulovitého tvaru (např. z jater) mají v průměru 0,5-5 μm . Mitochondrie oválného tvaru mají v průměru 0,2 μm a až 20 μm na délku (*Perkins, 2000*). Mají dvě membrány, vnitřní a vnější, které hrají důležitou roli v mitochondriálních dějích. Vnější membrána odděluje organelu od cytoplasmy a vnitřní membrána se vychlipuje dovnitř mitochondrií a odděluje velký vnitřní prostor zvaný matrix od užšího mezimembránového prostoru. Obě membrány se liší svou strukturou, chemickým složením a vlastnostmi. Vnější membrána obsahuje mnoho molekul transportního proteinu zvaného porin, který tvoří vodné kanály dvojnou vrstvou lipidů, a proto je membrána propustná pro ionty a všechny molekuly až do 5000 daltonů a není propustná pro bílkoviny. To činí mezimembránový prostor vzhledem k malým molekulám, které obsahuje, chemicky ekvivalentní cytosolu. Naopak vnitřní membrána obsahuje poměrně vysokou koncentraci kardiolipinu a nižší obsah cholesterolu a proniká jí jen O_2 , CO_2 a lipofilní látky (*Alberts, 2005; Křiváková, 2005*). Vnitřní membrána, která obklopuje na proteiny bohatou matrix, má větší povrch než vnější membrána, a proto se vnitřní membrána vchlipuje do středu mitochondrie a vytváří tzv. kristy (*Mannella, 2006*). Kristy tvoří cisterny nebo váčky, které se přes úzká tubulární spojení připojují k vnitřní membráně, tzv. vnitřní vazebné membráně (Obr. 2) (*Frey, 2000*).



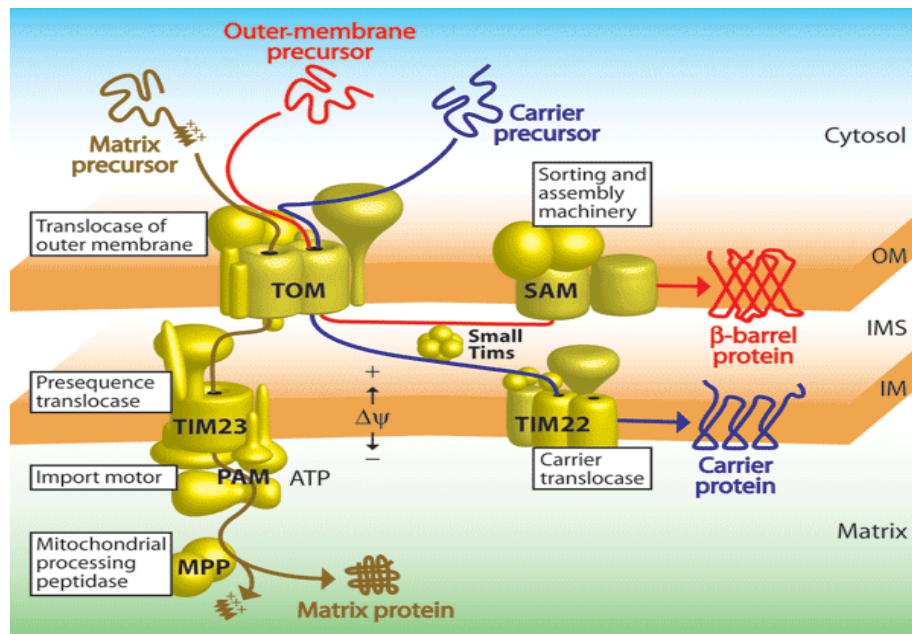
Obr. 2: Struktura mitochondrií část - elektronová tomografie (A); srovnání starého (horní) a nového (dolní) modelu mitochondrie (B) (upraveno dle *Scheffler, 2001*).

1.1.3 Transport mitochondriálních proteinů

Mitochondrie obsahují 800 (kvasinky) až 1500 (člověk) různých proteinů. Ačkoliv mitochondrie mají kompletní proteosyntetický aparát, pouze ~1% mitochondriálních proteinů je kódováno a syntetizováno v maticí.

Velká většina proteinů je kodována jadernými geny a jsou syntetizovány jako prekurzory proteinů na ribosomech v cytosolu. Tyto prekurzory obsahují signální molekulu, většinou N-konec, která je rozpoznána translokasami vnější mitochondriální membrány – TOM (translocase of the outer membrane) komplexem. TOM komplex se skládá ze tří receptorů (TOM20, TOM22 a TOM70), z proteinu vytvářející kanál TOM40 a z malých TOM proteinů (TOM5, TOM6 a TOM7). N-konec interaguje s receptorem TOM komplexu a pre-protein je transportován skrz kanál TOM komplexu jako lineární polypeptidový řetězec na presekvenční translokasu vnitřní mitochondriální membrány - TIM23 (translocase of the inner membrane) komplex. Konečné přenesení proteinu do maticí je vedeno přes PAM (presequence translocase-associated motor) a v maticí je pomocí MPP (mitochondrial processing peptidase) presekvence odštěpena (Obr. 3) (*Pfanner, 2004*). Prekurzory hydrofobních proteinů vnitřní mitochondriální membrány také využívají TOM komplex k přenesení přes vnější membránu.

Preproteiny jsou přeneseny mezimembránovým prostorem pomocí malých TIM komplexů a nakonec interagují s komplexem TIM22 a jsou vloženy do vnitřní membrány. Poslední krok této integrace je závislý na membránovém potenciálu (*Mokranjact, 2005*).



Obr. 3: Transport proteinů do mitochondrií (*Pfanner, 2004*).

Proteiny Bcl-2 rodiny jsou důležitými regulátory apoptosy. Bcl-2 proteiny patří mezi membránové proteiny, které se svým C-koncem váží na receptor TOM20 TOM komplexu, čímž dojde k zabudování těchto proteinů do vnější mitochondriální membrány. Rozpoznání receptoru TOM20 je závislé na dvou pozitivně nabitých zbytcích lysinu v bezprostřední blízkosti C-konce hydrofobní membránové kotvy. Oproti N-koncům jiných mitochondriálních preproteínů, C-konce Bcl-2 proteinů neinteragují s receptorem TOM22 (*Motz, 2002*).

1.1.4 Metabolismus mitochondrií

1.1.4.1 Krebsův cyklus

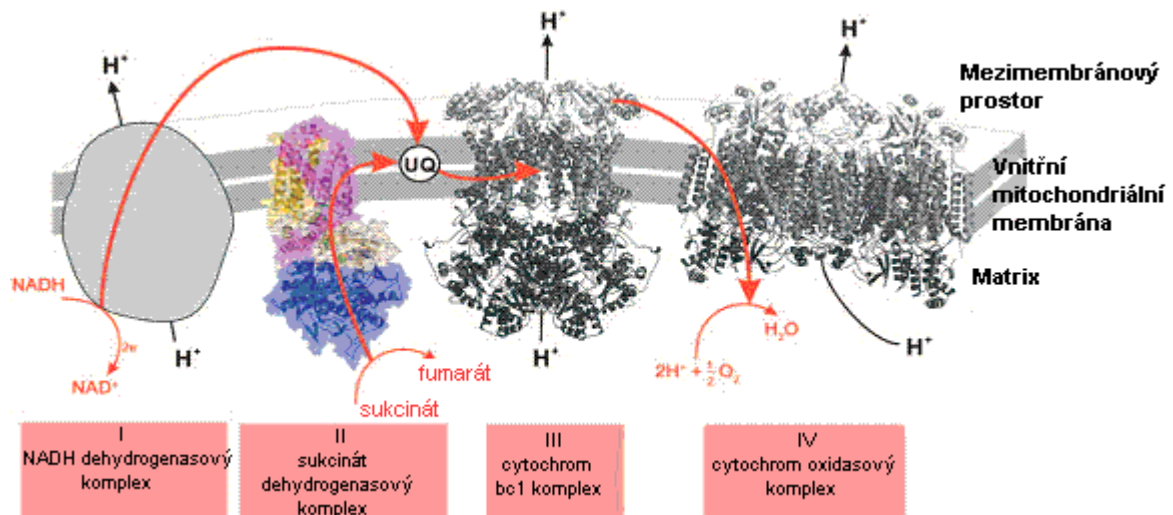
Mitochondrie využívají jako palivo jak pyruvát, tak mastné kyseliny. Pyruvát pochází z glukosy nebo z jiných cukrů a mastné kyseliny pocházejí z tuků. Molekuly obou těchto paliv jsou přenášeny přes vnitřní mitochondriální membránu a poté jsou převedeny na acetyl-CoA enzymy, které se nacházejí v mitochondriální matrix. Kromě

pyruvátu a mastných kyselin přecházejí z cytosolu do mitochondrií také některé aminokyseliny, které se zde mění na acetyl-CoA nebo na některý z meziproduktů citrátového cyklu. Acetylová skupina v molekule acetyl-CoA se neoxiduje přímo. Místo toho se přenáší z acetyl-CoA na větší čtyřuhlíkovou molekulu oxaloacetátu za vzniku šestiuhlíkaté karboxylové kyseliny – kyseliny citrónové, která je postupně oxidována a energie z této oxidace je využita k produkci vysokoenergetických přenašečových molekul – 3 NADH, FADH₂ a GTP. Cyklus generuje vysokoenergetické elektrony nesené aktivovanými nosičovými molekulami NADH a FADH₂ a produkuje CO₂, který se z buňky uvolňuje jako vedlejší produkt. Vysokoenergetické elektrony jsou potom přenášeny do vnitřní mitochondriální membrány, kde vstupují do elektrontransportního řetězce (*Alberts, 2005*).

1.1.4.2 Oxidativní fosforylace a membránový potenciál

Mitochondriální DNA kóduje 13 proteinů, které jsou umístěny ve vnitřní mitochondriální membráně, kde jsou součástí metabolické dráhy tzv. oxidativní fosforylace. Oxidativní fosforylace je proces, jenž spojuje přenos elektronů s buněčným dýcháním a syntézou ATP. Produkuje většinu buněčné energie, ale také se účastní na tvorbě radikálů a na apoptose (*Hüttemann, 2007*). Přenos elektronů začíná odebráním hydridového iontu (H⁻) z NADH a jeho převedením na proton a dva vysokoenergetické elektrony: $H^- \rightarrow H^+ + 2e^-$, tato reakce je katalyzována prvním z dýchacích enzymových komplexů – NADH-dehydrogenasou, mezi jehož flavinovou skupinou vázanou k proteinovému komplexu a sadou center obsahujících železo a síru přecházejí elektrony. Poslední Fe-S-centrum v dehydrogenase předává své elektrony ubichinonu, který je odevzdává do komplexu cytochromů b-c₁. Dalším zdrojem elektronů pro ubichinon je komplex sukcinát dehydrogenasa. Sukcinát dehydrogenasa katalyzuje oxidaci sukcinátu na fumarát v matrix. Tato oxidace je spojena s redukcí ubichinonu na ubichinol ve vnitřní mitochondriální membráně. Elektrony jsou transportovány ze sukcinátu na ubichinon skrz prostetické skupiny – flavin adenin dinukleotid (FAD); [2Fe-2S], [4Fe-4S] a [3Fe-4S] klastry a hem. Cytochrom c obsahující jednu hemovou skupinu, jejíž atom železa se při příjmu elektronu mění z železitého iontu Fe³⁺ na železnatý Fe²⁺, přenáší elektrony mezi komplexem cytochromů b-c₁ a komplexem cytochromoxidasy. Cytochromoxidasa předává získané elektrony kyslíku. Ke každé molekule O₂ se přidávají čtyři elektrony z cytochromu c a čtyři protony z vodného

prostředí v reakci $4e^- + 4H^+ + O_2 \rightarrow 2 H_2O$ (Obr. 4). Cytochromoxidasa obsahuje ve svém aktivním místě komplex hemového atomu železa hned vedle pevně vázaného atomu mědi. Právě zde téměř všechen kyslík slouží jako konečný příjemce elektronů (Alberts, 2005; Sun, 2005).



Obr. 4: Dýchací řetězec (upraveno dle Sun, 2005).

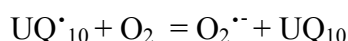
Jakmile však O₂ přijme jeden elektron, vytváří se superoxidový radikál O₂⁻; tento radikál je nebezpečně reaktivní a snaží se přijmout další tři elektrony. Jednou z úloh cytochromoxidasy je pevně držet kyslíkové molekuly, dokud nejsou k dispozici všechny čtyři elektrony potřebné pro její převedení na dvě molekuly H₂O, a tak chránit molekuly v buňce před náhodným útokem superoxidových radikálů (Cadenas, 2000; Alberts, 2005).

Každý z enzymových dýchacích komplexů spřahuje energii uvolněnou při přenosu elektronu přes něj s příjmem protonu z vody v mitochondriální matrix; potom následuje uvolnění protonu na druhé straně membrány do mezimembránového prostoru. Aktivní čerpání protonů vytváří gradient koncentrace protonů, tedy gradient pH, přičemž pH matrix je asi 8 a pH v mezimembránovém prostoru je blízké 7. A také generuje membránový potenciál přes vnitřní mitochondriální membránu. Vnitřní membrána této membrány je záporná a vnější strana je kladná. Gradient elektrochemického potenciálu pohání enzym vázaný na vnitřní membránu – ATP syntasu, který slouží k syntéze ATP. Mnoho přenašečových proteinů, například pro pyruvát, ADP, P_i spřahuje transport s energeticky výhodným tokem H⁺ do matrix (Alberts, 2005).

1.1.4.2.1 ROS

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou skupiny malých, ale vysoce reaktivních molekul zahrnující singletový kyslík, superoxidový anion, peroxid vodíku, peroxidové radikály a oxidy dusíku. Hlavním zdrojem ROS je komplex I – NADH dehydrogenasa a komplex III – cytochrom b-c₁. Tvorba O₂^{•-} a H₂O₂ je vyšší, když je respirace pomalá a je nedostatek ADP.

Molekula kyslíku přijímá elektron od ubisemichinonu a vytvoří superoxidový radikál.



Superoxidový anion může působit na Fe-S centrum NADH-oxidoreduktasy, Fe se vylije a katalytická funkce enzymu je porušena. Z toho důvodu je superoxidový anion rychle přeměněn Mn-superoxid dismutasou na peroxid vodíku. Peroxid vodíku vzniká také během oxidativní deaminace aminů monoamin-oxidasou ve vnější mitochondriální membráně. Peroxid vodíku může být později přeměněn za přítomnosti měďnatých a železitých iontů na hydroxylový radikál OH[•], tzv. Fentonova reakce. Hydroxylový radikál reaguje s některými složkami buňky, jako jsou lipidy, DNA a proteiny. Výsledkem je porušení celistvosti buňky, snížená funkčnost enzymů a stabilita genomu, která může mít až za následek některá neurodegenerativní onemocnění jako jsou Parkinsonova choroba a Alzheimerova choroba.

ROS jsou důležitými regulátory apoptózy, protože mohou velice rychle ovlivnit funkce mitochondrií. Oxidanty nebo pro-oxidanty mohou indukovat apoptosu, zatímco antioxidanty ji mohou zpozdit nebo úplně zastavit. Mnoho stimulů apoptosy, jako jsou TNF- α , UV záření, ceramidy, staurosporiny, sérová deprivace, imunodeficience, virová infekce a toxiny, také stimulují tvorbu ROS. Vysoká exprese superoxid dismutasy je schopná potlačit apoptosu vyvolanou působením TNF- α , bazicitou, peroxodisutany a antimycinem (Robinson, 2002; Hensley, 2000; Cadenas, 2000; Raha, 2001; Brookes 2004). Tvorba ROS je velice úzce spojena s absorpcí Ca²⁺ do mitochondrií. V in vitro experimentech bylo prokázáno, že izolované mitochondrie v médiu s vyšším obsahem Ca²⁺ generují ROS. Činidla, která jsou naopak schopna snížit množství vápníku, např. BAPTA-AM (1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl ester)) – chelatační činidlo, nifedipin – blokátor vápenatého kanálku, dantrolen – zabraňuje vylití vápníku z endoplasmatického retikula, chrání

mitochondrie před tvorbou H_2O_2 a ONOO^- . ROS a intramitochondriální Ca^{2+} mohou společně indukovat otevření MPT (mitochondrial permeability transition) póru. Otevření tohoto póru vyvolané anorganickými fosfáty, rozpojovací a prooxidanty je spuštěno vápníkem stimulovanou tvorbou ROS v dýchacím řetězci (Gordeeva, 2003). Vazba Ca^{2+} na submitochondriální částice (pravděpodobně na kardiolipin) vede k formaci lipidových domén, čímž dojde ke změně konformace a funkčnosti membránových proteinů a enzymů, k tvorbě ROS a následné oxidaci proteinů a lipidů (Vercesi, 1997).

1.1.4.2.2 Tvorba ROS

Chinonové sloučeniny, včetně herbicidů jako je parakvat (methyl viologem), menadion (vitamin K_3) a rozsáhlá škála léků způsobují cytotoxicitu, protože působí v elektronovém transportním řetězci mitochondrií a generují ROS. Jeden z nejvíce prozkoumaných léků je antracyklinové protinádorové antibiotikum *doxorubicin* (komerční název Adriamycin). B kruh Adriamycinu, je nesubstituovaný chinon, který ochotně podléhá redoxním reakcím s vhodným donorem elektronů jako je elektronový transportní řetězec. Redukcí Adriamycinu (při koncentraci 25-50 μM) komplexem I vzniká semichinonový radikál QH^\bullet , který redukuje O_2 na $\text{O}_2^{\bullet-}$, a tím se zpátky regeneruje na léčivo (Schéma 1). Adriamycin způsobuje snížení aktivity NADH dehydrogenasy. Tato inaktivace představuje silné oxidační poškození, ke kterému dochází mezi flavin skupinou (místo redukce doxorubicinu) a Fe-S centrem N-1. Tvorba ROS poté může poškodit lipidy, proteiny a DNA (Cadenas, 2000; Marcillat, 1989). Cílem Adriamycinu je také DNA topoisomerasa II (topoII), což je protein, který se podílí na změně terciární struktury DNA tím, že rozštěpí DNA a opětovně ji spojí. TopII usnadňuje transkripci DNA, replikaci a mitosu. Stabilizace komplexu DNA/topoII vlivem andriamyci způsobí narušení replikace DNA (Gewirtz, 1999; Potter, 2005).

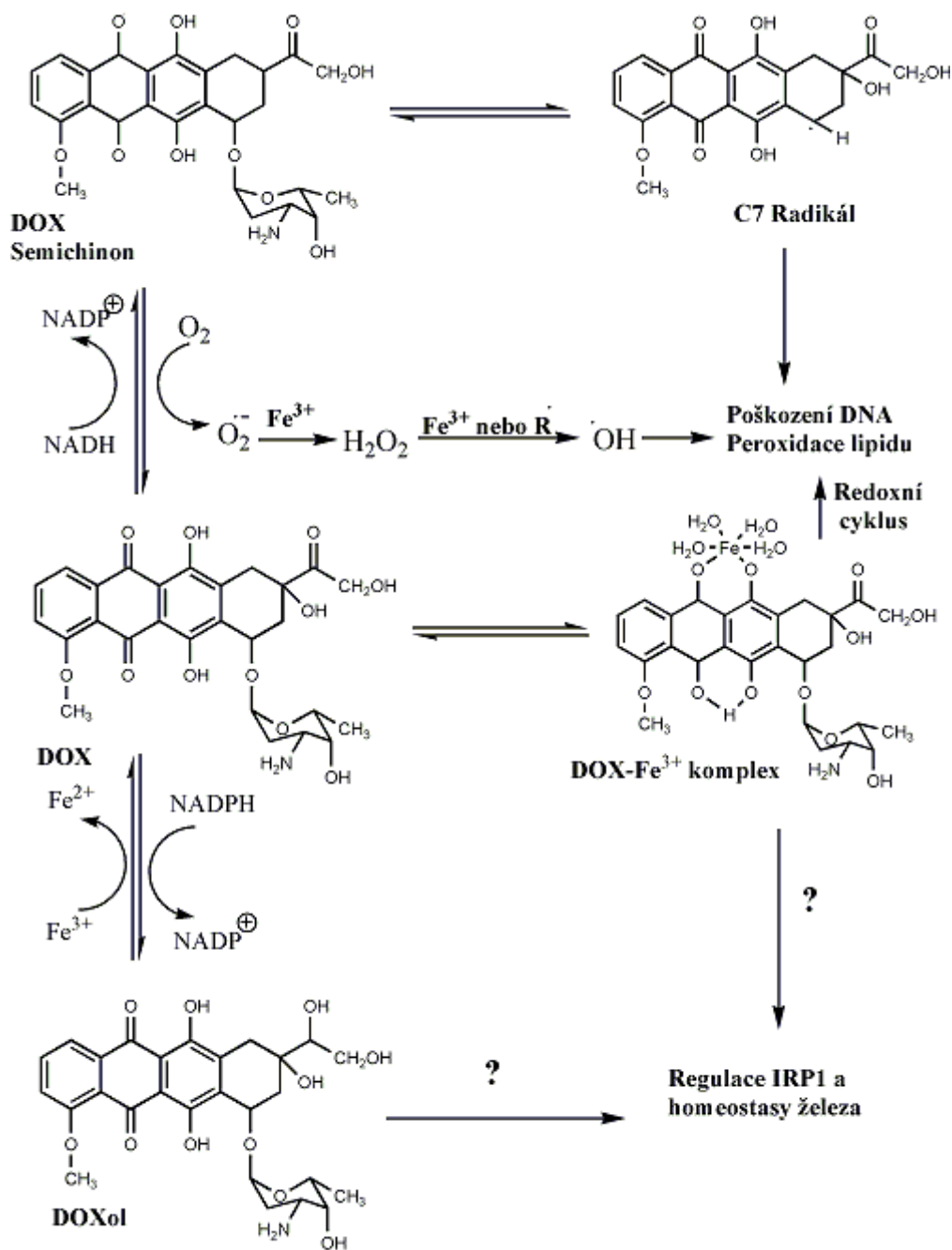


Schéma 1: Redoxní cyklus doxorubicinu (upraveno dle *Persson, 2005*).

Mitoxantron (MH2X, Novatrone, 1,4-dihydroxy-5,8-bis[2-(2 hydroxyethylamino)ethylamino]-anthracene-9,10-dione) je syntetický analog antracyklinových antibiotik vykazující významnou klinickou účinnost v léčení zhoubných nádorů (myeloidní leukémie, karcinom prsu), které vykazují vysoký titr peroxidasy. Na rozdíl od jiných antracyklinových antibiotik (např. doxorubicinu), které se aktivují redukcí, dochází k aktivaci mitoxantronu oxidací katalyzovanou peroxidasou a metabolizuje se reduktivními procesy (Schéma 2) (*Brück, 2011; Brück 2003*). Mitoxantron se také váže

na topoisomerasu II a inhibuje její aktivitu. Poškození DNA je důležitým signálem pro aktivaci NF- κ B a indukcii apoptozy (Hande, 2006).

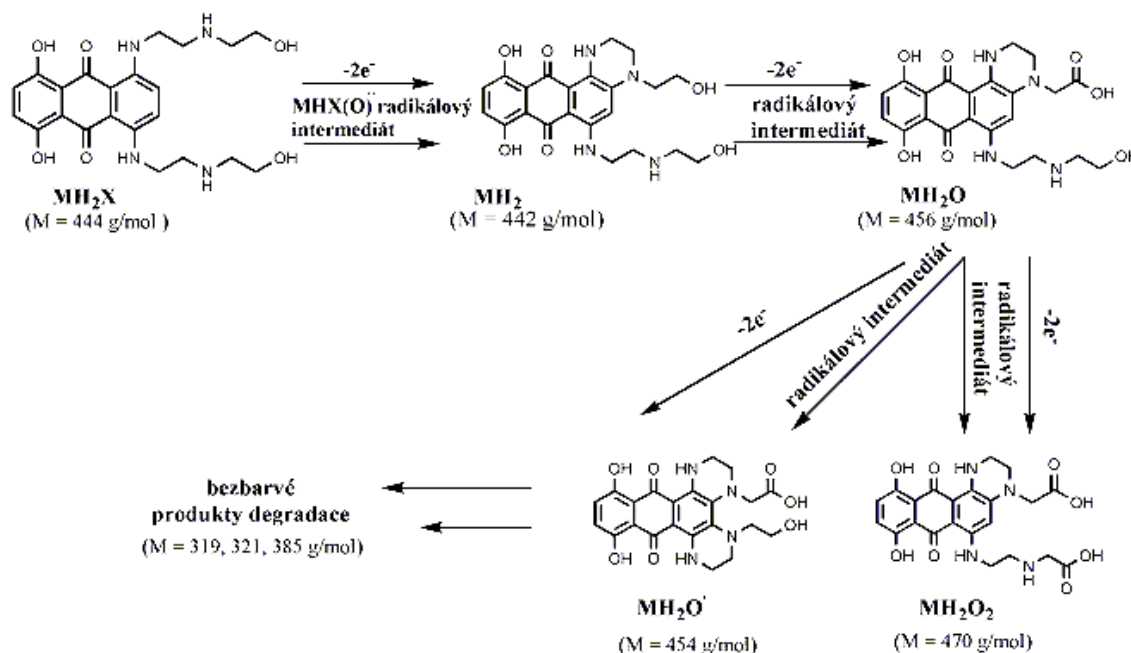


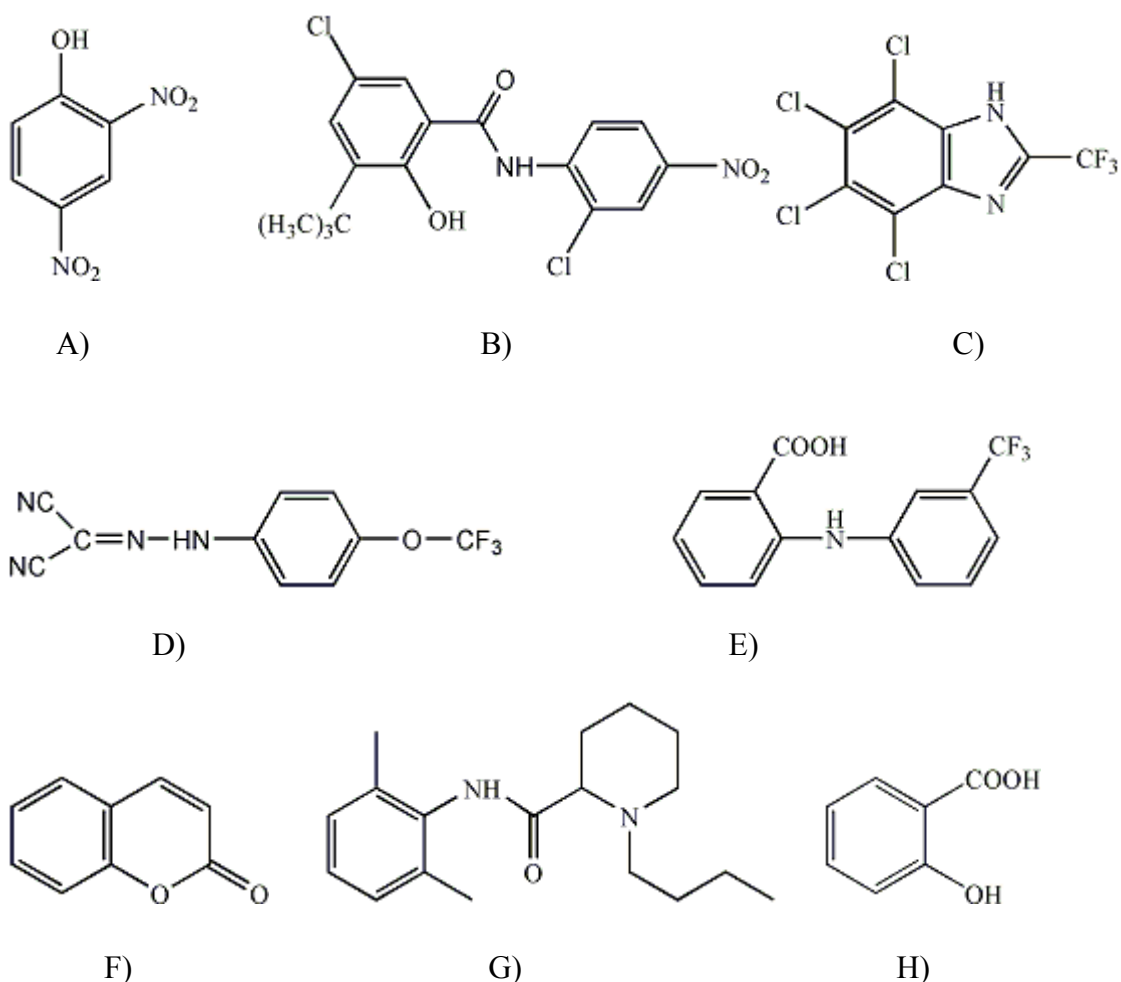
Schéma 2: Reakční schéma oxidace mitoxantronu H₂O₂ (upraveno dle Brück, 2011).

N-(4-hydroxyfenyl) retinamid (4HPR) je syntetický analog vitamínu A patřící do skupiny retinoidů. Nahrazení karboxylové skupiny all trans retinové kyseliny za amid spojený s hydroxyfenylem výrazně snižuje nežádoucí účinky, především toxicitu jater. Navíc není genotoxický. U zvířecích modelů se ukázal jako velice účinný proti rakovině prsu, prostaty, vaječníků, močového měchýře a plic. 4HPR je schopen inhibovat antioxidanty jako je vitamin C, vitamin E, N-acetylcystein, butylhydroxyanisol a pyrrolidinový dithiokarbamát. 4HPR se váže na ubiquinon mezi komplexem I a II a podporuje tvorbu ROS, otevření MPT (mitochondrial permeabilization transition) póru přes oxidaci thiolů, které regulují bílkoviny MPT póru, vylití cytochromu c a zvýšení aktivity kaspasy-3. Navíc 4HPR vyvolává konformační změny Bax a Bak, což vede k expozici jejich N-konců a následnému přenesení proteinů do vnější membrány (Suzuki, 1999; Hail, 2001; Hail 2009).

1.1.4.2.3 Rozpojovače dýchacího řetězce

Rozpojovače oxidativní fosforylace zabraňují spojení transportu elektronů s následnou fosforylací, a tak inhibují syntézu ATP, aniž by působily na tok elektronů a na ATP-syntasu.

Mnoho sloučenin, které jsou známé jako rozpojovače, patří do skupiny hydrofóbních slabých kyselin (fenoly - DNP, benzimidazoly, N-fenylantraniláty – flufenamová kyselina, salicylanilidy - S13, fenylylhydrazony - FCCP, kyselina salicylová, acyldithiokarbamáty, kumarin, aromatické aminy - bupivakain) (Obr. 5). Tyto kyseliny transportují H^+ skrz membránu, která je pro H^+ nepropustná (Terada, 1990).



Obr. 5: Struktura A) DNP; B) S13; C) TTFB; D) FCCP; E) flufenamová kyselina; F) kumarin G) bupivakain; H) salicylová kyselina (upraveno dle Terada, 1990).

ATP je syntetizován z ADP a P_i , když H^+ prochází H^+ -ATPasou (F_0F_1 -ATPázou). F_0F_1 -ATPasa je složena z katalytické části F_1 skládající se z podjednotek $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$, ta

vystupuje nad membránu a připojuje se k hydrofóbnímu proteinu F_0 obsahujícího podjednotky ab_2c_{12} (*Escherichia coli*), který je zabudovaný v membráně. Podjednotka a obsahuje 2 kanály a oba jsou spojené z jinou částí membrány. Jeden kanál přenáší H^+ do membrány, kde se váže na jednu z podjednotek c , a poté se pootočením c_{12} komplexu uvolní H^+ druhým kanálem na opačnou stranu membrány. Podjednotka c je ukotvena k γ , zatímco podjednotka a je spojena přes podjednotky b a δ k $\alpha_3\beta_3$ hexameru. Proto rotace c_{12} komplexu vzhledem k a podjednotce v F_0 řídí rotaci γ vzhledem k $\alpha_3\beta_3$ hexameru. Při otáčení asymetrické γ podjednotky o 120° dochází ke změně konformace všech tří podjednotek, u kterých se tak mění jejich afinita k substrátům ADP a P_i a k produktu ATP (*Gross, 2000*). Rozpojovače přenášejí H^+ dovnitř mitochondrií a způsobují tak kolaps H^+ chemického potenciálu. Navíc je přenos H^+ z matrix spojen se vznikem membránového potenciálu ($\Delta\psi$) a rozdílem pH na obou stranách membrány. Jako rozpojovače mohou působit některé sloučeniny, změna osmózy a stárnutí, které narušují pH a membránový potenciál (*Terada, 1990*).

Vychytávání lipofilních kationtů (např. rhodaminu 123) je řízeno plasmatickým a mitochondriálním membránovým potenciálem. K prekoncentraci lipofilních kationtů v cytoplasmě v porovnání s extracelulárním substrátem dochází v souladu s Nernstovou rovnicí:

$$[\text{cytoplasma}] = [\text{extracelulární substrát}] \times 10^{-(\Delta\psi_{\text{plasma}})/60 \text{ mV}}$$

Mitochondriální membránový potenciál koncentruje kationy uvnitř mitochondrií podle rovnice:

$$[\text{mitochondrie}] = [\text{cytoplasma}] \times 10^{-(\Delta\psi_{\text{mit}})/60 \text{ mV}}$$

Koncentrace kationtů v mitochondrii ve stavu rovnováhy závisí na plasmatickém a mitochondriálním potenciálu:

$$[\text{mitochondrie}] = [\text{cytoplasma}] \times 10^{-(\Delta\psi_{\text{plasma}} + \Delta\psi_{\text{mit}})/60 \text{ mV}} \quad (\text{Davis, 1985}).$$

Podle Nernstovy rovnice vede každé zvýšení membránového potenciálu (obvykle 120-170 mV) o 61,5 mV k 10 násobnému zvýšení koncentrace kationtů v matrix. Proto je koncentrace kationtů dvakrát až třikrát vyšší v matrix než v cytosolu (*Costantini, 2000*).

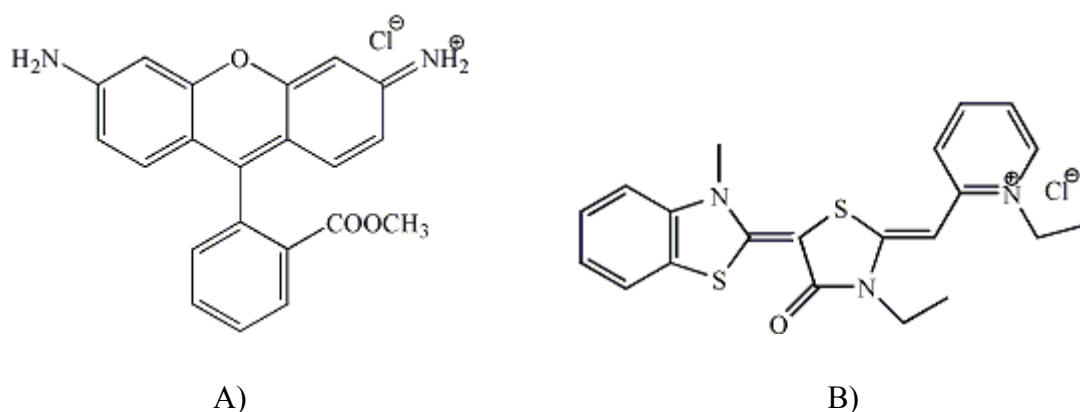
1.1.4.2.3.1 Využití vlastnosti rozpojovačů jako potenciálních léčiv

Rozsáhlé množství toxinů inhibuje respiraci mitochondrií vedoucí až ke spuštění buněčné smrti. K inhibici může dojít přes specifickou interakci látky s mitochondriálními proteiny nebo akumulací kationtů v matrix u lipofilních kationtů.

Rhodamin 123 je fluorescenční kationtové barvivo (Obr. 6). Akumulace rhodaminu v mitochondriích závisí na jeho lipofilních a kationtových vlastnostech, které mu napomáhají projít do matrix přes dvojitou mitochondriální membránu. Podle depolarizace plasmatické membrány bylo ukázáno, že vycytávání a retence rhodaminu 123 řízené membránovým potenciálem byla vyšší u nádorových buněk MCF-7 (karcinom prsu) než u buněk CV-1 (nenádorové fibroblasty). Vysoká retence rhodaminu 123 v mitochondriích byla také pozorována u přechodných buněk karcinomu, adenokarcinomu, chemicky karcinogenně transformovaných buněk a spinocelulárního karcinomu. Mitochondrie těchto rakovinných buněk udržely rhodamin 123 po dobu 2-5 dnů, zatímco normální buňky uvolnily rhodamin 123 během několika hodin. V klinických studiích byla u pacientů s rakovinou prostaty stanovena maximální tolerovaná dávka 96 mg/m^2 podávána v měsíčních intervalech. Data ze studie Jones a kol. (2005) však nebyla statisticky významná. Terapie by mohla být účinnější, pokud by byl rhodamin 123 v kombinaci s jinými terapeutickými modalitami. Pokles produkce ATP může být kompenzován zvýšením glykolýzy v cytosolu. Kombinace rhodaminu-123 s inhibitory glykolýzy, jako je 2-deoxyglukosa, se zdá jako vhodná. Některé rakovinné buňky mohou k syntéze ATP využít mastné kyseliny a aminokyseliny (např. glutamin) a inhibice glykolýzy pak sama o sobě nemusí být dostatečná. Kombinace inhibitorů glykolýzy a sloučenin, které narušují mitochondrie nebo potlačují alternativní metabolické dráhy v mitochondriích, by mohla být účinnější (Davis, 1985; Constantini, 2000; Wang, 2010).

MKT-077 je rhodanokyanidové kationtové barvivo (Obr. 6), které se vyznačuje výraznou protinádorovou aktivitou. MKT-077 inhibuje růst nádorových buněk CX-1 (karcinom tlustého střeva), MCF-7 (karcinom prsu), CRL1420 (karcinom pankreatu), EJ (karcinom přechodných buněk močového měchýře) a LOX (melanomu), ale tuto aktivitu nevykazuje u buněk CV-1 (nenádorové fibroblasty). Mitochondriální membránové potenciály buněk CV-1 a CX-1 byly odhadnuty na 104 a 163 mV. Tento 60 mV rozdíl by měl odpovídat 10 násobnému rozdílu v akumulaci MKT-077.

Vzhledem k tomu, že plasmatický membránový potenciál je také vyšší u nádorových buněk, tak zvýšená koncentrace MKT-077 v cytoplasmě zapříčiní vyšší vychytávání MKT-077. Koncentrace kationtů je 20 až 65 krát vyšší u buněk CX-1 oproti CV-1 buňkám. U nahých myši inhibuje MKT-077 růst subkutánně implantovaného renálního karcinomu A498 a karcinomu prostaty DU145. Také prodlužuje přežití myši nesoucích intraperitoneálně implantovaný melanom LOX (Koya, 1996). MKT-077 způsobil selektivní degradaci mtDNA u buněk CX-1, CRL1420, ale ne u CV-1 při koncentraci 3 $\mu\text{g/ml}$ po dobu 3 dnů. Jaderná DNA nebyla zasažena ani v jedné z buněčných linií. Kombinace různých faktorů, jako jsou oxidační stres, nedostatečné sdružení mtDNA s ochrannými histony, omezená oprava mtDNA opravnými mechanismy, mohou zvýšit náchylnost mtDNA oproti nDNA. Z enzymatických testů provedených na zmražených a poté rozmražených mitochondriích izolovaných z jater potkanů vyplynulo, že MKT-077 významně inhibuje elektronový transportní řetězec. Koncentrace nutná pro poloviční maximální inhibici byla stanovena na 22, 18 a 30 μmol na mg proteinu pro NADH cytochrom c reduktasu, sukcinát cytochrom c reduktasu a cytochrom oxidasu. Na aktivitu citrát syntasy nemá MKT-077 žádný vliv a to ani při koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ (Modica-Napolitano, 1996). V první fázi klinické studie bylo u pacientů se solidním tumorem zjištěno, že MKT-077 je velice dobře tolerován a u této skupiny pacientů byla stanovena dávka 126 mg/m^2 týdně. Jeho toxicita spočívala v hypomagnesemii, která se dá ale zvládnout podáním hořčičku (Costantini, 2000; Wang, 2010).



Obr. 6: Struktura rhodaminu 123 (A) a MKT-077 (B) (upraveno dle Wang, 2010, Tatsuta, 1999).

1.2 Buněčná smrt

K buněčné smrti může docházet několika různými způsoby. Dle regulace a indukce buněčné smrti rozlišujeme nekrosu, anoikis a apoptosu. Některé typy buněčné smrti se mohou navzájem prolínat, např. apoptosa a anoikis.

1.2.1 Nekrosa

Pokud u buňky dojde k rozsáhlejšímu vyčerpání ATP, vstupuje buňka do nekrosy. Nekrosa je nekontrolovaný pasivní proces postihující obvykle velké množství buněk. K hlavním morfologickým změnám, které jsou charakteristické pro nekrosu, patří bobtnání buňky; tvorba cytoplasmatických vakuol; zvětšené endoplasmatické retikulum; vznik cytoplasmatických puchýřků; narušení membránových organel; nabobtnání a prasknutí lysosomů a nakonec narušení buněčné membrány. Cytoplasmatický obsah se vylíje do okolní tkáně a spustí zánět (*Elmore, 2007*).

1.2.2 Anoikis

Jedním z klíčových faktorů k udržení buněčné homeostasy je adheze buňky k extracelulární matrix (ECM) prostřednictvím integrinů. Pokud dojde k porušení této interakce, může dojít ke spuštění určitého typu apoptosy, tzv. anoikis. Rakovinné buňky obvykle nejsou citlivé k anoikis a většina z nich je nezávislá, čímž k přežití a proliferaci nevyžadují interakci mezi buňkou a extracelulární matrix (*Chiuragi, 2008*).

1.2.3 Apoptosa

Apoptosu poprvé popsali Kerr, Wyllie a Curie v roce 1972 jako vysoce kontrolovaný mechanismus buněčné regulace, díky němuž jsou z organismu odstraněny poškozené buňky (*Kerr et al., 1972*). Apoptosa je od té doby považována za důležitý způsob naprogramované buněčné smrti, která také zahrnuje geneticky podmíněné vyloučení buněk. Buněčná smrt je nezbytná pro úspěšnou organogenezi v průběhu embryogeneze a je velice důležitá pro udržení homeostasy v dospělém organismu. I když existuje široká škála podnětů a to jak fyziologických, tak i patologických, které mohou vyvolat apoptosu, ne všechny buňky budou reagovat na stejný podnět stejně. Abnormality

v regulaci buněčné smrti mohou mít za následek i závažná onemocnění. Zvýšená apoptosa může vést k chronickým degenerativním onemocněním, imunodeficienci a neplodnosti, zatímco nedostatečná apoptosa se může projevit vznikem rakoviny nebo autoimunitním onemocněním. Apoptosa je tedy vysoce koordinovaný a energeticky závislý proces postihující jednotlivé buňky nebo jejich shluky. (*Elmore, 2007; Danial, 2004*).

1.2.3.1 Mechanismus apoptosy

Na molekulární úrovni můžeme apoptosu rozdělit do tří fází: iniciace, exekuce a terminace.

Iniciace

Iniciace je do značné míry závislá na typu buňky a apoptotických stimulech jako je např. oxidační stres, iontová nerovnováha, cytokiny. Apoptosa může být také vyvolána různými činiteli jako jsou UV nebo γ záření a chemoterapeutika.

Exekuce

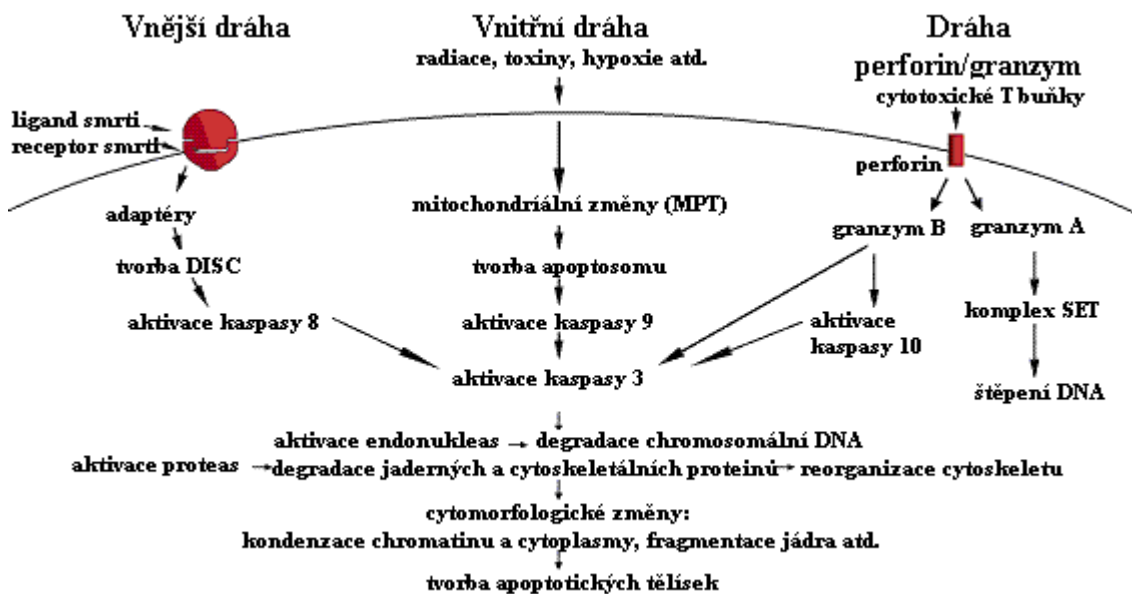
Exekuce je spuštěna štěpením kaspasy-3. Buňka se začne scvrkávat a ztratí tak až třetinu svého původního objemu během několika minut. Na membráně se vytvoří četné výběžky (zeiosis). Dochází k fragmentaci jádra, kondenzaci chromatinu, degradaci DNA a dilataci endoplasmatického retikula. DNA je nejprve fragmentována na části o velikosti 50-70 kb bází a poté (ne ve všech buňkách) až na jednu či několik jednotek nukleosomů na délku. Nukleosom se skládá z histonu obaleného asi 180 bp DNA. Degradace DNA je způsobena endonukleasami, které působí na linkery DNA mezi nukleosomy, protože DNA není v těchto místech dobře chráněna histony. V mnoha případech je tato fáze doprovázena se změnami v membráně, která obsahuje na vnitřní straně lipidové dvojvrstvy fosfatidylserin. Enzym aminofosfolipid transferasa přenesse fosfatidylserin na vnější stranu membrány, a tím dojde k rovnocennému rozložení fosfatidylserinu na obou stranách membrány.

Terminace

Fagocytující buňky mají na svém povrchu receptor pro fosfatidylserin a dokážou tak rozpoznat, navázat a pohltnout apoptotické buňky. Apoptotická tělíška jsou tedy rychle

fagocytována a nemají možnost zlyzovat a spustit zánět (Hail, 2006; Schmitz, 2000; Cohen, 1999; Fearnhead, 1995).

Jsou známy tři dráhy, které vedou ke spuštění apoptosy (Obr. 7). Vnější dráha je spuštěna přes aktivaci receptorů smrti, které jsou na povrchu buňky. Vnitřní dráha je řízena přes mitochondrie. Třetí dráha indukuje apoptosu přes granzym B a A. Všechny tyto dráhy vedou k aktivaci kaspáz, které mohou štěpit buněčné komponenty a způsobit biochemické a morfologické změny vedoucí k apoptose (Igney, 2002; Elmore, 2007).



Obr. 7: Schéma propojení apoptotických drah (upraveno dle Elmore, 2007).

1.2.3.2 Vnitřní mitochondriální dráha

Nedostatek některých růstových faktorů, hormonů, cytokinů, ale také záření, toxiny, hypoxie, hypertermie, virová infekce a volné radikály mohou způsobit změny vnitřní mitochondriální membrány, které vyústí v otevření MPT (mitochondrial permeability transition) pórů, ztrátu mitochondriálního potenciálu a uvolnění dvou hlavních skupin proapoptotických faktorů z mezimembránového prostoru do cytosolu.

Do první skupiny proapoptotických faktorů patří cytochrom c a Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspases) (Elmore, 2007). V cytosolu se cytochrom c váže s jednou molekulou Apaf-1 a tento komplex hydrolyzuje ATP nebo dATP na ADP či dADP. Tato hydrolýza umožní oligomerizaci komplexu na apoptosom, na který se naváže prokaspasa-9. K její aktivaci může dojít buď

přestavbou aktivního místa prokaspasy-9 vlivem interakce s apoptosomem nebo na apoptosomu dojde k dimerizaci dvou monomerů prokaspas-9 (Pop, 2006). Apoptosom se nakonec skládá ze 7 molekul Apaf-1. Aktivovaná kaspasa-9 se oddělí od komplexu a je schopná štěpit a aktivovat další kaspasy (Hill, 2004; Zou, 1999). Smac/Diablo je dimer, který inhibuje kaspasy rodiny IAP, což jsou proteiny inhibující apoptosu (Adrian, 2001). Druhá skupina proapoptotických faktorů – AIF, endonukleasa G a CAD vstupují z cytosolu do jádra. AIF (apoptosis-inducing factor) rozsáhle fragmentuje DNA (~50-300 kb) a způsobuje periferní kondenzaci chromatinu (1.fáze kondenzace). Endonukleasa G štěpí v jádře chromatin a způsobuje oligonukleosomální fragmentaci DNA. Funkce AIF a endonukleasy G jsou nezávislé na kaspázách. CAD (caspase-activated deoxyribonuclease) je přemístěn do jádra, kde po štěpení kaspasou-3 výrazněji kondenzuje chromatin (2.fáze kondenzace). CAD nejprve fragmentuje DNA (~50 kb) a poté také vede k oligonukleozomální fragmentaci DNA (~200 bp) (Susin, 2000; Elmore, 2007).

1.2.3.2.1 Regulace mitochondriální dráhy

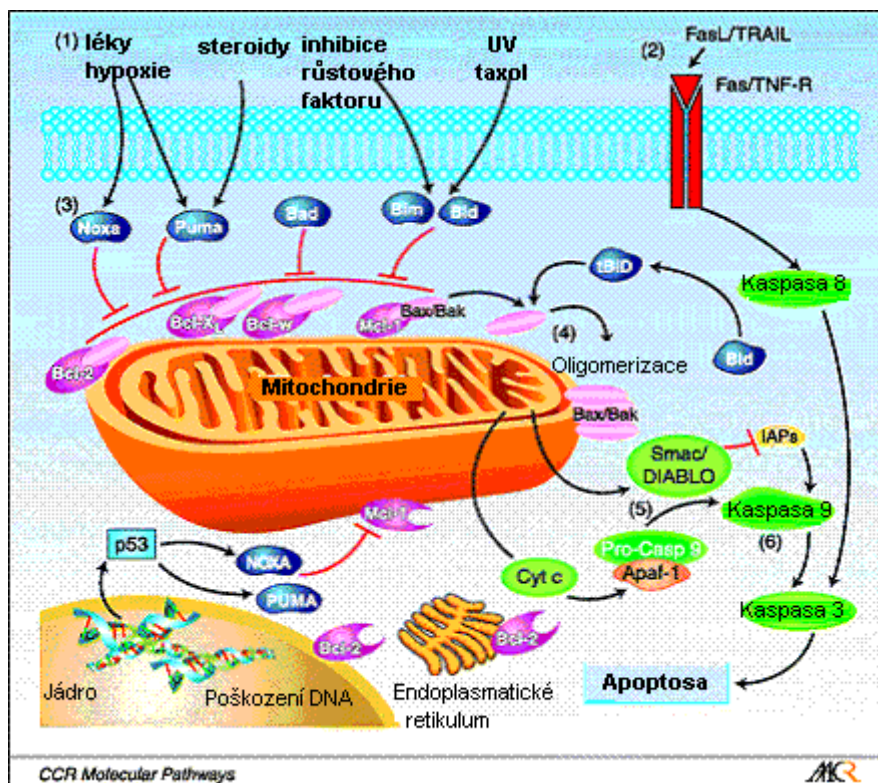
Permeabilita mitochondriální membrány a uvolnění cytochromu c do cytosolu je řízeno proteiny Bcl-2 rodiny (Elmore, 2007). Tyto proteiny jsou charakteristické krátkými Bcl-2 homologními doménami, což jsou krátké úseky maximálně 20 aminokyselinových zbytků. Proteiny Bcl-2 rodiny mohou být rozděleny do tří podskupin podle struktury či funkcí:

- 1) antiapoptotické proteiny Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, Bfl1/A-1 a Bcl-B, které apoptosu potlačují a obsahují všechny čtyři Bcl-2 homologní domény BH1-4
- 2) proapoptotické proteiny Bax, Bak a Bok tzv. vícedoménové obsahují BH1-3
- 3) proapoptotické proteiny Bim, Bad, Bid, Noxa a Puma, které obsahují pouze doménu BH-3, tzv. jednodoménové.

Proteiny podskupiny BH-3, Bim, Bid, se nazývají jako tzv. „aktivátoři“, protože se přímo vážou na Bax a Bak, které následně oligomerizují. Aktivované Bax/Bak vytváří ložiska na vnější mitochondriální membráně, což může vést až k tvorbě nespecifických lipidových pórů podobných těm, které se vytvářejí při fúzi membrán. Následně dojde k vylití cytochromu c do cytosolu, kde se váže na Apaf-1 (apoptosis protease-activating

factor 1). Naopak „senzibilizátoři“ podskupiny BH-3, Bad, Bik a Noxa, nemohou přímo aktivovat Bax/Bak, ale izolují antiapoptotické proteiny od Bim, Bid a Bax/Bak (Obr. 8).

Bak se také nemusí vázat na žádný z BH-3 proteinu. Bax a Bak mohou spustit apoptosu bez spolupráce s aktivátory Bim, Bid a to i v případě, že je v buňce nedostatek Bim, Bid a Puma (Kang, 2009; Esposti, 2003).



Obr. 8: Proteiny rodiny Bcl-2 a apoptosa (upraveno podle Kang, 2009).

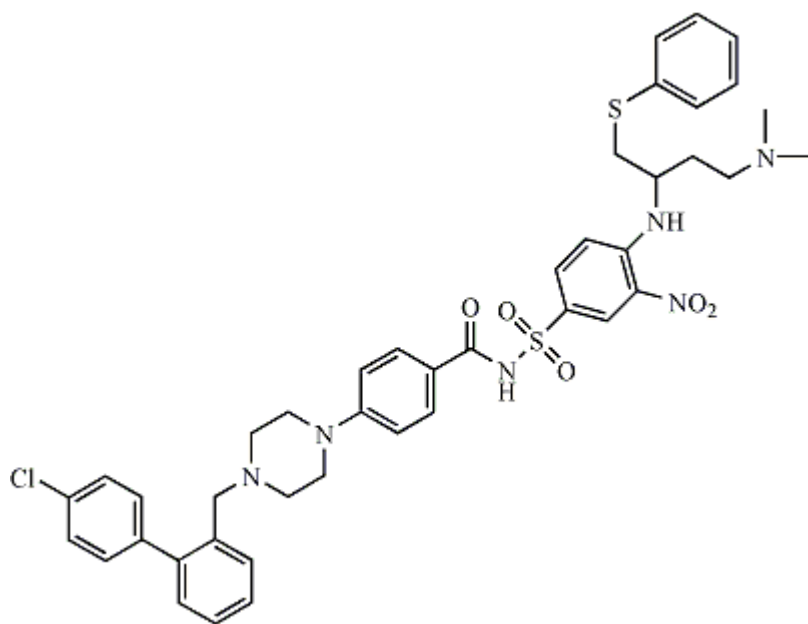
1.2.3.2.2 Inhibitory Bcl-2

Proteiny Bcl-2 rodiny hrají důležitou roli při regulaci buněčné smrti, a proto se dnes považují za potencionální cíl protinádorové terapie.

Syntetická BH-3 mimetika

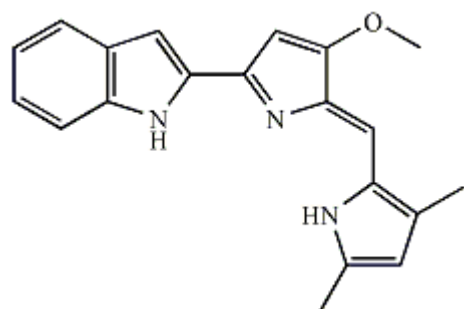
Synteticky připravené BH-3 peptidy indukují apoptosu stejně jako BH-3 domény. *BID-SAHB* je protein odvozený od Bid, u kterého bylo pozorováno u buněčné linie Jurkat spuštění apoptosu a inhibice růstu leukemických buněk. Peptid *Bad-BH s cpm-1285* (cell permeability moiety) aktivoval kaspasy a apoptosu u leukemických buněk HL-60.

ABT-737 je malá organická molekula (Obr. 9), která se váže stejně jako proapoptotická BH-3 doména na hydrofobní část povrchu antiapoptotického proteinu. Silně inhibuje Bcl-2, Bcl-XL a Bcl-w, zatímco na Mcl-1 a A1/Bfl-1 je neúčinná. *ABT-737* je funkční, ale ne strukturální mimetikum Bad-BH3 domény. Je-li apoptosa buňky závislá na Mcl-1, potom je *ABT-737* účinný v kombinaci např. s inhibitorem CDK (roskovitinem, flavopiridol).



Obr. 9: Struktura *ABT-737*.

Obatoclax (GX15-070) je syntetický indol bipyrolový derivát (Obr. 10). *Obatoclax* se váže na Bcl-w, Bcl-XL, Mcl-1 a narušuje interakci Mcl-1/Bak. Dokonce indukuje apoptosu u buněk, které jsou rezistentní k melfalanu, *ABT-737* a bortezomibu. V současné době je testován na pacientech s chronickou lymfatickou leukémií, karcinomem plic a solidních nádorů a to jak samostatně, tak i v kombinaci s bortezomibem, docetaxelem, topotekanem nebo rituximabem (Kang, 2009; Marzo, 2008).

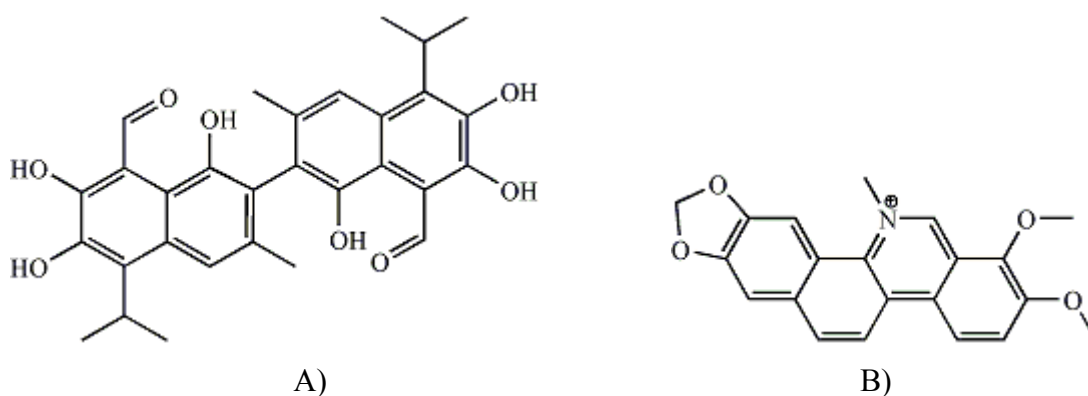


Obr. 10: Struktura *Obatoclaxu*.

Přírodní sloučeniny

Gossypol, polyfenolický aldehyd z bavlníku (Obr. 11), byl původně navržen jako antikoncepce pro muže. Později se ukázalo, že gossypol má protinádorovou aktivitu vůči nádorovým buňkám různého původu in vitro a in vivo. Gossypol inhibuje fosforylaci Bcl-2 na serinu 70 u leukemických buněk HL-60. Bcl-2 antiapoptotické proteiny nebudou zřejmě jeho jediným cílem. Kromě inhibice antiapoptotických proteinů je také schopen vázat laktát dehydrogenasu, 5-lipoxygenasu a kalcineurin (Huang, 2010; Marzo, 2007).

Chelerytrin je benzofenantridinový alkaloid (Obr. 11), který se váže na BH žlábek Bcl-XL a indukuje uvolnění cytochromu c u izolovaných mitochondrií a apoptosu u buněk neuroblastomu SH-SY5Y. Vykazuje také aktivitu u buněk MEF s nedostatkem Bax a Bak.



Obr. 11: Struktura Gossypolu (A) a Chelerytrinu (B).

Antisense terapie

Principem této terapie je redukovat expresi antiapoptotických Bcl-2 proteinů pomocí antisense nebo RNAi terapie.

Genasense (G3139) je 18-timerní fosforothioát oligodeoxyribonukleotid, který je komplementární k prvním šesti kodonům pro Bcl-2 mRNA. V III. fázi studie vykazoval genasense společně s dakarbazinem lepší výsledky u melanomu než samotný dakarbazin. Na druhou stranu některé klinické studie poukazují na nevýhody genasense v kombinaci s různými chemoterapeutiky, např. u pacientů s malobuněčným karcinomem plic. Tento rozdíl mezi in vitro a klinickými studiemi může být způsoben nedostatečným potlačením Bcl-2.

OGX-011 je 2'-methoxyethylen-modifikovaný fosforothioát oligonukleotid, který blokuje expresi klastrinu, což je protein inhibující proapoptotický protein Bax. Ve II.fázi studie se OGX-011 studuje v kombinaci s dalšími léky na pacientech s nemalobuněčným karcinomem plic, prostaty a rakovinou prsu (Marzo, 2007; Chi, 2005).

1.2.4 Dráha granzymu B

Granzym B patří do rodiny serinových proteas. Je hlavní součástí CTL/NK (cytotoxic T lymfocytes/natural killer) buněk a přes proteolysu i poměrně malého množství substrátu aktivuje apoptosu. Lze jej charakterizovat jako aspasu, protože štěpí substrát za zbytkem kyseliny asparágové. I přes tuto podobnost vykazuje specifiku k P4-P1 (I/V)EPD (enzyme potentiated desensitization). Granzym B se dostane do buněk s i bez pomoci perforinu, který je také uvolňován z CTL/NK buněk při jejich degranulaci a je schopen narušit mitochondriální membránu (Jans, 1999; Cullen, 2008).

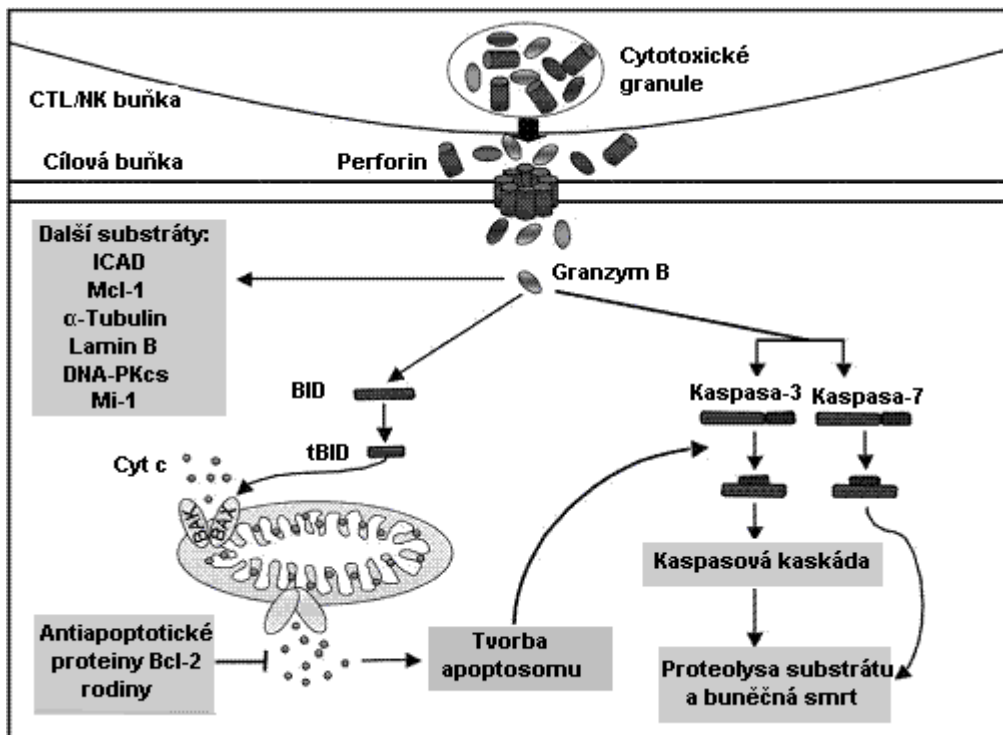
1.2.4.1 Substráty Granzymu B

Granzym B indukuje apoptosu štěpením substrátů Bid nebo kaspas. Takto aktivovaný Bid způsobí oligomerizaci Bix a/nebo Bak ve vnější mitochondriální membráně. Tím dojde k vylití cytochromu c do cytosolu s aktivací kaspas (Obr. 12). Některé antiapoptotické proteiny Bcl-2 rodiny mohou inhibovat uvolnění cytochromu c, což způsobí inhibice této dráhy. Granzym B může štěpit kaspasy-3 a -7. Aktivovaná kaspasa-3 poté aktivuje další kaspasy-2, -6 a -9, čímž buňka vstoupí do fáze exekuce.

Mezi další substráty patří:

- DFF45/ICAD je inhibitor DNasy. Po jeho štěpení granzymem B zůstane volný CAD, který fragmentuje DNA (Thomas, 2000; Cullen, 2008).
- α -tubulin je hlavní sloužkou mikrotubulů. Proteolysa vyvolaná granzymem B způsobí štěpení a snížení molekulové hmotnosti α -tubulinu (Adrian, 2006)
- Mcl-1 má oproti ostatním antiapoptotickým proteinům Bcl-2 rodiny nejrychlejší obrat a nejkratší poločas života. Mcl-1 s Bim se vyskytují převážně v mitochondriální membráně. Po štěpení Mcl-1 se proapoptotický protein Bim uvolní a podpoří vylití cytochromu c (Han, 2005).

- DNA-PK se podílí na opravě DNA
- další substráty: NUMA (nuclear mitotic apparatus protein), lamin-B, filamin, proteoglykany a různé autoantigeny (Cullen, 2008).



Obr. 12: Granzym B dráha (upraveno dle Cullen, 2008).

1.3 Triterpeny

Terpeny se vyskytují jako běžné látky obsažené v rostlinách, houbách, vzácně jsou akumulovány a metabolizovány bakteriemi a také jsou syntetizovány některými zvířaty. V současnosti do této skupiny patří přibližně 25 000 sloučenin. Terpeny lze rozdělit podle počtu stavebních molekul izoprenu na monoterpeny, seskvi-, di-, sester-, tri-, tetra-, polyterpeny a spolu se steroly tvoří rozsáhlou skupinu isoprenoidů.

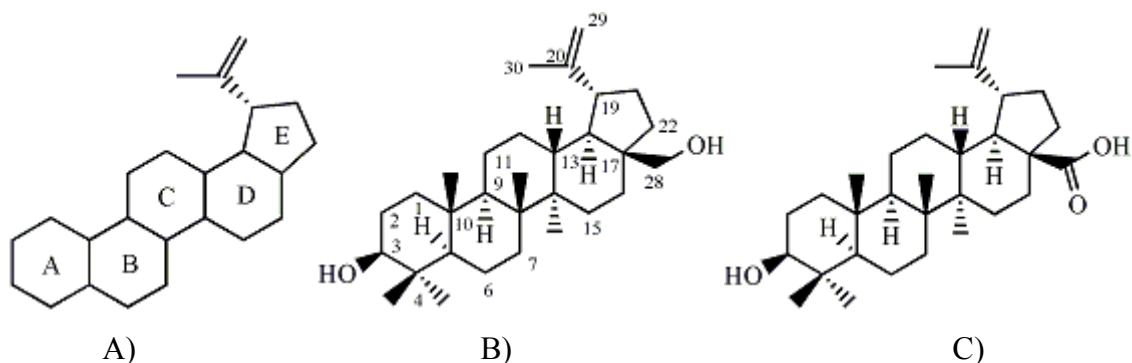
Pro své různorodé biologické účinky se do popředí zájmu dostala skupina cyklických triterpenů, do které se řadí více než 4 000 různých látek, volných triterpenů, triterpenických glykosidů (saponinů), fytosterolů či jiných prekurzorů. Kromě nich je zde ještě skupina rostlinných steroidních saponinů strukturně blízká cholesterolu a steroidním hormonům, ačkoliv nemají hormonální účinek. Triterpeny mají řadu jedinečných a potenciálně využitelných biologických účinků. Zmínky o používání rostlin s vysokým obsahem saponinů či triterpenů můžeme najít již v prvních psaných herbářích. Triterpeny nacházíme i v řadě běžně se vyskytujících rostlin nebo v ovoci

(např. smetánka lékařská, jablko, hruška nebo brusinka). Řada biologických účinků triterpenů byla odvozena z lidové fytotherapeutické praxe a ze zkušeností získaných používáním léčivých rostlin.

Z biologického pohledu jsou nejvýznamnějšími strukturami triterpenů oleananová (oleanolová kyselina, boswellová kyselina), ursanová (ursolová kyselina, β -amyrin), lupanová (lupeol, betulin, betulinová kyselina) a dammaran-eufanové triterpeny. Triterpeny jsou studovány v souvislosti s účinky protizánětlivými, hepatoprotektivními, analgetickými, hypoglykemickými, hypolipidemickými, anti mikrobiálními, antimykotickými, virostatickými, imunomodulačními a tonizujícími. Používají se k léčbě a prevenci hepatitidy, parazitárních a protozoálních infekcí a v centru zájmu jsou i jejich cytostatické účinky. Nevýhodou používání triterpenů je jejich toxicita vyplývající z hemolytického, případně cytostatického efektu (Hajdúch a kol., 2004).

1.3.1 Betulinová kyselina a betulin

Betulinová kyselina (3β -hydroxylup-20(29)-en-28-ová kyselina) je pentacyklický triterpen s lupanovou strukturou (pětičlenný E kruh s isopropylidenovou skupinou) (Obr. 13). Je obsažena v mnoha dřevinách po celém světě. Redukovaná forma betulinové kyseliny, betulin (lup-20(29)-en- 3β ,28-diol), byla jednou z prvních přírodních látek, které byly izolovány z rostlin a to více než před 2 stoletími. Betulin se v průmyslovém měřítku izoluje extrakcí z industriálního odpadu březové kůry a to extrakcí s vysoce vroucími uhlovodíkovými rozpouštědly nebo s vodními azeotropy alkoholů. Bříza bílá je rozšířená v severních zeměpisných šířkách a v současné době neexistuje žádné ekonomicky významné využití této snadno izolovatelné směsi. Dehet z březové kůry (betulae pix) se používal k léčbě kožních onemocnění, jako jsou ekzémy a lupénka. Betulin může být také využit jako výchozí látka k výrobě jiných materiálů a sloučenin majících různé zajímavé farmakologické vlastnosti (Fulda, 2009; Sami, 2006).



Obr. 13: Struktura lupanové kostry (A), betulinu (B) a betulinové kyseliny (C) (upraveno dle *Sami, 2006*).

1.3.2 Indukce apoptozy BetA

Studie Fuldy a kol. z roku 1998 ukázala, že u mitochondrií izolovaných z buněk neuroblastomu došlo vlivem BetA ke snížení membránového potenciálu, a to nezávisle na inhibitoru kaspas - benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl ketonu (Z-VAD-fmk). Ve volném buněčném systému obsahujícím mitochondrie, cytosol, jádra a BetA došlo k permeabilizaci mitochondriální membrány, vylití cytochromu c a AIF, s následným štěpením kaspas-3 a -8 a fragmentací DNA. Kromě toho cytochrom c štěpil v cytosolu kaspasu-3, ale ne kaspasu-8. Tyto projevy BetA byly však potlačeny expresí proteinů Bcl-2 nebo Bcl-XL, a také v přítomnosti Z-VAD-fmk a bongkrekovou kyselinou, která zabraňuje otevření MPT (mitochondrial permeability transition) póru (*Fulda, 1998*). BetA podporuje tvorbu ROS, což je důležité pro aktivaci kaspas a buněčné smrti (*Wick, 1999*).

1.3.3 Regulace apoptozy indukované BetA

Betulinová kyselina ovlivňuje expresi proteinů Bcl-2 rodiny. U buněk neuroblastomu, glioblastomu a melanomu došlo ke zvýšení proapoptotického proteinu Bax, zatímco protein Bcl-Xs (proapoptotická forma proteinu Bcl-XL) byl indukován u buněk neuroblastomu. U buněk melanomu nedošlo vlivem BetA ke změně vylučování proapoptotických proteinů Bak a Bad. Na úrovni exprese antiapoptotického proteinu Bcl-2 nebyla zaznamenána změna u neuroblastomu a dleždicových buněk karcinomu, ale u glioblastomu došlo ke zvýšení. Také u dalšího antiapoptotického proteinu Mcl-1

došlo ke snížení u melanomu, zatímco u dlaždicových buněk karcinomu ke snížení nedošlo. Působením BetA na buňky neuroblastomu, glioblastomu a melanomu se nezměnila exprese proteinu Bcl-XL (*Fulda, 2009*).

1.3.4 BetA a změna aktivity NF- κ B

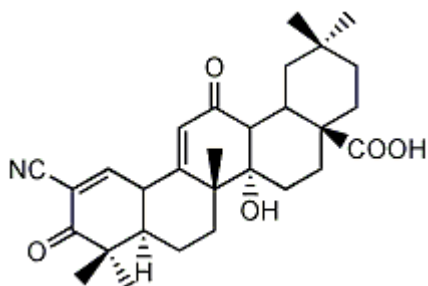
NF- κ B (The transcription factor nuclear factor-kappa B) je klíčový transkripční faktor. Skládá se z homo či heterodimerů NF- κ B/Rel rodiny proteinů. Komplex NF- κ B se ve většině buněk nachází v cytoplasmě v neaktivní formě kvůli interakci s jeho inhibitorem I κ B. Aktivaci NF- κ B může vyvolat mnoho stimulů, např. cytokiny, buněčný stres, ROS nebo protinádorové látky. Tyto podněty aktivují I κ B kinasové komplexy, které fosforylují I κ B proteiny, což vyvolá jejich degradaci přes proteasom. NF- κ B se uvolní a transportuje do jádra, kde se naváže na specifické místo DNA a reguluje přepis genů. NF- κ B přepisuje geny různých antiapoptotických proteinů, ale také několik proapoptotických faktorů.

BetA podporuje tvorbu ROS, a tak může aktivovat NF- κ B. NF- κ B skládající se z podjednotek p65/p50. BetA aktivuje I κ B kinasu, fosforyluje ji na serinu 32/36. Podjednotka p65 se přenesse z cytosolu do jádra a naváže se na DNA. Transkripční aktivita NF- κ B se poté zvýší a podporuje indukci apoptozy (*Kasperczyk, 2005*).

1.3.5 Syntetické triterpeny

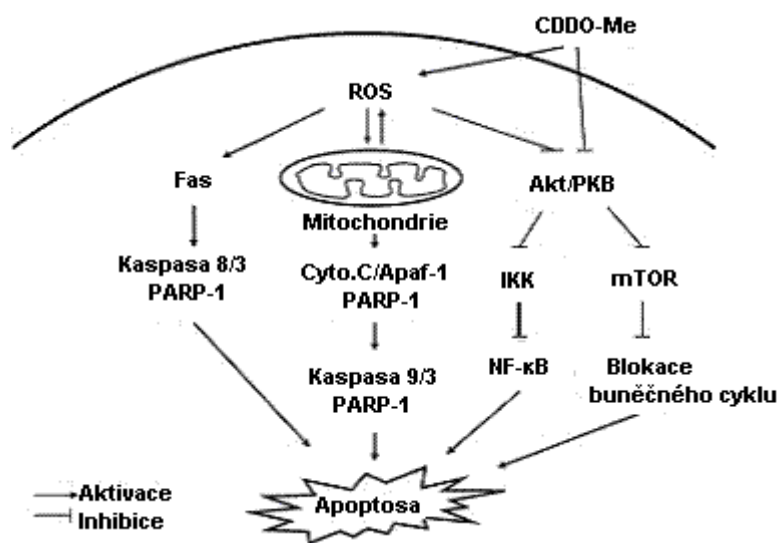
2-Cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-ová kyselina (CDDO) (Obr. 14) a její methyl ester derivát (CDDO-Me) a imidazolinový derivát (CDDO-Im) jsou syntetické triterpeny odvozené od oleanové kyseliny. CDDO-Im je účinnější proti melanomu u myši a leukemickým buňkám než jeho příbuzné sloučeniny. Syntetické triterpeny (ST) vykazují efektní kontrolu nad buněčným růstem mnoha typů rakovinných buněk (rakovina prsu, plic, vaječníků, melanomu, osteosarkomu, leukémie a mnohočetného myelomu). ST indukují apoptosu u rakovinných buněk jak v závislosti na kaspasach, tak i neaktivací kaspas. ST se váží jako ligandy na jaderný receptor PPAR γ (peroxisome proliferator activator receptor-gamma), který tvoří heterodimery s RXR (retinoidním X receptorem). Tyto heterodimery se váží na DNA a aktivují transkripci cílových genů. PPAR γ je zapojen do regulace metabolismu lipidů a diferenciaci adipocytů. Výrazná exprese tohoto receptoru byla pozorována u buněk rakoviny prsu,

plic, močového měchýře, tlustého střeva, prostaty, slinivky břišní. Navázáním ligandu se aktivuje PPAR γ /RXR, což vede k indukci apoptosy u těchto buněk. Kombinace ligandů PPAR γ s agonisty RXR mohou vykazovat větší diferenciaci a inhibici buněčného růstu (Konopleva, 2004).



Obr. 14: Struktura CDDO.

CDDO-Me indukuje tvorbu ROS a to jak z mitochondriálních, tak nemitochondriálních zdrojů u buněčných linií LNCaP a PC-3 (rakovina prostaty), čímž dojde ke spuštění apoptosy – zvýšená vazba annexinu V, štěpení PARP-1 a prokaspas-3, -8, -9, snížení mitochondriálního potenciálu a vylití cytochromu c (Obr. 15). CDDO-Me také spotřebovává glutathion, což je intracelulární antioxidant. Navíc je s indukci apoptosy spojena inhibice faktorů „pro přežití“ Akt, NF- κ B a mTOR (mammalian target of rapamycin). mTOR podporuje růst nádorů, jeho inaktivací dojde k inhibici proliferace nádorových buněk (Deeb, 2010; Deeb, 2007). CDDO-Me inhibuje NF- κ B p65 tím, že inaktivuje kinasy IKKB, které jsou nezbytné k fosforylaci I κ B α . K této inaktivaci IKKB dochází přímou oxidací Cys-179 (Ahmad, 2006).

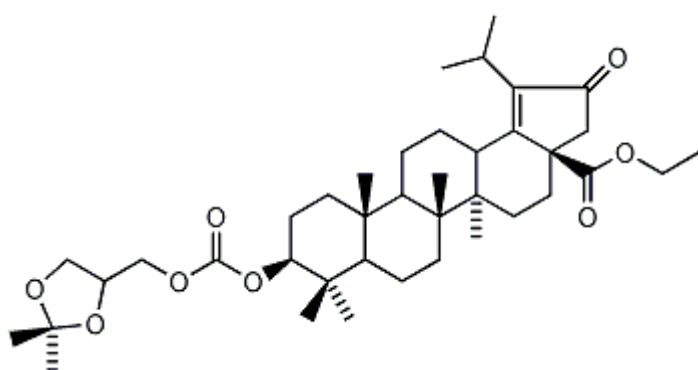


Obr. 15: Schéma působení CDDO-Me (upraveno podle Deeb, 2010).

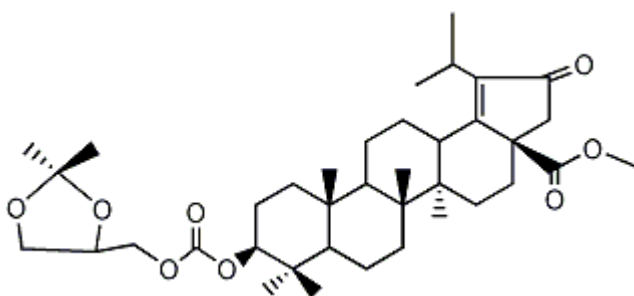
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V práci jsme použili deriváty BetA, na kterých byly v naší laboratoři v minulosti prováděny testy protinádorové aktivity a hodnocení modulace buněčného cyklu a které se v těchto testech jevily jako vysoce aktivní. Tyto testy indikovaly možné cílení účinku do mitochondrií, a proto jsme se rozhodli rozšířit toto testování o další varianty hodnotící vliv derivátů BetA na izolovaném mitochondriálním modelu. Pro testování jsme vybrali mateřskou sloučeninu kyselinu betulinovou a 6 látek strukturně různých (Obr. 16), které byly nasyntetizovány na Katedře organické chemie Univerzity Palackého RNDr. Miroslavem Kvasnicou pod vedením RNDr. Jana Šarka, Ph.D.

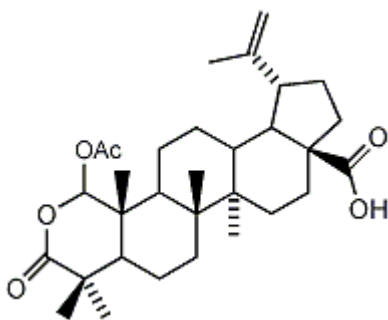
JS3.723



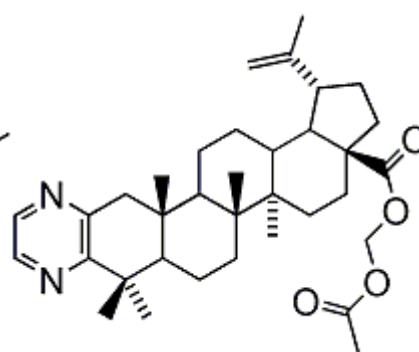
JS3.695



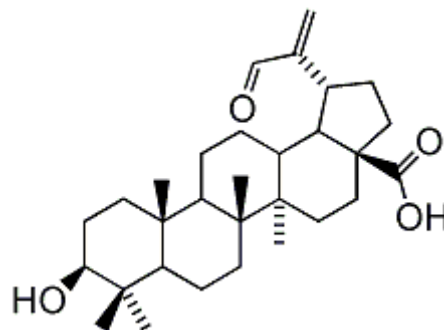
JS3.879



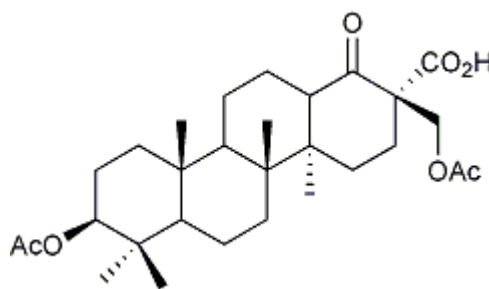
JS3.923



JS3.992



JS8



Obr. 16: Struktury testovaných látek

2.1 Chemikálie, roztoky, spotřební materiál, přístrojové vybavení

Chemikálie:

Diethylether (Merck); DMSO (Sigma); absolutní ethanol (TAMDA); D-manitol (Sigma); sacharóza (Sigma); HEPES (Sigma); BSA (Sigma); EGTA (Serva); reakční pufr pro JC-1 – 100 mM MOPS, pH 7.5, 550 mM KCl, 50 mM ATP, 50 mM MgCl₂, 50 mM sukcinát sodný a 5 mM EGTA (Sigma J4394); uchovávací pufr – 50 mM HEPES, pH 7.5, 1.25 M sacharosa, 5 mM ATP, 0.4 mM ADP, 25 mM sukcinát sodný, 10 mM K₂HPO₄ a 5 mM DTT (Sigma S9689); JC-1 (Sigma J4519); reakční pufr pro cytochrom c oxidasu – 50 mM Tris-HCl, pH 7.0, 600 mM KCl (Sigma A0599), ředící pufr pro enzym – 20 mM Tris-HCl, pH 7.0, 500 mM sacharosa (Sigma E2903); cytochrom c (Sigma); 1 M roztok dithiothreitolu (DTT) v deionizované vodě (Sigma D7059); cytochrom c oxidasa (Sigma C8109); n-dodecyl β-D-maltosid (Sigma D4641); reakční pufr pro citrát syntasu (Sigma B6935); Bicine pufr (B7060); DTNB (Sigma D8130); acetyl CoA (A2181); oxaloctová kyselina (Sigma O4126); citrát syntasa (Sigma C4741); Bradfordovo činidlo (Sigma)

Roztoky:

1x Reakční pufr pro JC-1 (20 mM MOPS, pH 7.5, 110 mM KCl, 10 mM ATP, 10 mM sukcinát sodný a 1 mM EGTA) - Zředíme alikvotní množství reakčního pufru pro JC-1 5x deionizovanou vodou.

1x Uchovávací pufr (10 mM HEPES, pH 7,4, obsahující 250 mM sacharosy, 1 mM ATP, 0,08 mM ADP, 5 mM sukcinát sodný, 2 mM K₂HPO₄ a 1 mM DTT) – Zředíme alikvotní množství uchovávacího pufru 5x deionizovanou vodou.

JC-1 – Obsah vialky (25 µg) rozpustíme v 25 µl DMSO. Výsledná koncentrace zásobního roztoku je 1 mg/ml. K měření naředíme alikvotní množství zásobního roztoku 12,5 krát s DMSO na koncentraci 80 µg/ml.

1x Reakční pufr pro cytochrom c oxidasu (10 mM Tris-HCl, pH 7.0, 120 mM KCl) – Zředíme alikvot reakčního pufru pro cytochrom c oxidasu 5x deionizovanou vodou.

1x ředící pufr pro enzym (10 mM Tris-HCl, pH 7.0, 250 mM sacharosy) – Zředíme alikvot ředícího pufru pro enzym 2x deionizovanou vodou.

Ředící pufr pro enzym obsahující 1 mM n-dodecyl β -D-maltosid (10 mM Tris-HCl, pH 7.0, 250 mM sacharosy a 1 mM n-dodecyl β -D-maltosid) – 1.02 mg n-dodecyl β -D-maltosidu rozpustíme ve 2 ml 1x koncentrovaného ředícího pufru pro enzym.

0.1 M dithiotreitol (DTT) – Zředíme alikvot 1 M DTT roztoku 10x deionizovanou vodou na výslednou koncentraci 0.1 M.

Ferocytochrom c (0.22 mM) – 2.7 mg cytochromu c rozpustíme v 1 ml deionizované vody. Přidáme 5 μ l 0.1 M roztoku DTT na výslednou koncentraci 0.5 mM, promícháme a počkáme 15 minut.

Cytochrom c oxidasa (pozitivní kontrola) – Obsah vialky rozpustíme ve 120 μ l deionizované vody. K měření poté naředíme 10x s 1x ředícím pufrem pro enzym.

1x Reakční pufr pro citrát syntasu – Zředíme alikvot reakčního pufru 5x deionizovanou vodou.

30 mM Acetyl CoA – Obsah vialky rozpustíme v 1 ml deionizované vody.

10 mM oxaloacetát (OOA) – 1.3 mg oxaloctové kyseliny rozpustíme v 1 ml 1x reakčního pufru pro citrát syntasu.

10 mM DTNB – Obsah vialky rozpustíme v 1 ml absolutního ethanolu.

Citrát syntasa (pozitivní kontrola) - Zředíme alikvót citrát syntasy 10x s 1x koncentrovaným reakčním pufrem pro citrát syntasu.

Izolační roztok:

Izolační H-médium o pH 7.2

40.08 g D-manitolu, 23.96 g sacharosy, 0.477 g HEPES a 0.5 g BSA rozpustíme v 1 l deionizované vody. Během homogenizace a první centrifugace obsahuje navíc 0,5 mM EGTA.

Spotřební materiál:

Buničina, nůžky, katetr, injekční stříkačka (BD Biosciences), 96 jamkový panel (Techno Plastic Products), 50 ml zkumavky „falkony“ (Techno Plastic Products), filtr (BD Biosciences)

Přístrojové vybavení:

Spektrofotometr EnVision (PerkinElmer), centrifuga (Eppendorf), Potter Elvehjemův homogenizátor (Sigma)

2.2 Příprava derivátů BetA

K testování účinků derivátů BetA na mitochondriích byly používány vybrané deriváty o koncentracích 1x a 5x IC_{50} , případně 20x IC_{50} , které byly stanoveny nádorové buněčné linii CEM. Hodnoty IC_{50} jsou uvedeny v tabulce (Tab.1).

Tab.1: Cytotoxické hodnoty IC_{50} zjištěné MTT testem pro testované deriváty BetA na buněčné linii CEM.

Kódové označení derivátů BetA	Mr	IC_{50} (μ M)
JS3.723	656	10,91
JS3.923	562	12,47
JS3.695	656	6,59
JS3.992	470	7,17
JS3.879	514	8,28
JS8	504	1
BetA	456	20

K přípravě pracovních a zásobních 10 mM koncentrací byl pro ředění derivátů BetA použit DMSO. Procentuální zastoupení DMSO v reakčních směsích bylo 0,5%.

2.3 Stanovení celkových proteinů – Bradfordova metoda

Pro kvantifikaci celkových proteinů existuje celá řada metod. Základním problémem je výběr nejvhodnější metody pro daný případ. Pro naše testy byla z důvodu chemické kompatibility vybrána Bradfordova metoda s vazbou barviva Coomassie modř na proteiny. Coomassie barvivo (Briliant blue G250) se váže na proteinové molekuly v kyselém pH dvěma způsoby. Trifenylmethanová skupina se váže na nepolární části proteinu a anion sulfoskupiny se váže na vedlejší řetězce aminokyselin nesoucí kladný náboj (např. arginin a lysin). Po vazbě barviva na proteiny dochází k barevné změně, která je úměrná množství proteinu. Reakce je velmi citlivá u albuminu a řady

globulárních proteinů. Stanovení může být rušeno řadou interferujících látek - > 0,5% Triton X-100, > 0,1% SDS, deoxycholát draselný a další (Peč a kol., 2008).

2.3.1 Postup

1. Do 96 jamkového panelu napipetujeme 5 μ l mitochondriální frakce suspendované v H médiu.
2. Bradfordovo činidlo promícháme a do každé jamky přidáme 250 μ l a směs opět důkladně promícháme.
3. Po 5 minutách čteme absorbanci při vlnové délce 595 nm.
4. Obsah proteinů stanovíme metodou kalibrační přímky za použití hovězího sérového albuminu (BSA) jako kalibračního proteinu.

2.4 Izolace mitochondrií

V rámci bakalářské práce jsem se zúčastnila workshopu na téma hodnocení energetického metabolismu pomocí high-resolution respirometry v Hradci Králové. Součástí tohoto školení jsme izolovali mitochondrie z jater potkana. Tento postup izolace jsem použila i v mé práci.

K izolaci mitochondrií byla použita metoda několikanásobné gradientní centrifugace v médiu s D-manitolem a sacharosou. Centrifugací homogenátu při nízkých otáčkách získáme sediment obsahující buněčná jádra, částečně poškozené a nepoškozené buňky a supernatant obsahující cytoplasmatickou a mitochondriální frakci. Odstředěním získaného supernatantu při vyšších otáčkách získáme sediment mitochondriální frakce (Bustamante, 1977).

2.4.1 Postup

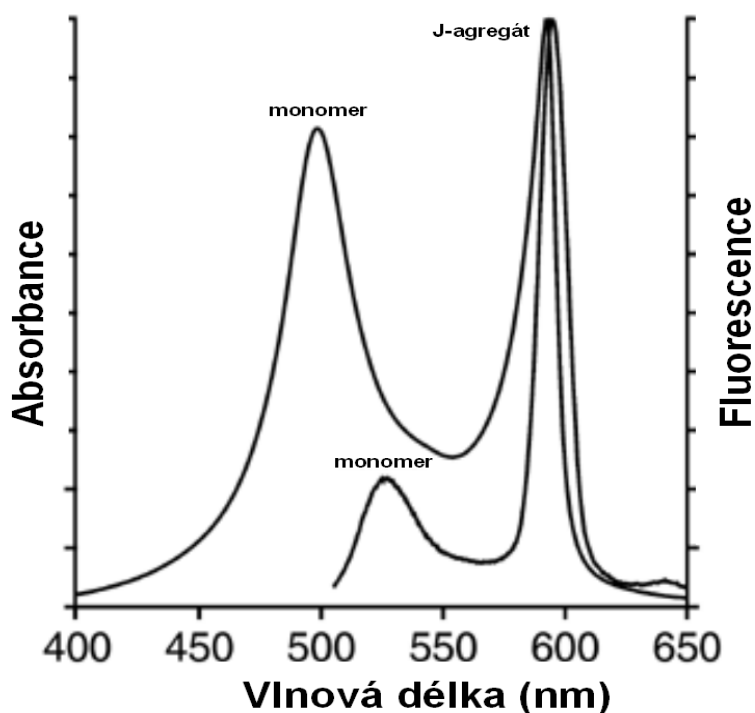
1. Játra se odeberou v éterové narkóze potkana.
2. Nastříhneme kůži levé horní končetiny a prostříhnutím a. axillaris potkana vykrvíme a krev pomocí buničiny odsajeme.
3. Břišní část se potře dezinfekčním roztokem.
4. Nástřihem kůže a svaloviny do tvaru V otevřeme dutinu břišní a viscerální orgány odsuneme k levé straně.

5. Nastříháme v. portae a zavedeme do ní katetr napojený na injekční stříkačku s ledovým H-médiem s 0,5 mM EGTA.
6. Játra promyjeme, vystříháme z dutiny břišní a poté je opláchneme v ledovém H médiu s 0,5 mM EGTA.
7. Celou izolaci provádíme na ledu.
8. Z jater odebereme 1 g tkáně, který v 20 ml H roztoku obsahující 0,5 mM EGTA nastříháme na malé kousky a směs přemístíme do homogenizační zkumavky.
9. Směs homogenizujeme v Potter Elvehjemově homogenizátoru s teflonovým pístem při 300 RPM.
10. Homogenát přelijeme do centrifugační falkony a centrifugujeme 4 min při 830 g při 4°C.
11. Supernatant opatrně přelijeme do další falkony přes filtr a centrifugujeme 15 min při 5200 g při 4°C.
12. Poté supernatant odlijeme a sediment resuspendujeme v 30 ml ledového H média.
13. Suspenzi centrifugujeme 10 min při 11200 g při 4°C.
14. Opět supernatant odlijeme a sediment resuspendujeme v 15 ml ledového H média.
15. Suspenzi centrifugujeme 10 min při 14400 g při 4°C.
16. Supernatant odlijeme a sediment resuspendujeme v 10 ml H média.
17. Suspenzi mitochondrií následně pro další analýzy rozpipetujeme do 10 mikrozkuvek po 1 ml.
18. Před použitím suspenze stanovíme obsah proteinů pomocí Bradfordovy metody.

2.5 Membránový potenciál

Funkční integritu mitochondrií je možné posoudit pozorováním membránového potenciálu ($\Delta\psi$). Pro monitorování mitochondriálního membránového potenciálu je používáno kationtové karbokyanidové barvivo JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanin iodide), které se akumuluje v mitochondriální matrix (Reers, 1991). Membránový potenciál ovlivňuje přerozdělení tohoto barviva. Jeho rozdělení závisí na transmembránovém elektrickém poli, které je v matrix negativní, a na koncentračním gradientu barviva. Fluorofor JC-1 má tu vlastnost, že emisní spektrum při excitaci 490 nm závisí na koncentraci molekul. Při zředění roztoku

≤ 300 nM dává zelenou fluorescenci o vlnové délce 527 nm (Obr. 17). Pokud je koncentrace větší než 1mM, dává JC-1 velice výraznou červeno-oranžovou fluorescenci o vlnové délce 590 nm, a to v důsledku tvorby agregátů barviva, tzv. J-agregátů. V mitochondriální matrix, která je ohraničena vnitřní membránou s vysokým membránovým potenciálem, je vnější koncentrace barviva na úrovni, jenž umožňuje tvorbu J-agregátů. Hodnocení intenzity fluorescence při 590 nm je jednoduchý a vhodný indikátor $\Delta\psi$ (Salvioli, 1997).



Obr. 17. Absorpční a fluorescenčně emisní spektra JC-1 v pufru o pH 8,2 obsahující 1% (v/v) DMSO (upraveno dle *Invitrogen*).

2.5.1 Postup

1. Připravíme si roztoky 1x reakční pufr pro JC-1, roztok JC-1 a 1x uchovávací pufr (postup uveden v přípravě roztoků).
2. Pomocí Bradfordovy metody stanovíme množství proteinů v mitochondriální frakci a poté ji doředíme na výslednou koncentraci 1 mg/ml H-médiem.
3. Do 96-jamkového panelu napipetujeme jednotlivé regencie (Tab.2), a to v pořadí 1x reakční pufr pro JC-1, derivát BetA, 1x uchovávací pufr a mitochondriální frakce. Na závěr přidáme JC-1.

4. Po přidání JC-1 a promíchání směsi necháme panel přikrytý hliníkovou fólií ve tmě při pokojové teplotě po dobu 7 minut z důvodu kompletní absorpce barviva do mitochondrií.
5. Fluorescenci čteme pomocí fluorimetru za následujícího nastavení:
Excitační vlnová délka = 490 nm
Emisní vlnová délka = 590 nm
6. Měření provádíme po dobu 3 hodin; první hodinu po 10 minutách a poté po 30 minutách.

Tab.2: Reakční schéma pro měření membránového potenciálu.

Vzorek	1x reakční pufr pro JC-1 (μl)	Derivát BetA nebo DMSO (μl)	1x uchovávací pufr (μl)	Mitochondriální frakce MF (μl)	JC-1 (μl)
Blank	190	-	10	-	0,5
MF	190	-	8	2	-
MF	190	-	8	2	0,5
MF + JS3.723 1x IC ₅₀	190	1	7	2	0,5
MF + JS3.723 5x IC ₅₀	190	1	7	2	0,5
MF + JS3.923 1x IC ₅₀	190	1	7	2	0,5
MF + JS3.923 5x IC ₅₀	190	1	7	2	0,5
MF + JS3.695 1x IC ₅₀	190	1	7	2	0,5
MF + JS3.695 5x IC ₅₀	190	1	7	2	0,5
MF + JS3.992 1x IC ₅₀	190	1	7	2	0,5
MF + JS3.992 5x IC ₅₀	190	1	7	2	0,5
MF + JS3.879 1x IC ₅₀	190	1	7	2	0,5
MF + JS3.879 5x IC ₅₀	190	1	7	2	0,5
MF + JS8 1x IC ₅₀	190	1	7	2	0,5
MF + JS8 5x IC ₅₀	190	1	7	2	0,5
MF + 20x IC ₅₀	190	1	7	2	0,5
MF + BetA 1x IC ₅₀	190	1	7	2	0,5
MF + BetA 5x IC ₅₀	190	1	7	2	0,5

2.6 Integrita vnější mitochondriální membrány

Integritu vnější mitochondriální membrány můžeme hodnotit pomocí měření aktivity mitochondriální cytochrom c oxidasy v přítomnosti (pozitivní kontrola, která vede k permeabilizaci vnější mitochondriální membrány) a také absenci detergentu (negativní kontrola). Cytochrom c oxidasa je dimer a obě jednotky obsahují 13

neidentických podjednotek. Detergenty extrahují enzym z membrány, nicméně často strukturu dimeru narušují. N-dodecyl β -D-maltosid (DDM) je jeden z mála detergentů, který při nízkých koncentracích zachovává dimerní strukturu enzymu a tím i jeho funkčnost (Musatov, 2000).

Cytochrom c, který používáme po jeho redukcí dithiotreitem, má úzký absorpční pás při 550 nm. Po oxidaci je tento pás s nižší intenzitou a širší. Pokud je vnější mitochondriální membrána permeabilizovaná a cytochrom c se dostane dovnitř mitochondrie, tak při měření pozorujeme pokles jeho absorbance při 550 nm v důsledku oxidace na fericytochrom c cytochrom c oxidasou. Redukovaný cytochrom c (ferocytochrom c) má oproti oxidovanému cytochromu c (fericytochromu c) odlišný extinkční koeficient. Tento rozdíl je 21,84 při 550 nm.

2.6.1 Postup

1. Pomocí Bradfordovy metody stanovíme množství proteinů v mitochondriální frakci.
2. Jednu část frakce naředíme na výslednou koncentraci 0,15 mg/ml pomocí 1x ředícího pufru pro enzym a druhou část frakce naředíme 1x ředícím pufrem pro enzym obsahující 1 mM n-dodecyl β -D-maltosid také na koncentraci 0,15 mg/ml.
3. Naředěné vzorky jednotlivých frakcí inkubujeme před analýzou 10 min při teplotě 2-8 °C.
4. Připravíme si 1x reakční pufr pro cytochrom c oxidasu, 1x ředící pufr pro enzym, 1x ředící pufr pro enzym obsahující 1 mM n-dodecyl β -D-maltosid, roztok ferocytochromu c a cytochrom c oxidasu (postup je uveden v přípravě roztoků).
5. Do 96 jamkového panelu napipetujeme jednotlivé reagentie (Tab.3). Nejprve napipetujeme 1x reakční pufr pro cytochrom c oxidasu, poté deriváty BetA, 1x ředící pufr pro enzym, cytochrom c oxidasu a mitochondriální frakce.
6. Do jamek obsahujících BetA a její deriváty přidáváme mitochondriální frakce v 1x ředícím pufrem pro enzym.
7. Reakci spustíme přidáním ferocytochromu c, směs promícháme a ihned měříme.

8. Absorbanci čteme pomocí spektrofotometru při 550 nm při teplotě 21°C po dobu 25 minut v intervalech 78 sekund. K vyhodnocení byl použit interval 15 minut od zahájení reakce.

Tab.3: Reakční schéma pro měření aktivity cytochrom c oxidasy.

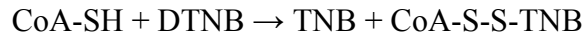
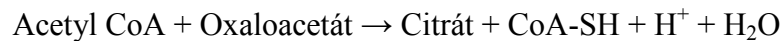
Vzorek	1x reakční pufr pro cytochrom c oxidasu (μ l)	Derivát BetA nebo DMSO (μ l)	1x enzym zředovací pufr (μ l)	Mitochondriální frakce MF nebo pozitivní kontrola (μ l)	Ferrocycyochrom c (μ l)
Blank	173	-	18	-	9
Pozitivní kontrola	173	-	10	8	9
MF	173	-	8	10	9
MF s detergentem	173	-	8	10	9
MF + JS3.723 1x IC ₅₀	173	1	7	10	9
MF + JS3.723 5x IC ₅₀	173	1	7	10	9
MF + JS3.923 1x IC ₅₀	173	1	7	10	9
MF + JS3.923 5x IC ₅₀	173	1	7	10	9
MF + JS3.695 1x IC ₅₀	173	1	7	10	9
MF + JS3.695 5x IC ₅₀	173	1	7	10	9
MF + JS3.992 1x IC ₅₀	173	1	7	10	9
MF + JS3.992 5x IC ₅₀	173	1	7	10	9
MF + JS3.879 1x IC ₅₀	173	1	7	10	9
MF + JS3.879 5x IC ₅₀	173	1	7	10	9
MF + JS8 1x IC ₅₀	173	1	7	10	9
MF + JS8 5x IC ₅₀	173	1	7	10	9
MF + 20x IC ₅₀	173	1	7	10	9
MF + BetA 1x IC ₅₀	173	1	7	10	9
MF + BetA 5x IC ₅₀	173	1	7	10	9

2.7 Integrita vnitřní mitochondriální membrány

Integritu vnitřní mitochondriální membrány měříme hodnocením aktivity enzymu citrát syntasy, který je umístěn za vnitřní mitochondriální membránou a katalyzuje první reakci Krebsova cyklu, v níž acetyl CoA reaguje s oxaloctovou kyselinou za tvorby kyseliny citronové. Acetyl CoA přispívá dvěma uhlíky k čtyřuhlíkatému oxaloacetátu za vzniku šestiuhlíkatého citrátu.

Hydrolyzou thioesteru acetylu CoA vzniká CoA obsahující thiol skupinu (CoA-SH). CoA-SH reaguje s 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoovou kyselinou) (DTNB), která je

v reakční směsi, a vzniká tak 5-thio-2-nitrobenzoová kyselina (TNB). Absorbanci tohoto žlutého produktu měříme při 412 nm (*Srere, 1969*).



Aktivita naměřena u vzorku s mitochondriální frakcí resuspendovanou v Bicine pufru představuje aktivitu enzymu způsobenou narušením membrán mitochondrií během izolace nebo působením BetA a jejích derivátů.

2.7.1 Postup

1. Pomocí Bradfordovy metody stanovíme množství proteinů v mitochondriální frakci.
2. Zkumavku obsahující 2 ml suspenze mitochondrií (z cca 0,2 g tkáně v H-médiu) centrifugujeme 10 minut při 11000 g při 4°C.
2. H-médium odlijeme a do zkumavky přidáme cca 300 μl Bicine pufru a pelety resuspendujeme.
3. Opět centrifugujeme 10 minut při 11000 g při 4°C.
4. Bicine pufr odlijeme a naředíme Bicine puftrem tak, aby ve výsledném vzorku bylo obsaženo nejméně 8 μg proteinů.
5. Poté si připravíme 1x reakční pufr pro citrát syntasu, 30 mM acetyl CoA a 10 mM DTNB, citrát syntasu a 10 mM oxaloacetát (postup je uveden v přípravě roztoků).
6. Do 96 jamkového panelu napipetujeme 1x reakční pufr pro citrát syntasu, 30 mM acetyl CoA, 10 mM DTNB, citrát syntasu a mitochondriální frakce (Tab.4).
7. Do jamek obsahující BetA přidáváme mitochondriální frakci v Bicine pufru.
8. Multikanálovou pipetou přidáme 10 mM oxaloacetátu a směs promícháme.
9. Poté měříme absorbanci při 412 nm po dobu 1,5 hodiny v intervalech 78 sekund. K vyhodnocení byl použit interval 67 minut od zahájení reakce.

Tab.4: Reakční schéma pro měření aktivity citrát syntasy.

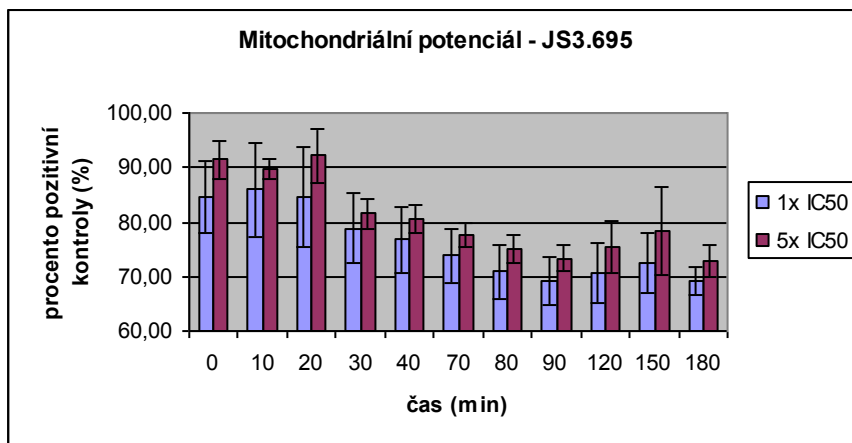
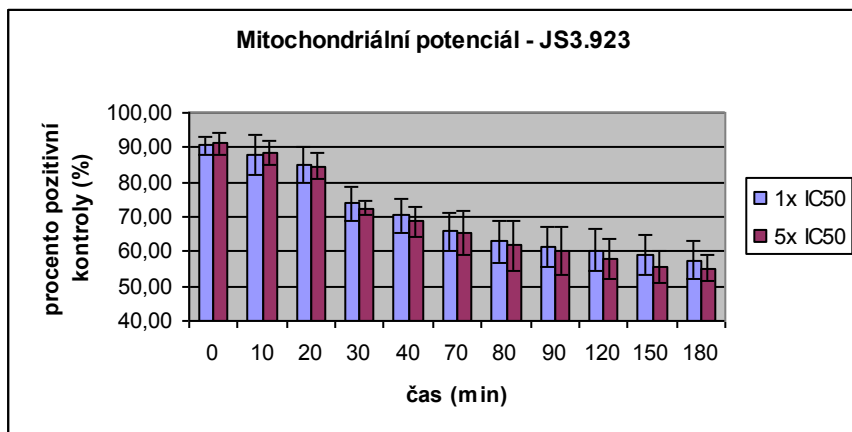
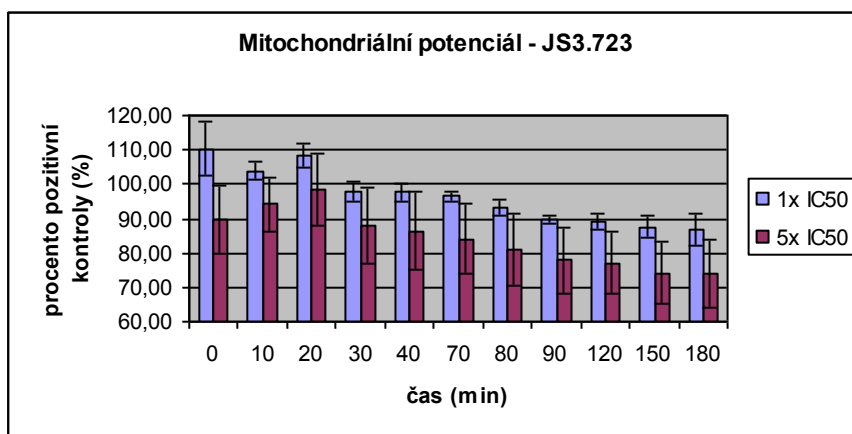
Vzorek	1x Testovací pufr pro citrát syntasu (μ l)	Derivát BetA nebo DMSO (μ l)	30 mM Acetyl CoA	10 mM DTNB (μ l)	Mitochondriální frakce MF nebo pozitivní kontrola (μ l)	10 mM OOA (μ l)
Blank	186	-	2	2	2	10
Pozitivní kontrola	171	-	2	2	2	10
MF v Bicine pufru	184	-	2	2	2	10
MF + JS3.723 1x IC ₅₀	183	1	2	2	2	10
MF + JS3.723 5x IC ₅₀	183	1	2	2	2	10
MF + JS3.923 1x IC ₅₀	183	1	2	2	2	10
MF + JS3.923 5x IC ₅₀	183	1	2	2	2	10
MF + JS3.695 1x IC ₅₀	183	1	2	2	2	10
MF + JS3.695 5x IC ₅₀	183	1	2	2	2	10
MF + JS3.992 1x IC ₅₀	183	1	2	2	2	10
MF + JS3.992 5x IC ₅₀	183	1	2	2	2	10
MF + JS3.879 1x IC ₅₀	183	1	2	2	2	10
MF + JS3.879 5x IC ₅₀	183	1	2	2	2	10
MF + JS8 1x IC ₅₀	183	1	2	2	2	10
MF + JS8 5x IC ₅₀	183	1	2	2	2	10
MF + 20x IC ₅₀	183	1	2	2	2	10
MF + BetA 1x IC ₅₀	183	1	2	2	2	10
MF + BetA 5x IC ₅₀	183	1	2	2	2	10

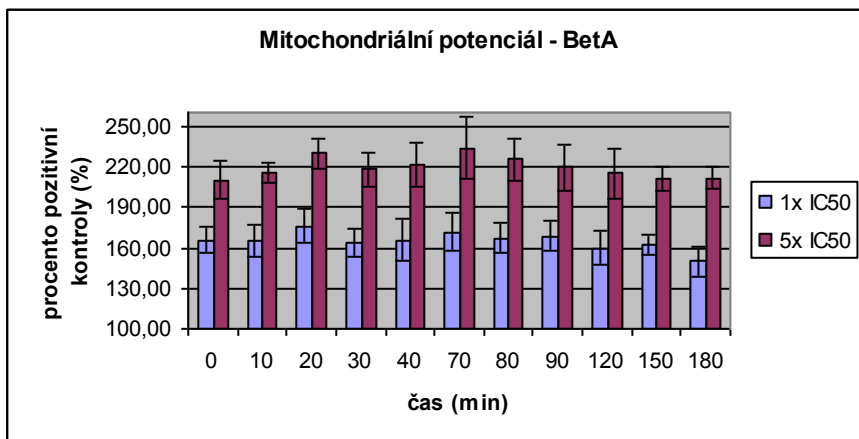
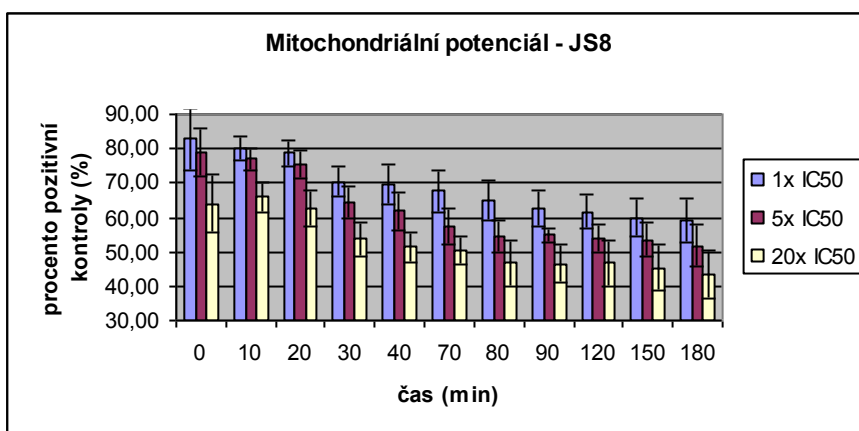
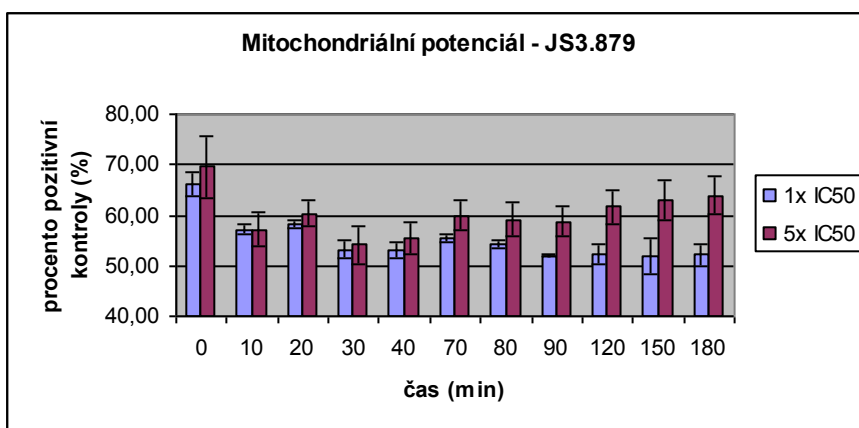
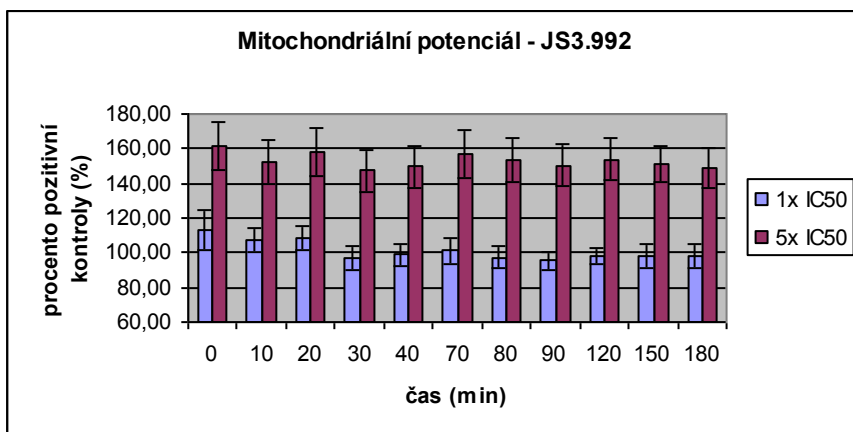
2.8 Výsledky

2.8.1 Hodnocení membránového potenciálu

Měřením mitochondriálního potenciálu můžeme posoudit funkční stav mitochondrií. Při zvýšení membránového potenciálu dochází k tzv. hyperpolarizaci membrány a bylo popsáno, že tento jev úzce souvisí se zvýšenou produkcí kyslíkatých radikálů a může vést k buněčné smrti (*Matarrese, 2003*). Naopak snížení potenciálu ukazuje na funkční poškození mitochondrií, kdy dochází k inhibici komplexů oxidativní fosforylace a nebo permeabilizaci mitochondriální membrány, což vede až k indukci apoptosy. Na základě hodnocení mitochondriálního potenciálu jsme pozorovali, že většina derivátů vedla k výrazným změnám v mitochondriálním potenciálu vůči pozitivní kontrole. Identifikovány byly jak deriváty, které membránový potenciál zvyšovaly (BetA), tak i

ty, které jej snižovaly (JS3.723, JS4.923, JS3.695, JS3.879, JS8). U derivátu JS3.992 docházelo k nepatrnému snížení potenciálu u koncentrace 1x IC₅₀, zatímco u koncentrace 5x IC₅₀ se potenciál výrazně zvyšoval. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v grafech, které jsou normalizované vůči pozitivní kontrole (Obr. 18). Jako pozitivní kontrolu jsme použili samotnou mitochondriální frakci, u které jsme určili průměrnou hodnotu absorbance jako 100%. U mitochondriálních frakcí s BetA a jejími deriváty jsme přepočítali jejich průměrné hodnoty absorbancí v % vůči pozitivní kontrole.

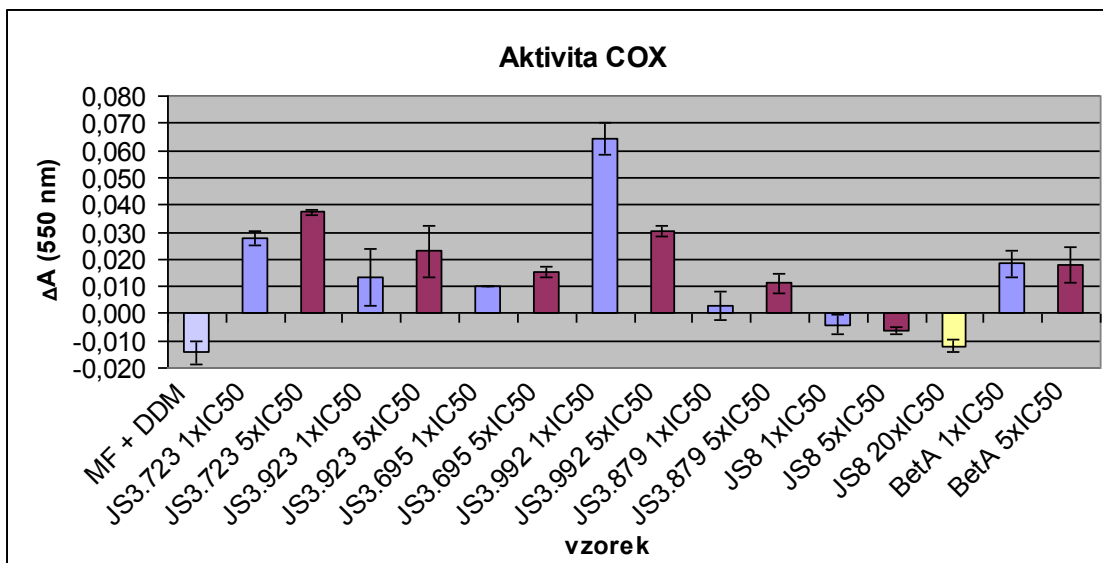




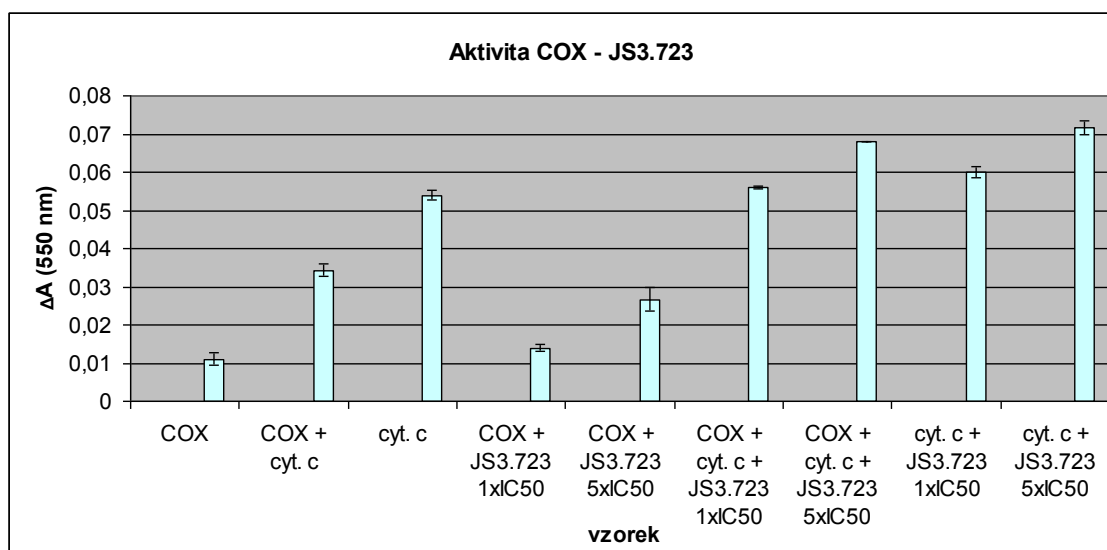
Obr. 18: Změny mitochondriálního potenciálu normalizované vůči pozitivní kontrole.

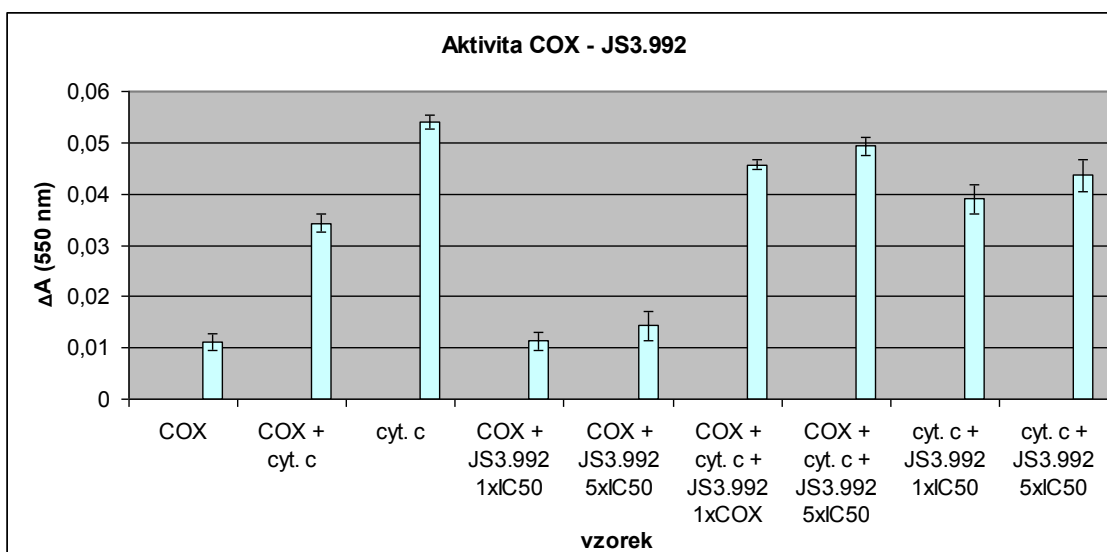
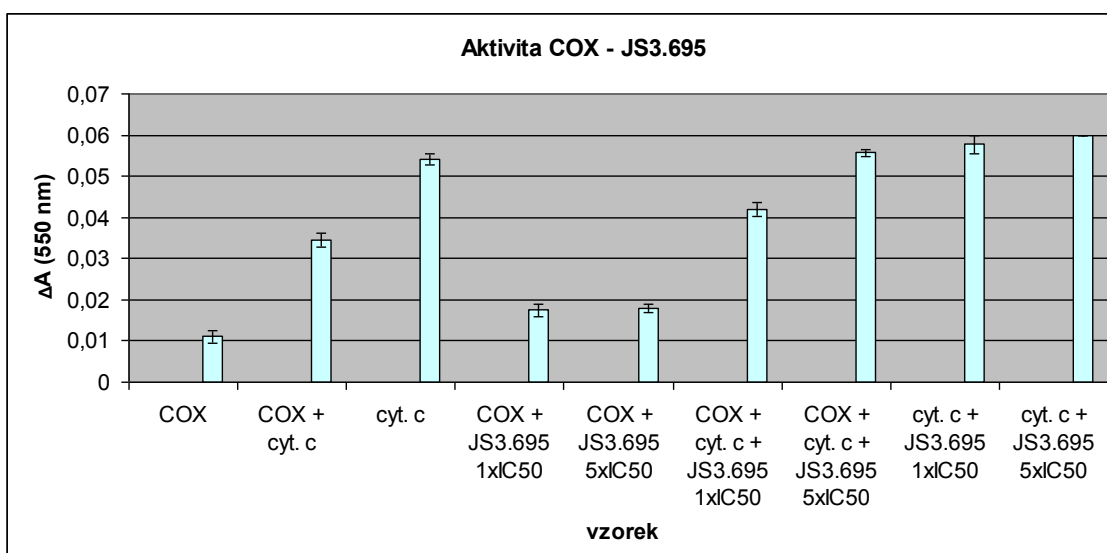
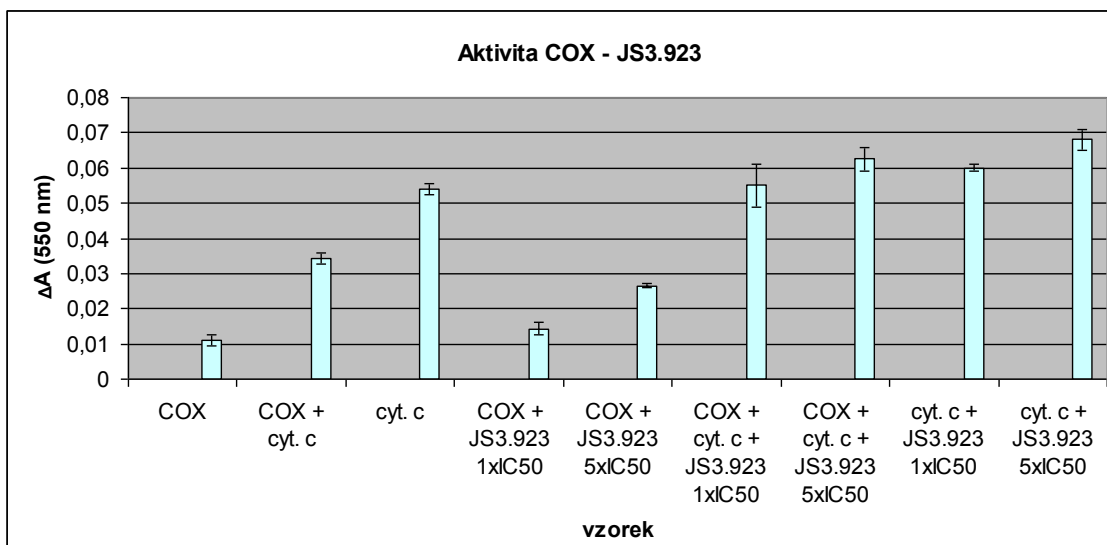
2.8.2 Integrita vnější mitochondriální membrány

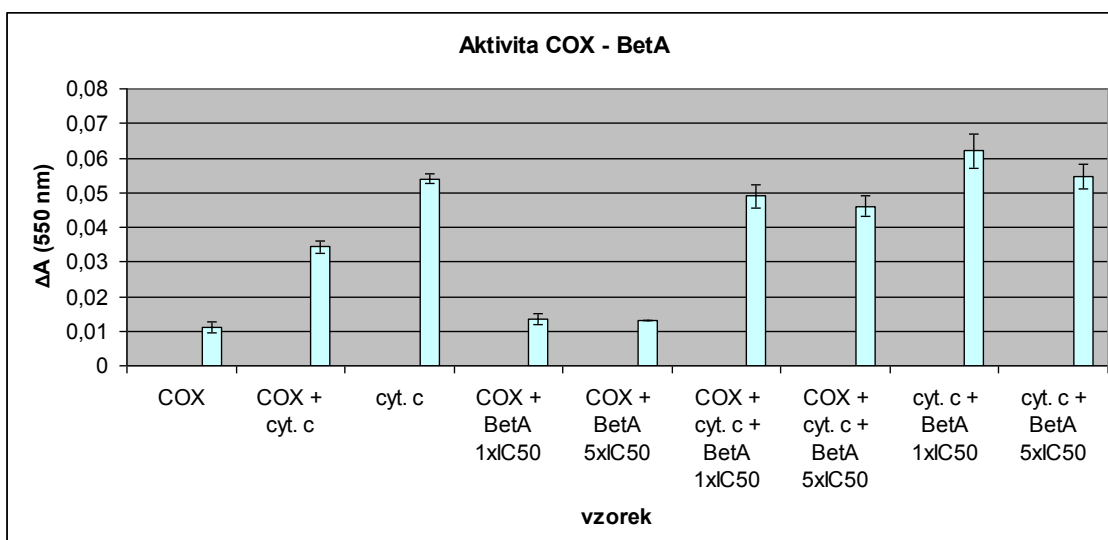
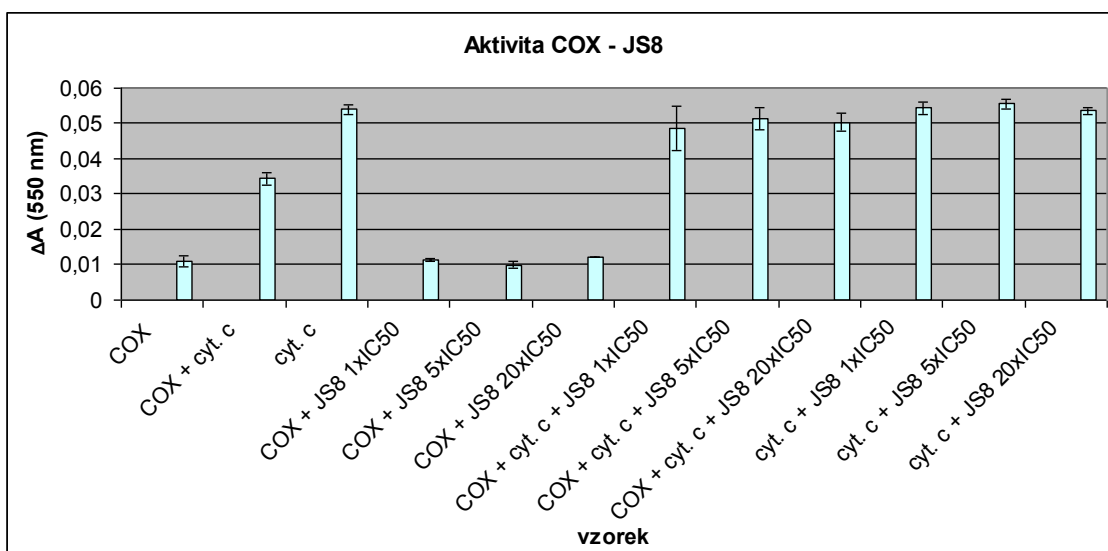
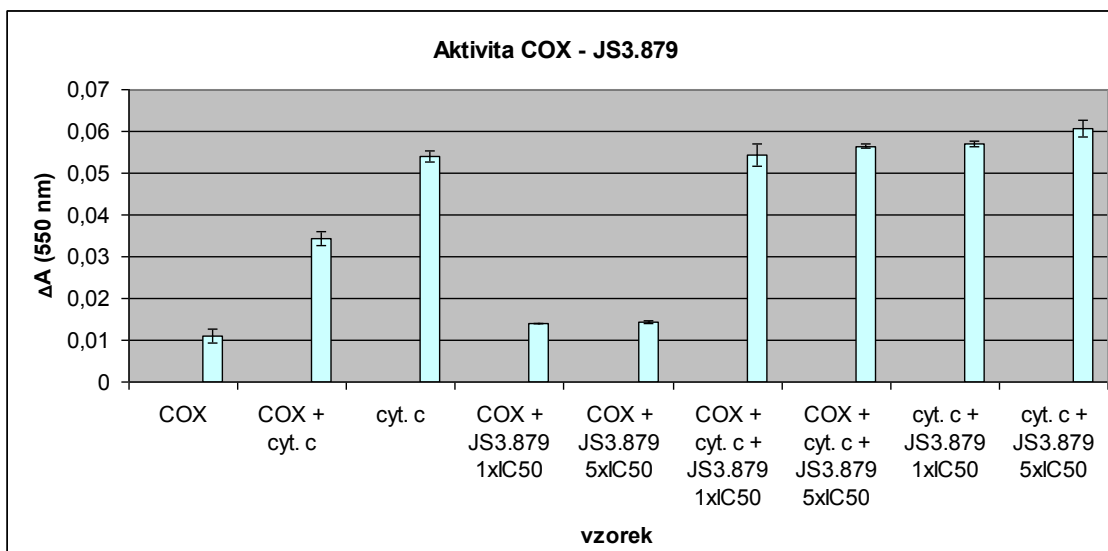
Pomocí testu hodnocení aktivity cytochrom c oxidasy (COX) můžeme zhodnotit míru permeabilizace vnější mitochondriální membrány způsobenou testovanými sloučeninami. Permeabilizace vnější mitochondriální membrány způsobí to, že ferocytochrom c se dostane k COX do mezimembránového prostoru, která jej oxiduje na fericytochrom c, čímž dojde k poklesu absorbance. Jako kontrola nejvyšší možné aktivity cytochromu c k ferocytochromu c byla použita mitochondriální frakce obsahující n-dodecyl β -D-maltosid (DDM), který provede permeabilizaci vnější mitochondriální membrány za současného zachování aktivity COX. U derivátů, které permeabilitu mitochondriální membrány neovlivní, nedochází k poklesu absorbance. Z měření bylo zjištěno, že většina testovaných látek (JS3.723, JS3.923, JS3.695, JS3.992, JS3.879, BetA) paradoxně zvyšovala absorbanci ferocytochromu c vůči pozitivní kontrole v důsledku jeho nedostatečné oxidace na fericytochrom c cytochrom c oxidasou. JS8 jako jediná absorbanci mírně snižovala a to v závislosti na její koncentraci. V grafu jsou znázorněny hodnoty změn absorbancí normalizované vůči pozitivní kontrole (Obr. 19). Výsledky pro nás byly překvapivé, protože předchozí testy hodnocení mitochondriálního potenciálu naopak poukazovaly na permeabilizaci vnější mitochondriální membrány. Proto, aby se vyloučila chybná interpretace testu, byl proveden enzymatický test. Z enzymatického testu vyplynulo, že látky zřejmě inhibují interakci mezi cytochromem c a COX a nebo samotnou aktivitu COX, protože hodnoty absorbancí se buď nemění a nebo se zvýšily. Na samotný cytochrom c neměly deriváty BetA vliv. Jediná výjimka byla pozorována u derivátu JS3.992, kdy došlo k snížení absorbance ferocytochromu, což bylo pravděpodobně způsobeno oxidačnickými účinky látky JS3.992 a nebo přímou interakcí derivátu s cytochromem c (Obr. 20).



Obr. 19: Permeabilizace vnější mitochondriální membrány vlivem BetA a jejich derivátů. V grafu je vynesena změna absorpance normalizovaná vůči pozitivní kontrole.



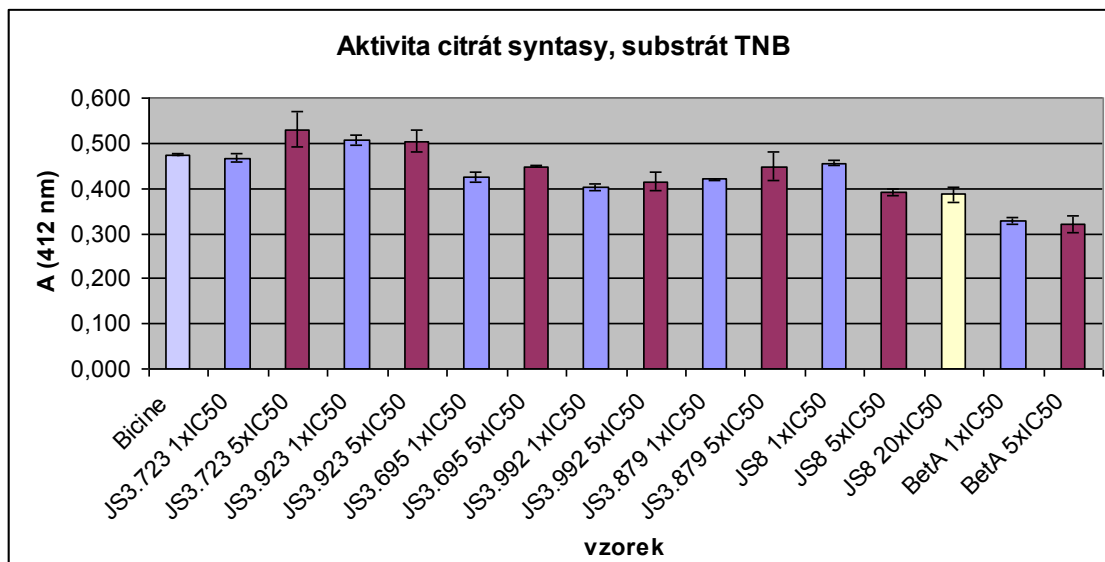




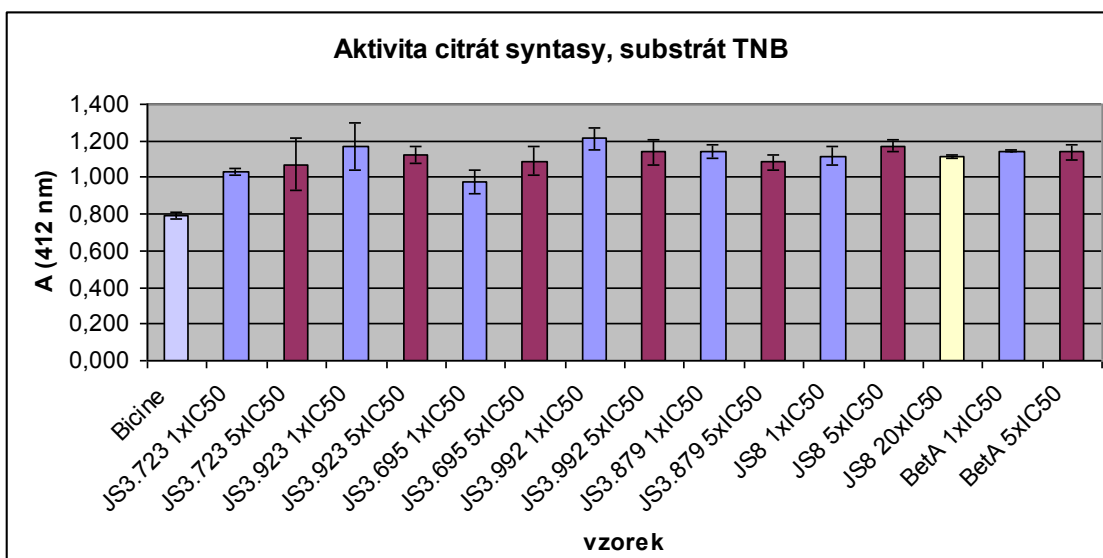
Obr. 20: Enzymatický test hodnocení aktivity COX.

2.8.3 Integrita vnitřní mitochondriální membrány

Integrita vnitřní mitochondriální membrány byla hodnocena na základě míry aktivity citrát syntasy, která je lokalizována až za vnitřní mitochondriální membránou. Proto u mitochondrií, které nemají permeabilizovanou vnější a současně vnitřní mitochondriální membránu, nejsme schopni měřit absorbanci žlutého produktu TNB, který vzniká reakcí CoA-SH a DTNB, kdy přeměna acetyl CoA a oxaloacetátu na CoA-SH je katalyzována citrát syntasou, která je lokalizovaná až za vnitřní mitochondriální membránou. Na základě našich prvních testů se ukázalo, že deriváty JS3.695, JS3.992, JS3.879, JS8, BetA permeabilizaci vnitřní membrány neindukovaly. Pouze použití derivátu JS3.723 o koncentraci 5x IC₅₀ vedlo k porušení integrity vnitřní mitochondriální membrány. Derivát JS3.923 také permeabilizoval vnitřní membránu, ale s menším rozdílem (Obr. 21). Důvod, proč nedochází k permeabilizaci vnitřní mitochondriální membrány, jsme hledali v možném vlivu Ca²⁺ iontů. Při izolaci mitochondrií bylo v první variantě použito chelatační činidlo EGTA, které má vysokou afinitu k iontům Ca²⁺. V měření, kdy chelatační činidlo nebylo pro izolaci mitochondrií použito jsme pozorovali, že všechny deriváty BetA včetně samotné BetA silně permeabilizovaly vnitřní mitochondriální membránu (Obr. 22). Proto usuzujeme, že pro účinek triterpenů je nezbytná přítomnost vápenatých iontů.



Obr. 21: Permeabilizace vnitřní mitochondriální membrány vlivem BetA a jejich derivátů u vzorku mitochondrií izolovaných za přítomnosti EGTA.



Obr. 22: Permeabilizace vnitřní mitochondriální membrány vlivem BetA a jejich derivátů u vzorku mitochondrií izolovaných bez přítomnosti EGTA.

2.9 Diskuze

Naše měření ukázaly, že ačkoliv se jedná o strukturně velmi podobné deriváty kyseliny betulinové, tak mechanismy působení jednotlivých molekul jsou s velkou pravděpodobností rozdílné.

Při našich testech jsme udělali několik zajímavých pozorování. Například při hodnocení vlivu derivátů BetA na mitochondriální potenciál došlo působením látek JS3.723, JS3.923, JS3.695, JS3.879 a JS8 k jeho předpokládanému snížení. Bylo však zajímavé, že BetA způsobila silnou hyperpolarizaci mitochondriální membrány o více než dvojnásobek oproti normálnímu stavu. Je popsáno, že hyperpolarizace mitochondriální membrány může být známkou zvýšené tvorby volných radikálů a předcházet vlastní buněčnou smrt. Nicméně, v předešlých pracech prováděných na mitochondriích izolovaných z buněk neuroblastomu nebyl tento efekt pozorován a membránový potenciál bez předchozího nárustu prudce poklesl. Je pravděpodobné, že vzhledem k vysoce aktivnímu metabolismu má nádorová buňka a také mitochondrie nádorové buňky nedostatečné kompenzační mechanismy a již menší a kratší oxidativní stres vede k permeabilizaci mitochondriální membrány a k poklesu mitochondriálního potenciálu. V našich pozorováních bylo také zajímavé, že derivát JS3.992, který je ze všech použitých sloučenin nejvíce podobný BetA, liší se pouze modifikovanou isopropylidenovou skupinou, má podobný vliv na mitochondriální potenciál. Při

koncentraci 5x IC₅₀ tato molekula zvyšovala membránový potenciál o cca 50% oproti pozitivní kontrole a u koncentrace 1x IC₅₀ došlo jen k nepatrnému snížení.

Další zajímavé pozorování jsme provedli při hodnocení permeability vnější mitochondriální membrány po působení derivátů BetA pomocí hodnocení aktivity cytochrom c oxidasy. V tomto testu se jeví, že vnější mitochondriální membrána není permeabilizovaná a přitom předešlé testy napovídaly, že by měla být. Proto jsme chtěli ověřit, zda test, který používáme je funkční, hodnocením aktivity purifikované COX. Z tohoto testu bylo zřejmé, že působením všech derivátů i samotnou BetA docházelo k inhibici funkce nebo interakce mezi COX a cytochromem c. U JS8 jsme pozorovali, že i když podobně inhibuje cytochrom c oxidasu, tak i přesto došlo k oxidaci ferocytochromu c. Pro podrobnější studium vlivu na komplexy dýchacího řetězce by bylo vhodné použít vysoko-rozlišovací respiometrii. Pokud bychom chtěli v dalších analýzách změřit míru permeabilizace vnější membrány, bylo by vhodné zvolit jiný test, který není závislý na enzymatické aktivitě.

Dalším testem jsme hodnotili integritu vnitřní mitochondriální membrány pomocí měření aktivity citrát syntasy. V tomto případě jsme identifikovali látky, které nezpůsobovaly její permeabilizaci (JS3.695, JS3.992, JS3.879, JS8, BetA) a látky, které naopak membránu permeabilizují (JS3.723 při koncentraci 5xIC₅₀ a JS3.923). Z testů, kde nebylo použito chelatační činidlo EGTA k vyloučení Ca²⁺ iontů bylo vidět, že Ca²⁺ hrají velice důležitou roli v ovlivnění mechanismů vedoucích ke spuštění apoptosy. Aktivita citrát syntasy v přítomnosti Ca²⁺ iontů a derivátů BetA prudce vzrostla, integrita membrány byla tedy silně narušena.

Testy byly provedeny pouze na mitochondriích izolovaných z nenádorové jaterní tkáně. Pro objasnění například hyperpolarizace membrány mitochondrií po působení Bet by bylo vhodné provést testy jak na normálních, tak i na nádorových buněčných liniích a na mitochondriích izolovaných z nádorové tkáně.

Naše studie ukázala, že i strukturně podobné deriváty BetA vykazují různé a někdy i zásadní rozdíly ve vlastnostech a účincích a je proto velmi pravděpodobné, že cílů těchto sloučenin bude několik. Proto je vhodné dále pracovat na identifikaci molekulárních cílů triterpenů a na přípravě dalších sloučenin, které by mohly mít potenciál pro protinádorovou terapii.

3. Závěr

Cílem práce bylo zavést metodu izolace mitochondrií z jater potkana.

Ve druhé části práce jsme se zabývali monitorováním vlivu derivátů BetA na funkci a integritu mitochondrií. Díky značení mitochondrií pomocí proby JC-1 jsme byli schopni pozorovat změny mitochondriálního potenciálu způsobené BetA a jejími deriváty za použití fluorimetru. K měření integrity vnitřní a vnější mitochondriální membrány jsme využili specifické reakce enzymů, které se podílejí na metabolických procesech mitochondrií a jsou umístěny buď v mezimembránovém nebo vnitřním prostoru mitochondrií.

V práci byly identifikovány látky, které zasahují do funkce mitochondrií. K podrobné identifikaci molekulárních cílů triterpenů je nutné provést analýzy, které se budou specificky zaměřovat na jednotlivé proteiny a enzymy klíčové pro funkci mitochondrií.

Cíle této bakalářské práce byly splněny.

Adrain, C. – Creagh, E. M. – Martin, S. J. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires caspases and is blocked by Bcl-2. *The EMBO Journal*, 2001, vol. 20, s.6627-6636.

Adrain, C. - Duriez, P. J. - Brumatti, G. - Delivani, P. – Martin, S. J. The Cytotoxic Lymphocyte Protease, Granzyme B, Targets the Cytoskeleton and Perturbs Microtubule Polymerization Dynamics. *The journal of biological chemistry*, 2006, vol. 281, s. 8118–8125.

Ahmad, R. – Raina, D. – Meyer, C. – Kharbanda, S. – Kuf, D. Triterpenoid CDDO-Me Blocks the NF- κ B Pathway by Direct Inhibition of IKK β on Cys-179. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, vol. 281, s. 35764–35769.

Alberts, B. – Bray, D. – Johnson, A. – Lewis, J. – Raff, M. – Roberts, K. – Walter, P. *Základy buněčné biologie, Úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 2005, s. 199-121, 410-428. ISBN 80-902906-2-0.

Bernardi, P. - Scorrano, L. – Colonna, R. - Petronilli, V. - Di Lisa, F. Mitochondrie and cell death. *European Journal of Biochemistry*, 1999, vol. 264, s. 687–701.

Brookes, P. S. - Yoon, Y. - Robotham, J. L. - Anders, M. W. – Sudu, S. S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2004, vol. 287:, s. 817–833.

Brück, T. B. – Brück, D. W. Oxidative metabolism of the anti-cancer agent mitoxantrone by horseradish, lacto-and lignin peroxidase. *Biochemie*, 2011, vol. 93, s. 217-226.

Brück, T. B. – Harvey, P. J. Oxidation of mitoxantrone by lactoperoxidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003, vol. 1649, s. 154–163.

Bustamante, E. – Soper, J. W. – Pedersen, P. L. A high-yield preparative method for isolation of rat liver mitochondria. *Analytical Chemistry*, 1977, vol. 80, s. 401-408.

Cadenas, E. - Davies, K. J. A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology & Medicine*, 2000, vol. 29, s. 222–230.

Cohen, J. J. Apoptosis: Mechanisms of life and death in the immune system. *The Journal of allergy Allergy and Clinical Immunology*, 1999, vol. 103, s. 548-554.

- Cullen, S. P. – Martin, S. J. Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death and Differentiation*, 2008, vol. 15, s. 251–262.
- Daniel, N. N. – Korsmeyer, S. J. Cell Death: Critical Control Points. *Cell*, 2004, vol. 116, s. 205-219.
- Davis, S. - Weiss, M. J. - Wong, J. R. - Lampidis, T. J. - Chen, L. B. Mitochondrial and Plasma Membrane Potential Cause Unusual Accumulation and Retention of Rhodamine 123 by Human Breast Adenocarcinoma-derived MCF-7 Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 1985, vol. 260, s. 13844-13850.
- Deeb, D. - Gao, X. – Dulchavsky, S. A. – Gautam, S. C. CDDO-Me Induces Apoptosis and Inhibits Akt, mTOR and NF- κ B Signaling Proteins in Prostate Cancer Cells. *Anticancer Research*, 2007, vol. 27, s. 3035-3044.
- Deeb, D. - Gao, X. - Jiang, H. - Janic, B. - Arbab, A. S. - Rojanasakul, Y. - Dulchavsky, S. A. – Gautam, S. C. Oleanane triterpenoid CDDO-Me inhibits growth and induces apoptosis in prostate cancer cells through a ROS-dependent mechanism. *Biochemical Pharmacology*, 2010, vol. 79, s. 350–360.
- Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 2007, vol. 35, s. 495–516.
- Esposti, M. D. – Dive, C. Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, vol. 304, s. 455–461.
- Gogvadze, V. – Orrenius, S. - Zhivotovsky B. Mitochondria as targets for cancer chemotherapy. *Seminars in Cancer Biology*, 2009, vol. 19, s. 57–66.
- Fearnhead, H. O. - MacFarlane, M. - Dinsdale, D. – Cohen, G. M. DNA degradation and proteolysis in thymocyte apoptosis. *Toxicology Letters*, 1995, vol. 82/83, s. 135-141.
- Frey, T. G. – Mannella, C. A. The internal structure of mitochondria. *Trends in Biochemical Science*, 2000, vol. 25, s. 319-324.
- Fulda, S. – Kroemer, G. Targeting mitochondrial apoptosis by betulinic acid in human cancers. *Drug Discovery Today*, 2009, vol. 14, s. 885-890.

Fulda, S. - Scaffidi, C. - Susin, S. A. - Krammer, P. H. - Kroemer, G. - Peter, M. E. – Debatin, K. M. Activation of Mitochondria and Release of Mitochondrial Apoptogenic Factors by Betulinic Acid. *The journal of biological chemistry*, 1998, vol. 273, s. 33942–33948.

Gordeeva, A. V. - Zvyagil'skaya, R. A. – Kavas, Y. A. Cross-Talk between Reactive Oxygen Species and Calcium in Living Cells. *Biochemistry (Moscow)*, 2003, vol. 68, s. 1077-1080.

Gross, R. L. The rotary binding change mechanism of ATP synthases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, vol. 1458, s. 270-275.

Hail Jr., N. - Carter, B. Z. – Konopleva, M. – Andreeff, M. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. *Apoptosis*, 2006, vol. 11, s. 889-904.

Hail, Jr., N.- Lota, R. Cancer chemoprevention and mitochondria: Targeting apoptosis in transformed cells via the disruption of mitochondrial bioenergetics/redox State. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2009, vol. 53, s. 49–67.

Hail, Jr., N. – Lotan, R. Mitochondrial Respiration Is Uniquely Associated with the Prooxidant and Apoptotic Effects of N-(4-Hydroxyphenyl)retinamide. *The Journal of biological chemistry*, 2001, Vol. 276, s. 45614–45621.

Hajdúch, M. – Džubák, P. – Šarek, J. Biologické účinky triterpenů: Protinádorová aktivita. *Klinická farmakologie a farmacie*, 2004, vol. 18, s.14-21.

Han, J. - Goldstein, L. A. - Gastman, B. R. - Rabinovitz, A. – Rabinowich, H. Disruption of Mcl-1_Bim Complex in Granzyme B-mediated Mitochondrial Apoptosis. *The journal of biological chemistry*, 2005, vol. 280, s. 16383–16392.

Hande, K. R. Topoisomerase II inhibitors. *Update on cancer therapeutics*, 2006, vol. 1, s. 3–15.

Hensley, K. - Robinson, K. A. - Gabbita, S. P. - Salsman, S. – Floyd, R. A. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radical Biology & Medicine*, 2000, vol. 28, s. 1456–1462.

Hill, M. M. - Adrain, C. - Duriez, P. J. – Creagh, E. M. – Martin, S. J. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *The EMBO Journal*, 2004, vol. 23, s. 2134–2145.

Hüttemann, M. - Lee, I. – Samavati, L. - Yu, H. – Doan, J. W. Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, vol. 1773, s. 1701-1720.

Chi, K. N. - Eisenhauer, E. – Fazli, F. - Jones, E. C. – Goldenberg, S. L. – Powers, J. – Tu, D. – Gleave, M. E. A Phase I Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of OGX-011, a 2' -Methoxyethyl Antisense Oligonucleotide to Clusterin, in Patients With Localized Prostate Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 2005, vol. 97, s. 1287-1296.

Chiarugi, P. – Giannoni, E. Anoikis: A necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochemical Pharmacology*, 2008, vol. 76, s. 1352–1364.

Invitrogen. Product Spectra [online]. [cit. 2011-04-3]. Dostupné z URL: <<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/Product-Spectra.3168p82.html>>.

IUPUI Department of biology. The Endosymbiotic Theory [online]. [cit. 2010-10-4]. Dostupné z URL:<<http://www.biology.iupui.edu/biocourses/n100/2k2endosymb.html>>.

Jans, D. A. - Sutton, V. R. - Jans, P. - Froelichi, Ch. J. – Trapani, J. A. BCL-2 Blocks Perforin-induced Nuclear Translocation of Granzymes Concomitant with Protection against the Nuclear Events of Apoptosis. *The journal of biological chemistry*, 1999, vol. 274, s. 3953–3961.

Kang, M. H. - Reynolds, C. P. Bcl-2 Inhibitors: Targeting Mitochondrial Apoptotic Pathways in Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 2009, vol. 15, s. 1126-1132.

Kartalou, M. – Essigmann, J. M. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutation Research*, 2001, vol. 478, s.23–43.

Kasperczyk, H. - La Ferla-Brühl, K. - Westhoff, M. A. - Behrend, L. - Zwacka, R. M. – Debatin, K. M. – Fulda, S. Betulinic acid as new activator of NF- κ B: molecular mechanisms and implications for cancer therapy. *Oncogene*, 2005, vol. 24, s. 6945–6956.

Kerr, J. F. – Wyllie, A. H. - Currie A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 1972, vol. 26, s. 239 – 257.

Konopleva, M. – Elstner, E. – McQueen, T. J. – Teak, T. – Sudarikov, A. – Hu, W. – Schober, W. D. – Wang, R. Y. – Chism, D. - Kornblau, S. M. – Younes, A. – Collins, S. J. - Koeffler, H. P. – Andreeff, M. Peroxisome proliferator-activated receptor γ and retinoid X receptor ligands are potent inducers of differentiation and apoptosis in leukemias. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2004, vol. 3, s.1249-1262.

Koya, K. - Li, Y. - Wang, H. - Ukai, T. - Tatsuta, N. - Kawakami, M. - Shishido, T. – Chen, L. B. MKT-077, a Novel Rhodacyanine Dye in Clinical Trials, Exhibits Anticarcinoma Activity in Preclinical Studies Based on Selective Mitochondrial Accumulation. *Cancer Research*, 1996, vol. 56, s. 538-543.

Křiváková P. – Červinková, Z. – Lotková, H. – Kučera, O. – Rousat, T. Mitochondrie a jejich úloha v buněčném metabolismu. *ACTA MEDICA (Hradec Králové) SUPPL*, 2005, vol. 48, s. 57–67.

Li, N. - Ragheb, K. - Lawler, G. - Sturgis, J. - Rajwa, B. – Melendez, J. A. – Robinson, J. P. DPI induces mitochondrial superoxide-mediated apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine*, 2003, vol. 34, s. 465–477.

Mannella, C. A. The relevance of mitochondrial topology to mitochondrial function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, vol. 1762, s. 140– 147.

Marcillat, O. - Zhang, Y. – Davies, K. J. A. Oxidative and non-oxidative mechanisms in the inactivation of cardiac mitochondrial electron transport chain components by doxorubicin. *The Biochemical Journal*, 1989, vol. 259, s.181-189.

Marzo I. – Naval, J. Bcl-2 family members as molecular targets in cancer therapy. *Biochemical pharmacology*, 2008, vol. 76, s. 939–946.

Matarrese, P. - Gambardella, L. – Cassone, A. – Vella, S. – Cauda, R. - Malorni, W. Mitochondrial Membrane Hyperpolarization Hijacks Activated T Lymphocytes Toward the Apoptotic-Prone Phenotype: Homeostatic Mechanisms of HIV Protease Inhibitors. *The Journal of Immunology*, 2003, vol. 170, 6006-6015.

Modica-Napolitano, J. S. - Koya, K. - Weisberg, E. - Brunelli, B. T. - Li, Y. – Chen, L. B. Selective Damage to Carcinoma Mitochondria by the Rhodocyanine MKT-077. *Cancer Research*, 1996, vol. 56, s. 544-550.

Mokranjac, D. – Neupert W. Protein import into mitochondria. *Biochemical Society Transaction*, 2005, vol. 33, s. 1019-23.

Motz, Ch. - Martin, H. – Krimmer, T. – Rassow, J. Bcl-2 and Porin Follow Different Pathways of TOM-dependent Insertion into the Mitochondrial Outer Membrane. *Journal of Molecular Biology*, 2002, vol. 323, s. 729–738.

Musatov, A. – Polez, J. O. - Robinson, N. C. Detergent-Solubilized Bovine Cytochrome c Oxidase: Dimerization Depends on the Amphiphilic Environment. *Biochemistry*, 2000, vol. 39, s. 12996-13004.

Perkins, G. A. – Frey, T. G. Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy. *Micron*, 2000, vol. 31, s. 97–111.

Peč, P. – Šebela, M. – Luhová, L. – Frébort, I. – Zajoncová, L. – Petřivalský, M. Stanovení celkových proteinů. In *Laboratorní cvičení z biochemie*. 3. dopl. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2008. Kapitola 2.1., s. 19-24. ISBN 978-80-244-2138-4.

Pfanner, N. - Wiedemann, N. – Meisinger, C. – Lithgow, T. Assembling the mitochondrial outer membrane. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2004, vol. 11, s. 1044 – 1048.

Pop, C. - Timmer, J. - Sperandio, S. – Salvesen, G. S. The Apoptosome Activates Caspase-9 by Dimerization. *Molecular Cell*, 2006, vol. 22, s. 269–275.

Raha, S. – Robinson, B.H. Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. *American Journal of Medical Genetics*, 2001, vol. 106, s. 62-70.

Reers, M. - Smith, T. W. – Chen, L. B. J-Aggregate Formation of a Carbocyanine as a Quantitative Fluorescent Indicator of Membrane Potential. *Biochemistry*, 1991, vol. 30, s. 4480-4486.

Salvioli, S. – Ardizzoni, A. – Franceschi, C. – Cossarizza, A. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess $\Delta\psi$ changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Letters*, 1997, vol. 411, s. 77-82.

Sami, A. - Taru, M. - Salme, K. – Jar, Y. K. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product botulin. *European journal of pharmaceutical science*, 2006, vol. 29, s. 1–13.

Scheffler, I. E. Mitochondrie make a come back. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, vol. 49, s. 3–26.

Schmitz, I. - Kirchhoff, S. – Krammer, P. H. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2000, vol. 32, s. 1123–1136.

Srere, P. A. [1] Citrate synthase: [EC 4.1.3.7. Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)]. *Methods in Enzymology*, 1969, vol. 13, s. 3-11.

Sun, F. - Huo, X. - Zhai, Y. - Wang, A. - Xu, J. - Su, D. - Bartlam, M. – Rao, Z. Crystal Structure of Mitochondrial Respiratory Membrane Protein Complex II. *Cell*, 2005, vol. 121, s. 1043-1057.

Susin, S. A. - Daugas, E. - Ravagnan, L. - Samejima, K. - Zamzami, N. - Loeffler, M. - Costantini, P. - Ferri, K. F. - Irinopoulou, T. - Prévost, M. C. - Brothers, G. - Mak, T. W. - Penninger, J. - Earnshaw, W. C. – Kroemer, G. Two Distinct Pathways Leading to Nuclear Apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 2000, vol. 192, s. 571-579.

Suzuki, S. – Higuchi, M. – Proske, R. J. – Oridate, N. – Hong, W. K. – Lotan, R. Implication of mitochondria-derived reactive oxygen species, cytochrome C and caspase-3 in N-(4-Hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis in cervical carcinoma cells. *Oncogene*, vol. 1999, vol. 18, s. 6380-6387.

Tatsuta, N. - Suzuki, N. - Koyaa, K. - Kawakami, M. – Shishido, T. - Chen, L. B. Determination of MKT-077, a novel antineoplastic agent, in plasma samples by high-performance liquid chromatography and its application to pharmacokinetics in rats. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1999, vol. 19, s. 423-428.

Terada, H. Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Environmental Health Perspectives*, 1990, vol. 87, s. 213-218.

Thomas, D. A. - Du, Ch. - Xu, M. - Wang, X. – Ley, T. J. DFF45/ICAD Can Be Directly Processed by Granzyme B during the Induction of Apoptosis. *Immunity*, 2000, vol. 12, s. 621–632.

Vercesi, A. E. - Kowaltowski, A. J. - Grijalba, M. T - Meinicke, A. R. – Castilho, R. F. The Role of Reactive Oxygen Species in Mitochondrial Permeability Transition. *Bioscience Reports*, 1997, vol. 17, s. 43-52.

Voet, D. – Voetová, J. G. Transport elektronů a oxidační fosforylace. In *Biochemie*. 1.čes. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995. Kapitola 4.20, s. 590-625. ISBN 80-85605-44-9.

Wanga, F. – Ogasawara, M. A. – Juany, P. Small mitochondria-targeting molecules as anti-cancer agents. *Molecular Aspects of Medicíně*, 2010, vol. 31, s. 75–92.

Wick, W. - Grimmel, C. - Wagenknecht, B. - Dichgans, J. – Weller, M. Betulinic Acid-Induced Apoptosis in Glioma Cells: A Sequential Requirement for New Protein Synthesis, Formation of Reactive Oxygen Species, and Caspase Processing. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1999, vol. 289, s.1306–1312.

Xu, X. - Persson, H. L. – Richardson, D. R. Molecular Pharmacology of the Interaction of Anthracyclines with Iron. *Molecular pharmacology*, 2005, vol. 68, s. 261-271.

Zou, H. - Li, Y. - Liu, X. – Wang, X. An APAF-1 Cytochrome c Multimeric Complex Is a Functional Apoptosome That Activates Procaspase-9. *The Journal of biological chemistry*, 1999, vol. 274, s. 11549–11556.

Errata:

Doplňené citace

Costantini, P. – Jacotot, E. - Decaudin, D. – Kroemer, G. Mitochondrion as a Novel Target of Anticancer Chemotherapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 2000, vol. 92, s. 1042-1053.

Gewirtz, D. A. A Critical Evaluation of the Mechanisms of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*, 1999 Vol. 57, s. 727–741.

Gogvadze, V. - Orrenius, S. – Zhivotovsky, B. Mitochondria as targets for cancer chemotherapy. *Seminars in Cancer Biology*, 2009, vol. 19, s. 57–66.

Huang, L. H. - Hu, J. Q. - Tao, W. Q. - Li, Y. H. - Li, G. M. - Xie, P. Y. - Liu, X. S. – Juany, J. Gossypol inhibits phosphorylation of Bcl-2 in human leukemia HL-60 cells. *European Journal of Pharmacology*, 2010, vol. 645, 9–13.

Igney, F. H. – Krammer, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature. Reviews. Cancer*, 2002, vol. 277-288.

Potter, A. J. – Rabinovitch, P. S. The cell cycle phases of DNA damage and repair initiated by topoisomerase II-targeting chemotherapeutic drugs. *Mutation Research*, 2005, vol. 572, s. 27–44.