



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**

**Nové deriváty betulinové a 21-oxo-18-lupenové kyseliny a jejich antiproliferační aktivita v buňkách lidského maligního melanomu *in vitro***

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

|                         |                                 |
|-------------------------|---------------------------------|
| Autor:                  | <b>Romana Christová</b>         |
| Studijní program:       | B1501 Experimentální biologie   |
| Studijní obor:          | Experimentální biologie         |
| Forma studia:           | Prezenční                       |
| Vedoucí práce:          | <b>Mgr. Lucie Rárová, Ph.D.</b> |
| Termín odevzdání práce: | 2016                            |

## Bibliografická identifikace

|                         |  |
|-------------------------|--|
| Jméno a příjmení autora | Romana Christová   |
| Název práce             | Nové deriváty betulinové a 21-oxo-18-lupenové kyseliny a jejich antiproliferační aktivita na buňkách lidského maligního melanomu <i>in vitro</i>   |
| Typ práce               | Bakalářská   |
| Pracoviště              | Laboratoř růstových regulátorů   |
| Vedoucí práce           | Mgr. Lucie Rárová, Ph.D.   |
| Rok obhajoby práce      | 2016   |
| Abstrakt                | <p>Maligní melanom je kožní nádorové onemocnění s velice vysokou úmrtností a jeho úspěšnost léčby je nedostačující. Bakalářská práce je zaměřena na studium antiproliferační aktivity nově syntetizovaných derivátů kyseliny betulinové a 21-oxo-18-lupenové, vykazující cytotoxicitou proti lidské nádorové linii G-361 odvozené od maligního melanomu. Teoretická část shrnuje poznatky o maligním melanomu a jeho léčbě, derivátech kyseliny betulinové a 21-oxo-18-lupenové a apoptotických markerech. V experimentální části byl studován vliv na apoptosu a buněčný cyklus metodami Western blot, průtokové cytometrie a biochemickým testem aktivity caspas 3/7, na buněčné linii G-361. Výsledky této práce dokazují antiproliferační účinky derivátů kyseliny betulinové a 21-oxo-18-lupenové. Nejvýznamnější účinek byl pozorován po aplikaci látek s označením <b>12</b> a <b>17</b>.</p> |
| Klíčová slova           | apoptosa, nádorová linie G-361, kyselina betulinová, western blot, průtoková cytometrie, caspasa 3/7   |
| Počet stran             | 58   |
| Počet příloh            | 0  |
| Jazyk                   | Český  |

## Bibliographical identification

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| Author's first name and surname | Romana Christová   |
| Title of thesis                 | New betulinic and 21-oxo-18-lupenoic acid derivatives and their antiproliferative activity on human malignant melanoma cells <i>in vitro</i>   |
| Type of thesis                  | Bachelor   |
| Department                      | Laboratory of Growth Regulators  |
| Supervisor                      | Mgr. Lucie Rárová, Ph.D.   |
| The year of presentation        | 2016   |
| Abstract                        | Malignant melanoma is the form of skin cancer with a higher mortality and its treatment success rate is still insufficient. The bachelor thesis is focused on studying the antiproliferative effect of new betulinic and 21-oxo-18-lupenoic acid derivatives showed cytotoxicity against a human tumor cell line of malignant melanoma G-361. The theoretical part summarizes the current knowledge about malignant melanoma, its treatment, betulinic acid derivatives and apoptotic markers. In the experimental part, effects of new betulinic and 21-oxo-18-lupenoic acid derivatives with focusing on the apoptosis and cell cycle by western blotting, flow cytometry and biochemical assay of caspase -3/7 activity, on a cell line G-361 were studied. Results of this research demonstrate the antiproliferative effects of betulinic and 21-oxo-18-lupenoic acid derivatives. The most significant effect was observed after application of substance with the indication <b>12 a 17</b> . |
| Keywords                        | apoptosis, cell line G-361, betulinic acid, flow cytometry, western blotting, caspases 3/7   |

|                      |       |
|----------------------|-------|
| Number of pages      | 58    |
| Number of appendices | 0     |
| Language             | Czech |

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne .....

Podpis .....

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce Mgr. Lucii Rárové, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a trpělivost. Dále děkuju celému kolektivu Laboratoře růstových regulátorů, Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého, za umožnění zpracování mé bakalářské práce na tomto pracovišti. Poděkování patří také paní laborantce Olze Hustákové za vstřícnost, ochotu a pomoc při vypracování experimentální části bakalářské práce.

## OBSAH

|   |    |
|---|----|
| <b>1 ÚVOD A CÍLE</b> .....  | 3  |
| <b>2 STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....   | 5  |
| 2.1 Nádorové onemocnění .....   | 5  |
| 2.1.1 Maligní melanom .....   | 7  |
| 2.1.2 Léčba maligního melanomu .....  | 8  |
| 2.1.2.1 Chirurgická léčba.....  | 9  |
| 2.1.2.2 Imunoterapie.....   | 9  |
| 2.1.2.3 Systémová chemoterapie .....  | 10 |
| 2.1.2.4 Biochemoterapie.....  | 11 |
| 2.1.2.5 Experimentální léčebné postupy.....   | 11 |
| 2.2 Terpenoidy .....  | 12 |
| 2.2.1 Betulin (lup-20(29)-en-3 $\beta$ ,28-diol) .....                              | 14 |
| 2.2.2 Kyselina betulinová (kyselina 3 $\beta$ -hydroxy-lup-20 (29)-en-28-ová) ..... | 15 |
| 2.2.3 Deriváty kyseliny betulinové .....  | 18 |
| 2.3 Apoptosa .....  | 20 |
| 2.3.1 Caspasy - 3 a -7 .....  | 22 |
| 2.3.2 PARP-1 [Poly (ADP-ribose) polymerase-1] .....                                 | 23 |
| 2.3.3 Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma 2).....                                       | 24 |
| 2.3.4 Mcl-1 (myeloid cell leukemia 1, myeloidní buněčná leukemie 1).....            | 25 |
| 2.3.5 Protein p53 .....   | 26 |
| 2.3.6 Rb (retinoblastomový) protein .....   | 27 |
| <b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....  | 28 |
| 3.1 MATERIÁL .....  | 28 |
| 3.1.1 Přístrojové vybavení.....   | 28 |
| 3.1.2 Použité chemikálie .....  | 28 |
| 3.1.3 Použité roztoky.....  | 29 |
| 3.1.4 Použité protilátky .....  | 30 |
| 3.1.5 Použitá buněčná linie .....   | 31 |
| 3.1.6 Testované deriváty kyseliny betulinové .....                                  | 31 |
| 3.2 METODY.....   | 32 |
| 3.2.1 Ovlivnění buněčné linie a sklizení .....                                      | 32 |
| 3.2.2 Lyzování buněk .....  | 33 |
| 3.2.3 SDS-PAGE, Western blotting a imunodetekce proteinů .....                      | 33 |
| 3.2.4 Analýza buněčného cyklu .....   | 34 |
| 3.2.5 Fluorimetrické stanovení aktivity caspasy 3/7 .....                           | 35 |
| <b>4 VÝSLEDKY</b> .....   | 36 |
| 4.1 Detekce pro- a anti-apoptotických proteinů.....                                 | 36 |
| 4.2 Analýza buněčného cyklu po ovlivnění deriváty .....                             | 39 |

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| 4.3 Aktivita caspasy -3/7..... | 40 |
| <b>5 DISKUZE</b> .....         | 41 |
| <b>6 ZÁVĚR</b> .....           | 45 |
| LITERATURA.....                | 46 |
| SEZNAM ZKRATEK.....            | 56 |

# 1 ÚVOD A CÍLE

Maligní melanom je nádorové onemocnění kůže vznikající nádorovou transformací melanocytů. Výskyt melanomu po celém světě trvale stoupá, každým rokem se zvýší počet případů až o 5 % a počet úmrtí připadá na 50 000 pacientů ročně (Pirard a Vries, 2007). Hlavní a nejspolehlivější léčbou je včasná diagnostika a včasné chirurgické odstranění. Ačkoliv toto nádorové onemocnění není příliš časté, jeho prognóza je velice závažná. Průměrná doba přežití se pohybuje v rozmezí 4-6 měsíců (Tsao *et al.*, 2004). I přes významný pokrok v oblasti soudobé medicíny s širokým portfoliem léčiv, je úspěšnost léčby metastazujícího melanomu nízká (15 – 20 %) a terapeutická odpověď je nedostačující (Balch *et al.*, 2001). Předmětem vědeckých a farmaceutických komunit je zkoumání nových sloučenin, které by mohly být použity jako potenciální nové léčiva proti malignímu melanomu.

V posledním desetiletí je studována skupina cyklických triterpenů, která vykazuje řadu biologických účinků, jako je například antivirový, antimikrobiální, antimykotický, protizánětlivý, hepatoprotektivní a protinádorový účinek. Triterpenoidy jsou používány v prevenci a léčbě hepatitidy, parazitární a protozoální infekce. Nevýhodou použití triterpenoidů je jejich toxicita spojená s jejich hemolytickými a cytostatickými účinky. Je přírodní sloučeninou pro vývoj syntetických derivátů s nižší toxicitou a vyšším terapeutickým potenciálem. (Džubák *et al.*, 2006).

Kyselina betulínová je nejznámějším zástupcem triterpenů, kterou můžeme nalézt v celé rostlinné říši, zejména v kůře bříz *Betula spp.*, *Betulaceae* (Ciechewicz a Kouzi, 2004). Biologická aktivita představuje antibakteriální, anti-HIV, antimalarické, protizánětlivé a protinádorové účinky (Steele *et al.*, 1999; Gautam a Jachak, 2009; Cichewicz a Kouzi, 2004; Fontanay *et al.*; 2008). V roce 1995 byly poprvé oznámeny cytotoxické účinky v buňkách maligního melanomu (Pisha *et al.*, 1995). Avšak nevýhodou kyseliny betulínové je špatná rozpustnost ve vodě a tím i její aplikace *in vivo* (Kim *et al.*, 1998).

Modifikace kyseliny betulínové a 21-oxo-18-lupenové byla provedena za účelem zvýšení terapeutického indexu látky, snížení lékové rezistence a jejich cílené působení pouze v nádorových buňkách. Tyto nově syntetizované deriváty vykazovaly významnou cytotoxicitu proti lidským nádorovým buňkám odvozených od maligního melanomu.



Cílem mé bakalářské práce je vypracovat rešerši na dané téma bakalářské práce. Charakterizovat antiproliferační účinky nově syntetizovaných derivátů kyseliny betulinové a 21-oxo-18-lupenové proti buněčné linii G-361 odvozené od maligního melanomu *in vitro*. Detekovat aktivitu proteinů spojených s apoptosou pomocí metody western blot a biochemického testu caspas 3 a 7 a detekovat buněčný cyklus pomocí průtokové cytometrie.

## 2 STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Nádorové onemocnění

Existuje více než 100 typů nádorových onemocnění. V roce 2012 bylo odhadováno 14,1 milionů nových případů rakoviny na světě. V České republice na nádorové onemocnění připadá odhadem 576,3 tisíc nových případů, z toho 307,2 tisíc (53,3 %) u mužů a 269,1 tisíc (46,7 %) u žen (Ferlay *et al.*, 2013; 2015). K tomu abychom snížili incidenci nádorových onemocnění, potřebujeme porozumět procesům a změnám fenotypu nádorových buněk. Jedním z nich je vícestupňový proces kancerogeneze, proces vzniku a vývoje nádoru. Podstatou je postupné hromadění genetických a epigenetických změn, které jsou způsobeny mutací klíčových genů regulující buněčný růst, proliferaci a buněčnou smrt. Velkou snahou biologů bylo studium identifikace těchto genů a případných změn v buňce. Tyto studie vedly k prvnímu klonování onkogenů a následné transdukci do normálních buněk. Bylo zjištěno, že více jak dva onkogeny způsobují maligní transformaci normální buňky v nádorovou (Land *et al.*, 1983).

Nádor je nová abnormální tkáň, která roste neregulovaným způsobem. Podle původu je dělíme na karcinomy, které vznikají z epitelálních buněk (85 % nádorů), sarkomy z pojivových tkání (1 % onemocnění) a leukémie z hepatopoetických buněk. Nádory dále můžeme dělit dle schopnosti se infiltrovat do jiné tkáně. Benigní (nezhoubné) nádory zůstávají v místě svého vzniku, nemigrují do jiné tkáně a při chirurgickým odstranění se obvykle neobnovují. Zatímco maligní (zhoubné) nádory pronikají do okolních tkání prostřednictvím krevního a lymfatického systému a v nových tkáních vyvolávají tvorbu sekundárního nádoru (metastázi).

Nádorové buňky se od normálních buněk se liší několika charakteristickými rysy. Jedním z nich je soběstačnost při tvorbě růstových signálů. Jsou schopné tvorby vlastních růstových faktorů, které jsou analogem přirozeného receptoru, na který se vážou a způsobují tak autokrinní stimulaci proliferace. Narušují negativní zpětnou vazbu signalizace, která tlumí proliferaci. Například mutace genu *ras* postihuje Ras GTPasovou aktivitu, což vede k masivní indukci a přenosu signálu (Rajalingam *et al.*, 2007). Normální buňky jsou závislé na mitogenních růstových signálech, které regulují dělení buněk, homeostázu a tím i schopnost udržet tvar a funkci tkáně. Pokusy *in vitro* na normálních lidských diploidních fibroblastech

ukázaly, že buněčná kultura má limitovanou životnost – asi po 50-70 dělení se růst zastavuje. Pokud u dané populace dojde k danému počtu dělení, přestávají se množit (senescence) (Houck *et al.*, 1971). Aby nádorové buňky byly schopny se neomezeně dělit, musí obejít výkonné procesy regulující buněčný cyklus. Mezi nimi se řadí tumor supresorové proteiny (Rb a p53), které v normálních buňkách při poškození DNA zastavují buněčný cyklus, buňky přechází do G<sub>0</sub> fáze, kdy mezitím dochází k opravě DNA nebo ke spuštění dráhy apoptosy. Při inhibici proteinu Rb nebo p53 může tak dojít k opětovnému dělení a neomezenému replikačnímu potenciálu. Neomezená proliferace je také způsobena prostřednictvím vysoké regulace telomerasové aktivity. Telomerasa je enzym, který chrání konce chromozomů (telomery) před jejím zkracováním, což by vedlo k senescenci. Dalším znakem je genetická nestabilita, která vede k chromozomálním aneuploidiím (zisk nebo ztráta chromozomu).

Bez produkce nových krevních kapilár (proces angiogeneze) je objem nádoru limitován na pár milimetrů. Důležitým faktorem angiogeneze je růstový faktor VEGF, který ve spojení s cytokiny způsobuje neovaskularizaci nádorů a umožňuje jim růst nad rámec limitované velikosti. Ztráta citlivosti k signálům zastavující buněčný růst a proliferaci vede k invazi a metastázi. Buňky s metastazujícím potenciálem jsou schopny proniknout přes bazální membránu epitelových buněk, kolonizovat se a šířit do okolní tkáně prostřednictvím degradace proteinů extracelulárního matrixu, vlivem enzymů metaloproteináz. Metastáze je jedním z hlavních znaků malignity nádorového onemocnění a nejčastější příčinou úmrtí pacienta.

Primární léčbou nádorových onemocnění je chirurgické odstranění benigního nebo maligního nádoru. Pokud dochází k velkému rozšiřování nádoru do okolních tkání (metastáze), léčba představuje kombinace radioterapie, chemoterapie, imunoterapie a další adjuvantní terapie.

### 2.1.1 Maligní melanom

Melanom představuje jen 4 % všech kožních nádorových onemocnění, nicméně je zodpovědný za 80 % všech úmrtí (Cancer facts & figures, 2003). Více než 50 000 pacientů ročně po celém světě umírá. Vyskytuje se 200 000 nových případů po celém světě (Ferlay *et al.*, 2015). Od roku 1960, výskyt melanomu vzrostl o 3-8 % ročně u většiny lidí z evropského prostředí (Armstrong, 2004). Ve všech evropských zemích je incidence vyšší u žen než u mužů. Nejvyšší výskyt se nachází v severních (Dánsko, Norsko a Švédsko) a západoevropských zemích (Francie, Nizozemsko a Spojené království), s výskytem 6-9 případů na 100 000 u mužů a 8-16 na 100 000 u žen. ([www.euro.who.int](http://www.euro.who.int)). V České republice se incidence odhaduje na 2200 nových případů a 350 úmrtí ročně (Ferlay *et al.*, 2013).

Maligní melanom vzniká nádorovou transformací melanocytů původem z multipotentní neurální lišty. Jednou z jejich hlavních funkcí je melanogeneze (syntéza melaninu). Je to metabolický proces, který je kontrolován řadou různých genů, transkripčních faktorů a hormonů (Herlyn a Satyamoorthy, 2001). Nádorová transformace obvykle začíná mutací onkogenů. Za vhodných podmínek může spustit kaskádu procesů vedoucí k množení změněných melanocytů nebo chromozomálních nestabilit (Krajsová, 2006). Tyto genetické mutace, jsou důsledky maligního fenotypu, včetně stimulace růstu krevních cév, rezistence k imunitní odpovědi, invaze nádoru a metastáz (Herlyn a Satyamoorthy, 2001).

Nejvýznamnějším rizikovým faktorem je ultrafialové záření (UV). Ultrafialové záření způsobuje genetické změny v kůži, poškozují kožní imunitní reakce, zvyšuje produkci růstových faktorů a indukují tvorbu reaktivních forem kyslíku poškozující DNA (Gilchrest, *et al.*, 1999). Spolu s dalšími faktory (světlá pleť, tvorba pih po oslunění, několikanásobné spálení, familiární výskyt melanomu, imunosuprese a vysoký počet melanocytárních a atypických névů) je hlavní příčinou vzniku melanomu (MacKie, 1998).

Melanocytární névy jsou prekurzory melanomu prokazující známky abnormálního chování, které ovlivňují jejich růst, hustotu, vzhled i melanogenezi. Melanocyt se během vývoje melanomu mění v melanocytární névus, atypický névus (benigní a dysplastický) a následně v maligní melanom (Tsao *et al.*, 2003). Na vzniku a vývoji benigního névu se podílí mutace B-raf onkogenů (50% výskyt u melanomu), které ovlivňují mitogenem aktivované proteinkinasy (MAPK) nebo tyrosinkinasy (PTK) (Omholt *et al.*, 2003). Dysplastické névy vznikají mutací genu CDKN2A s výskytem 25 až 40 % u familiárního melanomu. Je to gen

kódující dva proteiny – protein p16INK4A (inhibuje cyklin-dependentní kinasu 4) a protein p14ARF (Krajsová, 2006). Nicméně mutace v p14ARF umožňuje degradaci p53 uvolněním svého vazebného partnera hdm2 a v kombinaci s mutací BRAF se podílí na malignitě melanomu (Sharpless a Chin, 2003; Patton *et al.*, 2005). Další vývoj je spojen se snížením exprese melanomových markerů regulované transkripčním faktorem mikroftalmie (MITF) (Salti *et al.*, 2000). Primární melanom se vyvíjí v metastazující, který představuje změny v kontrole buněčné adheze, ztrátu E-cadherinu (epiteliální) a zvýšenou expresi N-cadherinu (neurální), která metastazujícímu melanomu umožňuje se šířit interakcí s ostatními buňkami (Danen *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2001). Jako další obranu, melanomové buňky často exprimují vysoké hladiny anti-apoptotických molekul Bcl-2 a Bcl-x. Jsou studiem potenciálního cílu terapie maligního melanomu (Soengas a Lowe, 2003).

Základní podmínkou primární prevence je dodržovat zásady správného opalování a tím se vyvarovat silné expozici slunečního záření a to zejména u dětí a lidí náchylnějších ke spálení pokožky (Elwood a Jopson, 1997). Sekundární prevence představuje včasnou diagnózu melanomu v rané fázi vývoje. V roce 1985 byla zavedena pomůcka identifikace melanomu, pravidlo ABCDE. Melanom je charakteristický svou asymetrií (A), nepravidelnými okraji (B), skvrnitou barvou (C), velikostí nad 10 mm (D) a vývojem (E). Na základě těchto aspektů jsme schopni rozlišit dysplastické névy či melanom od běžných získaných névů (Strumia a Montanari, 2003).

### **2.1.2 Léčba maligního melanomu**

Včasná diagnóza v kombinaci s vhodnou chirurgickou léčbou je základem pro léčbu primárního melanomu. Prognóza nemocných s metastazujícím melanomem je velmi závažná, průměrná doba přežití se pohybuje okolo 6 měsíců a méně než 5 % nemocných přežívá 5 let (Miller and Mihm, 2006; Tsao *et al.*, 2004). Zatímco pacienti s metastazujícím onemocněním na kůži, podkoží a lymfatických uzlin přežijí po dobu 12 měsíců. Při průkazu viscerálních metastáz se zvýšenou koncentrací LDH v séru medián přežití klesá na 4-6 měsíců (Balch *et al.*, 2001). Chirurgie, imunoterapie a chemoterapie jsou dosavadními nejpoužívanějšími postupy pro léčbu maligního melanomu a to buď v monoterapii nebo ve společné kombinaci. Celková léčebná odpověď těchto metod se pohybuje v rozmezí 15 – 20 %.

### 2.1.2.1 Chirurgická léčba

Chirurgická excize primárního melanomu je základní léčebnou metodou již od historických dob. V průběhu 20. století se tyto léze odstraňovaly s minimální šířkou ochranného lemu 4-5 centimetrů. Nicméně, byly pozorovány častá lokální recidiva a špatná celková prognóza onemocnění, proto studie WHO (World Health Organization) studovala vliv četnosti recidiv na šířce excize nádoru s Breslowem (invaze melanomu v milimetrech) pod 2 milimetry.

Metastáze lymfatických uzlin, plic, střev, nadledvinek a mozku lze léčit chirurgickou resekci. Zatímco u metastáz jater je chirurgická léčba vyloučena (Brand *et al.*, 1997).

Melanom je nádorové onemocnění s vysokým agresivním metastazujícím potenciálem do regionálních lymfatických uzlin. Typickým pokračováním radikální operace primárního melanomu je biopsie lymfatické sentinelové uzliny (SLNB). Sentinelová uzlina je první lymfatická uzlina, na které melanom roste. Umožňuje včasnou indikovanou disekci regionálních lymfatických uzlin, včasné zahájení adjuvantní terapie a lepší staging a prognostické informace (Morton *et al.*, 2006).

### 2.1.2.2 Imunoterapie

U pacientů s primárním melanomem o tloušťce ( $\geq 2$  mm), s nebo bez regionálních lymfatických uzlin je účinnou adjuvantní terapií interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) (Molife a Hancock, 2002). Produkci makrofágů, T-buněk a NK buněk vykazuje řadu protinádorových vlastností. IFN- $\alpha$  (2a) a IFN- $\alpha$  (2b) byly testovány jako terapeutická činidla v klinické praxi pro melanom, ale pouze rekombinantní IFN- $\alpha$  (2b) byl schválen pro adjuvantní léčbu této rakoviny (Mocellin *et al.*, 2010). Přínos v léčbě metastazujícího melanomu je kontroverzní. Počáteční studie uvádějí statisticky významné zlepšení přežívání bez známek příznaků onemocnění, avšak ne v celkovém přežití (Wheatley *et al.*, 2003). Nicméně, nedávné meta-analýzy, včetně 14 randomizovaných kontrolovaných studií, dokázali, že adjuvantní léčba IFN- $\alpha$  má statisticky významný pozitivní vliv na přežití bez známek příznaků onemocnění (snížení rizika = 18%) a celkové přežití (snížení rizika = 11%) (Mocellin *et al.*, 2010).

Cytokin interleukin 2 (IL-2) je glykoprotein vylučovaný T pomocnými buňkami ( $T_H$ ). Podporuje proliferaci T-buněk a rozvoj LAK (lymphokine-activated killer), které jsou schopné přímé lýze nádorových buněk (Yamamoto *et al.*, 2003). Používá se ve vysokých dávkách, nicméně, celková míra odezvy je nízká (16%) a systémová toxicita je vysoká (hypotenze, flu-

like syndrom, sepse a selhání ledvin) (Atkins *et al.* 1999). Při kombinaci interleukinu 2 a interferonu  $\alpha$  byla prokázána míra odpovědi nejvýše 30 % (Atzpodien *et al.*, 1988).

Jednou z nescifické adjuvantní imunoterapie je vakcína Bacillus Calmette-Guérin (BCG). Používá se při očkování proti lidské tuberkulóze. BCG byla také použita v léčbě mnoha různých malignit. Při počátečních pokusech, při léčbě melanomu se jevila jako slibná terapeutická vakcína, ale nakonec se objevily nežádoucí účinky a riziko úmrtí v důsledku anafylaktického šoku a rozvoji infekčních granulomů v místech injekce (Proctor *et al.*, 1978; Moff *et al.*, 1999)

### 2.1.2.3 Systémová chemoterapie

Až do vývoje dakarbazinu (r. 1970), neexistovala žádná terapeutická látka se skutečnou účinností proti metastazujícím melanomu. Je to jedna z nejrozšířenějších chemoterapeutických látek pro léčbu metastazujícího melanomu s léčebnou odpovědí 12-20 % (Lens a Eisen, 2003). Dakarbazin se využívá v řadě kombinací s ostatními cytostatiky nebo cytokiny. Například v kombinaci s vinblastinem se celkové procento léčebné odpovědi pohybovalo okolo 7% až 30% s účinkem 2-5 měsíců (Johnson a Jacobs, 1971). Lékové kombinace cisplatinu, dakarbazinu, bishloroethylnitrosomočoviny (BCNU) a tamoxifenu, vykazovaly 43 % léčebnou odpověď, ale nulový přínos v době přežití ve fázi III, ve srovnání se samotným dakarbazinem (Lattanzi *et al.*, 1995; Chapman *et al.*, 1999). Cisplatina, vinblastin a dakarbazin ve fázi II vykazovaly léčebnou odpověď 40 %, ale opět ve studijní fázi III, míra odpovědi byla pouze 24 % s žádným rozdílem v průměrné hodnotě přežití ve srovnání s monoterapií dakarbazinu (Legha *et al.*, 1989; Buzaid *et al.*, 1993).

Taxany (skupina léků, která obsahuje paclitaxel a docetaxel) jsou používány při léčbě rakoviny. Ve studiích fáze II vykazovaly léčebnou odpověď 17 % a 12 % (Gogas *et al.*, 2004). Cisplatina ukázala mírnou aktivitu v monoterapii s podobnou odpovědí 16,3 %, doby účinku 7,3 měsíce a mediánem přežití 7,58 měsíců (Glover *et al.*, 2003).

Temozolomid je poněkud dražší alternativou dakarbazinu (stejný aktivní meziprodukt 3-methyl-[triazin-1-yl]imidazol-4-carboxamid), který se může podávat orálně a má lepší distribuci do mozkomíšního moku. Jedná se o nový slibný prostředek s podobnou léčebnou odezvou (21%) jako dakarbazin (Patel *et al.*, 2011). Kombinace temozolomidu a thalidomidu

zvyšovala účinnost chemoterapie (medián přežití 9 měsíců) a je dobře tolerována (Hwu *et al.*, 2003).

Mezi další studium chemoterapeutických látek, které byly zkoumány, zahrnuje fotemustin (Servier, Gidy, Francie) - chlorethyl nitrosomočovina, která výrazně zlepšila míru léčebné odpovědi (15,2 % vs. 6,8 %) a prodlouženou průměrnou hodnotou celkového přežití (7,3 vs. 5,6 měsíce) ve srovnání s dakarbazinem ve studijní fázi III (Avril *et al.*, 2004).

#### **2.1.2.4 Biochemoterapie**

Důvodem pro kombinaci imunoterapie a chemoterapie je jejich rozdílný mechanismus účinku a profil toxicity. Ve fázi III klinických studií výsledky ukázaly 48 % léčebnou odpověď biochemoterapie ve srovnání s chemoterapií, která vykazovala jen 25% (Eton *et al.*, 2002).

Nicméně, v jedné studii Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)-3695 společnosti zkoumali účinek kombinace cisplatina, vinblastin a dakarbazin (CVD) spolu s IFN  $\alpha$  a IL-2. Ve srovnání se samotnou CVD chemoterapií, biochemoterapie vykazovala 17% léčebnou odpověď (CVD 11%) s žádným rozdílem v celkové době přežití (8,4% oproti 8,7%) (Atkins *et al.*, 2003). Druhá studie byla provedena Evropskou organizací pro výzkum a léčbu rakoviny (EORTC) a to v porovnání dvou režimů biochemoterapie, které se lišili tím, zda byl v tomto režimu zahrnut cytokin IL-2. Míry odpovědi byly podobné v obou větvích (23% a 21%) a střední doba přežití v obou skupinách byla 9 měsíců (Keilholz *et al.*, 2003). V současné době neexistuje dostatek údajů pro využití biochemoterapie v běžné praxi.

#### **2.1.2.5 Experimentální léčebné postupy**

Vzhledem k omezené účinnosti dosavadních metod léčby se testují stále nové preparáty s různými mechanismy účinků i nové kombinace léků. Možnost lepšímu pochopení biologie nádorů a složitosti u protinádorové imunitní reakci vedla k vývoji nových činidel. Několik slibných léků zahrnují blokádu inhibičních imunitních receptorů, inhibici dráh onkogenních kinas, snižování množství anti-apoptotických proteinů a terapii adoptivních buněk.

Nejčastějším mutovaným genem je onkogen BRAF, ovlivňující mitogenem aktivované proteinkinasy (MAPK). Zvýšená aktivace MAPK se podílí na vzniku nádoru melanomu (Satyamoorthy *et al.*, 2003). Sorafenib (Nexavar, BAY 43–9006; Bayer HealthCare Pharmaceuticals Inc., Wayne, New Jersey, and Onyx Pharmaceuticals, Inc., Emeryville,



California) je inhibítorem signální transdukce BRAF, zacílené na nádorovou proliferaci a angiogenezi přes blokádu dráhy RAF/MEK/ERK. Bohužel, většina publikovaných klinických studií neprokázaly žádné výhody spojené s přidavkem sorafenibu ve standardní chemoterapii (Hauschild *et al.*, 2009). Novým selektivním inhibítorem BRAF kinázy je RG7204, dříve označené jako PLX4032. Organizace ASCO 2009 ukázala objektivní odpověď u ~ 70 % pacientů léčených RG7204 (Flaherty *et al.*, 2009). Nejlepší celková odpověď byla stanovena konvenčním hodnocením pomocí Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) kritérií a objektivní míra odpovědi byla 86 % (McArthur *et al.*, 2010).

Oblimersen sodný (Genasense, Genta Incorporated, New Jersey, USA) je potenciálním inhibítorem anti-apoptické molekuly Bcl-2, která je nadměrně exprimována v mnoha melanomech. Buňky melanomu byly citlivé na tento lék v kombinaci s chemoterapeutickými činidly, v testování preklinických studií (Jansen *et al.*, 1998). Ve fázi III spolu s dakarbazinem oproti samotnému vykazoval zvyšování střední doby přežití, ale tento objev nebyl dostačující pro uznání organizací FDA (Millward *et al.*, 2004).

Adoptivní imunoterapie je jedna z mnoha nových terapeutických přístupů s možným přínosem v léčbě metastazujícího melanomu. Lymfocyty infiltrující nádor byly aplikovány ve formě intravenózní infuze, tato metoda vykazovala 50% léčebnou odpověď. Za doprovodu ošetření vysokých dávek IL-2 a přidáním celotělového ozáření s celkovou dávkou 12 Gy, by mohla být rychlost reakce zvýšena na 72% (Dudley *et al.*, 2008).

Tasisulam (Eli Lilly, Indianapolis) je nové antiproliferační a cytotoxické léčivo, které vyvolává apoptosu prostřednictvím mitochondriální dráhy buněčné smrti. Kromě apoptotické aktivity, dochází ke snížení mitochondriálního membránového potenciálu a indukci reaktivních forem kyslíku. Předběžná data studie fáze II ukázala celkovou míru odezvy 12% a stabilizaci onemocnění u dalších 35% pacientů (Kirkwood *et al.*, 2010).

## 2.2 Terpenoidy

Jsou to přírodní sloučeniny, jejichž molekuly se skládají z dvou či více isoprenových jednotek. Podle počtu isoprenových jednotek rozlišujeme na mono-, seskvi-, di-, tri-, tetra- a polyterpeny. Přírodní látky jsou bohatým zdrojem sloučenin s protinádorovými účinky, a proto se z nich při syntéze nových léčiv často vychází. Využití rostlin v léčbě lidských chorob i rakovinného onemocnění má dlouhou historii (Cragg a Newman, 2005). Terpeny jako přírodní

sloučeniny se vyskytují v rostlinách, zejména v květech, listech a plodech rostlin, ale v ojedinělých případech i v mořských organizmech, plísních, mikroorganismech, anebo vzácněji v houbách (Connolly a Hill, 2005). Jsou součástí rostlinných vonných silic (éterické oleje). Při poranění, rostlinné silice vytékají na povrch, na vzduchu oxidují a mění se na pryskyřice, čímž ochraňují strom před bakteriální či houbovou infekcí. Získávají se extrakcí za použití nepolárních rozpouštědel a následně destilací s vodní párou.

V dnešní době je identifikováno přes 30 000 sloučenin terpenoidů, z toho 4000 triterpenů. Biosyntéza těchto sloučenin je dána cyklizací triterpenů, která může vést k celé řadě různých triterpenových konstrukcí odvozených od isoprenoidního substrátu 2,3-oxidokvalenu (Thimmappa *et al.*, 2014). Mají tendenci se v rostlinách hromadit jako konjugáty se sacharidy, alkaloidy a jiných makromolekul, nejvíce jako triterpenové glykosidy (saponiny) (Chappell, 2002).

Triterpenové glykosidy mají významné ekologické a agronomické funkce, což přispívá k ochraně před škůdci a kvalitě potravin v zemědělských plodinách. Mají také širokou škálu komerčních aplikací v potravinářském průmyslu, kosmetice, farmaceutických a průmyslových odvětvích biotechnologie (Jörg *et al.*, 2011).

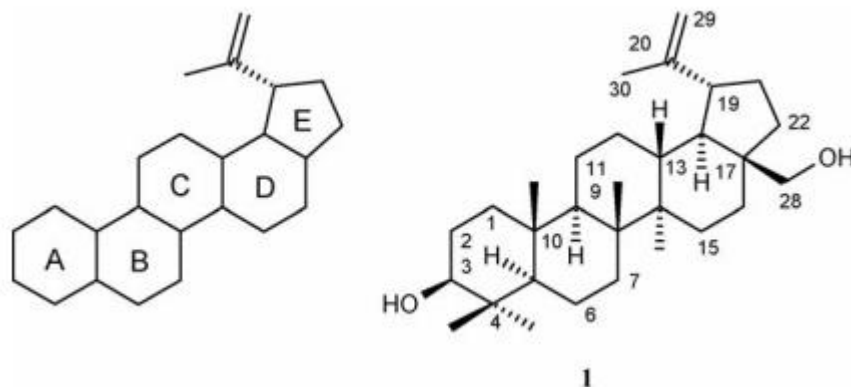
Triterpenoidy mají řadu biologických účinků, ale jen pár derivátů jsou využívány jako léčiva. Hlavním důvodem je to, že biologicky aktivní triterpeny mají nepříznivé farmakologické a fyzikálně-chemické vlastnosti. Tyto sloučeniny nejsou dostatečně účinné v nízkých koncentracích. To je jeden z hlavních důvodů pro mnoho vědeckých společností, zabývajících se syntézou nových látek odvozených od triterpenoidů, za účelem zvýšení aktivity, ale zachování nízké toxicity (Urban, 2015).

V posledním desetiletí je velkým zájmem skupina cyklických triterpenů, lišící se svým biologickým účinkem, například antivirovým, antimikrobiálním, antimykotickým, protizánětlivým, hepatoprotektivním, protinádorovým a řadou dalších (Džubák *et al.*, 2006). O jejich biologické aktivitě je již známo už dříve, kdy se triterpenoidy využívaly v lidovém léčitelství, například pro úlevu od bolesti. Nejvýznamnější skupinou jsou pentacyklické triterpeny, třicetihlíkové struktury, tvořící pět šestičlenných kruhů (ursan a lanostan) nebo čtyři šestičlenné kruhy a jeden pětičlenný kruh (lupan a hopan) (Patočka, 2003).

### 2.2.1 Betulin (lup-20(29)-en-3 $\beta$ ,28-diol)

Betulin byl jako jeden z prvních triterpenů, lupanové struktury, izolovaný v roce 1788 chemikem Johann Tobias Lowitzem z kůry bříz (*Betula sp.*). O účincích kůry břízy je známo už z předchozích let v lidovém léčitelství, kdy se extrakt z kůry bříz využíval (*betulae pix*) pro kožní onemocnění, jako je například ekzém a psoriáza (Hansel *et al.*, 1992). Bílá barva březové kůry je připsána betulinu, která často vyplňuje téměř celý prostor peridermálních buněk. Lze jej izolovat sublimací nebo extrakcí s organickými rozpouštědly (chloroform, dichlormethan, aceton, ethanol a další). Jako složka březové kůry je doprovázena stopovým množstvím lupeolu a kyseliny betulinové, které řadíme taktéž mezi triterpenoidy (Patočka, 2003). Obsah betulinu v březové kůře Skandinávského druhu *B. verrucosa* EHRH. se rovná 30 %, zatímco v Severní Americe u druhu *B. papyrifera* MARSHALL a *B. populifolia* MARSHALL je obsaženo více než 20 % betulinu (Green *et al.*, 1985).

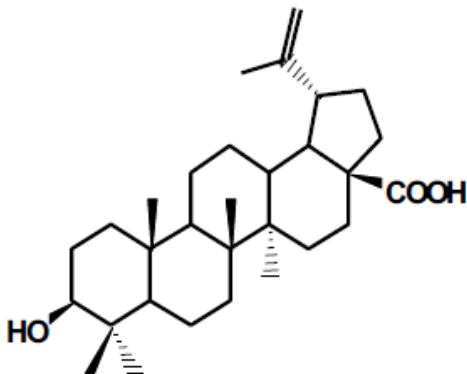
Betulin má tři polohy, které se modifikují za účelem studie vztahu struktury a aktivity (SAR). V pozici C-3 se nachází sekundární hydroxylová skupina, C-28 primární hydroxylová skupina a C-20 alkenová skupina (obr. 1) (Alakurtti *et al.*, 2006). Oxidací betulinu vzniká kyselina betulinová, která vykazuje daleko větší aktivitu než samotný betulin (Zhang *et al.*, 2015; Zuco *et al.*, 2002).



Obr. 1 Struktura kostry lupanu a betulinu (1). Převzato z Alakurtti *et al.*, 2006.

## 2.2.2 Kyselina betulinová (kyselina 3 $\beta$ -hydroxy-lup-20 (29)-en-28-ová)

Je to přirozeně se vyskytující pentacyklický triterpen, který můžeme nalézt v celé rostlinné říši, zejména v kůře bříz *Betula spp.*, *Betulaceae*. Mezi další náležiště kyseliny betulinové patří *Ziziphus spp.* (*Rhamnaceae*), *Syzygium spp.* (*Myrtaceae*), *Diospyros spp.* (*Ebenaceae*) a *Paeonia spp.* (*Paeoniaceae*) (Cichewicz a Kouzi, 2004). První zmínky o izolaci kyseliny betulinové byly popsány doktorem Friedrichem Retzlaffem v roce 1902 z *Gratiola officinalis* L., kdy tuto sloučeninu nazval „graciolon“ (Retzlaff, 1902). V roce 1939 byla tato sloučenina identifikovaná a pojmenovaná Robertsonem a jeho spolupracovníky jako kyselina betulinová (Robertson *et al.*, 1939). Její struktura je odvozena od kostry lupanu jako betulin, liší se v pozici C-28, kde se nachází karboxylová skupina (obr. 2).



Obr. 2 Struktura kyseliny betulinové. Převzato z Fulda, 2008.

Postup izolace kyseliny betulinové zahrnuje extrakci různými rozpouštědly (methanol, ethanol, n-hexanon, ethylacetát) a následnou separaci pomocí chromatografie (Zhang *et al.*, 2015). Množství kyseliny betulinové izolované z rostlin je velmi malé, pohybuje se okolo 0,5 - 2,5 % (Laszczyk, 2009). Proto se spíše uplatňuje syntéza z betulinu, která je k dispozici v uspokojivých množstvích (10 – 30 %).

Bylo navrženo několik průmyslových procesů k syntéze kyseliny betulinové z betulinu (Csuk *et al.*, 2006; Krasutsky *et al.*, 2003, 2006; Pezzuto *et al.*, 2007). V roce 2003 Cichewicz a jeho spolupracovníci objevili 7 způsobů syntézy kyseliny betulinové. Jedním z nich je dvouступňová metoda, kdy v prvním kroku nastává Jones oxidace C-3 a C-28 hydroxylové skupiny betulinu a ve druhém kroku dochází k redukci kyseliny betulinové tetrahydroboritanem sodným na kyselinu betulinovou (Zhang *et al.*, 2015). Nicméně tyto

postupy s oxidací Jonesovým činidlem na kyselinu betulonovou a následnou selektivní redukcí nejsou výhodné, protože se používají toxické Cr (VI) sloučeniny ve velkých množstvích a také vzniká jako vedlejší produkt 3 $\alpha$ -epimerický produkt, což činí izolaci a čištění příliš drahým způsobem syntézy (Pezzuto, 2007). Při alternativním způsobu syntézy se využívají chránicí skupiny, které se používají k selektivní ochraně primárního alkoholu (C-28 hydroxylová skupina) betulinu, následuje acetylace sekundárního alkoholu (C-3 hydroxylová skupina), chránicí skupiny z C-28 hydroxylové skupiny se odstraní a primární alkohol se oxiduje na karboxylovou kyselinu (Cichewicz a Kouzi, 2004).

Nicméně, některé kritické problémy v chemické syntéze zůstávají, včetně problémů reakčních podmínek, bezpečnosti a znečištění (Csuk *et al.*, 2006). Proto se v posledních letech využívá i proces biotransformace betulinu na kyselinu betulonovou pomocí mikroorganismů (Liu *et al.*, 2011).

Biologická aktivita představuje antibakteriální, anti-HIV, antimalarické, protizánětlivé a protinádorové účinky (Steele *et al.*, 1999; Gautam a Jachak, 2009; Cichewicz a Kouzi, 2004; Fontanay *et al.*; 2008). Svým účinkem se podílí na inhibici enzymu aminopeptidasy N v angiogenezi a metastazující činnosti během vývoje nádoru. Nicméně, výsledky účinku jsou konfliktní a význam inhibice enzymu je doposud nejasný (Fulda *et al.*, 1997; Karna *et al.*, 2010; Dehelean *et al.*, 2011). Bylo zjištěno, že kyselina betulonová je potenciálním inhibitorem enzymu ACAT1 (mitochondriální acetyl-CoA acetyltransferasa) a ACAT2 (cytosolová acetoacetyl-CoA thiolasa) katalyzující acylaci cholesterolu a inhibitorem enzymu topoizomerasa I a II (Lee *et al.*, 2006; Wada a Tanaka, 2005; Chowdhury *et al.*, 2002). Její účinek je dán výskytem v prostředí pH nižší než 6,8, což je prostředí růstu většiny rakovinových buněk (Noda *et al.*, 1997).

Charakteristickým rysem cytotoxicity je její schopnost vyvolat mitochondriální dráhu apoptosy v rakovinných buňkách. Po přidání kyseliny betulonové do izolované mitochondrie, vyvolala snížení mitochondriálního membránového potenciálu a následné vyplavení cytochromu c (Fulda *et al.*, 1998). Důkaz podporující apoptosu vychází z vysoké molekulové hmotnosti DNA fragmentů a tvorby reaktivních forem kyslíku (Pisha *et al.* 1995). Kyselina betulonová se liší od ostatních klasických protinádorových látek (např. doxorubicin) tím, že není spojena s aktivací vazby ligand/receptor jako je CD95 a nezahrnuje p53, ale indukuje aktivitu caspas (Fulda *et al.*, 1997).

Anti-HIV účinek samotné kyseliny betulinové vykazuje hodnotu  $IC_{50}$  o koncentraci 1,4 mM. Zájem o rozvoj silnějších anti-HIV účinků vedlo k objevu mnoha vysoce aktivních derivátů, vykazující vyšší aktivitu a lepší terapeutický index. Jeden z prvních derivátů vykazující anti-HIV účinek prostřednictvím inhibice replikace HIV-1 buněk je RPR103611 o hodnotě  $IC_{50}$  v rozmezí 40 a 100 nM (Mayaux *et al.*, 1994). Nejdůležitějším zástupcem této skupiny je kyselina  $3\beta$ -O-3',3'-dimethylsukcinylbetulinová známá jako PA-457 nebo bevirimat s hodnotou  $IC_{50} \sim 0.35$  nM, která má velice silné anti-HIV účinky ale i nízkou toxicitu (Kashiwada *et al.*, 1996). Další skupinou jsou látky s amido skupinou, zejména derivát kyselina 3-alkylamido-3-deoxybetulinová, inhibuje životní cyklus viru v infikovaných buňkách, v jeho časně fázi a brání tak okolním buňkám HIV proliferace (Kashiwada *et al.*, 2000). Přesný mechanismus tohoto účinku ještě zůstává nejasný. Je pravděpodobné, že deriváty kyseliny betulinové interagují s proteinovou vrstvou viru, a tak brání jeho vazbě na buněčné membráně hostitelské buňky, kdy nenavázaný virus není schopen reprodukce. Tyto antivirové vlastnosti kyseliny betulinové byly potvrzeny v klinických studiích (De Clercq, 2000).

Potenciální antiproliferační účinek byl jako první nalezen v buněčné linii melanomu MEL-1, MEL-2 a MEL-4 s hodnotami  $IC_{50}$  v rozmezí od 0,5 - 4,8  $\mu$ g/ml při testování *in vitro* organizací NCI v roce 1995 (Pisha *et al.*, 1995). Následně bylo zjištěno, že je účinná i proti jiným typům rakovinných buněk jako jsou buňky neuroektodermálního původu (Fulda *et al.*, 1999). V roce 2001 byla protinádorová aktivita prokázána u buněčné linie IGROV-1 karcinomu vaječníku, buněčné linie A431 karcinomu děložního čípku, buněčné linie Me665/2/21 a Me665/2/60 melanomu ( $IC_{50}$  1,5 - 1,6  $\mu$ g/ml) a později u buněčné linie SCC9 a SCC25 karcinomu jazyka (Zuco *et al.* 2002; Thurnher *et al.*, 2003). Již v roce 1997 bylo zjištěno, že myší buněčná linie leukémie L1210 byla citlivá na kyselinu betulinovou (Noda *et al.*, 1997). Další studie v roce 2004 tento projev u leukémie potvrdili, kdy v 65% pediatrických vzorků akutní leukémie indukovala apoptosu. Při porovnání s běžnými cytotoxickými látkami, byla účinnější než devět z deseti použitých terapeutických látek (Ehrhardt *et al.*, 2004). Později byl tento antiproliferační účinek prokázán i u dalších nádorů jako nádoru prsu, tlustého střeva a prostaty (Csuk, 2014; Aisha *et al.*, 2012; Chintharlapalli S. *et al.*, 2007).

Další výhodou kyseliny betulinové je jeho nízká toxicita. U normálních buněk nevykazuje při pH > nebo = 7 i při expozici v délce 48 hodin žádnou cytotoxicitu. Pisha a jeho

spolupracovníci podávali myším každý čtvrtý den šest dávek (500 mg/kg) kyseliny betulinové, kdy tyto dávky na hostitelských buňkách nevykazovaly žádnou toxicitu. Další pokusy se prováděly v dávce 250 mg/kg tělesné hmotnosti každý třetí den bez známek toxicity (Pisha *et al.*, 1995; Cichewicz a Kouzi, 2004).

V kombinační léčbě s vincristinem se zvyšuje chemoterapeutický účinek u maligního metastazujícího melanomu (B16F10) nebo v kombinaci spolu s protinádorovými léčivy doxorubicin, VP16, taxol a aktinomycin D, indukuje apoptózu v buňkách neuroblastomu SHEP (Sawada *et al.*, 2004; Fulda a Debatin, 2005). Betulinová kyselina je v současné době ve druhé fázi klinických zkoušek pro léčbu dysplastického névu, má vysoký potenciál se stát novým cytostatikem v boji proti malignímu melanomu (Šarek *et al.*, 2011).

### 2.2.3 Deriváty kyseliny betulinové

Nevýhodou kyseliny betulinové je špatná rozpustnost ve vodě a tím i její aplikace *in vivo*. Deriváty kyseliny betulinové byly syntetizovány za účelem zvýšení aktivity a zachování nízké toxicity. Modifikace kyseliny betulinové jsou možné v polohách C-3, kde se nachází hydroxylová skupina, C-20 alken a C-28 karboxylová skupina (Kim *et al.*, 1998).

Modifikační studie ukázaly, že C-28 karboxylová skupina má rozhodující úlohu v cytotoxické aktivitě. Deriváty C-28 konjugované s aminokyselinami (valin, alanin, leucin, glycin) vykazovali lepší rozpustnost ve vodě stejně jako selektivní cytotoxicitu. Toxicita derivátů byla hodnocena na kultivované lidské buněčné linie melanomu (MEL-2) a karcinomu úst (KB), kdy nejlepší rozpustnost vykazoval konjugát s glycinem a nejlepší profil toxicity oproti kyselině betulinové  $IC_{50}$  4,2  $\mu\text{g/ml}$  vykazoval konjugát s alaninem s hodnotou  $IC_{50}$  1,5  $\mu\text{g/ml}$  u buněčné linie MEL-2 (Jeong *et al.* 1999). Kromě toho, při zavedení polárních skupin na C-28, jako je například amin a hydroxyl skupina došlo také ke zvýšení aktivity (Santos *et al.*, 2009).

Dalším studiem modifikace byla závislost cytotoxicity na typu esteru v poloze C-28. Methyl, ethyl, benzyl estery jsou o řád méně aktivní než kyselina betulinová. Zatímco, acetoxymethyl ester byl stejně aktivní nebo více aktivní než výchozí kyselina a další výhodou bylo zvyšování její hydrofilnosti (Kvasnica *et al.*, 2005; Urban *et al.*, 2005). Derivát NWX-207 (ester kyseliny acetyl betulinové s tris (hydroxymethyl) aminomethanem) má protinádorovou aktivitu v terapii rakoviny u psů a zlepšuje výsledky radioterapie u maligního

gliomu (Willmann *et al.*, 2009; Bache *et al.*, 2014). Při zavedení esteru s cukrem neboli glykosidu nebyla projevna žádná protinádorová aktivita. Příkladem toho je 28-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl betulinát, který má aktivitu o jeden řád nižší než výchozí kyselina (Chatterjee *et al.*, 1999). Zavedení amonné soli ukázalo další cytotoxicitu proti liniím melanomu (Biedermann *et al.*, 2010; Šarek *et al.*, 2008). Soli byly získány dvoustupňovou reakcí kyseliny betulinové a dihydrobetulinové s 1,2-dibromethanu a následující kvarternizací s odpovídajícím aminem (trimethylamin, triethylamin, pyridin). Nejlepší cytotoxicita (IC<sub>50</sub> 1,6  $\mu$ M, buněčná linie UACC 62 melanomu) byla prokázána u kyseliny dihydrobetulinové se zavedením triethylaminu (Biedermann *et al.*, 2010).

Hydroxylová skupina na C-3 byla modifikována za účelem testování cytotoxicity, kdy tyto modifikace zahrnovaly oxidaci, acetylaci a tvorbu různých analogů obsahující dusík (amin, oxim). Zavedením oximové nebo aminové skupiny v pozici C-3 došlo ke snížení aktivity a selektivity v buňkách melanomu. Oxidací hydroxylové skupiny na keton se získal vysoce cytotoxický derivát, nicméně to taky vedlo ke ztrátě specificity k buňkám melanomu (Cichewicz a Kouzi, 2004). A acylací došlo ke vzniku derivátu kyselina 3-O-acetyl betulinová, který nevykazoval žádnou změnu v cytotoxicitě (Kim *et al.*, 1998). Zajímavostí je, že glykosylace v poloze C-28 nepřinesla žádnou změnu v aktivitě kyseliny betulinové, ale glykosylace v poloze C-3 ano.

Nejaktivnějším glykosidem se stal 3 $\beta$ -O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid s 4 krát větší protinádorovou aktivitou u buněčné linie melanomu B-16F1 než samotná kyselina betulinová. Přibližně stejná účinnost byla nalezena v případě 3 $\beta$ -O- $\alpha$ -D-arabinopyranosidu, zatímco 3 $\beta$ -O- $\alpha$ -D-glukopyranosid byl 2 krát méně aktivní než 3 $\beta$ -O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid (Gauthier *et al.*, 2006). Pakulski *et al.* zkoumali protinádorový účinek mannopyranosidů a 3,6-rozvětvených trimannopyranosidů, které byly stereoselektivně připravené z přírodních triterpenů - betulinu a kyseliny betulinové. Přestože se jedná o synteticky atraktivní metodu, mannosylace nepřinesla žádný významný účinek proti buňkám melanomu (Cmoch *et al.*, 2008; Pakulski *et al.*, 2009). Glykosidy 3 $\beta$ -O- $\alpha$ -D-mannopyranosid a 28-O- $\alpha$ -D-mannopyranosid vykazovaly velmi špatné výsledky proti buněčné linie G-361 odvozené od maligního melanomu a trimannopyranosidy nebyly taktéž aktivní (Pakulski *et al.*, 2009). 2-Deoxygalaktosidy a 2-deoxyglukosidy připravené z velké skupiny vysoce oxidovaných lupan hydroxyderivátů mají významnou protinádorovou aktivitu proti buňkám melanomu (Šarek *et al.*, 2009). 2-deoxyglykosidy mají velmi hydrofilní charakter a to činí tyto saponiny snadno použitelné v *in vivo* podmínkách.



Bylo prokázáno, že jsou orálně dostupné a to z nich dělá slibné kandidáty na léčivo proti rakovině (Šarek *et al.*, 2007).

Ze studie vztahu aktivity a struktury (SAR), Qian a jeho spolupracovníci dospěli k závěru, že deriváty v poloze C-3 a C-30 vzniklé modifikací spolu s lipofilním nebo aromatickým postranním řetězcem v této poloze jsou vhodné pro zvýšení inhibiční aktivity proteasomu (Qian *et al.*, 2011).

Deriváty, ve kterých byl upraven postranní řetězec v pozici C-20 zavedením oximové nebo ketonové skupiny, došlo ke ztrátě protinádorové aktivity. Nicméně hydrogenací dvojně vazby nemělo špatný vliv na cytotoxicitu buněk melanomu. Na základě těchto studií, alkenová skupina v pozici C-20 není vhodná pro syntézu účinných derivátů (Kim *et al.*, 2001).

Lupan deriváty obsahující buď nemodifikovaný kruh E a kyslíkové funkční skupiny v polohách 21 a 22 nebo nebo modifikaci E kruhu a 18,19-diketon skupinu (označené jako betuliny) vykazují významnou protinádorovou účinnost proti širokému spektru nádorových buněčných linií včetně melanomových linií (SK-MEL-2 MEL-3, B-16, B-16F) (Šarek *et al.*, 2003).

## 2.3 Apoptosa

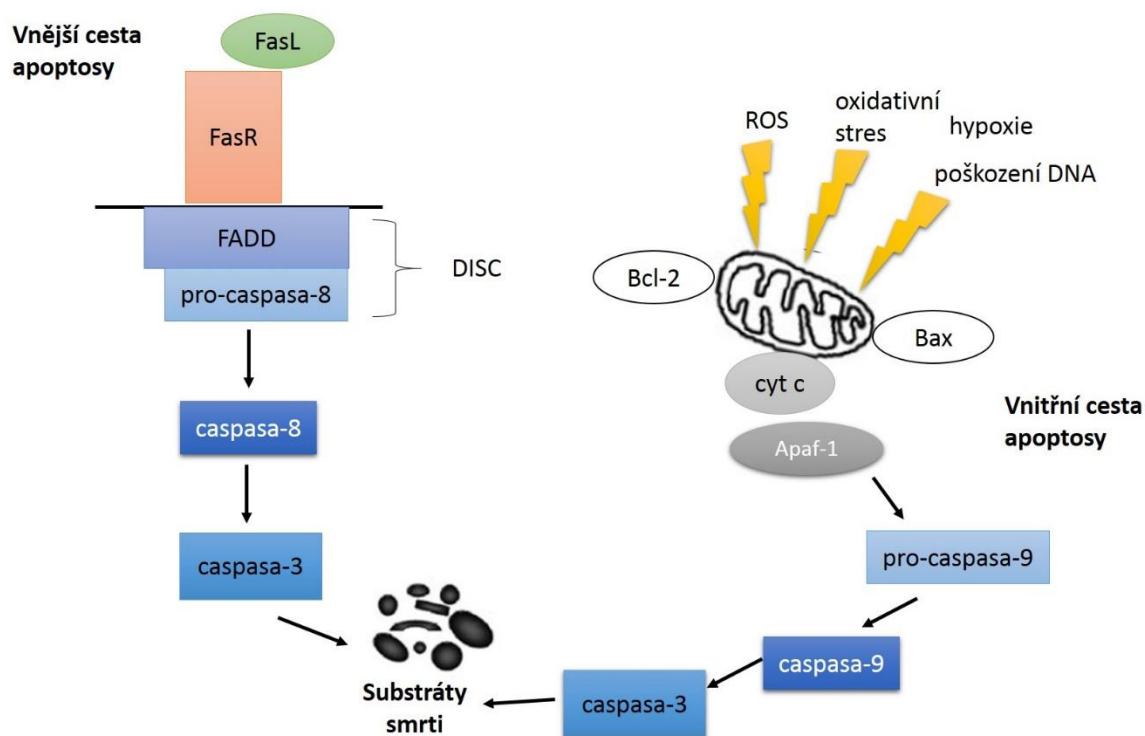
Buněčná smrt je souhrn procesů vedoucí ke konci života buňky. Jedním z těchto procesů je apoptosa, programovaná buněčná smrt, nezbytná pro normální tkáňovou homeostázu, regulovaná signálními dráhami. Zahrnuje aktivaci skupiny cysteinových proteas (caspas) a složitou kaskádu událostí, které vedou vlivem iniciačních podnětů ke konečnému zániku buňky. Existuje široká škála podnětů a podmínek k vyvolání programované buněčné smrti. Například může být vyvolána jako obranný mechanismus v imunitních reakcích nebo při poškození buněk nemocemi či škodlivými látkami (Norbury a Hickson, 2001).

Pomocí světelné nebo elektronové mikroskopie lze zaznamenat různé morfologické změny procesu apoptosy (Hacker, 2000). Tyto změny zahrnují smršťování buňky, "blebbing" membrány (tvorba váčkovitých výrůstků z membrány), nukleární fragmentaci, kondenzaci chromatinu a chromozomální DNA-fragmentaci, které probíhají v rané fázi apoptosy. Poté dochází k oddělení buněčných fragmentů do apoptotických tělísek, které jsou fagocytovány makrofágy (He *et al.*, 2009)

Vnější cesta apoptosy je indukovaná dráhou „receptorů smrti“ (Fas, TNF, CD95, APO-1). Při sekvenování a klonování objevených potenciálních receptorů smrti APO-1/Fas se ukázalo, že oba tyto proteiny mají shodné sekvence (Trauth *et al.*, 1989). Pro tento komplex byl navržen název CD95 (APO-1/Fas), zařazený do podrodiny, která je součástí TNF-receptoru (Tumor nekrotizující faktor) super-rodiny. Členové této rodiny se vyznačují dvěma až pěti kopiemi opakujících se sekvencí bohatých na cystein. Receptory smrti mají intracelulární doménu smrti (DD), která je nezbytná pro transdukcii apoptotického signálu (Walczak *et al.*, 2000). Navázáním příslušného ligandu na receptor (FasL / FasR nebo TNF- $\alpha$  / TNFR1) dochází k aktivaci caspas přes určitý prostředník FADD (Fas associated death domain) vázaný na DD. FADD se spojuje s pro-caspasou-8, kdy dochází k tvorbě komplexu zvaného DISC („death-inducing signaling complex“), který aktivuje například caspasu 8 (iniciační caspasy) štěpící caspasu 3 nebo 7 (efektorové caspasy) a ty štěpí substráty smrti (Kischkel *et al.*, 1995).

Vnitřní cesta souvisí s mitochondriemi. Podněty, které spouští dráhu vnitřní cesty jsou oxidativní stres, poškození DNA, hypoxie (nedostatek kyslíku), reaktivní formy kyslíku (ROS) nebo toxické látky. Tyto signály aktivují pro-apoptotické členy rodiny Bcl-2 proteinů, mění mitochondriální membránový potenciál a tak dochází k propustnosti vnější membrány mitochondrie. Tím se uvolňuje řada proteinů do cytosolu (cytochrom c, Smac, AIF a jiné) (Green a Kroemer, 2004). Vyplavený cytochrom c (cyt c) spolu s proteinem Apaf-1 (faktor aktivující apoptotické proteasy-1) a pro-caspasou-9 vytváří útvar apoptosom, který aktivuje caspasu-9 štěpící caspasu-3 a ta substráty smrti (Obr. 3).

Kontrola a regulace mitochondriální dráhy je regulována členy rodiny proteinů Bcl-2, které se dělí na anti-apoptotické (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-X<sub>S</sub>, Bcl-w, BAG, Mcl-1) a pro-apoptotické (Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik a Blk) proteiny. Ovlivňují propustnost mitochondriální membrány a následné vyplavení cytochromu c. Regulace rovnováhy anti-apoptotických a pro-apoptotických proteinů je řízena proteiny obsahující pouze BH3. A dalším důležitým regulátorem rodiny Bcl-2 je IAP (inhibitor apoptózy). Tyto proteiny inhibují apoptosu vazbou na některé z pro-caspas, aby se zabránilo jejich aktivaci (Cory a Adams, 2002).



Obr. 3: Signální dráhy apoptozy.

### 2.3.1 Caspasy - 3 a -7

Caspasa 3 a 7 jsou členem rodiny cysteinových proteas (caspas) aktivující proces apoptozy. Caspasa 3 je 32 kDa zymogen, který je štěpen na 17 kDa a 12 kDa produkty. Je-li pro-caspasa 3 štěpena, heterotetramer pak může být tvořen hydrofobními interakcemi čtyř anti-paralelních  $\beta$ -listů z p17 a dva z p12 za vzniku heterodimeru, který zase interaguje s jiným heterodimerem za vzniku plně 12 - spletené struktury  $\beta$ -listu obklopené  $\alpha$ -šroubovicí (Lavrik *et al.*, 2005).

Pro-caspasa-7 je tvořena jako protein 303 aminokyselinami a nachází se v cytosolu jako homodimer (Boatright *et al.*, 2003). Strukturálně, homodimer se skládá z centrálně umístěné 12-spletené struktury  $\beta$ -listu, který je obklopen 10  $\alpha$ -šroubovicí. Skládá se ze dvou identických anti-paralelní uspořádaných enzymatických jednotek, z nichž každý nese jedinečné aktivní místo. Každá enzymatická jednotka se skládá z velké a malé katalytické podjednotky, respektive 20 kDa a 11 kDa, které jsou spojeny sekvencí v zymogenu caspasy 7 (Riedl *et al.*, 2001 a Chai *et al.*, 2001).

Cysteinové caspasy jsou aktivovány proteolytickým štěpením a můžeme je dělit na iniciační (-2, -8, -9, -10), efektorové (-3, -6, -7) a zánětlivé (-1, -4, -5, -11, -12, -14) (Ribe *et*

*al.*, 2008). Caspasa -3 a -7 jsou aktivovány štěpením iniciačních caspas v místě mezi malou a velkou podjednotkou, kdy dochází ke konformační změně, která přináší dvě aktivní místa dimeru zralé funkční proteasy (Riedl a Shi, 2004). Tyto aktivní caspasy dále štěpí substráty jako je např. DFF, PARP, PKC $\delta$  (protein kinasa C  $\delta$ ), MEKK a U1-70kD, kdy dochází k indukci apoptozy (Stenicke a Salvesen, 1998).

Ačkoli caspasy hrají klíčovou úlohu v apoptose, na rozdíl od mutací p53, mutace genů Casp není v lidských nádorových buňkách příliš častá. Snížená exprese pro-apoptotických caspas byla studována u řady nádorových onemocnění (Philchenkov *et al.*, 2004). Jedna studie zkoumala kódující oblast caspasy-3 v 944 nádorech 14 různých typů ve srovnání se zdravou sousední tkání. Nicméně, pouze u 14 nádorů (1,48%) byla dosažena somatická mutace CASP3 (Soung *et al.*, 2004). V další studii byly zkoumány somatické mutace v CASP7, které se vyskytly u dvou z 98 karcinomů tlustého střeva (2,0%), jednoho z 50 karcinomů jícnu (2,0%) a jednoho z 33 karcinomů hlavy/krku (3,0%), ale nikoli v žaludku, močovém měchýři nebo plic (Soung *et al.*, 2003). Analýzy ukázaly, že inaktivace jednotlivých caspas a mutace genů Casp nejsou dostatečné k tomu, aby se zabránilo buď pokračování caspasové kaskády, nebo odstranění mechanismů vedoucí k buněčné smrti.

### **2.3.2 PARP-1 [Poly (ADP-ribose) polymerase-1]**

PARP-1 má velikost 116 kDa a skládá se ze tří funkčních domén. Automodifikační doména, která je bohatá na kyselinu glutamovou, obsahuje na C-konci motiv BRCA1 (BRCT), který je nalezen v několika proteinech podílejících se na reakci při poškození DNA. Zprostředkovává interakci s XRCC1, PARP-2, hUBC9, histony DNA polymerázy  $\beta$  a transkripční faktory. Automodifikační doména se podílí i na PARP-1 dimerizaci a jiných protein-protein interakcích (Buki *et al.*, 1995). Amino-terminální DNA-vazebná doména obsahuje dva zinkové prsty, které působí jako „nick sensor“ při poškození DNA (D'Amours *et al.*, 1999; Hakme *et al.*, 2008). Katalytická doména je nezbytná pro katalyzu přenosu ADP-ribosy zbytku NAD<sup>+</sup> na konkrétní podskupinu jaderných substrátů v reakci na poškození DNA, pro polymeraci a větvení se reakce (Simonin *et al.*, 1993).

Poly (ADP-ribosyl) ace je důležitým mechanismem pro udržování genomové integrity v odpovědi na DNA poškození. Enzym odpovědný za poly (ADP-ribosa) syntézu, poly (ADP-ribóza) polymerasa 1 (PARP-1), je zapojena do dvou odlišných režimů buněčné smrti

indukované poškozením DNA, a to apoptosy a nekrosy. Rozhodnutí, zda buňka zemře cestou nekrosy nebo apoptosy může být modulována podle stupně aktivace PARP-1. V poslední době bylo prokázáno, že nadměrná aktivace PARP-1 způsobuje sníženou aktivitu NAD<sup>+</sup>-dependentního buněčného procesu, včetně syntézy ATP. Dojde tak k vyčerpání energie a tím k procesu nekrosy (Ha a Snyder, 1999).

Cesta apoptosy je řízena caspasami 3 a 7. PARP-1 je štěpen caspasami (3/7) na 24 kDa DNA-vazebné domény a 89 kDa katalytické fragmenty (Nicholson a Thornberry 1999; Germain *et al.*, 1999). Hlavním důvodem pro inaktivaci PARP-1 a vyhnutí procesu nekrosy je zachování buněčné energie ve formě ATP nezbytné pro apoptosu (Eguchi *et al.*, 1997). Nedávné studie ukázaly, že cesta buněčné smrti iniciována aktivitou PARP-1 je zprostředkována AIF (apoptosa indukující faktor), kdy AIF translokace vyžaduje PARP-1 aktivitu. Translokace AIF z mitochondrie do jádra může být spuštěna poly (ADP-ribosyl)ací (Yu *et al.*, 2002).

### **2.3.3 Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma 2)**

Bcl-2 byl původně identifikován jako onkogen podílející se na lidském folikulárním lymfomu původem z B-buněk (Tsujimoto *et al.*, 1984). V roce 1988, Vaux a jeho kolegové objevili anti-apoptotickou aktivitu tohoto proteinu vyvolané nedostatkem IL-3 (Vaux *et al.*, 1988). Obsahuje všechny čtyři BH domény na rozdíl od pro-apoptotických členů rodiny Bcl-2 (pouze 3 BH domény). Přítomnost hydrofobních aminokyselin na karboxylové doméně Bcl-2 proteinu umožňuje jeho post-translačnímu uložení do intracelulárních membrán, zejména vnější mitochondriální membrány a části v endoplasmatickém retikulu (Tsujimoto *et al.*, 1986; Chen-Levy a Cleary, 1990, Krajewski *et al.*, 1993). Koimunoprecipitačními experimenty naznačují, že Bcl-2 se může vázat na Bax a tvořit tak heterodimery nebo heteromultimery a inhibovat tak jeho pro-apoptotickou funkci (Oltvai *et al.*, 1993). Naopak Bax může inhibovat aktivitu Bcl-2 nahrazením oblasti BH3 z Bcl-2 oblastí BH3 z Bax, což naznačuje, že doména BH3 má určitou funkci u anti a pro-apoptotických členů rodiny Bcl-2 (Hunter a Parslow, 1996). Kromě toho, na základě kvasinkového dvou-hybridního experimentu, Bcl-2 se dokáže vázat i s ostatními anti-apoptotickými členy s Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-X<sub>S</sub> a Mcl-1 za tvorby heterodimerů. Tato vazba může být důsledkem v řízení a odolnosti buněk k apoptose (Sato *et al.*, 1994).

Bcl-2 je velmi důležitým anti-apoptotickým faktorem jak normálních tak i různých typů rakovinných buněk. Leiter a jeho kolegové (Leiter *et al.*, 2000) objevil zvýšení Bcl-2 v melanomových metastázích ve srovnání s primárním nádorem. Jiné studie však hlásili sníženou expresi Bcl-2 v metastazujících nádorech. (Tang *et al.*, 1998; Alonso *et al.*, 2004; Zhuang *et al.*, 2007; Zhuang *et al.*, 2010). Pozorovaný rozpor mezi výsledky (Zhuang *et al.*, 2007; Leiter *et al.*, 2000) mohl být částečně vysvětlen komplexní heterogenitou melanomu (Hoek *et al.*, 2010). Avšak důležité je, že Bcl-2 byl označen jako kritický regulátor růstu melanomu *in vivo*, na kterém se zakládají různé studie vývoje léků s anti-Bcl-2 účinky (Piro, 2004).

### **2.3.4 Mcl-1 (myeloid cell leukemia 1, myeloidní buněčná leukemie 1)**

Mcl-1 je anti-apoptotický člen rodiny Bcl-2. Obsahuje 350 zbytků aminokyselin, oblasti podobné s ostatními proteiny Bcl-2 rodiny označované jako BH domény, N-terminální doménu a C-terminální doménu (Kozopas *et al.*, 1993). Pomocí BH domén se zprostředkovávají proteinové interakce mezi dalšími proteiny rodiny Bcl-2 a mimoto slouží k regulaci apoptosy (Gross *et al.*, 1999). Avšak Mcl-1 obsahuje pouze BH domény 1-3 a má větší velikost (40/42 kDa) než Bcl-2 (26 kDa) a Bcl-XL (29 kDa), v důsledku přítomnosti PEST sekvence na N-terminální doméně (Michels *et al.* 2003, Akgul *et al.*, 2000). N-terminální doména obsahuje dvě PEST sekvence, bohaté na aminokyselinové zbytky prolinu (P), kyseliny glutamové (E), serinu (S) a threoninu (T), vyskytující se u proteinů s krátkým poločasem rozpadu (okolo 3 hodin) (Kozopas *et al.*, 1993, Akgul *et al.*, 2000). Karboxylová oblast proteinu neboli transmembránová obsahuje hydrofobní aminokyselinové zbytky. Slouží k lokalizaci Mcl-1 proteinu na různých intracelulárních membránách, zejména na vnější mitochondriální membráně (Yang *et al.*, 1995). Alternativní sestřih Mcl-1 vede ke vzniku druhé proteinové isoformě: Mcl-1S/ $\Delta$ TM, která postrádá domény BH1-2 a transmembránovou doménu (Bingle *et al.*, 2000). Její význam není zcela ověřen, ale podobá se pro-apoptotickým proteinům obsahující pouze BH3 doménu (Gross *et al.*, 1999).

Nadměrná exprese Mcl-1 byla popsána u několika hematologických nádorových onemocnění (Aichberger, *et al.*, 2005, Gouill, *et al.*, 2004) včetně chronické myeloidní leukémie a hepatocelulárního karcinomu (Sieghart *et al.*, 2006). Edgar Selzer a jeho skupina objevili existenci Mcl-1 v lidském melanomu. Bylo zjištěno, že exprese Mcl-1 je rychle

indukována kyselinou betulinovou. Nicméně, tento mechanismus není zcela znám, ale je dalším pokrokem v terapii nádorových onemocnění (Selzer *et al.*, 2002).

Svým anti-apoptickým mechanismem brání uvolnění cytochromu c z mitochondrií, popřípadě neutralizuje pro-apoptické proteiny rodiny Bcl-2 (BIM nebo Bak) (Cuconati *et al.*, 2003 a Opferman *et al.*, 2003). Protein Mcl-1 je taky důležitý ve vývoji a diferenciaci T a B-lymfocytů (Opferman, *et al.* 2003), hraje kritickou roli v regulaci apoptosy makrofágů a neutrofilů a je nezbytný pro přežití krvetvorných buněk a synoviálních fibroblastů (Luke, *et al.*, 2010).

### 2.3.5 Protein p53

P53 je oligomerní fosfoprotein, který se váže na specifické sekvence DNA a aktivuje transkripci cílových genů jak *in vivo*, tak *in vitro* (Vogelstein a Kinzler, 1992). Nemutovaný protein p53 se v buňce nachází v latentní formě s velmi krátkým poločasem rozpadu. K jeho funkční aktivaci dochází teprve v reakci na poškození DNA, hypoxii (nedostatek kyslíku) a onkogenní aktivaci. Tyto stresové situace jsou zodpovědné za fosforylaci N- a C-koncových oblastí p53, což vede i k zadržení proteinových oligomerů v jádře (Ko a Prives, 1996). Takto stabilizovaný protein p53 aktivuje transkripci genů, které kódují proteiny podílející se na regulaci buněčného cyklu, reparace DNA a/nebo apoptosy (Levine, 1997; Giaccia a Kastan, 1998). Mezi geny indukované p53 patří p21 - inhibitor Cdk a mnoho genů kódujících pro-apoptotické proteiny. Negativním regulátorem p53 je Mdm-2 (Hdm2 u lidí), který hraje roli v potlačení reakce p53. MDM2 se váže přímo na p53, katalyzuje inhibici transkripce a ubikvitinaci p53 (Juven-Gershon a Oren, 1999). Na druhé straně, p19Arf se může vázat přímo na Mdm2 a potlačit tak jeho funkci (Sherr, 2001).

Gen p53 je mutován ve více než 50 % nádorových onemocnění, a mutace v dalších genech, které ovlivňují funkci p53 se vyskytují taky v mnoha nádorech, které si zachovávají normální funkci genu p53. Mezi nimi jsou mutace, které ovlivňují hdm2, ARF a řada transkripčních faktorů, které řídí ARF a expresi genu p53 (Jacks, 1996).

### 2.3.6 Rb (retinoblastomový) protein

Rb protein je složen z 928 aminokyselin a má molekulovou hmotnost 110 kDa. Skládá se ze tří domén, centrální doména se označuje jako kapsa a je složena ze dvou subdomén připomínajících cyklinový „box“. Patří do skupiny tumor supresorových genů regulující buněčný cyklus. Ve své nefosforylované formě, kdy je navázán na transkripční faktor E2F zastavuje buněčný cyklus ve fázi G<sub>1</sub> a brání tak i proliferaci nádorových buněk (Weintraub *et al.*, 1995). Tento komplex udržuje histony jádra v neacytalované formě a omezuje tak přístup transkripčním faktorům regulující transkripci důležitých genů pro dělení buněk (Brehm *et al.*, 1998). Stimulace cyklin D/cdk4 fosforyluje Rb v C-terminální oblasti proteinu, narušuje vazebnou oblast pro E2F a způsobí tak jeho uvolnění. Tato změněná konformace umožňuje navázání cyklin dependentní kinázy CDK2, která dává signál k buněčnému dělení v S fázi buněčného cyklu (Harbour *et al.*, 1999).

Čtyři INK4 proteiny (p16, p15, p18 a p19) specificky inhibují aktivitu cyklin D-dependentních kinas, aby se zabránilo fosforylaci Rb proteinů (Roussel, 1999). V současné době existuje přesvědčivý důkaz, že inaktivita Rb proteinu a skupiny proteinů INK4 a zvýšená exprese cyklin D1 nebo CDK4 je zásadní pro tvorbu nádorových buněk (Ortega *et al.*, 2002).



## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 MATERIÁL

#### 3.1.1 Přístrojové vybavení

V experimentální části bakalářské práce byly použity následující přístroje: flowbox s vertikálním prouděním vzduchu TC 48 (Gelaire, Austrálie); CO<sub>2</sub> inkubátor (Sanyo, Japonsko); optický mikroskop Nikon TMS (Nikon, Japonsko), Olympus CK2 (Olympus, Japonsko); centrifuga BR4i (Jouan, Saint-Herblain, Francie); vodní lázeň (GFL, Německo); ultrazvukový homogenizátor Sonoplus HD2200 (Bandelin, Německo); třepačka MR-1 (Biosan, Lotyšsko); UV-VIS spektrofotometr UV-1800 (Shimadzu, Japonsko); aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad, USA); blotovací aparatura Mini Trans-Blot Cell (BioRad, USA); chemiluminiscenční kamera LAS4000 (FujiFilm, Japonsko); průtokový cytometr Cell Lab Quanta™ SC-MPL (Beckman Coulter, USA); fluorescenční detektor Fluoroskan Ascent (Labsystems, Finsko).

#### 3.1.2 Použité chemikálie

|  |               |
|--|---------------|
| Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylkumarin (Ac-DEVD-AMC) | Sigma-Aldrich |
| Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyd (Ac-DEVD-CHO)                 | Sigma-Aldrich |
| Akrylamid  | Sigma-Aldrich |
| Aprotinin  | Sigma-Aldrich |
| Bis akrylamid  | Sigma-Aldrich |
| Bromfenolová modř  | Sigma-Aldrich |
| Butanol  | Lach-ner      |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                                      | Sigma-Aldrich |
| Dithiothreitol (DTT)   | Sigma-Aldrich |
| Dodecylsírán sodný (SDS)                                     | Lach-ner      |
| Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)                    | Sigma-Aldrich |
| Ethanol 96%  | Penta         |
| Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA)                     | Sigma-Aldrich |
| Ethylenglykoltetraoctová kyselina (EGTA)                     | Sigma-Aldrich |
| Fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)                            | Sigma-Aldrich |
| Fetální telecí sérum (FS)                                    | BioTech       |
| Fluorid sodný (NaF)  | Sigma-Aldrich |

|  |                   |
|--|-------------------|
| Glutamin   | Sigma-Aldrich     |
| Glycerol   | Lach-ner          |
| Glycin   | MP Biomedicals    |
| Hovězí sérový albumin (BSA)  | Sigma-Aldrich     |
| Hydroxid draselný  | Sigma-Aldrich     |
| 4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-ethansulfonová kyselina (HEPES)     | Sigma-Aldrich     |
| 3-(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio)-1-propansulfonát (CHAPS)    | Sigma-Aldrich     |
| Chemiluminiscenční činidlo luminol-peroxid (1:1)                   | Thermo Scientific |
| Chlorid draselný (KCl)   | Penta             |
| Chlorid sodný (NaCl)   | Lach-ner          |
| Leupeptin  | Sigma-Aldrich     |
| 2-merkaptioethanol   | Serva             |
| Methanol   | Penta             |
| Nonidet – 40   | Sigma-Aldrich     |
| Penicilin  | Sigma-Aldrich     |
| Peroxodosíran amonný (APS)   | Sigma-Aldrich     |
| Ponceau S  | Serva             |
| Propidium jodid  | Sigma-Aldrich     |
| Proteinový marker (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder) | Thermo Scientific |
| Streptomycin   | Sigma-Aldrich     |
| Tetramethylethylendiamin (TEMED)                                   | Sigma-Aldrich     |
| Tris (hydroxymethyl) aminomethan (TRIS)                            | MP Biomedicals    |
| Triton X-100   | Sigma-Aldrich     |
| Trypsin  | Sigma-Aldrich     |
| Tween 20   | MP Biomedicals    |

#### **Výrobce/Stát**

Sigma-Aldrich (USA), Penta (ČR), Thermo Fisher Scientific (USA), Serva (Německo), MP Biomedicals (USA), Sigma (USA), Lach-Ner (ČR).

### **3.1.3 Použité roztoky**

10 % DMEM: 10% fetální sérum, streptomycin (0,1 mg/ml), penicilin (100 U/ml) a L-glutamin (2 mM)

Trypsin/EGTA: 0,1 % trypsin, 0,25% EGTA

0,5 % EGTA pH 7,2: 2,5 g EGTA/ 500 ml PBS  
PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O; 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4  
RIPA pufr: 20 mM TRIS-HCl pH 7,4; 100 mM NaCl; 5 mM EDTA; 2 mM EGTA; 0,2% Nonidet P-40 (pH = 7,4); těsně před použitím přidáno: 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 0,5 µg/ml leupeptin; 2 µg/ml aprotinin, 2 mM NaF  
Činidlo Bradford: 0,01% Coomassie brilliant blue; 95% ethanol; 85% kyselina *o*-fosforečná  
AA+Bis: 30% Akrylamid (AA) + 0,8% Bisakrylamidu (Bis AA): 58,4 g AA + 1,6 N'N Bis AA/200ml  
1 M TRIS/HCl pH 8,8: 48,46 g TRIS/ 400 ml pH 8,8  
1 M TRIS/ HCl pH 6,8: 24,23 g TRIS/ 200 ml pH 6,8  
10% SDS: 5 g SDS / 50 ml H<sub>2</sub>O  
10% APS: 0,1 g / 1 ml H<sub>2</sub>O  
Elektroforetický pufr: 37,8 g TRIS, 180 g Glycin, 12,5 g SDS / 2,5 l H<sub>2</sub>O  
5x SDS vzorkový pufr: 0,3 M TRIS pH 6,8; 10% SDS, 50% glycerol, 0,05% bromfenolová modř; 5% 2-Merkaptoethanol  
TBS: 137 mM NaCl, 20 mM TRIS pH 6,8  
TBS s 0,1 % Tweenem 20: 500 ml TBS + 500 ml 0,1 % Tween 20  
Blokovací roztok: 5 % BSA v TBS s Tweenem 20: 2,5 g BSA / 50 ml TBS s Tweenem 20  
Blotovací pufr: 30,3 g TRIS, 144 g Glycin/ 1 litr H<sub>2</sub>O  
Ponceau S: 0,2 % v 1 % kyselině octové  
Caspasový lyzační pufr: 10mM KCl, 5mM Hepes pH 7,4; 1mM EDTA; 1mM EGTA a 0,2% CHAPS; před použitím přidat 1 mM DTT; 0,5 µg/ml leupeptin; 2 µg/ml aprotinin; 1 mM PMSF  
Caspasový reakční pufr: 25 mM PIPES/KOH, pH 7,3; 2mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub> ; před použitím přidat 1 mM DTT, substrát Ac-DEVD-AMC: 10 mM roztok v DMSO  
Inhibitor caspasy 3/7: 1 mM Ac-DEVD-CHO v DMSO

### **3.1.4 Použité protilátky**

#### **Primární protilátky**

anti-PARP (rabbit, klon 46D11, ředění 1:500), Cell signaling technology  
anti-p53 (mouse, klon DO-1, ředění 1:1000), Dr. B. Vojtěšek z MOÚ v Brně  
anti-Mcl-1 (rabbit, klon S-19, ředění 1:500), Santa Cruz biotechnology  
anti-Bcl-2 (mouse, klon 10C4, ředění 1:1000), Sigma-Aldrich  
anti-Rb (mouse, klon 4H1, ředění 1:1000), Cell signaling technology  
anti-pRb (rabbit, klon S780, ředění 1:1000), Cell signaling technology  
anti-caspase-7 (rabbit, ředění 1:500), Cell signaling technology

anti-caspase-3 (mouse, ředění 1:500), Cell signaling technology

anti- $\beta$ -actin (mouse, klon C4, ředění 1:2000), Santa Cruz biotechnology

### **Sekundární protilátky**

RAM/Px (rabbit anti-mouse, ředění 1:1000), Sigma-Aldrich

SwAR/Px (swine anti-rabbit, ředění 1:1000), Sigma-Aldrich

### **Výrobce/Stát**

Sigma-Aldrich (USA), Cell Signaling Technology (USA), Santa Cruz Biotechnology (USA).

### **3.1.5 Použitá buněčná linie**

Experimenty byly provedeny na adherentní nádorové buněčné linii G-361 odvozené od lidského maligního melanomu získané z Evropské kolekce ověřených buněčných kultur (ECACC, UK).

Buněčná linie byla kultivovaná na sterilních plastových Petriho miskách (TPP, Švýcarsko), v kultivačním médiu DMEM, obohacené 10% telecím fetálním sérem, streptomycinem (0,1 mg/ml), penicilinem (100 U/ml) a L-glutaminem (2 mM), v inkubátoru při teplotě 37 °C a v atmosféře s obsahem 5 % oxidu uhličitého.

### **3.1.6 Testované deriváty kyseliny betulinové**

Výchozí struktura kyseliny betulinové a 21-oxo-18-lupenové byla různě modifikovaná v poloze C-3, C-20 a C-28 za účelem studie nově syntetizovaných derivátů dr. Janem Šarkem (Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci).

V experimentální části bakalářské práce byly testovány deriváty kyseliny betulinové **6** (derivát kyseliny 21-oxo-18-lupenové), **12** (derivát kyseliny betulinové), **17** (derivát kyseliny 21-oxo-18-lupenové), které byly připraveny jako 7,5 mM zásobní roztoky v DMSO a dle potřeby byly naředěny na požadovanou koncentraci do kultivačního média (1, 10 a 20  $\mu$ M).

Proti buňkám lidského maligního melanomu G-361 vykazovaly hodnoty cytotoxicity: látka **6**  $IC_{50}$  7,0  $\pm$  0,0  $\mu$ M, **12** -  $IC_{50}$  3,4  $\pm$  0,1  $\mu$ M a látka **17** -  $IC_{50}$  1,6  $\pm$  0,3  $\mu$ M.

## 3.2 METODY

### 3.2.1 Ovlivnění buněčné linie a sklizení

Buněčná linie G-361 byla kultivována v Petriho misce (100 mm) při teplotě 37 °C v atmosféře obsahující 5 % oxidu uhličitého. Buňky byly vysazeny do Petriho misek v objemu 10 ml buněčné suspenze. Pomocí Bürkerovy komůrky a optického mikroskopu byly spočítány na požadovanou koncentraci  $1,7 \times 10^6$  buněk do misky o objemu 10 ml. Po 24 hodinové kultivaci v inkubátoru bylo médium skleněnou pipetou odsáto a poté bylo přidáno 5 ml předem naředěné testované látky (**6**, **12** a **17**) v kultivačním médiu o zvolené koncentraci (1, 10, 20  $\mu$ M). K buňkám sloužícím jako kontrola bylo přidáno pouze kultivační médium (10% DMEM). Po další 24 hodinové kultivaci byly buňky sklizeny pro danou analyzovanou metodu (Western blotting, průtoková cytometrie, biochemický test caspasy 3/7).

Sklizení buněk probíhalo na ledě, aby se zabránilo denaturaci proteinů. Buňky byly uvolněny ze dna Petriho misky pomocí škrabky. Obsah seškrábnuté buněčné suspenze se přepipetoval do zkumavky a zbylé buňky na dně kultivační nádoby byly spláchnuty 1 ml PBS. Buňky ve zkumavkách byly centrifugovány 10 minut při 1000 g v předem vychlazené centrifuze o teplotě 4 °C. Supernatant byl odsát a pelet rozpuštěn v 1 ml PBS. Po další centrifugaci za stejných podmínek, byl pelet resuspendován v 1 ml PBS a přenesen do 1,5 ml mikrozkušavek. Při poslední centrifugaci se supernatant opět odsál a pelet byl uchován v mrazáku o teplotě -80 °C pro analýzu metodou Western-blotting nebo biochemického testu caspas -3 a -7.

Pro analýzu pomocí průtokového cytometru byly buňky sklizeny trypsinizací. Nejprve se kultivační médium odpipetovalo do zkumavek a buňky byly spláchnuty dvakrát 1 ml PBS (filtrované). Až poté byl do misky přidán roztok trypsin/EGTA, který se nechal působit až do doby, než se buňky uvolnily ze dna misky. Po úplném uvolnění buněk ze dna nádoby se buňky spláchly 5 ml kultivačním médiem a celý obsah se přepipetoval do zkumavky. Následovala centrifugace 10 minut při 1000 g a teplotě 4°C. Supernatant byl odsát a pelet rozpuštěn v 1 ml PBS (filtrované). Po další centrifugaci za stejných podmínek, byl pelet resuspendován v 100  $\mu$ l PBS (filtrované). Důležitým krokem bylo zafixování buněk pomocí vychlazeného 1 ml 70% ethanolu přidávaného po kapkách, při mírném míchání na vortexu. Následně byly buňky uskladněny v lednici při teplotě -20 °C.

### **3.2.2 Lyzování buněk**

Lyzace buněk pro metody western blotting a caspasový test se provádí stejným způsobem za použití odlišných lyzačních pufrů. U metody western blotting se při resuspendování peletu použil lyzační pufr RIPA (před použitím přidání DTT, leupeptin, aprotinin, PMSF a NaF) a u buněčných peletů při stanovení aktivity caspas se použil caspasový lyzační pufr obsahující 10mM KCl, 5mM Hepes pH 7,4; 1mM EDTA; 1mM EGTA a 0,2% CHAPS (před použitím přidání DTT, leupeptin, aprotinin a PMSF). Do jednotlivých zkumavek se přidalo potřebné množství lyzačního pufru (30-50  $\mu$ l dle velikosti peletu). Vzorky byly sonikovány použitím ultrazvukového homogenizátoru (3 cykly, 10 sekund, 30 % max.). Poté byla provedena centrifugace 25 minut při 14 000 rpm a teplotě 4 °C. Definovaný objem (maximum) supernatantu se přepitoval do nových zkumavek. Do skleněných zkumavek se odměřilo činidlo bradford a k tomu se přidalo 1  $\mu$ l vzorku. Po 5 minutové inkubaci od prvního vzorku s činidlem bradford se stanovilo celkové množství proteinů metodou Bradford (Bradford, 1976) při 595 nm na UV-VIS spektrofotometru. Po přepočítání byly lyzáty naředěny lyzačním pufrům na stejnou koncentraci proteinů (u Western blottingu na nejnižší koncentraci proteinu a u caspasového testu na koncentraci 3  $\mu$ g/ $\mu$ l). Ke vzorkům určené pro western blotting metodu bylo navíc přidáno množství 5x SDS. Poté byly lyzáty zahřáty 2 minuty při 95 °C a uschovány pro SDS-PAGE elektroforézu a Western blotting v mrazáku o teplotě -80°C.

### **3.2.3 SDS-PAGE, Western blotting a imunodetekce proteinů**

Proteiny byly separovány vertikální polyakrylamidovou elektroforézou v 10% dělicím gelu a 5% zaostřovacím gelu (složení v Tabulce 1). Do jamek bylo napipetováno 5  $\mu$ l vzorku proteinu a do boční jamky 3  $\mu$ l standardu molekulových hmotností proteinů. Bylo nastaveno napětí 80 V po dobu běhu vzorků a hlavně molekulového markeru v zaostřovacím gelu. Další běh vzorku v dělicím gelu pokračoval při změně napětí na 120 V. Po doběhu markeru na konec dělicího gelu, byl gel zbaven zaostřovacího gelu a gel se separovanými proteiny byl následně přenesen na nitrocelulosovou membránu. Přenos probíhal při napětí 270 mA za stálého míchání a chlazení blotovacího pufru v nádobě s blotovací kazetou po dobu 2 hodin. Po ukončení blotování byla membrána obarvena v roztoku Ponceau asi 5 minut, opláchnutá destilovanou vodou a usušená na filtračním papíře. Membrána se nařezala dle velikosti sledovaných proteinů a tyto proužky byly odbarveny v roztoku TBS. Nespecifické vazby

proteinů byly zablokovány v 5% roztoku BSA s TBS a Tweenem 20 po dobu 1 hodiny na kývačce při laboratorní teplotě. Po zablokování se membrány propláchly TBS.

Imunologická detekce probíhala za použití primárních protilátek dle potřeby naředěné 5% BSA v TBS s 0,1% Tweenem 20 blokovacím pufrem. Inkubace membrán s primárními protilátkami probíhala přes noc při teplotě 4 °C. Následující den byly membrány promyty a to následujícími kroky: 5 minut v TBS, 5 minut v TBS s 0,1% Tweenem 20, 5 minut v TBS a poté 10 minut v TBS. Sekundární protilátky byly naředěny blokovacím pufrem a aplikovány na membrány. Inkubace probíhala 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po ukončení inkubace se opět membrány promyly a to následujícím způsobem: 10 minut v TBS, 5 minut v TBS s 0,1% Tweenem 20, 5 minut v TBS a 10 minut v TBS. Nakonec byla provedena detekce chemiluminiscencí za použití substrátu činidla peroxidu vodíku a luminolu v poměru 1:1. Detekční signál byl zaznamenán pomocí CCD kamery a snímky byly následně analyzovány v programu Image Reader.

Tabulka 1: Příprava 10% dělicího a 5% zaostřovacího gelu.

| Chemikálie       | 10% dělicí gel |          | Chemikálie       | 5% zaostřovací gel |         |
|------------------|----------------|----------|------------------|--------------------|---------|
|                  | 4 gely         | 2 gely   |                  | 4 gely             | 2 gely  |
| AA+Bis           | 6,25 ml        | 3,125 ml | AA+Bis           | 1,67 ml            | 0,84 ml |
| H <sub>2</sub> O | 5,34 ml        | 2,67 ml  | H <sub>2</sub> O | 7,03 ml            | 3,51 ml |
| TRIS pH 8,8      | 7 ml           | 3,5 ml   | TRIS pH 6,8      | 1,25 ml            | 0,63 ml |
| SDS 10 %         | 188 µl         | 94 µl    | SDS 10 %         | 100 µl             | 50 µl   |
| TEMED            | 12,5 µl        | 6,25 µl  | TEMED            | 10 µl              | 5 µl    |
| APS              | 75 µl          | 37,5 µl  | APS              | 60 µl              | 30 µl   |

### 3.2.4 Analýza buněčného cyklu

K vyhodnocení procentuálního zastoupení počtu buněk ve fázích (subG<sub>1</sub>, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S a G<sub>2</sub>/M) buněčného cyklu byl použit průtokový cytometr. Fáze subG<sub>1</sub> odpovídá procentuálnímu zastoupení počtu apoptotických buněk a jejich fragmentů. Vizualizace buněk v jednotlivých fázích byla provedena pomocí barvení propidium jodidem. Propidium jodid je fluorescenční barvivo, které interkaluje do struktury dvoušroubovice DNA a po ozáření světlem o vlnové délce 488 nm dochází k emisi záření kolem 610 nm. Pomocí analýzy fluorescenčního signálu propidium jodidu se stanoví obsah DNA v buňce a tím fáze buněčného cyklu, ve které se buňka právě nachází.

Buňky zafixované vychlazeným 70% ethanolem byly centrifugovány při 1000 g a 4 °C po dobu 5 minut. Supernatant byl odsát a pelet rozpuštěn v 1 ml PBS (filtrované). Po další centrifugaci za stejných podmínek, byl pelet pořádně resuspendován v 1 ml PBS (filtrované), do kterého bylo navíc přidáno 1  $\mu$ l Tritonu X-100 a 10  $\mu$ l propidium jodidu. Inkubace probíhala 30 minut ve tmě za laboratorní teploty. Obsah zkumavek byl přepipetován do vialek, které byly vloženy do průtokového cytometru. Analýza probíhala na kanále FL3 (fluorescent light, záření okolo 670 nm) v programu Quanta Analysis.

### **3.2.5 Fluorimetrické stanovení aktivity caspasy 3/7**

Fluorimetrické měření aktivity caspasy 3/7 je založeno na hydrolýze peptidového substrátu značeného 7-amido-4-methylkumarinem (Ac-DEVD-AMC). Produktem hydrolýzy je 7-amino-4-methylkumarin (AMC), který po excitaci zářením o vlnové délce 346 nm emituje fluorescenční spektrum o vlnové délce 422 nm umožňující tak kvantifikovat průběh reakce.

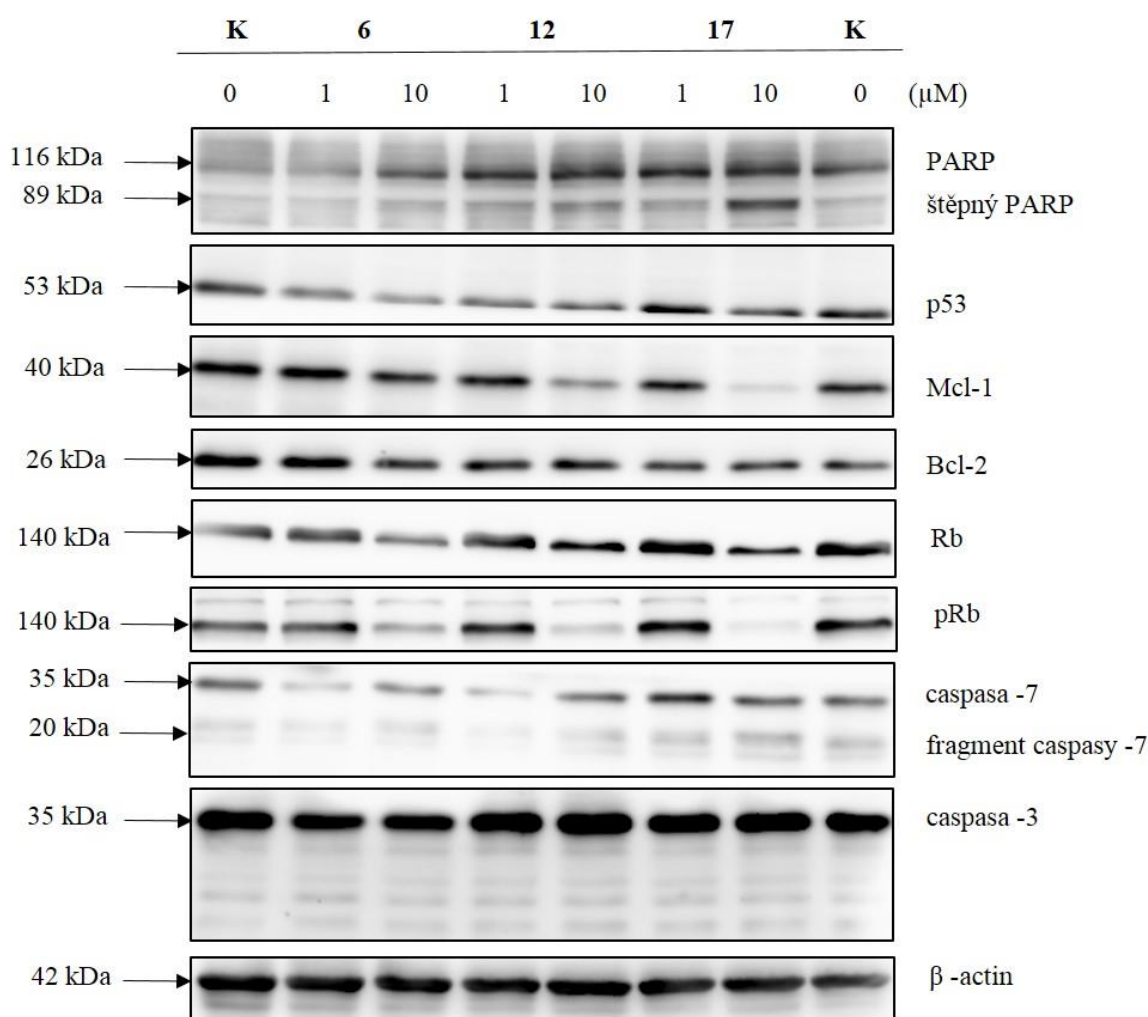
Buněčné lyzáty o koncentraci 3  $\mu$ g/ $\mu$ l v objemu 5  $\mu$ l byly napipetovány do mikrotitrační destičky v triplicátu. Do první a druhé řady bylo napipetováno 100  $\mu$ l reakčního pufru s fluorescenčně značeným peptidovým substrátem (25 mM PIPES/KOH, pH 7,3; 2mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub> a před použitím přidáno 5 mM DTT a 100  $\mu$ M substrát Ac-DEVD-AMC v DMSO) a do třetí řady 100  $\mu$ l reakčního pufru obohaceného roztokem inhibitoru caspas-3/7 (1 mM Ac-DEVD-CHO v DMSO). Vzorky byly inkubovány ve tmě při laboratorní teplotě a fluorescenční signál byl měřen každou hodinu na fluorimetru Fluoroskan Ascent (Labsystems) při 346/442 nm (ex/em). Data byla analyzována pomocí programu Ascent. Vyhodnocena byla nejdelší expozice. Získané absolutní hodnoty fluorescence byly normalizovány podle signálu kontrolního vzorku a převedeny na hodnoty relativní. Experiment byl opakován dvakrát, po aplikaci látkami **6**, **12** a **17** v koncentraci 10  $\mu$ M a po druhé v koncentraci 1 a 10  $\mu$ M.



## 4 VÝSLEDKY

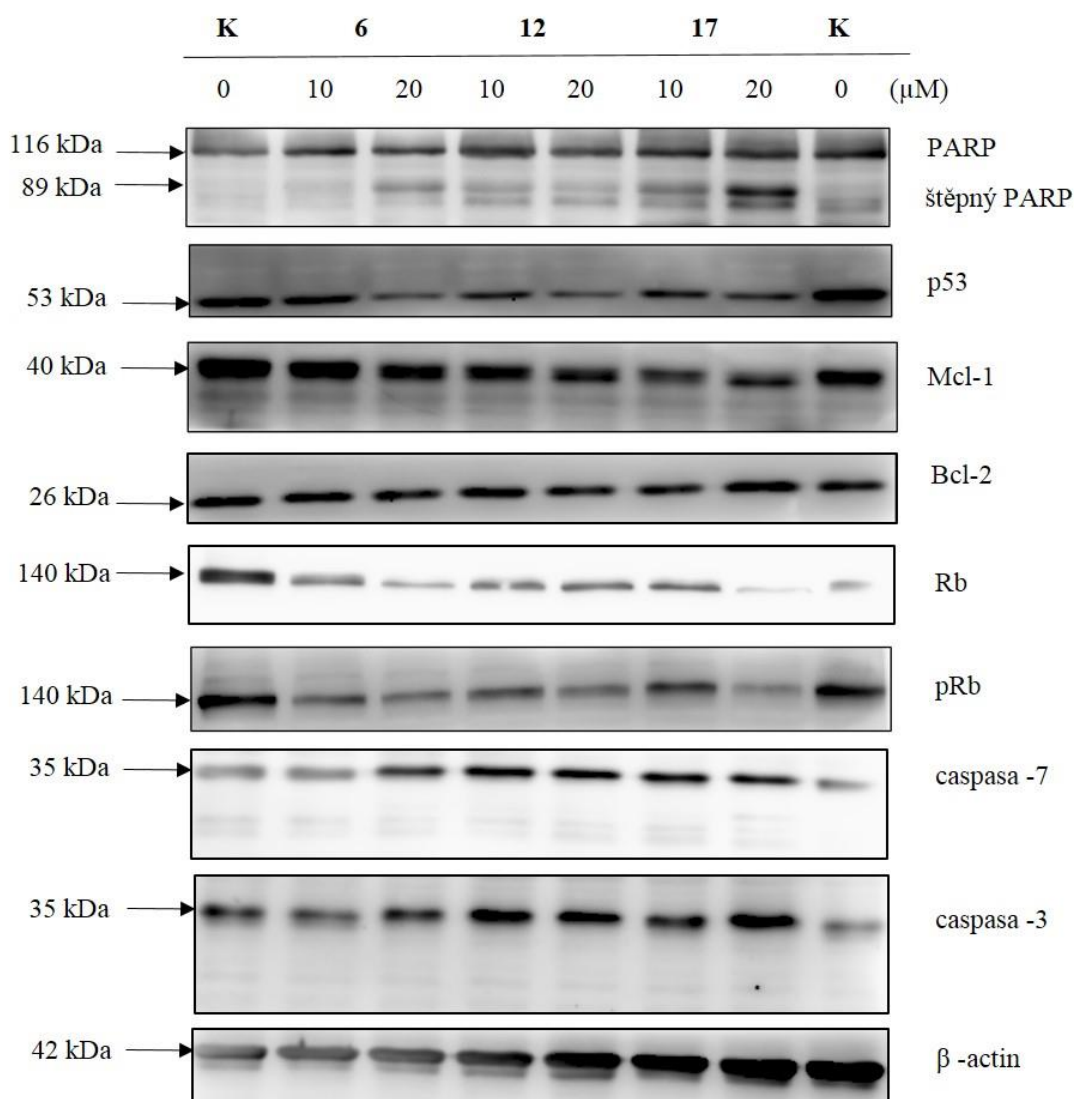
### 4.1 Detekce pro- a anti-apoptotických proteinů

V experimentální části bakalářské práce byla provedena analýza pro- a anti-apoptotických proteinů pomocí metody western blotting. Byly porovnány změny hladin exprese proteinů v buňkách odvozených od maligního melanomu (G-361), ovlivněných deriváty kyseliny betulinové a 21-oxo-18-lupenové, označené jako **6**, **12** a **17**, po dobu 24 hodin s kontrolními neovlivněnými buňkami označené jako **K**, v porovnání koncentrace 1 a 10  $\mu\text{M}$  (Obr. 4) a koncentrace 10 a 20  $\mu\text{M}$  (Obr. 5).



Obr. 4: Detekce pro-apoptotických proteinů (PARP, caspasa-7, caspasa-3 a p53) a anti-apoptotických proteinů (Mcl-1 a Bcl-2) a proteinů regulujících buněčný cyklus (Rb, pRb). Buněčná linie G-361 ovlivněna deriváty kyseliny betulinové a 21-oxo-18-lupenové (**6**, **12**, **17**) o koncentraci 1 a 10  $\mu\text{M}$  po dobu 24 hodin

Caspasa-3 a -7 jsou členem rodiny cysteinových proteas (caspas) aktivující proces apoptosy. V cytosolu se nachází jako neaktivní zymogeny (pro-caspasy), které jsou aktivovány štěpením na aktivní fragmenty 19 kDa a 17 kDa caspasy-3 a fragmenty 11 kDa a 20 kDa caspasy-7. Změny nastaly u hladiny exprese zymogenu caspasy-7, kdy nebyla pozorována u derivátů **6** a **12** v koncentraci 1  $\mu$ M, nicméně s rostoucí koncentrací látek se hladina exprese neaktivní caspasy-7 zvyšovala. Hladina exprese aktivního fragmentu caspasy-7 byla zaznamenána po aplikaci látky **17** v koncentraci 10  $\mu$ M.



*Obr. 5:* Detekce pro-apoptotických proteinů (PARP, caspasa-7, caspasa-3 a p53) a anti-apoptotických proteinů (Mcl-1 a Bcl-2) a proteinů regulujících buněčný cyklus (Rb, pRb). Buněčná linie G-361 ovlivněna deriváty kyseliny betulínové a 21-oxo-18-lupenové (**6**, **12**, **17**) o koncentraci 10 a 20  $\mu$ M po dobu 24 hodin.

Substrátem efektorové caspasy-3 je protein PARP. Během apoptosy je celkový protein PARP o velikosti 116 kDa štěpen na dva fragmenty 89 kDa a 24 kDa. Fragment PARP (89 kDa) je důležitým markerem indukce apoptosy. Hladina exprese tohoto fragmentu byla pozorována v buňkách G-361 ovlivněných deriváty **6**, **12** a **17** v koncentraci 10 a 20  $\mu\text{M}$ . Nejsilnější exprese fragmentu PARP byla detekována pro derivát kyseliny 21-oxo-18-lupenové **17** v koncentraci 20  $\mu\text{M}$  po 24 hodinové inkubaci.

Bcl-2 genová rodina je schopna regulovat propustnost vnější mitochondriální membrány a uvolnění cytochromu c z mitochondrií. V mé práci byly detekovány anti-apoptotické proteiny Bcl-2 a Mcl-1. Mírně snížená hladina exprese proteinu Bcl-2 byla pozorována po aplikaci látky **6** v koncentraci 10  $\mu\text{M}$  a **17** v koncentraci 1 a 10  $\mu\text{M}$ . Nízká hladina dalšího antiapoptotického proteinu Mcl-1 byla zaznamenána po aplikaci látek **12** a **17** v koncentraci 10  $\mu\text{M}$ .

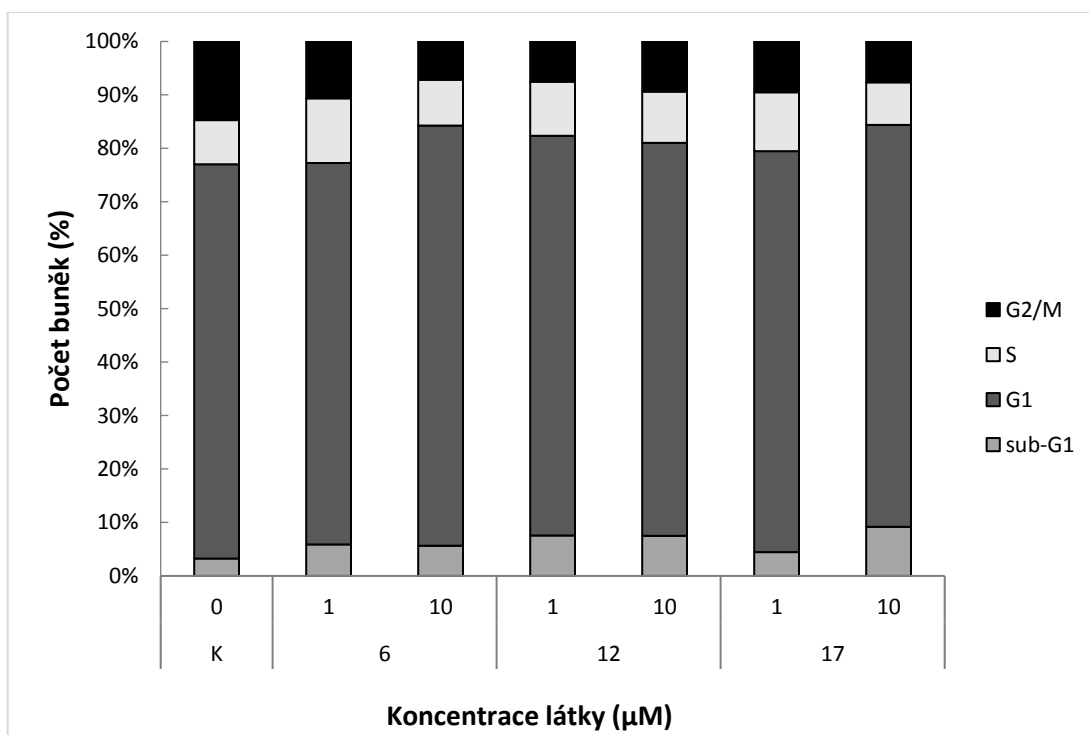
Proteiny p53 a Rb jsou významnými regulátory buněčného cyklu. Protein p53 je indukován v reakci na poškození DNA, hypoxii (nedostatek kyslíku) a onkogenní aktivaci, a to vede buď k zastavení buněčného cyklu nebo k apoptose (Levine, 1997; Giaccia a Kastan, 1998).

Hladina proteinu p53 se vyskytla jak v buňkách ovlivněných deriváty kyseliny betulinové a 21-oxo-18-lupenové tak i u kontrolních neovlivněných buněk. Buňky byly během doby sklizení nejspíše ve stresu (příčina aktivace proteinu p53 i u kontrolních buněk) a následkem toho došlo k pozitivně falešnému výsledku u neovlivněných buněk. Po aplikaci látky **17** v koncentraci 20  $\mu\text{M}$  byla detekována nízká exprese Rb proteinu i fosforylovaného proteinu pRb, což je v rozporu s faktem, že defosforylace proteinu Rb způsobuje jeho aktivitu (obr. 5). Nízká hladina může být způsobena štěpením během procesu apoptosy. Nicméně, v koncentraci 10  $\mu\text{M}$  látky **17** a **12** vykazovaly nízkou hladinu exprese pRb a mírně zvýšenou hladinu celkového proteinu Rb. Protein Rb byl aktivován defosforylací a následně zastavil dělení buněk v  $G_1$  fázi (obr. 4).

## 4.2 Analýza buněčného cyklu po ovlivnění deriváty

Buněčná linie G-361 byla ovlivněna deriváty kyseliny betulinové a 21-oxo-18-lupenové v koncentraci 1 a 10  $\mu\text{M}$  po dobu 24 hodin. Byly zaznamenány změny v buněčném cyklu pomocí průtokového cytometru. Tato metoda je založena na měření obsahu buněčné DNA značené fluoresceční sondou propidium jodid. Při průchodu buněk kapilárou dochází k excitaci navázané DNA sondy o vlnové délce 488 nm a emisi záření okolo 610 nm. Získaná data byla vyhodnocena v histogramech, obsahující procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu.

Z histogramu analýzy vyplývá, že buňky po ovlivnění deriváty v koncentraci 1 a 10  $\mu\text{M}$  značně ovlivňují buněčný cyklus buněčné linie G-361, zvýšením počtu buněk v  $G_1$  fázi a poklesem počtu buněk v  $G_2/M$  fázi (Obr. 6). Kumulace buněk ve fázi  $G_0/G_1$  znamená, že buňky nemohou vstoupit do fáze S, což je prokázáno snížením počtu buněk  $G_2/M$  fázi. Během této doby může dojít buď k opravným mechanismům nebo k apoptotické dráze. Počet apoptotických buněk a jejich fragmentů je zaznamenán ve fázi sub $G_1$ . Nejvyšší hodnota počtu buněk v této fázi byla naměřena u látky **17** v koncentraci 10  $\mu\text{M}$ .

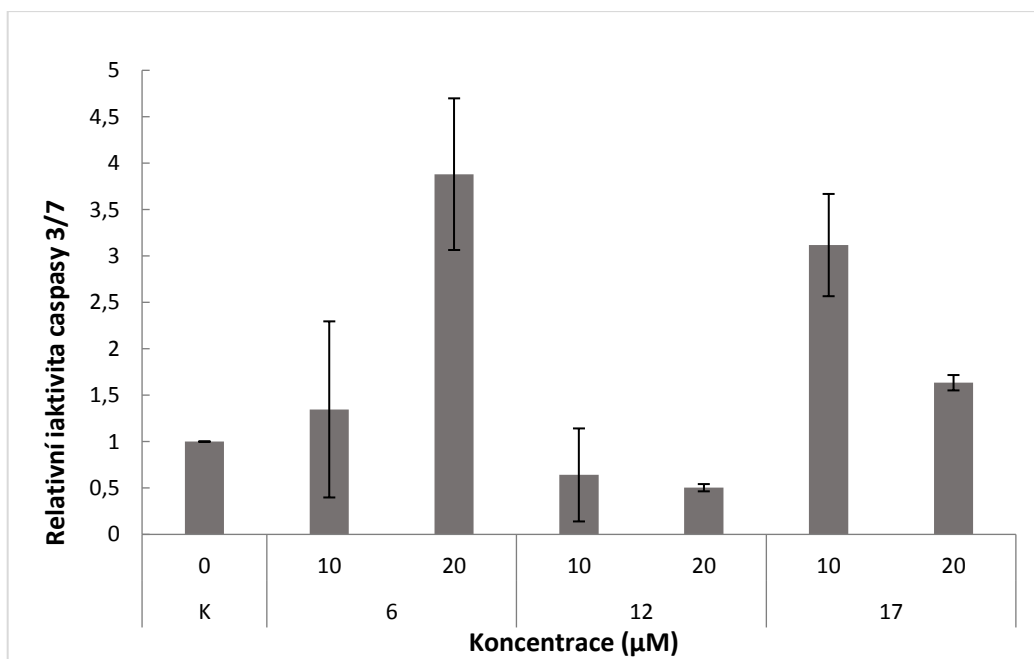


Obr. 6: Analýza procentuálního zastoupení buněk maligního melanomu G-361 v jednotlivých fázích buněčného cyklu pomocí metody průtokové cytometrie. Buněčná linie byla ovlivněna deriváty kyseliny betulinové a 21-oxo-18-lupenové v koncentraci 1 a 10  $\mu\text{M}$  po dobu 24 hodin.

### 4.3 Aktivita caspasy -3/7

Apoptotické účinky látek **6**, **12** a **17** v koncentraci 1 a 10  $\mu\text{M}$  po 24 hodinovém ovlivnění buněčné linie G-361, byly ověřeny metodou fluorimetrického stanovení aktivity caspasy 3/7, při použití substrátu caspas-3/7 Ac-DEVD-AMC anebo inhibitoru Ac-DEVD-CHO. Fluorescenční signál caspasy -3/7 byl měřen každou hodinu po dobu 7 hodin. Vyhodnocena byla nejdelší expozice. Absolutní hodnoty fluorescence získané měřením na Fluoroskanu Ascent byly normalizovány podle signálu kontrolního vzorku a převedeny na hodnoty relativní.

Z naměřených hodnot je patrné, že aktivita caspasy 3/7 v buňkách maligního melanomu se po aplikaci látky **6** s rostoucí koncentrací 10 a 20  $\mu\text{M}$  zvyšovala, naopak u látek **12** a **17** došlo k poklesu aktivity caspas 3/7. Nejvyšší aktivita caspas byla zaznamenána po aplikaci látky **6** v koncentraci 20  $\mu\text{M}$  s 3,8 krát vyšší aktivitou v porovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami **K**.



Obr. 7: Aktivita caspasy 3/7 v buňkách maligního melanomu G-361 ovlivněných deriváty kyseliny betulinové a 21-oxo-18-lupenové (6, 12, 17) v koncentraci 10 a 20  $\mu\text{M}$ , po dobu 24 hodin. Hodnoty jsou vztaženy k neovlivněným buňkám označené 0. Fluorescenční signál byl měřen po dobu 7 hodin inkubace ve tmě při 25  $^{\circ}\text{C}$ .

## 5 DISKUZE

Cílem praktické části bakalářské práce bylo charakterizovat antiproliferační účinky derivátů kyseliny betulinové a 21-oxo-18-lupenové na lidské nádorové buněčné linii G-361 odvozené od maligního melanomu *in vitro*, metodou western blot, průtokovou cytometrií a biochemickým testem caspasy 3/7.

Potenciální antiproliferační účinek kyseliny betulinové byl v roce 1995 jako první nalezen v buněčné linii melanomu MEL-1, MEL-2 a MEL-4 s hodnotami  $IC_{50}$  v rozmezí od 0,5 - 4,8  $\mu\text{g/ml}$ , při testování *in vitro* výzkumnou organizací vedené panem Pisha a jeho spolupracovníky. Jejich poznatky o cytotoxických účincích kyseliny betulinové získané z kůry kmene *Ziziphus mauritiana* proti lidským melanomovým liniím MEL-1, -2, -3 a -4 zahrnovaly vyšetřování mechanismu účinku pomocí průtokové cytometrie. Bylo zjištěno, že účinek kyseliny betulinové indukuje apoptosu zástavou nádorových buněk MEL-2 ve fázi  $G_0/G_1$ , což je v souladu s mými výsledky průtokové cytometrie. Tento jev byl prokázán i zvyšujícím se počtem apoptotických buněk ve fázi  $subG_1$  po 56-72 hodinové aplikaci (Pisha *et al.*, 1995). Po 24 hodinové aplikaci mých testovaných látek **6**, **12** a **17** v koncentraci 1 a 10  $\mu\text{M}$  byl pozorován zvýšený počet buněk v  $G_0/G_1$  fázi, snížený počet v S a  $G_2/M$  fázi a s rostoucí koncentrací byl zaznamenán zvyšující se počet apoptotických buněk v  $subG_1$ . Buňky, které jsou kumulovány v  $G_0/G_1$  fázi buď prochází opravnými mechanismy, nebo je spuštěna apoptotická dráha. Podobný efekt byl pozorován i v buněčné linii HeLa ovlivněné deriváty kyseliny betulinové publikovaných v práci Cmocha *et al.* (2014). Naopak lupan deriváty v práci Šarka *et al.*, (2003) s modifikací E kruhu a přidáním kyslíkových skupin v pozici 18, 19 a 21 vykazovaly kumulaci buněk v  $G_2/M$  a S fázi (Šarek *et al.*, 2003). Podobný efekt byl pozorován i u derivátů kyseliny betulinové v buňkách melanomu B-16, které vykazovaly pokles buněk v  $G_0/G_1$  fázi (Liu *et al.*, 2004).

Významnými regulátory buněčného cyklu jsou proteiny p53 a Rb. Retinoblastomový protein Rb rozhoduje o tom, zda buňka zůstane ve fázi  $G_0/G_1$  buněčného cyklu nebo vstoupí do fáze S, kde se nadále množí. Interakcí s transkripčním faktorem E2F brání transkripci S fázových genů a působením defosforylace/fosforylace se protein Rb stává aktivním/neaktivním (Levine, 1997; Giaccia a Kastan, 1998). První vlna fosforylace je zprostředkována CDK4 a CDK6 v komplexu s cyklinem D. Pomocí tohoto komplexu je E2F

uvolněn a tak dochází k zahájení aktivace komplexu CDK2/cyklin E, který dává signál ke spuštění fáze S (Shapiro, 2006). Po aplikaci látky **17** v koncentraci 20  $\mu\text{M}$  byla detekována nízká exprese Rb proteinu i fosforylovaného proteinu pRb, což je v rozporu s faktem, že defosforylace proteinu Rb způsobuje jeho aktivitu. Nízká hladina může být způsobena štěpením během procesu apoptosy. Nicméně, v koncentraci 10  $\mu\text{M}$  látky **17** a **12** vykazovaly nízkou hladinu exprese pRb a mírně zvýšenou hladinu celkového proteinu Rb (obr. 4). Protein Rb byl aktivován defosforylací a následně zastavil dělení buněk v  $G_1$  fázi, což potvrzuje výsledky průtokové cytometrie, zvýšením buněk v  $G_1$  fázi a snížením počtu buněk v S a  $G_2/M$  fázi.

Protein p53 je indukován v reakci na poškození DNA, hypoxii (nedostatek kyslíku) a onkogenní aktivaci, a to vede buď k zastavení buněčného cyklu nebo k apoptose (Levine, 1997; Giaccia a Kastan, 1998). Hladina proteinu p53 se vyskytla jak v buňkách ovlivněných deriváty kyseliny betulínové a 21-oxo-18-lupenové tak i v kontrolních neovlivněných buňkách. Buňky byly během doby sklizení nejspíše ve stresu (příčina aktivace proteinu p53 i u kontrolních buněk) a následkem toho došlo k pozitivně falešnému výsledku u neovlivněných buněk.

Apoptosa je fyziologický proces sloužící k eliminaci opotřebovaných nebo poškozených buněk. Existují dvě hlavní signální dráhy, které zprostředkovávají apoptosu: vnější a vnitřní (mitochondriální) cestou (Fulda a Debatin, 2004). Efektorové caspasy 3 a 7 hrají významnou roli při procesu apoptosy. V cytosolu se nachází jako neaktivní pro-caspasy, kde vlivem iniciačních caspas (8, 9) jsou štěpeny na aktivní fragmenty, které následně štěpí různé substráty způsobující mnoho charakteristických rysů apoptotické buňky (Hengartner, 2000). Stanovení aktivity caspas 3/7 bylo provedeno měřením fluorescenčního signálu a detekcí metodou western blot. Buněčná linie byla ovlivněna deriváty kyseliny betulínové a 21-oxo-18-lupenové po dobu 24 hodin. Nicméně aktivita těchto caspas byla slabá. Buněčná linie G-361 ovlivněná látkou **6** v koncentraci 20  $\mu\text{M}$  vykazovala pouze 3,8 krát vyšší aktivitu než kontrolní neovlivněné buňky (K). V porovnání s ostatními látkami je nejvyšší dosaženou hodnotou relativní aktivity caspasy-3 a -7. Nízká aktivita může být odůvodněna nejspíš krátkým časem působení. Hladina exprese zymogenu caspasy-7 byla nízká po ovlivnění látek **6** a **12** v koncentraci 1  $\mu\text{M}$ . Dle výsledků fluorimetrického stanovení se relativní caspasová aktivita s rostoucí koncentrací (10 a 20  $\mu\text{M}$ ) látek **12** a **17** snížila. Caspasy 3 a 7 jsou koncovou částí

procesu apoptosy proto je možné, že látky v dávce 20  $\mu\text{M}$  byly natolik toxické, že jejich aktivita nemohla být natolik zaznamenána, což je v souladu s jejich cytotoxickou hodnotou  $\text{IC}_{50}$  proti lidské nádorové linii G-361 po 72 hodinové aplikaci. V normálních buňkách látky **12** a **17** nevykazovaly cytotoxicitu a látka **6** měla vysokou hodnotu  $\text{IC}_{50}$ , což značně zvyšuje jejich terapeutický index ( $\text{IC}_{50}$  **12**:  $3,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$  a **17**:  $1,6 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ).

Caspasa 3/7 způsobuje proteolytickou degradaci řady buněčných proteinů během apoptosy. Protein PARP je štěpen caspasou-3 a -7 na fragmenty 89 kDa a 24 kDa. Zejména, fragment 89 kDa je důležitým markerem indukce apoptosy. Dle výsledků detekce metodou western blotting byla zaznamenána ve srovnání s ostatními látkami nejvyšší hladina exprese fragmentu PARP (89 kDa) v buňkách ovlivněných derivátem kyseliny 21-oxo-18-lupenové **17** v koncentraci 10 a 20  $\mu\text{M}$ .

Regulace apoptosy je řízena anti- a pro- apoptotickými členy rodiny Bcl-2. V mé práci byly studovány hladiny exprese anti-apoptotických proteinů Mcl-1 a Bcl-2, jenž se podobají svou strukturou (Kozopas *et al.*, 1993). Mírně snížená hladina exprese proteinu Bcl-2 byla pozorována po aplikaci látky **6** v koncentraci 10  $\mu\text{M}$  a **17** v koncentraci 1 a 10  $\mu\text{M}$ . Nicméně došlo i ke snížení hladiny exprese anti-apoptotického proteinu Mcl-1 po aplikaci látky **12** a **17** v koncentraci 10  $\mu\text{M}$ . Za snížení exprese by mohly být odpovědné efektorové caspasy, poněvadž mohou štěpit protein Mcl-1 (Craig, 2002; Michels *et al.*, 2004). Nízká exprese proteinu Mcl-1 po aplikaci kyseliny betulínové byla taky zkoumána v buňkách lidského melanomu skupinou Edgara Selzera. Bylo zjištěno, že exprese Mcl-1 je rychle indukována kyselinou betulínovou (Selzer *et al.*, 2002).

Na buněčné linii G-361 byly také testovány Orchelem *et al.* (2014) deriváty betulínu, vykazující podobný antiproliferační účinek jako u mých testovaných derivátů. Inkubace buněk s derivátem 28-O-propynoylbetulínem vedla k indukci apoptosy nárůstem buněk ve frakci sub-G<sub>1</sub> a zvýšené aktivitě caspasy 3 (Orchel *et al.*, 2014).

V současné době jsou lupanové deriváty testovány i na mnoha dalších buněčných liniích. V nejnovější publikované práci Borkové *et al.* (2016) bylo testováno 19 nově syntetizovaných lupan derivátů a 18 $\alpha$ -oleanan derivátů, substituovaných v poloze C-2 v osmi nádorových buněčných liniích, z nichž nejaktivnějším derivátem se stal 2-amino allobetulin. Účinkem tohoto derivátu došlo v porovnání s mými testovanými deriváty naopak k nahromadění buněk ve fázi S a mírně v G<sub>2</sub>/M fázi (Borková *et al.*, 2016).



Dále byly studovány nové 28a-homo-28a-thiolupanové triterpeny a saponiny, které obsahovaly D-mannosu, D-idosu, L-arabinosu a L-rhamnosu. Cytotoxická aktivita homothiolupan sloučenin odhalila, že některé triterpeny vykazovaly zajímavou cytotoxickou aktivitu proti lidským nádorovým buněčným liniím - melanomu G-361, T-lymfoblastické leukemie CEM, karcinomu děložního čípku HeLa a adenokarcinomu prsu MCF7. Do této doby byla syntéza lupanových derivátů obsahující síru velice vzácná, tyto výsledky otevřely cestu k syntéze dalších derivátů obsahující síru (Sidoryk *et al.*, 2016).

I přes velký počet derivátů určených k použití jako proléčiva nejsou k dispozici žádné *in vivo* experimenty ani neexistují jiné biologické studie o enzymatické stabilitě těchto sloučenin, proto je syntéza nových derivátů stále předmětem studia mnoha vědeckých společností (Urban *et al.*, 2015).

## 6 ZÁVĚR

V této bakalářské práci byly zkoumány antiproliferační účinky derivátů kyseliny betulinové a 21-oxo-18-lupenové na nádorové buněčné linii G-361 odvozené od maligního melanomu *in vitro*. Maligní melanom je kožní nádorové onemocnění se špatnou prognózou a úspěšností léčby. Řada studií se zabývá účinkem modifikovaných derivátů kyseliny betulinové za účelem zvýšení terapeutického indexu a antiproliferačního účinku výchozí struktury.

Experimentální část bakalářské práce byla věnována charakterizaci antiproliferačních účinků derivátů kyseliny betulinové a 21-oxo-18-lupenové na studované buněčné nádorové linii G-361 odvozené od maligního melanomu, pomocí tří metod. První metodou byla detekce proteinů pomocí western blotingu. Stanovovaly se hladiny exprese pro- a anti-apoptických proteinů, jež se podílí na procesu apoptosy. Nejvyšší hladina exprese důležitého markeru apoptosy, fragmentu PARP, byla pozorována po aplikaci látky **17** v koncentraci 20  $\mu\text{M}$ . Dále byla pozorována nejnižší hladina exprese anti-apoptického proteinu Mcl-1 po aplikaci látky **12** a **17** v koncentraci 10  $\mu\text{M}$ . Další významné změny nastaly v expresi fosforylovaného proteinu pRb. Defosforylace proteinu a zároveň aktivace celkového proteinu Rb nastala po aplikaci látky **12** a **17** v koncentraci 10  $\mu\text{M}$ . Při aktivaci proteinu Rb dochází k zástavě buněk v  $G_0/G_1$  fázi a buňky prochází buď opravnými mechanismy nebo procesem apoptosy. S tím je spojena detekce buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie. Po ovlivnění deriváty kyseliny betulinové a 21-oxo-18-lupenové došlo u všech použitých látek ke kumulaci buněk ve fázi  $G_0/G_1$ , což potvrzuje předchozí výsledek.

Další použitou metodou byla detekce aktivity caspas 3 a 7 pomocí fluorimetrického stanovení. Po 24 hodinovém ovlivnění látkou **6** v koncentraci 20  $\mu\text{M}$  byla naměřena 3,8 krát vyšší aktivita caspasy 3 a 7. Nicméně, po aplikaci ostatních látek se se zvyšující koncentrací snižovala aktivita caspasy 3 a 7. Látky v dávce 20  $\mu\text{M}$  mohly být pro buňky toxické s případným navozením nekrózy, takže aktivita caspas 3 a 7 nemohla být natolik zaznamenána.

Z těchto výsledku je patrné, že látky **12** a **17** v koncentraci 10 a 20  $\mu\text{M}$  vykazují nejvyšší antiproliferační účinky proti buněčné linii G-361 odvozené od maligního melanomu. Tyto poznatky by tak mohly být použity pro studium dalších modifikací a dalšího testování nových derivátů.

## LITERATURA

- Aisha A.F., Abu-Salah K.M., Ismail Z., Majid A.M. (2012). alpha-Mangostin enhances betulinic acid cytotoxicity and inhibits cisplatin cytotoxicity on HCT 116 colorectal carcinoma cells. *Molecules* **17**:2939–2954.
- Aichberger K.J., Mayerhofer M., Krauth M.T., Skvara H., Florian S., Sonneck K., Akgul C., Derdak S., Pickl W.F., Wacheck V., Selzer E., Monia B.P., Moriggl R., Valent P., Sillaber C. (2005). Identification of mcl-1 as a BCR/ABL-dependent target in chronic myeloid leukemia (CML): evidence for cooperative antileukemic effects of imatinib and mcl-1 antisense oligonucleotides. *Blood* **105**:3303–3311.
- Akgul C., Moulding D. A., White M.R.H., Edwards S. W. (2000). In vivo localisation and stability of human Mcl-1 using green fluorescent protein (GFP) fusion proteins. *FEBS Letters* **478**:72–76.
- Alakurtti S., Mäkelä T., Koskimies S., Yli-Kauhaluoma J. (2006). Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *Eur J Pharm Scien* **29**:1–13.
- Alonso S.R., Ortiz P., Pollan M., Perez-Gomez B., Sanchez L., Acuna M.J., Pajares R., Martinez-Tello F.J., Hortelano C.M., Piris M.A., Rodriguez-Peralto J.L. (2004). Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles – a tissue microarray-based study. *Am J Path* **164**:193–203.
- Armstrong B. (2004). Epidemiology of cutaneous melanoma and current trends. *Textbook Mel* :65–80.
- Atkins M.B., Lotze M.T., Dutcher J.P., Fisher R.I., Weiss G., Margolin K., Abrams J., Sznol M., Parkinson D., Hawkins M., Paradise C., Kunkel L., Rosenberg S.A. (1999). High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Onco* **17**:2105–2116.
- Atkins M.B., Lee S., Flaherty L.E., Sosman J.A., Sondrak V.K., Kirkwood J.M. (2003). A prospective randomized phase III trial of concurrent biochemotherapy (BCT) with cisplatin, vinblastine, dacarbazine (CVD), IL-2, and IFN- $\alpha$ -2b versus CVD alone in patients with metastatic melanoma (E3695): an ECOG-coordinated intergroup trial. *Proc Am Soc Clin Onco* **22**:708.
- Atzpodien J., Shimazaki C., Wisniewski D. (1988). Interleukin-2 und interferon-a in der adoptiven Immunotherapie des Plasmozytoms: ein experimentelles Model. D Lutz, R Heinz, H Nowotny (Eds.). *Leukaemien und Lymphome*, Urban and Schwarzenberg, Munchen, Wien, Baltimore: 211–212.
- Avril M.F., Aamdal S., Grob J.J., Hauschild A., Mohr P., Bonerandi J.J., Weichenthal M., Neuber K., Bieber T., Gilde K., Guillem Porta V., Fra J., Bonnetterre J., Saiag P., Kamanabrou D., Pehamberger H., Sufliarsky J., Gonzalez Larriba J.L., Scherrer A., Menu Y. (2004). Fotemustine compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: a phase III study. *J Clin Onco* **22**:1118-25.
- Bache M., Bernhardt S., Passin S., Wichmann H., Hein A., Zschornak M., Kappler M., Taubert H., Paschke R. and Vordermark D. (2014). Betulinic acid derivatives NVX-207 and B10 for treatment of glioblastoma - an *in vitro* study of cytotoxicity and radiosensitization. *Inter J Mol Scien* **15**:19777–19790.
- Balch C.M., Soong S.J., Gershenwald J.E., Thompson J.F., Reintgen D.S., Cascinelli N., Urist M., McMasters K.M., Ross M.I., Kirkwood J.M., Atkins M.B., Thompson J.A., Coit D.G., Byrd D., Desmond R., Zhang Y., Liu P.Y., Lyman G.H., Morabito A. (2001). Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Onco* **19**:3622-34.
- Biedermann D.; Eignerova B.; Hajdúch, M. & Šarek J. (2010) Synthesis and Evaluation of Biological Activity of the Quaternary Ammonium Salts of Lupane-, Oleanane-, and Ursane-Type Acids. *Synth-Stutt* **42**:3839-3848.

- Boatright K. M., Rénatus M., Scott F.L., Sperandio S., Shin H., Pedersen I.M., Ricci J.E., Edris W.A., Sutherlin D.P., Green D.R., Salvesen G.S. (2003). A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* **11**:529–541.
- Borková L., Gurska S., Džubák P., Burianová R., Hajdúch M., Šarek J., Popa I., Urban M. (2016). Lupane and 18 $\alpha$ -oleanane derivatives substituted in the position 2, their cytotoxicity and influence on cancer cells. *Euro J Med Chem* **121**:120-131.
- Borner C., Martinou I., Mattmann C., Schaerer E., Martinou J.C., Tschopp J. (1994). The protein bcl-2 alpha does not require membrane attachment, but two conserved domains to suppress apoptosis. *J Cell Biol* **126**:1059-1068.
- Brand C.U., Ellwanger U., Stroebel W., Meier F., Schlagenhauß B., Rassner G. and Garbe C. (1997). Prolonged survival of 2 years or longer for patients with disseminated melanoma. An analysis of related prognostic factors. *Cancer* **79**:2345–2353.
- Brehm A., Miska E.A., McCance D.J., Reid J.L., Bannister A.J., Kouzarides T., (1998). Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* **391**:597-601.
- Buki K.G., Bauer P.I., Hakam A., Kun E. (1995). Identification of domains of poly(ADP-ribose) polymerase for protein binding and self-association. *J Biol Chem* **270**:3370–3377.
- Buzaid A., Legha S., Winn R., et al. (1993). Cisplatin (C) vinblastine (V), and dacarbazine (D) (CVD) versus dacarbazine alone in metastatic melanoma: preliminary results of a phase III Cancer Community Oncology program (CCOP) trial. *Proc Am Soc Clin Oncol* **12**:389.
- Cancer facts & figures, 2003. Atlanta: American Cancer Society.
- Cichewicz R.H., Kouzi S.A. (2004) Chemistry, biological activity and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. *Med Res Rev* **24**:90-114.
- Cmoch P., Pakulski Z., Swaczynová J., Strnad M. (2008). Synthesis of lupane-type saponins bearing mannosyl and 3,6-branched trimannosyl residues and their evaluation as anticancer agents. *Carbo Res* **343**:995-1003.
- Cmoch P., Korda A., Rárová L., Okleštková J., Strnad M., Luboradzki R., Pakulski Z. (2014). Synthesis and structure-activity relationship study of cytotoxic lupane-type 3 $\beta$ -O-monodesmosidic saponins with an extended C-28 side chain. *Tetrahedron* **70**:2717-2730.
- Connolly J. D. and Hill R. A. (2005) Triterpenoids. *Nat Prod Rep* **22**:230.
- Cory S., Adams J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2**:647-56.
- Cragg G. M., Newman D. J. (2005): Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol* **100**:72-79.
- Craig R. W. (2002). MCL-1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia* **16**:444-454.
- Csuk R. (2014) Betulinic acid and its derivatives: a patent review (2008–2013). *Expert Opin Ther Pat* **24**:913–923.
- Csuk R., Schmuck K. and Schäfer R. (2006). A practical synthesis of betulinic acid. *Tetrahedron Lett* **47**:8769–8770.
- Cuconati A., Mukherjee Ch., Perez D. and White E. (2003). DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. *Gen Dev* **17**:2922–2932.
- Danen E.H., de Vries T.J., Morandini R., Ghanem G.G., Ruiter D.J., van Muijen G.N. (1996). E-cadherin expression in human melanoma. *Melanoma Res* **6**:127-31.
- D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I., Poirier G.G. (1999). Poly (ADP-ribosyl) ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* **342**:249–268.
- De Clercq E. (2000). Novel compounds in preclinical/early clinical development for the treatment of HIV infections. *Rev Med Virol* **10**:255–277.

- Dehelean C.A., Feflea S., Ganta S., Amiji M. (2011). Anti-angiogenic effects of betulinic acid administered in nanoemulsion formulation using chorioallantoic membrane assay. *J Biomed Nanotechnol* **7**:317–324.
- Dudley M.E., Yang J.C., Sherry R., Hughes M.S., Royal R., Kammula U., Robbins P.F., Huang J., Citrin D.E., Leitman S.F., Wunderlich J., Restifo N.P., Thomasian A., Downey S.G., Smith F.O., Klapper J., Morton K., Laurencot C., White D.E., Rosenberg S.A. (2008). Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J Clin Oncol* **26**:5233-9.
- Džubák P., Hajduch M., Vydra D., Hustova A., Kvasnica M., Biedermann D. Markova L., Urban M., Šarek J. (2006). Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Nat Prod Rep* **23**:394-411.
- Eguchi Y., Shimizu S., Tsujimoto Y. (1997). Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* **57**:1835–1840.
- Ehrhardt H., Fulda S., Fuhrer M., Debatin K.M., Jeremias I. (2004). Betulinic acid-induced apoptosis in leukemia cells. *Leukemia* **18**:1406-1412.
- Eton O., Legha S.S., Bedikian A.Y., Lee J.J., Buzaid A.C., Hodges C., Ring S.E., Papadopoulos N.E., Plager C., East M.J., Zhan F., Benjamin R. S. (2002). Sequential biochemotherapy versus chemotherapy for metastatic melanoma: results from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol* **20**:2045–2052.
- Ferlay J., Steliarova-Foucher E., Lortet-Tieulent J., Rosso S., Coebergh J. W. W., Comber H., Forman D., Bray F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Euro J Cancer* **49**:1374– 1403.
- Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M., Forman D. and Bray F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Intern J Cancer* **136**:359–386.
- Fontanay S., Grare M., Mayer J., Finance C., Duval R.E. (2008) Ursolic, oleanolic and betulinic acids: antibacterial spectra and selectivity indexes. *J Ethnopharmacol* **120**: 272- 276.
- Flaherty K., Puzanov I., Sosman J., Kim K., Ribas A., McArthur G., Lee R. J., Grippo J. F., Nolop K., Chapman P. (2009). Phase I study of PLX4032 proof of concept for V600E BRAF mutation as a therapeutic target in human cancer. *J Clin Onco* **27** Abstract 9000.
- Fulda S., Friesen C., Los M., Scaffidi C., Mier W., Benedict M., Nuñez G., Krammer P. H., Peter M. E., Debatin K.-M. (1997). Betulinic Acid Triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent Apoptosis via Activation of Caspases in Neuroectodermal Tumors. *Cancer Res* **57**:4956-4964.
- Fulda S., Jeremias I., Steiner H.H., Pietsch T., Debatin K.M. (1999) Betulinic acid: a new cytotoxic agent against malignant brain-tumor cells. *Int J Cancer* **82**:435–441.
- Fulda S., Scaffidi C., Susin S.A., Krammer P.H., Kroemer G., Peter M.E., Debatin K.M. (1998). Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid. *J Biol Chem* **273**:33942–33948.
- Fulda S., Debatin K.-M. (2004). Targeting apoptosis pathways in cancer therapy, *Curr Cancer Drug Targets*:**4**:569 –576.
- Fulda S., Debatin K. (2005). Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by betulinic acid. *Neoplasia* **7**:162–170.
- Fulda S. (2008). Betulinic acid for cancer treatment and prevention. *Int J Mol Sci* **9**:1096-1107.
- Gautam R., Jachak S.M. (2009) Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Med Res Rev* **29**:767–820.
- Gauthier C., Legault J., Lebrun M., Dufour P.S. & Pichette A. (2006). Glycosidation of lupane-type triterpenoids as potent in vitro cytotoxic agents. *Bio & Med Chem* **14**:6713-6725.
- Germain M., Affar E.B., D'Amours D., Dixit V.M., Salvesen G.S., Poirier G.G. (1999). Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7. *J Biol Chem* **274**:28379–28384.

- Giaccia A. J., Kastan M. B. (1998). The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* **12**:2973–2983.
- Gilchrest B.A., Eller M.S., Geller A.C., Yaar M. (1999). The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med* **340**:1341–8.
- Glover D., Ibrahim J., Kirkwood J., Glick J., Karp D., Stewart J., Ewell M., Borden E. (2003). Phase II randomized trial of cisplatin and WR-2721 versus cisplatin alone for metastatic melanoma: an Eastern Cooperative Oncology Group Study (E1686). *Melanoma Res* **13**:619–626.
- Gouill S. Le, Podar K., Harousseau J.-L. & Anderson K.C. (2004). Mcl-1 regulation and its role in multiple myeloma. *Cell Cycle* **3**:1259–1262.
- Gogas H., Bafaloukos D., Bedikian A.Y. (2004). The role of taxanes in the treatment of metastatic melanoma. *Melanoma Res* **14**:415–420.
- Green B., Bentley M. D., Chung B. Y., Lynch N. G., Jensen, Bruce L. (2007). Isolation of Betulin and Rearrangement to Allobetulin A Biomimetic Natural Product Synthesis, *J Chem Educ* **84**:1985.
- Green D.R. and Kroemer G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305**:626–629.
- Gross A., McDonnell J. M. and Korsmeyer S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Gen Dev* **13**:1899–1911.
- Ha H. C., Snyder S. H. (1999). Poly (ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:13978–13982.
- Hacker G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* **301**:5–17.
- Hakme A, Wong H.K., Dantzer F., Schreiber V. (2008). The expanding field of poly (ADP-ribose) modification reactions. ‘Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects’ Review Series. *EMBO Rep* **9**:1094–1100.
- Hänsel R., Keller K., Rimpler H., Schneider G. (1992). Drogen A-D: Betula. Springer Verlag, Berlin.
- Harbour J.W., Luo R.X., Dei S.A., Postigo A.A., Dean D.C. (1999). Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* **98**:859–869.
- He B., Lu N. and Zhou Z. (2009). Cellular and nuclear degradation during apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* **21**:900–912.
- Hauschild A., Agarwala S.S., Trefzer U., Hogg D., Robert C., Hersey P., Eggermont A., Grabbe S., Gonzalez R., Gille J., Peschel C., Schadendorf D., Garbe C., O’Day S., Daud A., White J.M., Xia C., Patel K., Kirkwood J.M., Keilholz U. (2009). Results of a phase III, randomized, placebo-controlled study of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel as second-line treatment in patients with unresectable stage III or stage IV melanoma. *J Clin Oncol* **27**:2823–30.
- Hengartner M. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**:770–776.
- Herlyn M. and Satyamoorthy K. (2001). Molecular biology of cutaneous melanoma. In *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. DeVita VT, Hellman, S, Rosenberg, SA, eds. Sixth edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins:2003–2012.
- Hoek K.S. and Goding C.R. (2010). Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma, *Pigment Cell Melanoma Res* **23**:746–759.
- Houck J.C., Sharma V.K. and Hayflick L. (1971). Functional failures of cultured human diploid fibroblasts after continued population doublings. *Proc Soc Exp Biol Med* **137**:331–333.
- Hunter J.J. & Parslow T.G. (1996) A peptide sequence from Bax that converts Bcl-2 into an activator of apoptosis. *J Biol Chem* **271**:8521–8524.
- Hwu W.J., Krown S.E., Menell J.H., et al. (2003). Phase II study of temozolomide plus thalidomide for the treatment of metastatic melanoma. *J Clin Oncol* **21**:3351–3356.
- Chai J., Q. Wu, E. Shiozaki, S.M. Srinivasula, E.S. Alnemri, Y. Shi. (2001). Crystal structure of a procaspase-7 zymogen: mechanisms of activation and substrate binding. *Cell* **107**:399–407.
- Chapman P.B., Einhorn L.H., Meyers M.L. (1999). Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* **17**:2745–2751.

- Chappell J. (2002). The genetics and molecular genetics of terpene and sterol origami. *Curr Opin Plant Biol* **5**:151–157.
- Chatterjee P., Pezzuto J.M., Kouzi S.A. (1999). Glucosidation of betulinic acid *Cunninghamella* species. *J Nat Prod* **62**:761–763.
- Chen-Levy Z. and Cleary M.L. (1990). Membrane topology of the Bcl-2 proto-oncogenic protein demonstrated in vitro. *J Biol Chem* **265**:4929-4933.
- Chintharlapalli S., Papineni S., Ramaiah S.K., Safe S. (2007) Betulinic acid inhibits prostate cancer growth through inhibition of specificity protein transcription factors. *Cancer Res* **67**: 2816–2823.
- Chowdhury A.R., Mandal S., Mittra B., Sharma S., Mukhopadhyay S., Majumder H.K. (2002) Betulinic acid, a potent inhibitor of eukaryotic topoisomerase I: identification of the inhibitory step, the major functional group responsible and development of more potent derivatives. *Med Sci Monit* **8**:254-265.
- Jacks T. (1996). Tumor suppressor gene mutations in mice. *Annu Rev Genet* **30**:603-636.
- Jansen B., Schlagbauer-Wadl H., Brown B.D., Bryan R.N., van Elsas A., Muller M., Wolff K., Eichler H.G., Pehamberger H. (1998). bcl-2 antisense therapy chemosensitizes human melanoma in SCID mice. *Nat Med* **4**:232–34.
- Johnson F. D. and Jacobs E. M. (1971). Chemotherapy of metastatic malignant melanoma: experience with 73 patients. *Cancer* **27**:1306-1312.
- Jeong H.J., Chai H.B., Park S.Y., Kim D.S.H.L. (1999). Preparation of amino acid conjugates of betulinic acid with activity against human melanoma. *Bioorg Med Chem Lett* **9**:1201–1204.
- Jörg M. Augustina, Vera Kuzinaa, Sven B. Andersen, Søren Baka. (2011). Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phyt* **72**: 435–57.
- Juven-Gershon T., Oren M. (1999). Mdm2: the ups and downs. *Mol Med* **5**:71–83.
- Karna E., Szoka L., Palka J. A. (2010) Betulinic acid inhibits the expression of hypoxiainducible factor 1a and vascular endothelial growth factor in human endometrial adenocarcinoma cells. *Mol Cell Biochem* **340**:15–20.
- Kashiwada Y., Hashimoto F., Cosentino L. M., Chen C., Garrett H, P. E., Lee K. H (1996). Betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives as potent anti-HIV agents. *J Med Chem* **39**(5):1016-7.
- Kashiwada Y., Chiyo J., Ikeshiro Y., Nagao T., Okabe H., Cosentino L.M., Fowke K., Morris-Natschke S.L, Lee K.H. (2000). Synthesis and anti-HIV activity of 3- alkylamido-3-deoxy-betulinic acid derivatives. *Chem Pharm Bull* **48**:1387–1390.
- Keilholz U., Punt C.J., Gore M., Krut W., Patel P., Lienard D., Thomas J., Proebstle T.M., Schmittel A., Schadendorf D., Velu T., Negrier S., Kleeberg U., Lehman F., Suci S., Eggermont A.M. (2003). Dacarbazine, cisplatin and IFN- $\alpha$ -2b with or without IL-2 in advanced melanoma: final analysis of EORTC randomized phase III trial 18951. *Proc Am Soc Clin Oncol* **22**:708.
- Kim D.S., Pezzuto J.M., Pisha E. (1998). Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma. *Bioorg Med Chem Lett* **8**:1707-1712.
- Kim J.Y., Koo H.M., Kim D.S.H.L. (2001). Development of C-20 modified betulinic acid derivatives as antitumor agents. *Bioorg Med Chem Lett* **11**:2405–2408.
- Kirkwood J. M., Gonzalez R., Reintgen D. S., Clingan P. R., McWilliams R. R., Ilaria R. L., de Alwis D. P., Zimmermann A., Brown M. P. and Millward M. (2010). A phase II study of tasisulam sodium (LY573636) as second-line treatment for patients with unresectable or metastatic melanoma. *J Clin Oncol* **28**(15) Abstract 8541.
- Kischkel F.C., Hellbardt S., Behrmann .I, Germer M., Pawlita M., Krammer P.H., Peter M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* **14**:5579–88.
- Ko L. J. and Prives C. (1996) p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* **10**:1054-72.
- Kozopas K. M., Yang T., Buchan H. L., Zhou P. and Craig R. W. (1993). MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:3516-3520.

- Krajewski S., Tanaka S., Takayama S., Schibler M.J., Fenton W., Reed J.C. (1993). Investigation of the Subcellular Distribution of the *bcl-2* Oncoprotein: Residence in the Nuclear Envelope, Endoplasmic Reticulum, and Outer Mitochondrial Membranes. *Cancer Res* **53**:4701-4714.
- Krajsová I. (2006). Melanoma. Maxdorf, Praha, ISBN-80-7345-096-8.
- Kvasnica M., Šarek J., Klinotova E., Džubák P. & Hajdúch M. (2005). Synthesis of Phthalates of Betulinic Acid and Betulin with Cytotoxic Activity. *Bioorg Med Chem* **13**:3447-3454.
- Land H., Parada L.F., Weinberg R.A. (1983). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* **304**:596-602.
- Laszczyk M. N. (2009) Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta Med* **75**:1549–1560.
- Lattanzi S.C., Tosteson T., Chertoff J., Maurer L. H., O'Donnell J., LeMarbre P.J., Mott L., DelPrete S.A., Forcier R.J., Ernstoff M.S. (1995). Dacarbazine, cisplatin and carmustine, with or without tamoxifen, for metastatic melanoma: 5-year follow-up. *Melanoma Res* **5**:365–369.
- Lavrik I.N., Golks A., Krammer P.H. (2005). "Caspases: pharmacological manipulation of cell death". *J Clin Invest* **115**: 2665–72.
- Lee W.S., Im K.R., Park Y.D., Sung N.D., Jeong T.S. (2006) Human ACAT-1 and ACAT-2 inhibitory activities of pentacyclic triterpenes from the leaves of *Lycopus lucidus* TURCZ. *Biol Pharm Bull* **29**:382-384.
- Legha S.S., Ring S., Papadopoulos N., Plager C., Chawla S., Benjamin R. (1989). A prospective evaluation of a triple-drug regimen containing cisplatin, vinblastine, and dacarbazine (CVD) for metastatic melanoma. *Cancer* **64**:2024–2029.
- Leiter U., Schmid R.M., Kaskel P., Peter R.U., Krahn G. (2000). Antiapoptotic bcl-2 and bcl-xL in advanced malignant melanoma. *Arch Dermatol Res* **292**:225–232.
- Lens M.B., Eisen T.G. (2003). Systemic chemotherapy in the treatment of malignant melanoma. *Expert Opin Pharmacother* **4**:2205-11.
- Levine A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**:323–331.
- Li G., Satyamoorthy K., Herlyn M. (2001). N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res* **61**:3819-25.
- Liu W.-K., Ho J.C.K., Cheung F.W.K., Liu B.P.L., Ye W-Ch., Che Ch.-T. (2004). Apoptotic activity of betulinic acid derivatives on murine melanoma B16 cell line. *Euro J Pharm* **498**:71– 78.
- Liu J., Fu M. L. and Chen Q.H. (2011), Biotransformation optimization of betulin into betulinic acid production catalysed by cultured *Armillaria luteo-virens* Sacc ZJUQH100-6 cells. *J Applied Microbiol* **110**:90–97.
- Luke W. T., Lam C., Edwards S.W. (2010) Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett* **584**:2981–2989.
- MacKie R. M. (1998). Incidence, risk factors and prevention of melanoma. *Euro J Cancer* **34**:3–6.
- Mayaux J.F., Bousseau A., Pauwels R., Huet T., Henin Y., Dereu N. (1994). Triterpene derivatives that block entry of human immunodeficiency virus type 1 into cells. *Proc Natl Acad Sci* **91**:3564-3568.
- McArthur G., Puzanov I., Ribas A., Chapman P.B., Kim K.B., Sosman R.J.(2010). Early FDG-PET responses to PLX4032 in BRAF-mutant advanced melanoma. *J Clin Oncol*. **28** Abstract 8529.
- Michels J., O'Neill J. W., Dallman C. L., Mouzakiti A., Habens F., Brimmell M., Zhang K. Y., Craig R. W., Marcusson E. G., Johnson P. W., Packham G. (2004). Mcl-1 is required for Akata6 B-lymphoma cell survival and is converted to a cell death molecule by efficient caspase-mediated cleavage. *Oncogene* **23**:4818-4827.
- Michels J., Johnson P. W. M., Packham G. (2005). Mcl-1. *Inter J Biochem Cell Biol* **37**(2): 267–271.
- Miller A. J., Mihm M. C. (2006). Melanoma. *N Engl J Med* **355**:51-65.
- Millward M.J., Bedikian A.Y., Conry R.M., Gore M. E., Pehamberger H. E., Sterry W., Pavlick A. C., De Conti R. C., Gordon D. and Itri L. M. (2004). Randomized multinational phase 3 trial of dacarbazine (DTIC) with or without Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) in patients (pts) with



- advanced malignant melanoma (MM): Analysis of long-term survival. New Orleans: ASCO:708 (abstract 7505).
- Mocellin S., Pasquali S., Rossi C.R., Nitti D. (2010) Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high-risk melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J Nat Cancer Inst* **102**:493-501.
- Moff S.L., Corey G.R., Gottfredsson M. (1999). Distant cutaneous granulomas after bacille Calmette-Guerin immunotherapy for malignant melanoma: case for direct infection. *Clin Infect Dis* **29**: 1569–1570.
- Morton D. L., Thompson J.F., Cochran A.J., Mozzillo N., Elashoff R., Ph.D., Richard Essner R., Nieweg O.E., Roses D.F., Hoekstra H.J., Karakousis C.P., Reintgen D.S., Coventry B.J., Glass E.C., Wang H.J. (2006). Sentinel-Node Biopsy or Nodal Observation in Melanoma. *N Engl J Med* **355**:1307-1317.
- Nicholson D. W., Thornberry N. A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* **22**:299–306.
- Noda Y., Kaiya T., Kohda K., Kawazoe Y. (1997). Enhanced cytotoxicity of some triterpenes toward leukemia L1210 cells cultured in low pH media: possibility of a new mode of cell killing. *Chem Pharm Bull* **45**:1665-1670.
- Oltvai Z., Milliman C., Korsmeyer S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**: 609-619.
- Omholt K., Platz A., Kanter .L, Ringborg U., Hansson J. (2003). NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clin Cancer Res* **9**:6483-8.
- Opferman J.T., Letai A., Beard C., Sorcinelli M.D., Ong C.C. a Korsmeyer S.J. (2003). Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* **426**: 671–676.
- Ortega S., Malumbres M., Barbacid M. (2002). Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochem Biophys Acta* **1602**:73–87.
- Orchel A., Kulczycka A., Chodurek E., Bebenek E., Borkowska P., Boryczka S., Kowalski J., Dzierzewicz Z. (2014). Influence of betulin and 28-O-propynoylbetulin on proliferation and apoptosis of human melanoma cells. *Postepy Hig Med Dosw* **68**:191-197.
- Pakulski Z. A.; Cmoch P.; Oklestkova J. & Strnad, M. (2009). Saccharide lupane derivatives, their use and pharmaceutical compositions containing these derivatives. PCT/CZ2009/000007, filling date 2009-01-28.
- Patočka J. (2003). Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *J Applied Biomed* **1**:7 – 12.
- Patton E.E., Widlund H.R., Kutok J.L., Kopani K.R., Amatruda J.F., Murphey R.D., Berghmans S., Mayhall E.A., Traver D., Fletcher C.D., Aster J.C., Granter S.R., Look A.T., Lee C., Fisher D.E., Zon L.I. (2005). BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Curr Biol* **15**:249-54.
- Patel P.M., Suci S., Mortier L., Kruit W.H., Robert C., Schadendorf D., Trefzer U., Punt C.J., Dummer R., Davidson N., Becker J., Conry R, Thompson J.A., Hwu W.J., Engelen K., Agarwala S.S., Keilholz U., Eggermont A.M., Spatz A. (2011). Extended schedule, escalated dose temozolomide versus dacarbazine in stage IV melanoma: final results of a randomised phase III study. *EORTC Melanoma Group Eur J Cancer* **47**:1476-83.
- Pezzuto J. N., Kosmeder J. W., Xu Ze-Qi, Zhou N. E. & Goldsmith M. E. (2007). Method of preparing and use of prodrugs of betulinic acid derivatives, US 2007072835.
- Philchenkov A., Zavelevich M., Krocak T.J., Los M. (2004). Caspases and cancer: Mechanisms of inactivation and new treatment modalities. *Exp Oncol* **26**: 82–97.
- Piro L.D. (2004). Apoptosis, Bcl-2 antisense and cancer therapy. *Oncology* **18**:5-10.
- Pisha E., Chai H., Lee I.S., Chagwedera T.E., Farnsworth N.R., Cordell A.C., Beecher C.W.W., Fong H.H.S., Kinghorn A.D., Brown D.M., Wani M.C., Wall M.E., Hieken T.J., Das Gupta T.K., Pezzuto J.M. (1995). Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat Med* **1**:1046–1051.

- Proctor J.W., Zidar B., Pomerantz M., Yamamura Y., Eng C.P., Woodside D. (1978). Anaphylactic reaction to intralesional B.C.G. *Lancet* **2**: 162.
- Rajalingam Krishnaraj, Schreck R., Rapp U.R, Albert Š.. (2007). Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Mol Cell Res* **1773**:1177–1195.
- Retzlaff, F. (1902). Ueber Herba Gratiolae. *Archiv der Pharmazie* **240**: 561-568.
- Ribe E. M., Serrano-Saiz E., Akpan N., Troy C. M. (2008). Mechanisms of neuronal death in disease: defining the models and the players. *Biochem. J* **415**: 165-182.
- Rieber M., Rieber M. S.: Induction of p53 without increase in p21WAF1 in betulinic acid-mediated cell death is preferential for human metastatic melanoma.(1998). *DNA Cell Biol* **17**:399–406.
- Riedl S.J., Fuentes-Prior P., Renucci M., Kairies N., Krapp S., Huber R., Salvesen G.S., Bode W. (2001). Structural basis for the activation of human procaspase-7. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 14790-14795.
- Riedl S.J., Shi Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 897–907.
- Robertson A., Solima G. & Owen E. (1939). Polyterpenoid compounds - Part I Betulic acid from *Cornus florida* L. *J Chem Soc* 1267 – 1273.
- Roussel M. F. (1999). The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* **18**:5311-5317.
- Rutkowski P., Zdzienicki M., Nowecki Z. I. and Akkooi van A.C.J. (2010). Surgery of primary melanomas. *Cancers* **2**: 824-841.
- Qian K., Kim S. Y., Hung H.Y., Huang L., Chen C.H., Lee K.H. (2011) New betulinic acid derivatives as potent proteasome inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **21**:5944–5947.
- Salti G.I., Manougian T., Farolan M., Shilkaitis A., Majumdar D., Das Gupta T.K. (2000). Microphthalmia transcription factor: a new prognostic marker in intermediate-thickness cutaneous malignant melanoma. *Cancer Res* **60**:5012-6.
- Santos R.C., Salvador J.A., Marín S., Cascante M. (2009) Novel semisynthetic derivatives of betulin and betulinic acid with cytotoxic activity. *Bioorg Med Chem* **17**:6241–6250.
- Sato T., Hanada M., Bodrug S., Irie S., Iwama N., Boise L.H., Thompson C.B., Golemis E., Fong L., Wang H.-G., Reed J.C. (1994). Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **91**: 9238-9242.
- Sawada N., Kataoka K., Kondo K., Arimochi H. (2004). Betulinic acid augments the inhibitory effects of vincristine on growth and lung metastasis of B16F10 melanoma cells in mice. *Br J Cancer* **90**:1672–1678.
- Satyamoorthy K., Li G., Gerrero M.R., Brose M.S., Volpe P., Weber B.L., Van Belle P., Elder D.E., Herlyn M. (2003). Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer Res* **63**:756-9.
- Selzer E., Schlagbauer-Wadl H., Okamoto I., Pehamberger H., Potter R., Jansen B. (1998) Expression of Bcl-2 family members in human melanocytes, in melanoma metastases and in melanoma cell lines. *Melanoma Res* **8**: 197–203.
- Selzer E., Thallinger C.H., Hoeller C.H., Oberkleiner P., Wacheck V., Pehamberger H. and Jansen B. (2002). Betulinic Acid-induced Mcl-1 Expression in Human Melanoma – Mode of Action and Functional Significance. *Mol Med* **8**: 877–884.
- Shapiro G.I. (2006) Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *J Clin Oncol.* **24**:1770-1783.
- Sharpless E., Chin L. (2003). The INK4a/ARF locus and melanoma. *Oncogene* **22**:3092-3098.
- Sherr C. J. (2001). The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:731-737.
- Sidoryk K., Korda A., Rárová L., Oklešťková J., Pakulski Z., Strnad M., Cmoch P., Gwardiak K., Karczewski R. (2016). Synthesis and cytotoxicity of 28a-homothiolupanes and 28a-homothiolupane saponins. *Euro J Org Chem* **2016**:373-383.
- Sieghart W., Losert D., Strommer S., Cejka D., Schmid K., Rasoul-Rockenschaub S., Bodingbauer M., Crevenna R., Monia B. P., Peck-Radosavljevic M., Wacheck V. (2006). Mcl-1

- overexpression in hepatocellular carcinoma: A potential target for antisense therapy. *J Hepatology* **44**: 151–157.
- Simonin F., Poch O., Delarue M., de Murcia G. (1993). Identification of potential active-site residues in the human poly(ADP-ribose) polymerase. *J Biol Chem* **268**:8529–8535.
- Soengas M.S., Lowe S.W. (2003). Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* **22**:3138–3151.
- Soung Y.H., Lee J.W., Kim H.S., Park W.S., Kim S.Y., Lee J.H., Park J.Y., Cho Y.G., Kim C.J., Park Y. (2003). Inactivating mutations of CASPASE-7 gene in human cancers. *Oncogene* **22**: 8048–8052.
- Soung Y.H., Lee J.W., Kim S.Y., Park W.S., Nam S.W., Lee J.Y., Yoo N.J., Lee S.H. (2004). Somatic mutations of CASP3 gene in human cancers. *Hum Genet* **115**: 112–115.
- Steele J.C., Warhurst D.C., Kirby G.C., Simmonds M.S. (1999). In vitro and in vivo evaluation of betulinic acid as an antimalarial. *Phytother Res* **13**: 115–119.
- Stennicke H. R. and Salvesen G. S. (1998). Properties of the caspases. (*BBA*) - *Prot Structure Mol Enzym* **1387**:17–31.
- Strumia R., Montanari A. (2003). Low positive predictive value of ABCD-E rule for dermoscopy of small melanocytic nevi. *Melanoma Res* **13**:631–632.
- Šarek J., Klinot J., Bražinová S., Džubák P., Klinotová E., Nosková V., Křeček V., Kořínková G., Thomson J. O., Janošťáková A., Wang S., Parsons S., Fischer P. M., Zhelev N. Z. & Hajdúch M. (2003). New Lupane Derived Compounds with Pro-Apoptotic activity: Synthesis and Structure-Activity Relationships. *J Med Chem* **46**:5402 – 5415.
- Šarek J., Hajdúch M., Nováková K., Svoboda M., Spáčilová P., Kubelka T. & Biedermann D. (2007). Method of preparation of a soluble formulation of water-insoluble pentacyclic and tetracyclic terpenoids, a soluble formulation of a pentacyclic or tetracyclic terpenoid and a pharmaceutical composition containing this soluble formulation. PCT/CZ2007/000088.
- Šarek J., Biedermann D. & Hajdúch M. (2008). Triterpenoids derivatives for cancer treatment and preparation thereof. CZ 301158.
- Šarek J., Spáčilová P. & Hajdúch M. (2009). Triterpenoid 2-deoxy glycosides, method of preparation thereof and use thereof as medicaments. PCT/CZ2009/000132.
- Šarek J., Kvasnica M., Vlk M., Urban M., Džubák P. and Hajdúch M. (2011). The potential of triterpenoids in the treatment of melanoma- A Glimpse into Current Directions and Future Trends, Prof. Mandi Murph (Ed.).
- Tang L.R., Tron V.A., Reed J.C., Mah K.J., Krajewska M., Li G., Zhou X.W., Ho V.C., Trotter M.J., (1998). Expression of apoptosis regulators in cutaneous malignant melanoma. *Clin Cancer Res* **4**:1865–1871.
- Testori A., Rutkowski P., Marsden J., Bastholt L., Chiarion-Sileni V., Hauschild A. & Eggermont A. M. M. (2009). Surgery and radiotherapy in the treatment of cutaneous melanoma. *Ann Oncol* **20**:22–29.
- Thimmappa R., Geisler K., Louveau T., O'Maille P. and Osbourn A. (2014). Triterpene Biosynthesis in Plants. *Ann Rev Plant Biol*:225–257.
- Thurnher D., Turhani D., Pelzmann M., Wannemacher B., Knerer B., Formanek M., Wacheck V., Selzer E. (2003) Betulinic acid: a new cytotoxic compound against malignant head and neck cancer cells. *Head Neck* **25**:732–740.
- Trauth B. C., Klas C., Peters A. M., Matzku S., Müller P., Falk W., Debatin K. M. and Krammer P. H. (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* **245**: 301–305.
- Tsao H., Bevona C., Goggins W., Quinn T. (2003). The transformation rate of mole into cutaneous melanoma. A population based estimate. *Arch Dermatol* **139**:282–288.
- Tsao H., Atkins M.B., Sober A.J. (2004). Management of cutaneous melanoma. *N Engl J Med* **351**:998–1012.

- Tsujimoto Y., Ikegaki N., Croce C. M. (1986). Characterization of the protein product of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Oncogene* **2**:3-7.
- Tsujimoto Y., Finger L.R., Yuni J., Nowell P.C., Croce C.M. (1984) Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* **226**: 1097-1109.
- Urban M.; Šarek J.; Tislerova I.; Džubák P. & Hajduch M. (2005). Influence of Esterification and Modification of A-ring in a Group of Lupane Acids on their Cytotoxicity. *Bioorg Med Chem* **13**: 5527 – 5535.
- Urban M., Kvasnica M., Dickinson, N.J., Šarek, J. (2015). Biologically active triterpenoids usable as produgs. *Terpenoids and Squalene: Biosynthesis, Functions and Health Implications* Hauppauge NY: Nova Science Pub. Inc: 25-49.
- Vaux D.L., Cory S., Adams J.M. (1988) bcl-2 gene promotes haematopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**:440-442.
- Veronesi U., Cascinelli N. (1991). Narrow excision (1 cm margin). A safe procedure for thin cutaneous melanoma, *Arch Surg* **126**:438-441.
- Vogelstein B. and Kinzler K. W. (1992). p53 function and dysfunction. *Cell* **70**:523-6.
- Wada S., Tanaka R. (2005) Betulinic acid and its derivatives, potent DNA topoisomerase II inhibitors, from the bark of *Bischofia javanica*. *Chem Biodivers* **2**:689-694.
- Walczak H; Krammer PH. (2000). The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* **256**:58–66.
- WHO. (2009). Incidence of melanoma in people aged under 55 years. Fact sheet 4.2.
- Wheatley K., Ives N., Hancock B., Gore M., Eggermon A., Suci S. (2003). Does adjuvant interferon-alpha for high-risk melanoma provide a worthwhile benefit? A meta-analysis of the randomised trials. *Cancer Treat Rev* **29**:241–252.
- Weintraub S.J., B.Chow K.N., Luo R.X., Zhang S.H., He S., Dean D.C. (1995). Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. *Nature* **375**:812-815.
- Willmann M., Wacheck V., Buckley J., Nagy K., Thalhammer J., Paschke R. (2009). Characterization of NVX-207, a novel betulinic acid-derived anti-cancer compound. *Eur J Clin Invest* **39**:384-394.
- Yamamoto T., Ueta E., Osaki T. (2003). Apoptosis induction by interleukin-2-activated cytotoxic lymphocytes in a squamous cell carcinoma cell line and Daudi cells – involvement of reactive oxygen species-dependent cytochrome c and reactive oxygen species-independent apoptosis-inducing factors. *Immunology* **110**:217–224.
- Yang T., Kozopas K.M., Craig R.W. (1995). The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *J Cell Biol* **128**:1173–1184.
- Yu S. W., Wang H., Poitras M.F. (2002). Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* **297**:259–263.
- Zhang D.M., Hong-Gui X., Wang L., Li Y.J., Sun P.H., Xiao-Ming Wu, Guang-Ji Wang, Wei-Min Chen and Ye W.C. (2015). Betulinic acid and its derivatives as potential antitumor agents. Wiley Periodicals, *Inc Med Res Rev* **35**: 1127–1155.
- Zhuang L., Lee C.S., Scolyer R.A., McCarthy S.W., Zhang X.D., Thompson J.F., Hersey P. (2007). Mcl-1, Bcl-XL and Stat3 expression are associated with progression of melanoma whereas Bcl-2, AP-2 and MITF levels decrease during progression of melanoma, *Mod Pathol* **20**:416–426.
- Zhuang L., Scolyer R.A., Murali R., McCarthy S.W., Zhang X.D., Thompson J.F., Hersey P. (2010). Lactate dehydrogenase 5 expression in melanoma increases with disease progression and is associated with expression of Bcl-XL and Mcl-1, but not Bcl-2 proteins, *Mod. Pathol.* **23**:45–53.
- Zitelli J.A., Brown C.D., Hanusa B.H. (1997). Surgical margins for excision of primary cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol* **37**:422-429.
- Zuco V., Supino R., Righetti S.C., Cleris L., Marchesi E., Gambacorti-Passerini C., Formelli F. (2002). Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Lett* **175**:17–25.

## SEZNAM ZKRATEK

|                    |  |
|--------------------|--|
| ACAT               | Acetyl-CoA acetyltransferáza   |
| Ac-DEVD-AMC        | Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylkumarin                                   |
| Ac-DEVD-CHO        | Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyd   |
| AIF                | Apoptosis inducing factor, apoptosu indukující faktor                            |
| Apaf-1             | Apoptotic protease activating factor 1, faktor aktivující apoptotické proteasy-1 |
| APO-1              | Apoptosis antigen 1  |
| ARF                | ADP ribosylation factor  |
| ASCO               | American society of clinical oncology  |
| ATP                | Adenosine triphosphate, adenosin trifosfát                                       |
| BCG                | vakcína Bacillus Calmette-Guérin   |
| Bcl-2              | B-cell CLL/lymphoma 2  |
| Bcl-X <sub>L</sub> | B-cell lymphoma-extra large  |
| BCNU               | Bischlorethylnitrosourea   |
| BRCA1              | Breast and ovarian cancer gene   |
| BSA                | Bovine serum albumin   |
| CASP3              | gen caspasy-3  |
| CD95               | Cluster of differentiation 95  |
| CDK                | Cyclin-dependent kinase  |
| DD                 | Death domein   |
| DDT                | Dithiothreitol   |
| DISC               | Death – inducing signaling complex   |
| DMEM               | Dulbecco´s Modified Eagle  |
| DNA                | Deoxyribonucleic acid  |
| EDTA               | Ethylenediaminetetraacetic acid  |
| EGTA               | Ethylenglycoltetraacetic acid  |
| ECOG               | Eastern Cooperative Oncology Group   |
| EORTC              | European organization for research and treatment of cancer                       |
| ERK                | Extracellular-signal-regulated-kinase  |
| FADD               | Fas associated death domain  |
| FasL               | Fas ligand   |

|                  |  |
|------------------|--|
| FDA              | Food and drug administration                               |
| Gy               | jednotka záření Grey                                       |
| Hdm-2            | Human double minute 2                                      |
| HEPES            | 4 - (2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid       |
| HIV              | Human imunodeficiency virus                                |
| CHAPS            | [3-((3-cholamidopropyl)-dimethylammonio)-1-propansulfonát] |
| IAP              | Inhibitory of apoptosis proteins                           |
| IC <sub>50</sub> | 50% inhibitory concentration                               |
| IFN              | Interferon   |
| IL               | Interleukin  |
| LAK buňky        | Lymphokine-activated killer                                |
| LDH              | Lactate dehydrogenase                                      |
| MAPK             | Mitogen-activated protein kinase                           |
| Mcl-1            | Myeloid-cell leukemia 1                                    |
| Mdm-2            | Murine double minute 2                                     |
| MITF             | Microphthalmia transcription factor                        |
| MEK              | Mitogen-activated protein kinase kinase                    |
| MU               | Million units  |
| NAD <sup>+</sup> | Nicotinamidadeninucleotid                                  |
| NK buňky         | Natural killer, přirození zabíječi                         |
| PARP             | Poly(ADP-ribose)polymerasa                                 |
| PBS              | Phosphate buffered saline                                  |
| PKCδ             | Proteinkinasa Cδ   |
| PMSF             | Phenylmethylsulfonyl fluoride                              |
| Rb               | Retinoblastoma protein                                     |
| RECIST           | Response evaluation criteria in solid tumors               |
| RIPA             | Radioimmunoprecipitation buffer                            |
| ROS              | Reactive oxygen species                                    |
| SAR              | Structure–activity relationship                            |
| SDS              | Sodium dodecyl sulphate                                    |
| SDS-PAGE         | Sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis  |
| SLN              | Sentinel lymph node, sentinelová uzlina                    |
| SLNB             | Sentinel lymph node biopsy                                 |

|             |   |
|-------------|---|
| Smac        | Second mitochondria-derived activator of caspases |
| TBS         | Tris-buffered saline                              |
| TEMED       | Tetramethylethyldiammin                           |
| TGF $\beta$ | Transforming growth factor beta                   |
| TNF         | Tumour necrosis factor                            |
| TRIS        | Tris(hydroxymethyl)aminomethane                   |
| US          | Ultra sound                                       |
| UV          | Ultra violet                                      |
| VEGF        | Vascular endothelial growth factor                |
| WHO         | World health organization                         |

