

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2015

Bc. Jana Komárková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Hodnocení biologické aktivity purinových inhibitorů Rho kináz

Diplomová práce

Bc. Jana Komárková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

Vedoucí práce: Mgr. Jiří Voller, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, s pomocí vedoucího práce a citované literatury.

V Olomouci dne

Podpis.....

SOUHRN

Aberantní aktivita Rho kináz (ROCK) hraje roli v řadě lidských nemocí včetně aterosklerózy, hypertenze, neurodegenerace a neurotraumatu, glaukomu a rakoviny. Série purinových derivátů s předpokládanou aktivitou vůči ROCK byla testována v kinázovém testu a testech cytotoxicity. Následně byla vyhodnocena schopnost vybraných aktivních derivátů bránit nádorovým buňkám v invazi kolagenní matrix. Zatímco sloučeniny snižovaly invazivitu buněk pohybujících se améboidním způsobem, která je závislá na aktivitě ROCK, na buňky s mezenchymální migrací neměly vliv. Nové ROCK inhibitory jsou tedy sto dosáhnout aktivních koncentrací v buňkách.

Práce také zahrnuje rešerši literatury zabývající se rolí ROCK v lidských onemocněních a možnostech využití ROCK inhibitorů v terapii.

SUMMARY

Aberrant activity of Rho kinases (ROCK) plays a role in a range of human diseases including atherosclerosis, hypertension, neurodegeneration and neurotrauma, glaucoma and cancer. A series of purine derivatives with anticipated activity against ROCK were tested in kinase and cytotoxicity assays. The ability of the selected active ones to interfere with tumour cell invasion in collagen matrix was studied. While the compounds inhibited invasion of cell lines with amoeboid migration that is dependent on ROCK activity, cells with mesenchymal migration were not influenced. The novel ROCK inhibitors are therefore able to reach active concentrations in the cells.

The thesis also includes a survey of literature on the role of ROCK in human diseases and on the use of ROCK inhibitors in therapy.

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Dr. Jiřímu Vollerovi za jeho čas, trpělivost a rady, které mi poskytnul při řešení problematiky. Dále bych chtěla také poděkovat Kateřině Fakové a Janě Hudcové, za jejich čas a praktickou výpomoc při výzkumu.

Některé experimenty jsem dělala v Laboratoři invazivity nádorových buněk na Přírodovědecké fakultě UK. Poděkování proto také patří doc. Janu Brábkovi, Dr. Danielovi Rösellovi a jejich týmu, především Dr. Csille Pataki.

OBSAH

| | |
|---|----|
| 1. ÚVOD A CÍL PRÁCE..... | 1 |
| 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED | 3 |
| 2.1 Rho kinázy | 3 |
| 2.2 Farmakologické inhibitory ROCK | 7 |
| 2.3 Role ROCK v patogenezi nemocí a možnosti terapie založené na jejich inhibici..... | 9 |
| 2.3.1 Role ROCK v iniciaci a progresi nádorů | 9 |
| 2.3.1.1 Změny exprese a aktivity ROCK při nádorovém onemocnění..... | 9 |
| 2.3.1.2 ROCK a nádorová angiogeneze..... | 10 |
| 2.3.1.3 ROCK a metastazování nádorů | 13 |
| 2.3.1.4 Farmakologická inhibice ROCK v in vivo modelech rakoviny | 13 |
| 2.3.2 ROCK a kardiovaskulární onemocnění | 14 |
| 2.3.2.1 Ateroskleróza a hypertenze..... | 15 |
| 2.3.2.2 Plicní hypertenze | 16 |
| 2.3.3 ROCK v neurotraumatu a neurodegeneraci..... | 17 |
| 2.3.3.1 Cévní mozková příhoda | 17 |
| 2.3.3.2 Neuroregenerace | 18 |
| 2.3.3.3 Alzheimerova choroba..... | 19 |
| 2.3.4 ROCK inhibitory v terapii glaukomu | 19 |
| 3. MATERIÁL A METODY | 21 |
| 3.1 Seznam použitých přístrojů a zařízení..... | 21 |
| 3.2 Seznam použitých kultivačních plastů..... | 22 |
| 3.3 Seznam použitých chemikálií | 23 |
| 3.4 Seznam použitých roztoků..... | 25 |
| 3.5 Testované látky | 27 |
| 3.6 Biologický materiál | 28 |
| 3.6 Metody | 29 |

| | |
|---|----|
| 3.6.1 Hodnocení cytotoxicity..... | 30 |
| 3.6.1.1 Test založený na redukci resazurinu..... | 30 |
| 3.6.1.2 Kalceinový test | 30 |
| 3.6.2 Kinázový test | 31 |
| 3.6.3 Fluorescenční mikroskopie aktinového cytoskeletu..... | 32 |
| 3.6.4 Hodnocení invazivity v 3D kultuře v kultivačních komůrkách..... | 33 |
| 3.6.5 Hodnocení vlivu na morfologii v kolagenní matrix | 34 |
| 3.6.6 Vliv látek na morfologii buněk migrujících ze sféroidů..... | 35 |
| 3.6.7 Efekt na fosforylaci vybraných substrátů ROCK (MLC a kofilin) | 37 |
| 4. VÝSLEDKY | 38 |
| Kinázový test | 38 |
| Testování toxicity | 39 |
| Fluorescenční mikroskopie aktinového cytoskeletu | 40 |
| Hodnocení invazivity v kolagenní matrix v kultivačních komůrkách..... | 43 |
| Hodnocení vlivu na morfologii buněk v kolagenní matrix..... | 47 |
| Vliv látek na morfologii buněk migrujících ze sféroidů..... | 57 |
| Efekt na fosforylaci vybraných substrátů ROCK (MLC a kofilin) | 69 |
| 5. DISKUZE A ZÁVĚR | 70 |
| 6. LITERATURA | 73 |
| 7. INTERNETOVÉ ZDROJE..... | 86 |

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Rho kinázy ROCK1 a ROCK2 jsou klíčovými regulátory aktinového cytoskeletu. Aberantní aktivita Rho kináz (ROCK) hraje roli v řadě lidských nemocí včetně aterosklerózy, hypertenze, neurodegenerace a neurotraumatu, glaukomu a osteoporózy. V případě nádorových onemocnění aktivita Rho–ROCK dráhy ovlivňuje kromě přežívání, programované buněčné smrti také angiogenezi a metastazování. Inhibitory ROCK proto mají potenciálně široké uplatnění v terapii. Zatím jsou schváleny v Japonsku v terapii glaukomu a cerebrálního vazospazmu při subarachnoidálním krvácení. V klinickém hodnocení se testoval vliv na aterosklerózu a pulmonální hypertenzi. Pozitivní efekt byl pozorován i v řadě zvířecích modelů onemocnění. Nevýhodou většiny stávajících pokročilých inhibitorů je jejich nedostatečná kinázová selektivita. Obzvláště vývoj inhibitorů selektivních pro jednotlivé ROCK izoformy je obtížný. Přitom je známo, že některé pozitivní účinky jsou zprostředkovány inhibicí jedné z izoform. Efekt inhibice ROCK1 a ROCK2 dokonce může vést k opačným efektům – popsáno to bylo například v regulaci produkce β -amyloidu. Existuje proto poptávka po nových inhibitech ROCK.

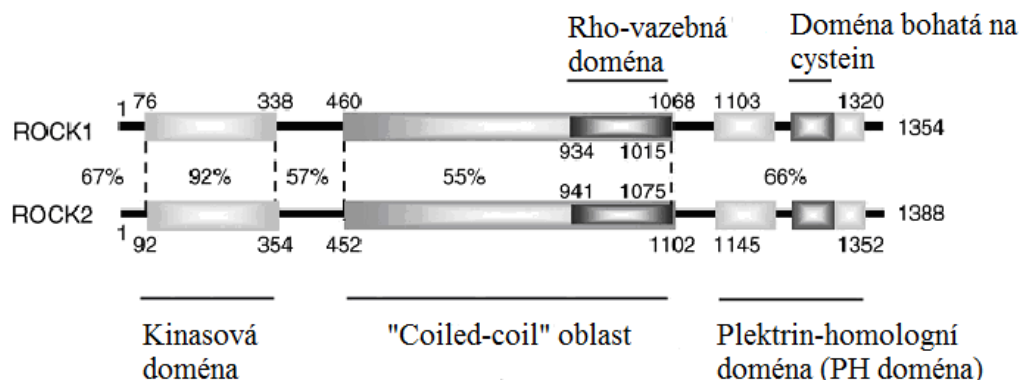
Cílem této práce bylo testování aktivity nových purinových derivátů s očekávanou aktivitou vůči ROCK. V souladu se zadáním byly provedeny následující experimenty. Inhibiční aktivita vůči ROCK2 byla hodnocena v biochemickém testu založeném na kvantifikaci inkorporace radioaktivního fosfátu ze značeného ATP do substrátu kinázy. Cytotoxická aktivita byla hodnocena na nádorových a primárních liniích. K průkazu inhibice ROCK v buňkách byl sledován vliv na fosforylaci některých cílů ROCK, stav aktinového cytoskeletu a na invazivitu buněk. Dalším cílem bylo vypracovat rešerši literatury o roli ROCK v patogenezi a možnostech využití ROCK inhibice v terapii.

Práce navazuje na moji bakalářskou práci zabývající se optimalizací metod pro hodnocení ROCK inhibitorů (Komárková, 2013). V rešeršní části rozšiřuji o nové poznatky a doplňuji některé její části (popis Rho-ROCK signální dráhy, ROCK v nádorové biologii). Nově se věnuji významu ROCK v nemocech kardiovaskulárního systému, neurodegenerace a glaukomu. Z bakalářské práce jsem převzala některé obrázky pocházející původně z literatury (Ghoreschi *et al.*, 2009; Liao *et al.*, 2007).

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Rho kinázy

V lidském genomu jsou geny pro 2 izoformy Rho kináz (Rho asociované kinázy, ROCK). Gen pro ROCK1 (ROK β nebo p160ROCK) se nachází na chromozómu 18 a kóduje protein o délce 1354 aminokyselin. Gen pro ROCK2 (ROK α) je na chromozómu 2 a kóduje protein z 1388 aminokyselin (Leung *et al.*, 1995). Izoformy jsou vysoce homologické - přes 65 % na úrovni proteinu. V kinázové doméně dosahuje homologie 92 % (Riento and Ridley, 2003) (Obr. 1). C-konec proteinu slouží jako autoregulační inhibitor kinázové domény nacházející se na N-konci. Vazba aktivní formy GTP proteinu Rho do Rho-vazebné domény ROCK vede k narušení interakce kinázové domény s C-koncem proteinu a otevření aktivní kinázové domény (Amano *et al.*, 1999). Vznik otevřené konformace lze také indukovat pomocí kyseliny arachidonové, která se váže na PH doménu (Feng *et al.*, 1999). Dále také odštěpením autoinhibičního C-konce kaspázou-3 (Sebbagh *et al.*, 2001) nebo granzymem B (Sebbagh *et al.*, 2005) v průběhu programované buněčné smrti. ROCK mohou být také aktivovány nezávisle na Rho, transfosforylací N-konce (Chen *et al.*, 2002) a přímo inhibovány interakcí s malými GTP-vazebnými proteiny jako je Gem a Rad (Ward *et al.*, 2002).

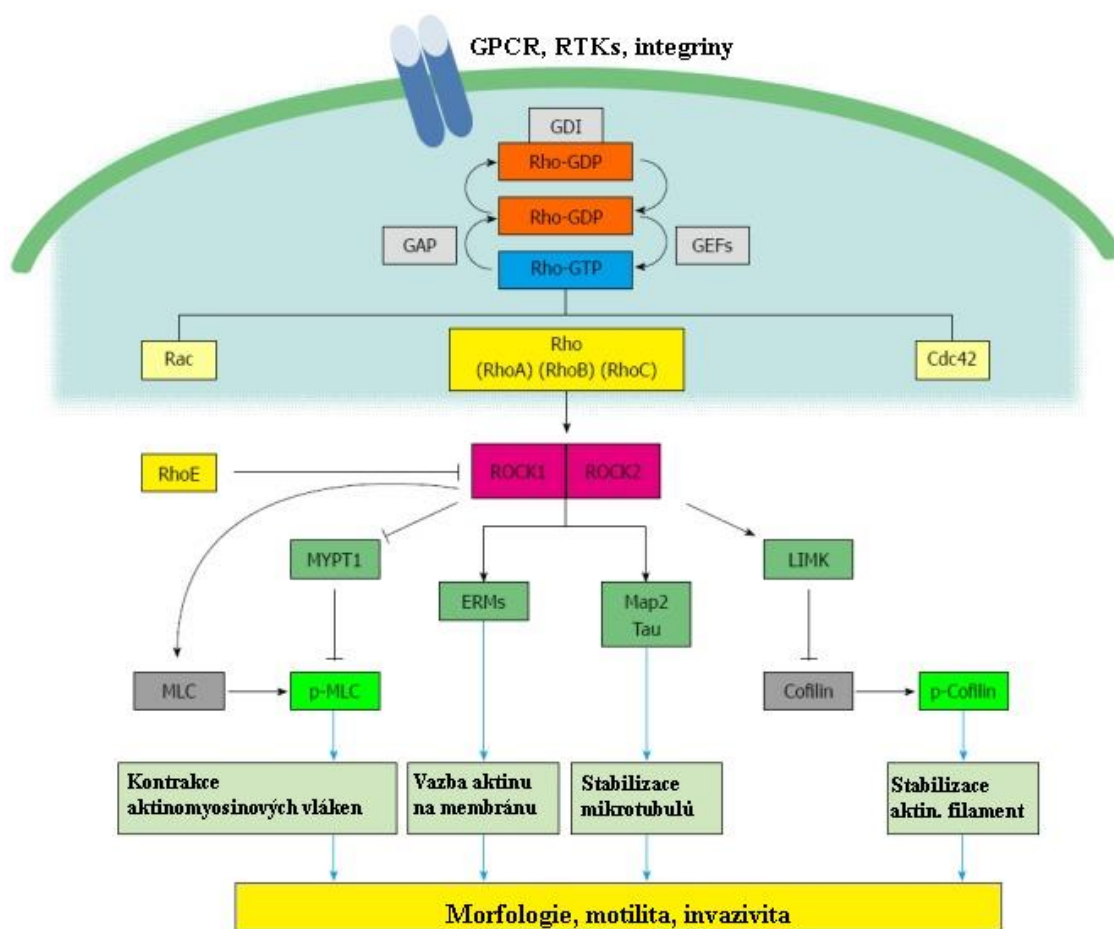


Obr. 1 – Schéma uspořádání domén Rho kinázy.

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

Rho - ROCK dráha hraje klíčovou roli v organizaci aktinového cytoskeletu. Reguluje řadu buněčných procesů včetně adheze, kontrakce, motility, proliferace a přežití (Amano *et al.*, 2010). Podílí se na hojení ran a metastazování nádorů. ROCK1 stabilizuje aktinový cytoskelet tím, že aktivuje LIM kinázy, které následně fosforylují kofilin. Fosforylace

inhibuje jeho schopnost narušovat stabilitu aktinových vláken (Obr. 2). Kontraktilita stresových vláken podobně jako kontraktilita aktinomyosinových vláken buněk hladké svaloviny závisí na fosforylaci lehkého řetězce myosinu (MLC). Ta je katalyzována kinázou lehkých řetězců myosinu (MLCK), zpětnou reakci působí příslušná fosfatáza. Rho kinázy inaktivují tuto fosfatázu fosforylací její podjednotky MYPT1 („myosin phosphatase - targeting subunit 1“) na threoninech v pozicích 696 a 853. ROCK2 (stejně jako MLCK) přímo fosforyluje MLC na serinu v pozici 19, což způsobí zvýšení ATPázové aktivity (Amano *et al.*, 2010). Regulace MLC Rho kinázou hraje roli také při dělení buňky. ROCK se váže na aktinomyosinový komplex kontraktálního prstence. Kromě Rho ji aktivuje též mitotická kináza PLK1. Další substráty ROCK, které hrají roli v organizaci aktinového cytoskeletu, jsou ezrin/radixin/moezin (ERM), CPI-17, calponin, adducin. Efekt ROCK na proliferaci a na buněčnou polaritu je zprostředkován fosforylací PTEN. Růst neuritů je ovlivněn fosforylací CRMP-2, MAP2 a Tau (Liao *et al.*, 2007; Mueller *et al.*, 2005). Přehled substrátů uvádí tabulka 1.



Obr. 2 – Vliv ROCK na polymerizaci aktinu a kontraktilitu aktinomyosinových vláken (Převzato a upraveno z Matsuoka *et Yashiro*, 2014)

| Protein | Lokalizace | Funkce | Efektor |
|----------------|----------------------|---|-----------------|
| RhoA | cytoplazma | regulace polymerizace aktinu, a kortikální kontraktility, destabilizace bazální membrány | ROCK a mDia1 |
| | plazmatická membrána | regulace tvorby „blebs“ (měchýřky vzniklé odškrcením buněčné membrány), regulace interakcí buňky s extracelulární matrix při pohybu buňky | |
| RhoB | endozómy | regulace adhezivity a schopnosti hojit rány fibroblastů | p76RBE a DIAPH1 |
| | lyzozómy | zpomalení nitrobuněčného transportu (trafficking) receptoru pro růstový faktor, negativní regulace přežití buňky, inhibice metastazování | |
| RhoC | cytoplazma | podpora invaze a metastazování | ROCK a mDia1 |

| | | | |
|-------|----------------------|--|----------------|
| | plazmatická membrána | regulace polymerizace aktinu ve výběžcích invazopodií | |
| ROCK1 | plazmatická membrána | destabilizace aktinového cytoskeletu regulací fosforylace MLC, regulace buněčného pohybu | MLC a RhoE |
| ROCK2 | cytoplazma | stabilizace aktinového cytoskeletu regulací aktivity kofilinu | LIMK a kofilin |
| | plazmatická membrána | regulace fagocytózy závislé na myosinu II, negativní regulace migrace buněk | |

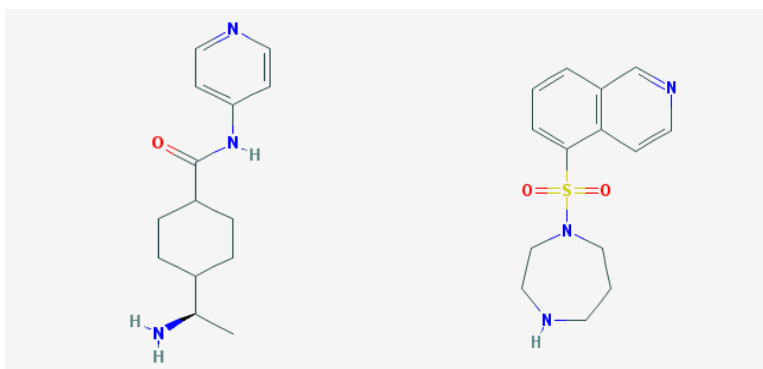
Tab. 1 – Přehled substrátů Rho a ROCK.

(Převzato a upraveno z Matsuoka *et* Yashiro, 2014)

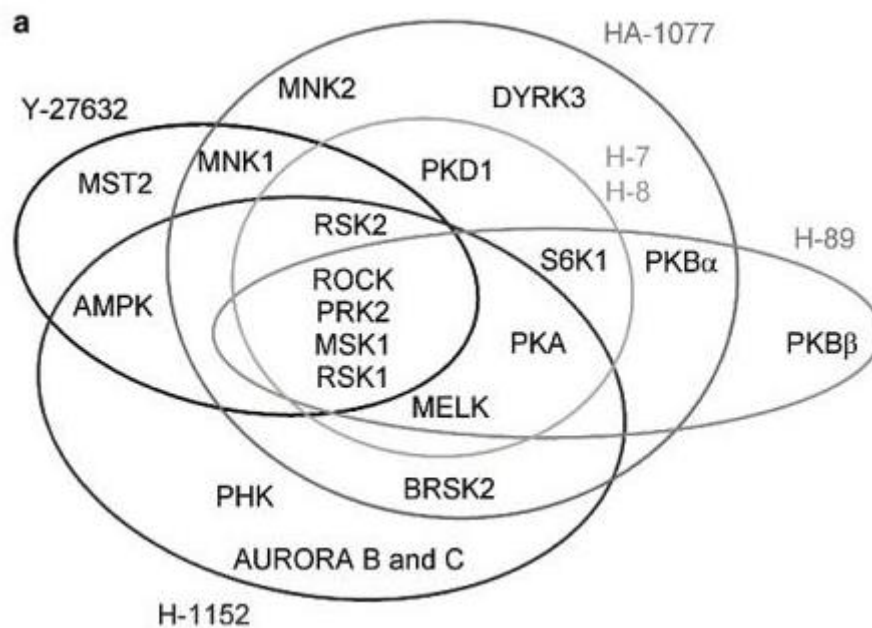
2.2 Farmakologické inhibitory ROCK

Inhibitory ROCK mají potenciálně široké uplatnění od biotechnologie (zvýšení životnosti kmenových buněk, výroba náhrad kůže) po terapii (Amin *et al.*, 2013). Schváleny jsou v Japonsku v terapii glaukomu a cerebrálního vazospazmu při subarachnoidálním krvácení. V klinickém hodnocení se testoval vliv na aterosklerózu a pulmonální hypertenzi. Ve zvířecích modelech mají aktivitu, která ukazuje na možné užití v terapii rakoviny, Alzheimerovy choroby, bronchiálního astmatu, osteoporózy a erektilní dysfunkce (Liao *et al.*, 2007; Olson, 2008).

Farmakologické inhibitory ROCK kináz jako je Y-27632 kompetují s ATP v kinázové doméně (Obr. 3). Inhibují ROCK1 a ROCK2 v ekvimolární koncentraci. Při vyšších koncentracích může Y-27632 inhibovat mj. proteinkinázu PRK-2, proteinkinázu N, citronovou kinázu. Fasudil může inhibovat proteinkinázu A (PKA) a proteinkinázu C (PKC), ale i další kinázy (Obr. 4) (Shimokawa *et Rashid*, 2007). Pozitivní účinky farmakologických inhibitorů je proto obtížné jednoznačně připsat inhibici jednotlivých izoform ROCK kináz. Vývoj inhibitorů selektivních pro jednotlivé izoformy ROCK stále probíhá (Pan *et al.*, 2013).



Obr. 3 – Struktury komerčních inhibitorů ROCK kináz: Y-27632 a fasudil
(Převzato z databáze PubChem <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)



Obr. 4 – Selektivita ROCK inhibitorů (HA-1077 = fasudil).
(Převzato z Golen, 2010)

2.3 Role ROCK v patogenezi nemocí a možnosti terapie založené na jejich inhibici

V této části se pokusím shrnout publikované poznatky o roli ROCK v patogenezi vybraných onemocnění. Soustředím se na ta, kde je výzkum (a vývoj farmakoterapie) asi nejpokročilejší - kardiovaskulární onemocnění, nemoci CNS a glaukom. Kapitole věnuji roli ROCK v nádorové biologii mj. i proto, že v praktické části diplomové práce hodnotím vliv inhibitorů ROCK na migraci nádorových buněk. Deregulace ROCK hraje ale roli i v dalších onemocněních jako je astma bronchiale, osteoporóza a makulární degenerace ((Liao *et al.*, 2007; Olson, 2008; Hollanders *et al.*, 2015).

2.3.1 Role ROCK v iniciaci a progresi nádorů

Rakovina je hlavní příčinou úmrtí ve světě. Iniclace a progresse rakoviny zahrnuje buněčnou transformaci, růst tumoru, neovaskularizaci, invazi a metastazování (Hanahan *et Weinberg*, 2010).

Aktinový cytoskelet hraje roli v řadě procesů v průběhu a progresi nádorových onemocnění - buněčné adhezi, migraci a invazi, epiteliálně-mezenchymálním a mezenchymálně-epiteliálním přechodu, metastazování, neoangiogenezi a infiltraci imunitních buněk (Morgan-Fisher *et al.*, 2013). Navíc sama reorganizace aktinového cytoskeletu ovlivňuje genovou expresi, buněčný cyklus, vezikulární transport a přestavbu extracelulární matrix (Ridley, 2006; Singh *et al.*, 2010; Skarp *et Vartiainen*, 2010). Vzhledem k tomu, že ROCK jsou významnými regulátory dynamiky aktinového cytoskeletu, je logické, že budou hrát roli i v některých z těchto procesů. Jejich role ale není omezena na regulaci aktinového cytoskeletu. ROCK také ovlivňují koncentrace regulátorů buněčného cyklu jako je cyklin A (přes LIMK), cyklin D1 a p21 (přes Ras) a p27 (Street *et Bryan*, 2011; Croft *et Olson*, 2006). ROCK kinázy také mohou chránit nádorové buňky před apoptózou (Burthem *et al.*, 2007). ROCK jsou důležité pro nádorovou angiogenezi a metastazování.

2.3.1.1 Změny exprese a aktivity ROCK při nádorovém onemocnění

V nádorových buňkách může být narušena jak exprese, tak regulace aktivity ROCK kináz. Somatické mutace se vyskytuje u obou ROCK genů. Mutace vedoucí ke konstitutivně aktivní formě byly zjištěny v genomech nádorových buněk a primárních tumorů (Greenman *et al.*, 2007). Mutace v genu pro ROCK1 vedoucí ke ztrátě autoinhibice byly pozorovány u primárního karcinomu prsu a v buněčné linii odvozené z karcinomu plic (Greenman *et al.*,

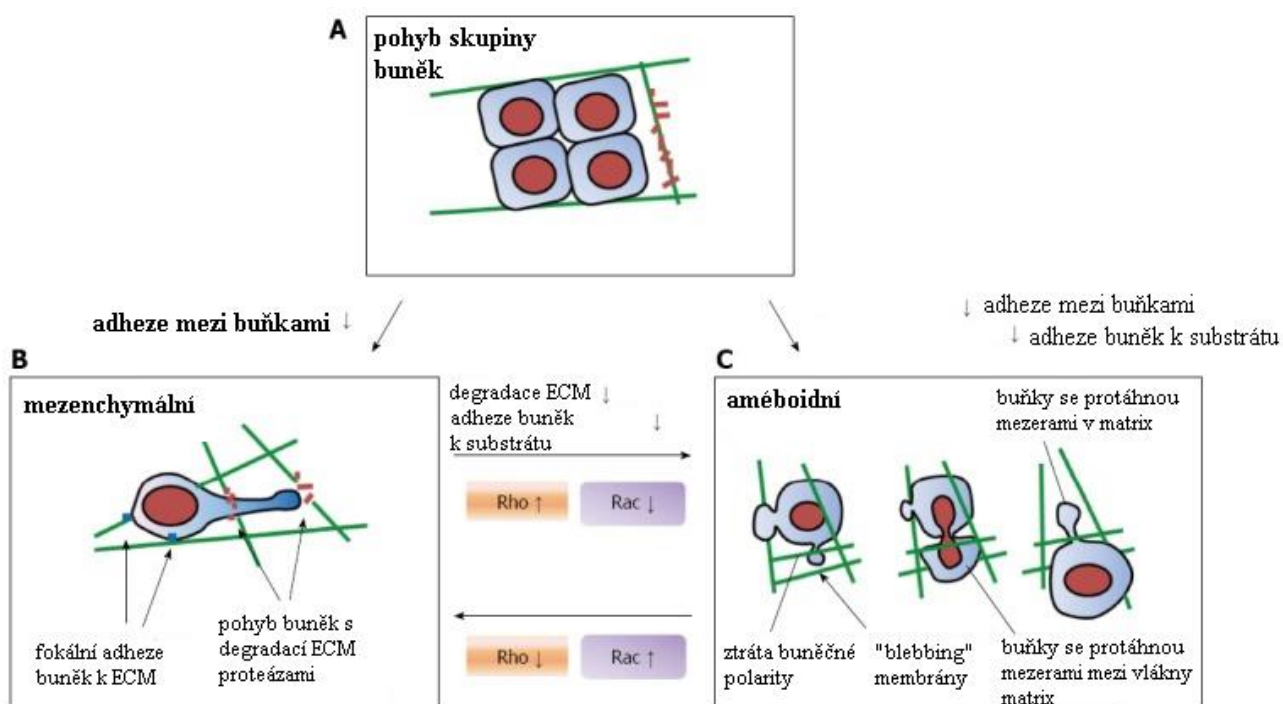
2007; Lochhead *et al.*, 2010). Mutace genu ROCK2 byly zjištěny u primárního karcinomu žaludku a maligní melanomové buněčné linie. Některé mutace byly pozorovány v homologických oblastech u obou izoform.

Také zvýšení exprese na úrovni RNA a/nebo proteinů bylo pozorováno u některých rakovin. Zvýšení proteinové exprese ale nemusí korelovat se zvýšenou celkovou aktivitou ROCK. Ale v některých případech byla zjištěna korelace mezi expresí a agresivitou nádoru. U nádorů prsu koreluje vyšší exprese ROCK1 se zvyšující se třídou tumoru (Lane *et al.*, 2008). V osteosarkomech zas koreluje s nižším celkovým přežitím (Liu *et al.*, 2011). Vyšší expresi ROCK2 proteinu můžeme najít u více agresivně se chovajících hepatocelulárních karcinomů (Wong *et al.*, 2009). V případě rakoviny močového měchýře je naopak zvýšená ROCK2 exprese spojená se zvýšením celkového bezpříznakového přežití (Kamai *et al.*, 2003). Zdá se, že zvýšená exprese jednotlivých ROCK izoform je spojena s rozdílnými typy malignit. Zatím není zcela jasné, kdy je aberantní exprese jednotlivých izoform přímo spojena s progresí onemocnění a kdy je naopak důsledkem progresu nemoci (Hahmann *et al.*, 2010).

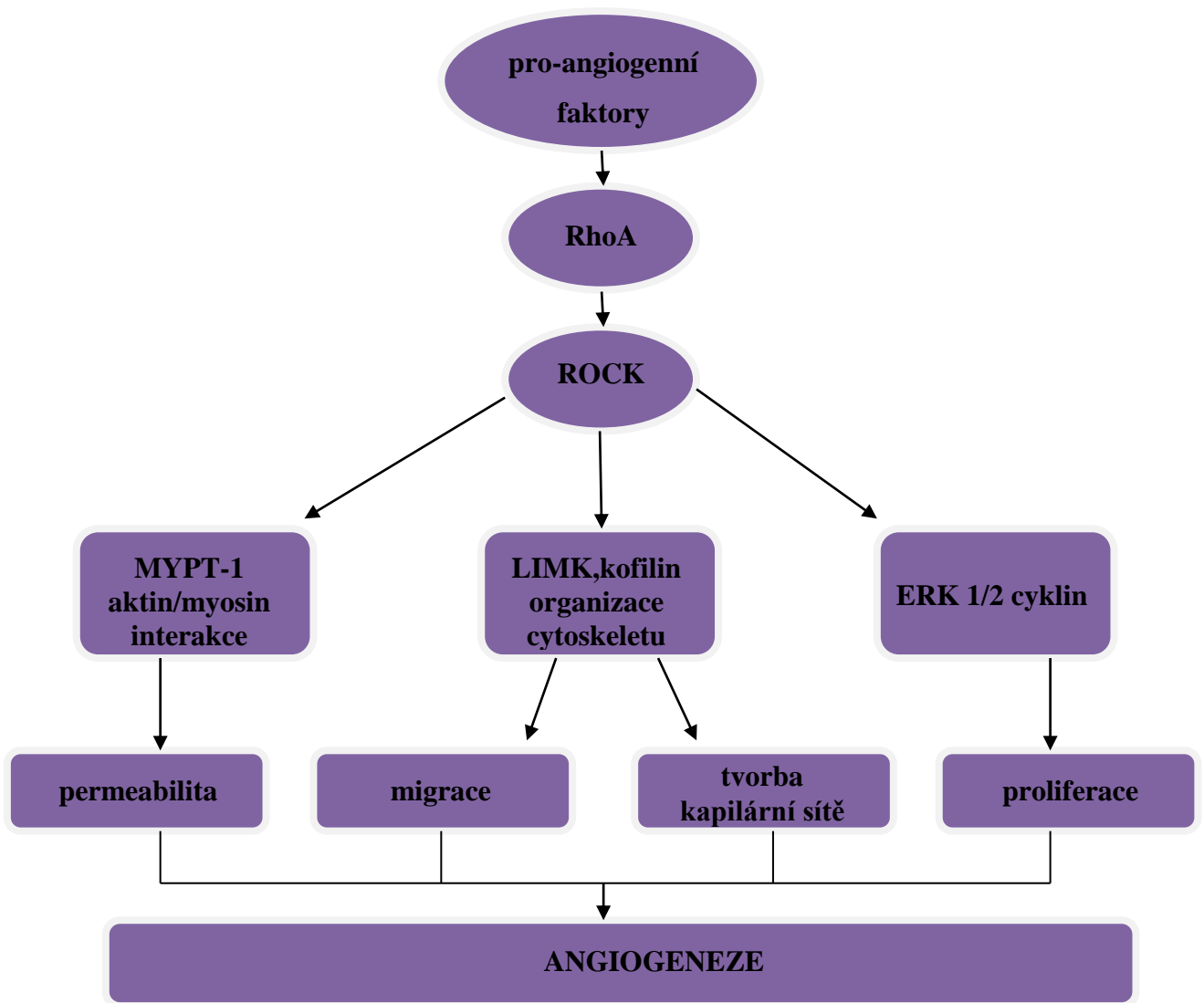
2.3.1.2 ROCK a nádorová angiogeneze

Pokud tumor nemá cévní zásobení, jeho růst je limitován – uvádí se, že může dosáhnout maximálně několika mm³. Součástí tumorogeneze je proto indukce vrůstání cév do tumoru. Angiogenezi je možné popsat jako proces o pěti krocích. Zvýšení permeability stěny kapiláry umožní migraci endotelií do extracelulární matrix po gradientu angiogenního signálu. Během tohoto procesu dochází také k dělení endotelií. Ty potom vytvářejí protokapiláry. Do tvorby kapilár se pak zapojí pericyty a buňky hladkého cévního svalů (Chen *et al.*, 2014). Rho-ROCK signalizace hraje roli ve všech fázích. K její aktivaci v endoteliích dochází působením vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) secernovaného nádorem (Bryan *et al.*, 2010; Montalvo *et al.*, 2013). Ke zvýšení permeability přispívá kontrakce endotelií způsobená reorganizací aktinového cytoskeletu regulovanou Rho-ROCK. Ta hraje roli i při migraci endotelií. Dráha hraje roli i v mitogenním a anti-apoptotickém efektu VEGF na endotelie (Yin *et al.*, 2007; Bryan *et al.*, 2010) a ovlivňuje některé aspekty vznikajících protokapilár. Implantace buněk lidského kolorektálního karcinomu s indukovatelným ROCK2 konstruktem u myši vedla ke vzniku silně vaskularizovaných agresivních tumorů (Croft *et al.*, 2004).

Proto není překvapivé, že inhibice ROCK pomocí siRNA i nízkomolekulárních inhibitorů má antiangiogenní efekt *in vitro* i *in vivo* (Chen *et al.*, 2014). V angiogenezi hrají roli obě izoformy ROCK - inhibice jednotlivých izoform pomocí RNA interference má na některé fáze angiogeneze *in vitro* nižší vliv než farmakologická inhibice neselektivním inhibítorem obou variant. Pozorování potvrdil i následný pokus s implantací buňek angiosarkomu do oplozeného slepičího vajíčka (Montalvo *et al.* 2013). Endotelie odvozené z tumorů si zachovávají abnormální vlastnosti i při kultivaci *in vitro*. Například oproti nenádorovým endoteliím jsou schopny lépe vytvářet kapilární síť. Příčinou je konstitutivní aktivace dráhy Rho - ROCK (Ghosh *et al.*, 2008) (Obr. 5, Obr. 6)



Obr. 5 – Rozdíl mezi mezenchymální a améboidní migrací
 (Převzato a překresleno z Matsuoka *et Yashiro*, 2014)



Obr. 6 – Schéma efektu ROCK na angiogenezi
(Překresleno podle Chen *et al.*, 2014)

2.3.1.3 ROCK a metastazování nádorů

Motilita buněk je spojená s přestavbou aktinového cytoskeletu regulovanou Rho GTPázami. Zatímco Rac a Cdc42 stimulují pohyb čela buňky, Rho indukuje refrakci zadní části buňky. Role Rho-ROCK dráhy v migraci endotelií při angiogenezi již byla zmíněna výše. Rho-ROCK dráha hraje také důležitou roli v invazivitě a metastazování nádorů. Asociace se vznikem metastáz ve vzdálených orgánech byla pozorována u nádorů prsu (Tang *et al.*, 2008), ovarií (Cheng *et al.*, 2009), žaludku (Matsuoka *et al.*, 2014) a jater (Grise *et al.*, 2009).

Buňky nádorů pocházejících z epitelů se pohybují ve skupinách nebo jednotlivě. Druhý způsob je umožněn tím, že v průběhu tumorogeneze dochází ke ztrátě polarity buněk potlačením mezibuněčné adheze díky snížené expresi cadherinů. Proces je označován jako epiteliálně mezenchymální tranzice. Dediferencované buňky se pak mohou pohybovat dvěma způsoby – mezenchymálním, závislým na interakci s integriny a proteolýze extracelulární matrix a améboidním, na těchto procesech nezávislým. *In vitro* lze typ migrace určit na základě morfologie buněk pohybujících se v 3D matrix – mezenchymální buňky jsou protáhlé, améboidní kulaté. ROCK byla identifikována jako klíčový regulátor améboidní migrace, kdežto její role v mezenchymální migraci je omezená (Sahai *et al.*, 2003).

Potenciální terapii zaměřenou na potlačení metastazování komplikuje to, že v tumoru se mohou vyskytovat buňky pohybující se oběma způsoby (Friedl *et al.*, 2003). Nádorové buňky mohou také invazivní strategii měnit (Paňková *et al.*, 2010), změnu může indukovat inhibice jednoho z typů pohybu (Matsuoka *et al.*, 2014). Jako možná strategie prevence invaze a metastazování nádorů by se proto mohlo uplatnit podávání kombinace inhibitoru ROCK a látky bránící mezenchymálnímu pohybu např. inhibitoru matrixových proteáz (Sahai *et al.*, 2003; Torika *et al.*, 2006), Rac (Ridley, 2012) nebo kinázy MRCK (Heikkilä *et al.*, 2011).

2.3.1.4 Farmakologická inhibice ROCK v *in vivo* modelech rakoviny

Farmakologická inhibice ROCK má protinádorový efekt jak v buněčných kulturách, tak v některých zvířecích modelech včetně xenograftů. Některé studie již byly zmíněny výše. Zde jsou uvedeny některé experimenty na zvířecích modelech. Fasudil, Y-27632, Wf-536, RKI-1447 a některé další byly schopny redukovat růst hepatocelulárního a plicního karcinomu, myelomu a karcinomu prsu u myši (Itoh *et al.*, 1999; Takamura *et al.*, 2001; Nakajima *et al.*,

2003; Ying *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2012). Fasudil a Wf-53 brání neoangiogenezi a v *in vivo* modelu modelu při karcinomu plic (Nakajima *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2012).

Redukce invazivity a diseminace po podání ROCK inhibitoru byla pozorována v melanomech, fibrosarkomech, nádorech prsu, ledvin, jater a prostaty. Na základě těchto pozorování je možné soudit, že ROCK inhibitory by mohly působit nejen redukcí primárního tumoru, ale bránit i nádorové angiogenezi a metastazování.

2.3.2 ROCK a kardiovaskulární onemocnění

Řada experimentů *in vitro* i *in vivo* prokázala, že abnormální funkce ROCK přispívá k cévním onemocněním. V cévní stěně ROCK zprostředkovávají kontrakci hladkého svalu, organizaci aktinového cytoskeletu, buněčnou adhezi a motilitu. Mají také vliv na proliferaci a apoptózu buněk cévního hladkého svalu. Dysregulovaná aktivita ROCK může přispět k abnormální kontrakci hladkého svalu pozorované při mozkovém a koronárním vazospasmu (Masumoto *et al.*, 2002), hypertenzi a plicní hypertenzi (Abe *et al.*, 2004). ROCK mohou také regulovat cévní tonus a oběh krve nepřímo přes negativní regulaci exprese a aktivace eNOS, případně působením na CNS (Ito *et al.*, 2004). ROCK inhibice vede ke zvýšení krevního průtoku mozky a ke snížení rozsahu infarktu při mozkové mrtvici (Rikitake *et al.*, 2005). V této indikaci byl také v Japonsku schválen fasudil.

ROCK se také podílí na zánětu a remodelaci cév, restenóze po „balonovém“ zranění při angioplastice (Shibata *et al.*, 2003), ischemicko-reperfúzním poškození (Wolfrum *et al.*, 2004) a ateroskleróze (Mallat *et al.*, 2003). Dlouhodobé podávání fasudilu zmírňuje monokrotalinem indukovanou fatální plicní hypertenzi u potkanů (Abe *et al.*, 2004) a potlačuje vaskulopatii srdečního štetu u myši (Hattori *et al.*, 2004). ROCK také ovlivňují expresi některých genů důležitých pro funkci cév, včetně monocytového chemoatraktantového proteinu-1 (MCP-1/CCL2), plasminogen-aktivujícího inhibitoru-1 (PAI-1/SERPINE1) a osteopontinu (sekretuje fosfoprotein 1, SPP1) (Shimokawa *et al.*, 2005). ROCK je stimulován zánětlivými podněty jako je angiotensin II a interleukin-1 β v buněčných kulturách (Hiroki *et al.*, 2004) a lipopolysacharidem při *in vivo* (Buyukafsar *et al.*, 2004). Aktivita ROCK se podílí na regulaci exprese PAI-1 při hyperglykemii, což naznačuje, že ROCK mohou být klíčovým regulátorem u kardiovaskulárních nemocí u pacientů s diabetes mellitus (Rikitake *et al.*, 2005).

Rozsáhlé klinické studie prokázaly, že hypolipidemika (inhibitory 3-hydroxy-3-methylglutarylreduktázy, HMG-CoA) snižují efektivně hladiny krevního cholesterolu a

následně kardiovaskulární morbiditu a mortalitu. Mj. také zlepšují a obnovují endoteliální funkci (Zhou *et* Liao, 2010). Statinům jsou ale připisovány i další pozitivní účinky nezávislé na jejich hypolipidemickém účinku. Roli zde hraje snížení hladin izoprenoidních meziproduktů syntézy cholesterolu. Ty se uplatňují jako posttranslační modifikace některých významných intracelulárních signálních proteinů. Např. membránová lokalizace a správná funkce malých GTP-vazebných proteinů Rho, Ras a Rac je závislá na izoprenylaci (Zhou *et* Liao, 2009). Statiny také zvyšují expresi endoteliální syntázy oxidu dusnatého (eNOS). Tento efekt je důsledkem inhibice RhoA, což vede ke změnám aktinového cytoskeletu a následné stabilizaci mRNA pro eNOS (Laufs *et* Liao, 1998). Inhibice Rho-ROCK dráhy hraje roli v rychlé fosforylaci a aktivaci eNOS přes fosfatidylinositol-3-kinázu Akt drahou (Wolfrum *et al.*, 2004). Rho-ROCK dráha tedy negativně regulují endoteliální funkci na úrovni eNOS exprese a také aktivaci dvěma jasnými mechanismy.

Protože ROCK ovlivňují fungování cév na mnoha úrovních, porozumění jejich role v cévní stěně může poskytnout klíčové poznatky o tom, jak jsou cévy regulovány jako celek v běžných i patofyziologických podmínkách. Intenzivně probíhá preklinický i klinický výzkum aplikace ROCK inhibitorů v kardiovaskulárních indikacích. Výsledkem těchto snah je i schválení fasudilu v terapii cerebrálního vazospazmu při mozkové mrtvici.

2.3.2.1 Ateroskleróza a hypertenze

Ateroskleróza je komplex patofyziologických procesů charakterizovaných progresivním zánětem, akumulací lipidů v cévní stěně a její fibrózou. Proces typicky začíná dysfunkcí endotelu, vedoucí k aktivaci endoteliálních buněk a vstupu leukocytů do cévní stěny (Zhou *et al.*, 2011). Následný lokální zánět pak dále podporuje chemotaxi a adhezi leukocytů a aktivovaných trombocytů na poškozenou cévu. To vede ke zvýšení permeability cévní stěny pro lipidy plasmy. Oxidované lipidy se hromadí v makrofázích infiltrujících arteriální intimu (Libby *et al.*, 2002). Akumulace dalších zánětlivých buněk a extracelulárních lipidů vede k tvorbě tukových desek, které se dále vyvíjí v aterosklerotické pláty. Sekrece cytokinů a růstových faktorů stimuluje další růst plátů, což může vést k zúžení průsvitu cévy - stenóze. Přítomnost aterosklerotických plátů může zvyšovat agregaci trombocytů a vést v důsledku k trombóze. Důsledkem snížené pružnosti cévy je hypertenze. Pozitivní efekt ROCK inhibitorů v prevenci a terapii aterosklerózy a jejích komplikací je komplexní.

Hyperpermeabilita cévní stěny vyvolaná podáním LPA ve zvířecím modelu aterosklerózy vyžaduje aktivaci RhoA-ROCK dráhy. Inhibice ROCK pomocí Y-27632 zamezuje vzniku časných aterosklerotických plaků u myši s mutací LDL receptoru krmných

dietou s vysokým obsahem cholesterolu. To bylo spojeno s výraznou redukcí akumulace T-lymfocytů (Mallat *et al.*, 2003). Další studie sledovaly distribuci a fosforylaci cílových proteinů ROCK, zejména MLC a ERM proteinů, u apolipoprotein-E deficientních myší. Po podání Y-27632 došlo k inhibici fosforylace ERM v aterosklerotických placích (Rekhter *et al.*, 2007). Experimenty tedy naznačují, že ROCK1 hraje klíčovou roli v rozvoji aterosklerózy a že její inhibice by mohla mít být přínosná v její léčbě. Potenciál inhibice ROCK2 v terapii je zatím nejasný. Dlouhodobá ROCK inhibice onemocnění nejen stabilizuje, ale dokonce indukuje regresi aterosklerotických koronárních lézí u prasete *in vivo* (Shimokawa *et al.*, 2001).

Jak již bylo uvedeno, aktivita ROCK snižuje expresi eNOS. Inhibice ROCK přispívá k udržení krevního průtoku tím, že brání hypoxií indukovanému snížení endoteliální syntézy vazodilatačně aktivního oxidu dusnatého.

Výzkum role ROCK kináz v arteriální ateroskleróze vyústil v klinické studii. Aplikace fasudilu redukovala zvýšenou aktivitu ROCK u pacientů s aterosklerózou a zlepšila vazodilataci závislou na endotelu. Zajímavé je, že se vazodilace závislá na endotelu u zdravých účastníků studie se zhoršovala po podání fasudilu v porovnání s placebem. Důvodem je pravděpodobně negativní zpětná vazba vedoucí ke zvýšené transkripci Rho (Rekhter *et al.*, 2007).

2.3.2.2 Plicní hypertenze

Klinicky se ROCK inhibitory testují i v terapii plicní hypertenze (PH). Pro tento stav je typická trvalá vazokonstrikce, progresivním remodelace a trombotizace cév a nevratná pravosrdeční dysfunkce. Zatímco při hypoxické plicní vazokonstrikci je znám hlavní patofyziologický faktor, způsobující zvýšení plicního arteriálního tlaku, procesy vedoucí k plicní hypertenzi nejsou zcela pochopeny. Alespoň v některých případech se předpokládá, že příčinou je dysfunkce endotelu. K vyvolání onemocnění v experimentálních zvířatech se používá injekce monokrotalinu. Ten má toxický efekt na endoteliální buňky, v důsledku pak dochází k dramatické akumulaci makrofágů v malých cévách (Duong-Quy *et al.*, 2013).

Roli RhoA-ROCK dráhy v patogenezi idiopatické plicní arteriální hypertenze prokázali na patientských vzorcích v roce 2009 Guilluy *et al.* V plicích, krevních destičkách a buňkách hladkého cévního svalu pozorovali zvýšenou aktivitu Rho a ROCK kinázy pravděpodobně v důsledku serotonylace Rho proteinu. Ta přispěla k proliferaci buněk hladkého svalu arterií. Ve studii pacientů s plicní hypertenzí, kteří podstoupili transplantaci

plic (Do *et al.*, 2009), se ukázalo, že Rho-kinázová aktivita koreluje se závažností a vývojem onemocnění.

Na zvířecích modelech byl úspěšně testován jak Y-27632, tak fasudil. Aby se předešlo systémové vazodilataci, byly látky v řadě případů podávány inhalačně. Kromě redukce tlaku byl pozorován pozitivní efekt na hemodynamické změny a cévní přestavbu u léčených oproti neléčeným. V případě fasudilu byl pozorován i vliv na proliferaci a apoptózu hladkých buněk cévní svaloviny (McNamara *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2010; Zino *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2007; Mouchaers *et al.*, 2007).

Pozitivní výsledky aplikace ROCK inhibitorů při léčbě PH ve zvířecích modelech vedly ke klinickým studiím. Pozitivní efekt na tlak a další kardiovaskulární parametry byl demonstrován v pilotní studii Fukumoto *et al.* (2005) a poté ve větší studii na pacientech s idiopatickou plicní arteriální hypertenzí (Ishikura *et al.*, 2006). Akutní prospěšné efekty fasudilu na hemodynamiku při léčbě vrozeného srdečního onemocnění s levoprávním přesunem indukujícím PH u mladých pacientů byly pozorovány v další studii (12 pacientů, průměrný věk 12,3 let) (Li *et al.*, 2009). V této studii byl fasudil podáván intravenózně. Pozitivní efekt inhalační aplikace na střední arteriální tlak a poměr plicní/systémové cévní rezistence demonstroval Fujita *et al.* (2010). Jednoznačné důkazy pozitivního efektu dlouhodobé léčby fasudilem u pacientů s PH ať v monoterapii nebo v kombinaci ale zatím chybí.

2.3.3 ROCK v neurotraumatu a neurodegeneraci

ROCK hrají roli i při akutním postižení CNS jako je poranění mozku a mrtvice. Jediným ROCK inhibitorem zatím schváleným v terapii CNS je fasudil. Ten se používá v případě cerebrálního vazospasmu v důsledku subarachnoidálního krvácení v Japonsku a Číně.

Nadměrná aktivace ROCK se pravděpodobně podílí na patogenezi neurodegenerací jako je Alzheimerova, Huntingtonova a Parkinsonova choroba (Raad *et al.*, 2012). ROCK inhibitory se proto v budoucnu mohou uplatnit i zde.

2.3.3.1 Cévní mozková příhoda

Cévní mozková příhoda (mozková mrtvice, iktus) je náhlé postižení tkáně mozku v důsledku poruchy prokrvení. K tomu může dojít v důsledku ischemie způsobené okluzí cév např. trombem nebo krvácením (hemoragie). V případě ischemické cévní příhody je cílem

obnovit krevní zásobení např. podáním trombolitik, v případě hemoragie zastavit krvácení. S určitým zpožděním dochází k zániku neuronů i v okolí vlastního infarktu v oblasti takzvané penumbry. Cílem terapie je předejít ztrátě neuronů v této oblasti, úspěchy jsou zatím omezené. Důležitou vlastností potenciálních léčiv je schopnost působit protektivně, i pokud jsou podána s odstupem po vzniku infarktu.

Neuroprotektivní působení inhibitorů ROCK při hemoragii a hypoxii je komplexní – kromě zvýšení krevního zásobení díky vazodilataci, brání lokálnímu zánětu, agregaci trombocytů a chrání nervové buňky proti apoptóze. Některé také snižují oxidativní stres.

Pozitivní efekt byl pozorován v celé řadě zvířecích modelů (hlodavci, psi). Obvyklým přístupem je vyvolání lokálního infarktu pomocí mechanické okluze mozkových cév. Satoh *et al.* (2007) pomocí tohoto přístupu na pískomilech ukázali, že fasudil je schopný ochránit neurony pokud je podán i s odstupem 24 hodin po vzniku ischemie.

Ishirigo *et al.*, (2012) v myším modelu ukázali, že je výhodné kombinovat trombolytickou terapii pomocí tPA s podáním fasudilu. Fasudil chránil před hemorhagickou transformací, přičemž autoři efekt alespoň částečně připisují inhibici metaloproteinázy 9 fasudilem.

Koumara *et al.* (2011) hodnotili neuroprotektivní efekty fasudilu, ozagrelu (antiagregans působící pomocí inhibice tromboxin-syntázy) a jejich kombinace v modelu ischemické mrtvice. Terapie vedla k redukci velikosti infarktu vazodilatací a inhibici agregace destiček v místech uzávěru tepen. Kombinace byla účinnější než monoterapie. Na molekulární úrovni došlo i k fosforylaci eNOS a zvýšení množství oxidu dusnatého.

V případě ischemie k poškození nepřispívá jen hypoxie, ale i oxidativní stres. Fasudil chránil buňky PC12 proti oxidativnímu stresu vyvolaného expozicí peroxidu vodíku. Pozorována byla redukce akumulace reaktivních forem kyslíku a hodnot poměru koncentrace Bax/Bcl-2 mRNA a proteinů (Li *et al.*, 2011).

2.3.3.2 Neuroregenerace

Fasudil podporuje produkci granulocytového stimulujícího faktoru (G-CSF) astrocyty v *in vitro* modelu ischemie. V důsledku toho došlo k aktivaci neurogeneze. Efekt zmizel při blokáde receptoru pro G-CSF, což dokazuje, že neuroprotektce je zprostředkována tímto receptorem (Ding *et al.*, 2009). Je tedy možné, že k terapeutickému efektu fasudilu může přispívat i schopnost stimulovat proliferaci nervových buněk a neurogenezi.

2.3.3.3 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je nejčastější příčinou poruchy paměti a kognitivní dysfunkce (Iqbal *et* Grundke-Iqbal, 2011). Typickým patologickým nálezem je přítomnost neurofilament hyperfosforylovaného proteinu Tau v neuronech a plaků β -amyloidu v mezibuněčných prostorech. Přestože se jedná o nejnápadnější změny, role těchto agregátů v patogenezi onemocnění není zcela jasná – mohou být příčinou i důsledkem onemocnění (Huang *et al.*, 2013). Existují i alternativní hypotézy.

V poslední době se věnuje pozornost vztahu mezi narušeným metabolismem glukózy a AD – někdy se dokonce o AD mluví jako o dalším typu diabetu. Porucha signalizace přes inzulínové receptory vede k snížení klírens β -amyloidu. Inzulínová rezistence a hyperinzulinemie údajně zvyšují riziko rozvoje AD a zhoršení paměti. Epidemiologické studie také ukazují, že existuje asociace AD se snížením hladiny cirkulujícího leptinu.

Role Rho-ROCK signalizace v patogenezi AD je zatím hypotetická, ale mluví pro ni následující pozorování. Jednak ROCK1 je nezbytná pro aktivitu leptinu v některých oblastech CNS. Jednak schopnost některých nesteroidních antiflogistik redukovat sekreci beta-amyloidu je zprostředkována regulací Rho-ROCK dráhy a její přímá inhibice pomocí ROCK inhibitoru má podobný efekt (Zhou, 2003). Problém pro farmakoterapii představuje pozorování, že inhibice jednotlivých izoform může mít na produkci beta-amyloidu opačný efekt (Herskowitz *et al.*, 2013).

2.3.4 ROCK inhibitory v terapii glaukomu

Glaukom (zelený zákal) (Obr. 7) je optická neuropatie, při které dochází k zrychlenému odumírání retinálních gangliových buněk. Je hlavní příčinou slepoty na světě. Odhaduje se, že v roce 2020 počet lidí postižených glaukomem dosáhne 79,6 milionů. Vzhledem ke své počáteční asymptomatické povaze zůstává významná část pacientů nediodagnostikována (Wang *et al.*, 2014).

Glaukom je často důsledkem zvýšeného nitroočního tlaku, ale existuje i forma, kdy nitrooční tlak zůstává normální. V prvním případě je cílem terapie snížení nitroočního tlaku. V terapii se používají léčiva ze skupin prostaglandinů, beta-blokátory, alfa-adrenomimetika, parasymptomimetika a inhibitory karbonické anhydrázy. Pokud farmakoterapie nezabírá, přistupuje se k operaci umožňující zvýšení přirozeného odtoku komorové tekutiny. Přístupy založené na neuroprotektu a neuroregeneraci nebyly zatím zavedeny do klinické praxe. Experimentální léčiva zahrnují látky modulující cytoskelet, kanabinoidy, ligandy

adenosinových/serotoninových/dopaminových receptorů, modulátory produkce NO a CO (Bucolo *et al.*, 2013). Testuje se i siRNA proti několika cílům.

Hypotéza o roli Rho-ROCK dráhy v regulaci odtoku komorové tekutiny vyšla z pozorování exprese Rho-GTPázy v trabekulární síťovině králičího oka, kde přispívala k senzibilitě ke stahu vyvolanému vápníkem (Fukatay *et al.*, 2011). Později byla pomocí imunohistochemie pozorována zvýšená hladina RhoA ve zrakovém nervu glaukomatického oka ve srovnání s kontrolní věkovou skupinou (Goldhagen *et al.*, 2012). Protože ROCK regulují kontrakci hladkého svalstva, ROCK inhibitory mohou zvýšit odtok komorové tekutiny přes trabekulární síťovinu a následně snížit nitrooční tlak.

Experimentálně hypotézu potvrdil Rao *et al.* (2001), kteří perfundovali prasečí oko 10-100 $\mu\text{mol/l}$ ROCK inhibitorem Y-27632 a pozorovali zvýšení odtoku komorové tekutiny přes trabekulární síťovinu až na 80 % oproti kontrole. V izolované trabekulární tkáni pak pozorovali snížení fosforylace lehkého řetězce myosinu, což naznačuje, že změny v morfologii buněk a odtoku tekutiny byly skutečně ovlivněny inhibicí Rho-ROCK dráhy.

Na zvířecích modelech byly demonstrovány i další pozitivní efekty ROCK inhibice. Po aplikaci inhibitoru došlo ke zvýšení krevního průtoku okem. V případě některých látek byl pozorován i neuroprotektivní efekt a neuroregenerační efekt. Na rozdíl od stávajících léků, které snižují nitrooční tlak tím, že potlačují produkci komorové tekutiny, ROCK inhibitory mohou působit terapeuticky na několika úrovních.

V současné době se v klinickém hodnocení terapie glaukomu nachází 4 ROCK inhibitory (K-115, AR-13324, PG324, AMA0076). Vývoj dalších nejméně 6 inhibitorů byl ale v klinické fázi zastaven obvykle pro nežádoucí účinky (Tanihara *et al.*, 2013; Kopezynski *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012). Typickým nežádoucím účinkem je hyperémie (překrvení) v důsledku vazodilatace. V případě látek dostávajících se do systémové cirkulace může ze stejných důvodů docházet k hypotenzii. Proto se vyvíjejí inhibitory, které jsou sice sto penetrovat do oka v dostatečné koncentraci, ale zároveň nedochází k systémové distribuci. Ke snížení nežádoucích účinků by přispělo i zvýšení selektivity inhibitorů.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Analyzář luminiscence – LAS-4000 (FUJIFILM)
- Analyzář pro světlocitlivou kazetu – FLA-7000 (FUJIFILM)
- Automatické pipety (Eppendorf); 8-kanálová pipeta (Brand Transferpette S-8)
- Box s vertikálním prouděním vzduchu – Gelaire TC 48 (Gelaire, Flow Laboratories)
- Bürkerova komůrka (Marienfeld)
- CO₂ inkubátor –MCO-18AIC (SANYO)
- Destičkový spektrofotometr – Sunrise (Tecan)
- Elektroforetický zdroj – EC 3000P (E-C Apparatus Corporation)
- Chlazená centrifuga – BR4i (Jouan); stolní centrifuga – Mini Spin (Eppendorf)
- Mikroskop – Eclipse TE2000-S (Nikon)
- Mikroskop – IX51 (Olympus); zdroj světla – TH4-200 (Olympus); kamera – DP71 (Olympus)
- Sestava pro elektroforézu a blot – Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad)
- Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky – Fluoroskan Ascent (Thermo Labsystems)
- Světlocitlivá kazeta – BAS Cassette 2025 (FUJIFILM)
- Thermo-mixér – Thermomixer Comfort (Eppendorf)
- Termostat blokový – MBT 250 (Kleinfeld Labortechnik)
- Termostatová míchačka – RCT S26 (OMNILAB)
- Třepačka – KS 260 Basic (IKA)
- Třepačka s kývavým pohybem – Mini Rocker MR-1 (BIOSAN)
- Ultrazvuk – HD 2200 (BANDELIN SONOPLUS)
- Ultrazvuková lázeň – RK31 (BANDELIN SONOREX)
- Váhy – 440-33N (Kern)
- Vortex – Minishaker MS2 (IKA)
- Vývěva – KIF LAB (Laboport)

3.2 Seznam použitých kultivačních plastů

- Kultivační láhve s víčkem 75 cm²
- Kultivační destičky 6-jamkové 9,6 cm²
- Kultivační destičky 12-jamkové 3,85 cm²
- Kultivační destičky 48-jamkové 1 cm²
- Kultivační destičky 96-jamkové 0,33 cm²
- Kultivační misky o průměru 10 cm
- Škrabky

Materiál pocházel od firmy TPP.

3.3 Seznam použitých chemikálií

- Agaróza – Invitrogen
- Akrylamid (AA) – SERVA Electrophoresis
- [γ -³³P]ATP – MP
- Bovinní sérový albumin (BSA) – Sigma Aldrich
- Bromfenolová modř – Sigma Aldrich
- Coomasie Brilliant Blue – SERVA Electrophoresis
- D-(+)-glukóza – Sigma Aldrich
- Destilovaná voda
- Dimethylsulfoxid (DMSO) – Sigma Aldrich
- 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid (MTT) – Sigma Aldrich
- Dodecylsírán sodný (SDS) – Lach Ner s.r.o.
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) – Invitrogen
- Ethanol 70 % - Lach Ner s.r.o.
- Ethanol 96 % - Lach Ner s.r.o.
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) – Sigma Aldrich
- Ethylenglykoltetraoctová kyselina (EGTA) – Sigma Aldrich
- Fetální bovinní sérum – Invitrogen
- Fluorid sodný – Sigma Aldrich
- Glycerol-2-fosfát – Sigma Aldrich
- Hepes – Sigma Aldrich
- Histon III-S – Sigma Aldrich
- Chlorid hořečnatý hexahdrát – Sigma Aldrich
- Kalcein AM (1 mg/ml) - Invitrogen
- Kolagen G (bovinní) – Biochrom AG
- Kolagen R (krysí) – SERVA
- Kyselina chlorovodíková – Sigma Aldrich
- Kyselina orthofosforečná (85%) – Sigma Aldrich
- N,N'-methylenbisakrylamid (BIS) – SERVA Electrophoresis
- N₂ tekutý dusík – Linde
- N-butanol – Sigma Aldrich
- Penicilin-Streptomycin Solution – Sigma Aldrich

- Peptid LRRWSLG (substrát ROCK2) – Clonestar
- Persíran amonný (APS) – SERVA Electrophoresis
- Ponceau S – Sigma Aldrich
- Pyruvát sodný – Sigma Aldrich
- ROCK2, rekombinantní enzym – Proqinase
- RPMI 1640 GlutaMAX – Sigma Aldrich
- Temed – Sigma Aldrich
- TRIS – SERVA Electrophoresis
- TRITON X-100 – Sigma Aldrich
- Trypsin – Sigma Aldrich
- Tween 20 – MP

3.4 Seznam použitých roztoků

- APS 10%: 0,1 g APS + 0,9 ml H₂O; doplnění přesně na objem 1 ml H₂O
- ATP 1 mmol/l (5 ml): 2,76 mg ATP + 4 ml H₂O + 5 μl 2 mmol/l MgCl₂; doplnění přesně na objem 5 ml H₂O
- Blotovací pufr (10x): 30,3 g TRIS + 144 g glycin + 950 ml H₂O; doplnění přesně na objem 1 l H₂O
- D-glukosa 1 mol/l (100 ml): 18,02 g D-glukosy + 90 ml H₂O; doplnění přesně na objem 100 ml H₂O
- EDTA 0,5 mmol/l v PBS (500 ml): 0,073 g EDTA + 450 ml PBS, doplnění přesně na objem 500 ml PBS, sterilně přefiltrovat přes 0,22 μmol/l filtr
- EGTA 0,5%, pH 7,2 (500 ml): 2,5 g EGTA + 450 ml PBS; úprava na pH 7,2; doplnění přesně na objem 500 ml PBS; přefiltrování přes 0,22 μm filtr
- ELFO pufr (10x): 30,24 g TRIS + 144 g glycinu + 10 g SDS + 950 ml H₂O; doplnění přesně na objem 1 l H₂O
- Kinázový pufr (2x) (20 ml): 4 ml 0,5 mol/l Hepes pH 7,4 + 0,2 ml 2 mol/l MgCl₂ + 0,4 ml 0,25 mol/l EGTA + 0,8 ml 0,5 mol/l glycerol 2-fosfát + 0,2 ml 0,2 mol/l NaF; úprava na pH 7,4; doplnění přesně na objem 20 ml H₂O
- Kolagen roztok 2 mg/ml: 266,16 μl 5x DMEM + 60,38 μl NaHCO₃ + 60 μl FBS + 51,36 μl 200 mmol/l NaOH + 463,2 μl vody + 226,83 μl kolagen R + 226,83 μl kolagen G
- Kolagen roztok 1,5 mg/ml: 266,16 μl 5x DMEM + 60,38 μl NaHCO₃ + 60 μl FBS + 51,36 μl 200 mmol/l NaOH + 463,2 μl vody + 453,66 μl kolagen R
- Lyzační pufr: 1 ml RIPA pufru + 1 μl lenpaptin 1000x + 1 μl apapsin 1000x + 10 μl PMSE 100x + 1 μl DDT 1 mol/l
- PBS (1 l): 3,58 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O + 0,2 g KH₂PO₄ + 8 g NaCl + 0,2 g KCl + 950 ml H₂O; úprava pH na hodnotu 7,4; doplnění na objem 1 l H₂O, přefiltrování přes 0,22 μm filtr
- Reakční pufr (2x): 1 ml 2x kinasového pufru + 30 μl 1 mM ATP + 0,5-2 μl [γ-³³P]ATP podle stáří
- Rozmrazovací médium (100 ml): 1 ml penicilin/streptomycin + 99 ml DMEM
- SDS (5x) (10 ml): 3,1 ml 1 mol/l TRIS pH 6,8 + 1 g SDS + 5 ml glycerol + 0,5 ml 1 % BPB + 0,5 ml 2-merkapt ethanol
- SDS 10%: 5 g SDS + 45 ml H₂O; doplnění přesně na objem 50 ml H₂O

- Standardní kultivační médium DMEM 10 % (500 ml): přidat sterilně 50 ml fetálního séra + 5 ml penicilin/streptomycin k 445 ml DMEM média
- TBS: 4,84 g Tris, 58,44 g NaCl + 1 l H₂O; úprava pH a doplnění na 2 l H₂O
- TRIS pH 6,8: 24,23 g 1 mol/l TRIS + 150 ml H₂O; úprava na pH 6,8
- TRIS pH 8,8: 48,46 g 1 mol/l TRIS + 350 ml H₂O; úprava na pH 8,8
- Trypsin/EDTA (50 ml): sterilně smíchat 20 ml zásobního trypsinu (25 g/l) + 230 ml sterilní H₂O; poté přidat 25 ml 0,5 mmol/l EDTA
- Trypsin/EGTA (50 ml): sterilně smíchat 20 ml zásobního trypsinu (25 g/l) + 230 ml sterilní H₂O; poté přidat 25 ml 0,5% EGTA pH = 7,2
- Zamrazovací médium (10 ml): 9 ml fetálního séra + 1 ml DMSO (přidávat po kapkách za stálého míchání)

3.5 Testované látky

N6-substituované puriny (N = 19) navržené jako potenciální inhibitory ROCK byly připraveny Dr. Lenkou Zahájskou (Ústav experimentální botaniky, AV Praha), Dr. Lucií Plíhalovou (Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Univerzita Palackého, Olomouc) a jejich studenty. Jako kontrola sloužil fasudil a v některých testech i Y-27632 od firmy Cayman Chemical.

Testované látky: 1944, 1948, 2859, 3604, 3605, 3606, 3607, 3625, 3626, 3698, 3699, 3958, 3959, 3960, 3961, 4683, 4686.

3.6 Biologický materiál

Použité linie jsou lidské a pocházejí z ATCC („American Type Culture Collection“). Linie HaCaT byla získána z DKFZ („Deutsches Krebsforschungszentrum“). A375m² poskytl prof. R. Hynes.

A2058 – buňky melanomu

A375m² – buňky melanomu

ARPE-19 – buňky epitelu sítnice

BJ – kožní fibroblasty

HaCaT – imortalizované keratinocyty

HT1080 – buňky fibrosarkomu

K562 – buňky chronické myeloidní leukémie

MCF-7 – buňky adenokarcinomu

SH-SY5Y – buňky neuroblastomu

3.6 Metody

Kultivace buněk

Buňky jsem pěstovala v CO₂ inkubátoru (37 °C; 5.5% CO₂) v médiu DMEM, které obsahovalo 10% fetální bovinní sérum a antibiotika penicilin (100 IU/ml) a streptomycin (100 µg/ml). Médium bylo doplněno glutaminem do konečné koncentrace 3,97 mol/l. Buňky byly pasážovány jednou za 2-3 dny.

Pokud není řečeno jinak, bylo v pokusu použito toto standardní kultivační médium.

Vysetí buněk na experimenty

Z kultivačních lahví jsem odsála médium a buňky opláchla PBS temperovaným na 37 °C. Buňky jsem ze dna kultivační láhve uvolnila působením trypsinu. Průběh uvolňování buněk jsem kontrolovala v mikroskopu. K uvolněným buňkám jsem přidala kultivační médium, spočítala počet buněk v 10 µl pomocí Bürkerovy komůrky a buněčnou suspenzi naředila na požadovanou koncentraci a vysela do kultivační nádoby.

Sklízení buněk na izolaci proteinu

Z kultivačních lahví jsem odsála médium a buňky opláchla ledovým PBS. Poté jsem přidala k buňkám lyzační pufr a pomocí škrabky seškrábala ze dna jamky. Veškerý obsah jsem přepipetovala do předem připravených 1,5ml mikrozkušavek a vložila do centrifugy (500 g/10 minut/4 °C). Následně jsem přepipetovala obsah zkumavky do nové zkumavky, obsahující SDS pufr. Lyzi jsem podpořila provzdušněním roztoku buněk pomocí injekční stříkačky. Dále jsem zkumavky vložila do termobloku na 6 minut při 100 °C, opět provzdušnila injekční stříkačkou a uložila do -20 °C.

3.6.1 Hodnocení cytotoxicity

Vysela jsem buňky do 96-jamkových desek (pro linie BJ a HaCaT 5000 buněk/80 μ l; pro linii ARPE-19 7000 buněk/80 μ l; pro linii SH-SY5Y 8000 buněk/80 μ l, pro linie K562 a MCF-7 10000 buněk/80 μ l). Do krajních jamek jsem přidala čisté médium (sloužilo poté jako slepý vzorek, 100 μ l). Po 6 h jsem přidala 5x koncentrované testované látky nebo DMSO vehikulum ve 20 μ l média (maximální koncentrace obvykle 100 μ mol/l, ředící faktor 3, 6 testovaných koncentrací, triplikát).

3.6.1.1 Test založený na redukci resazurinu

Do jamek jsem přidala 20 μ l 6x koncentrovaného roztoku resazurin. Doba inkubace se lišila podle typu buněk – pro linie BJ, HaCaT a SH-SY5Y byla inkubace 3 hodiny a pro linii ARPE-19 byla inkubace 1 hodinu. Změřila jsem fluorescenci při 590 nm. Hodnoty IC₅₀ byly odečteny z dávkových křivek v programu R (knihovna drc).

3.6.1.2 Kalceinový test

Naředila jsem zásobní roztok kalceinu AM (1 mg/ml) 500x do PBS a přidala jsem 100 μ l do hodnocených jamek. Po hodinové inkubaci jsem změřila fluorescenci (excitační/emisní vlnová délka 485/520) na přístroji Fluoroscanner Ascent. Hodnoty IC₅₀ byly odečteny z dávkových křivek v programu R (knihovna drc).

3.6.2 Kinázový test

Přichystala jsem si v ředící desce 5krát koncentrované roztoky látek v DMSO. Na reakční destičku jsem dala 2 μl testované látky, 1 μl roztoku rekombinantního enzymu, 1 μl roztoku substrátu peptidu LRRWSLG a 1 μl vody. Nastartovala jsem reakci přidáním 5 μl reakčního pufru obsahujícího $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ a dala destičku na 50 minut do termobloku nastaveného na 37 °C. Poté jsem reakci zastavila přidáním 5 μl 3% kyseliny orthofosforečné. Na fosfocelulókový papír jsem přenesla 5 μl reakční směsi z každé jamky. Na závěr jsem papír opláchla 96% etanolem. Papír jsem uzavřela do kazety AE-PR-2025 s citlivou deskou a po 16 hodinách skenovala v přístroji Image Reader Bas-1800 softwarem BAS-1800. Intenzitu signálu jsem odečlala programem Aida Image Analyzer a vyhodnotila míru závislosti fosforylace substrátu na koncentraci inhibitoru pomocí programu GraphPad.

3.6.3 Fluorescenční mikroskopie aktinového cytoskeletu

Aktinový cytoskelet jsem vizualizovala pomocí barvení TRITC-faloidinem. Napěstovala jsem buňky fibroblastů BJ v 96-jamkové skleněné destičce, množství 1500, 3000 a 6000 buněk. Po 24 hodinách jsem buňky otráвила potenciálními a komerčními ROCK inhibitory, některé jamky jsem nechala bez inhibitorů (kontrola). Po dalších 24 hodinách jsem buňky vyfotila pomocí mikroskopu (zvětšení 10x). Poté jsem odsála médium, opláchla buňky 1x PBS pufrem a permeabilizovala je pomocí 1% Tritonu 3 minuty. Dále jsem buňky 2krát promyla 1x PBS pufrem a přidala k nim 90 μ l faloidinu/PBS (1:1000). Po hodinovém barvení jsem roztok faloidinu odsála a promyla opět v 1x PBS pufrem. Pořídila jsem fotografie pomocí fluorescenčního mikroskopu s použitím zeleného filtru a kamery DP71 (Olympus) ovládané programem DP Controller (Olympus).

3.6.4 Hodnocení invazivity v 3D kultuře v kultivačních komůrkách

Na ledu jsem si připravila roztoky kolagenu s inhibítozem (1,5 mg/ml – viz materiál a metody, výsledná koncentrace inhibítora 10 $\mu\text{mol/l}$). Do komůrek kultivačního sklíčka firmy Ibidi (Obr. 8) jsem pipetovala 10 μl tohoto roztoku a nechala ztuhnout při 37 °C. Buňky jsem naředila v médiu, tak aby jich v 50 μl bylo 100000. Pipetovala jsem 50 μl buněčné suspenze na ztuhlý kolagen. Sklíčko jsem vložila do krabičky obsahující malé množství vody, která při inkubaci měla zabránit odparu z jamek. Inkubace v CO₂ inkubátoru probíhala 16 hodin. Další den jsem vyměnila médium za bezsérové. Po 72 hodinách jsem pořídila fotografie v centrální oblasti komůrky v různých hloubkách gelu (0, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{mol/l}$ – vrstvy 1 až 6) pomocí mikroskopu TE2000-S (Nikon) vybaveného kamerou. Index invazivity jsem vypočetla podle následujícího vzorce: číslo vrstvy * počet buněk ve vrstvě/ celkový počet buněk.



Obr. 8 – Komůrka pro testování invazivity od firmy Ibidi
(Převzato z <http://ibidi.com>)

3.6.5 Hodnocení vlivu na morfologii v kolagenní matrix

Připravila jsem si roztok kolagenu s inhibítorem (1,5 mg/ml – viz materiál a metody, výsledná koncentrace inhibítoru 10 $\mu\text{mol/l}$). Roztoky musí být po celou dobu na ledu, aby se zabránilo předčasnému ztuhnutí kolagenu v gel. Sklidila jsem a napočítala buňky pomocí Bürkerovy komůrky (linie A375m², A2058 a HT1080; 100000 buněk na jamku). Do 48-jamkové destičky jsem napipetovala na ledu 250 μl roztoku kolagenu, přidala dané množství buněk a promíchala. Destičku jsem vložila do inkubátoru na 30 minut, aby kolagen ztuhl. Mezitím jsem si připravila média s příslušnými inhibitory ve výsledné koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$. Přidala jsem 500 μl média s inhibítorem na ztuhnutý kolagen s buňkami. Inkubace probíhala přes noc v CO₂ inkubátoru za standardních kultivačních podmínek. Druhý den jsem pořídila fotografie migrujících buněk pomocí mikroskopu TE2000-S (Nikon). Vyhodnotila jsem jejich počet a morfologii (protáhlé mezenchymální, kulaté améboidní a přechodný typ) v programu pro analýzu obrazu ImageJ. Efekt inhibitorů na počty buněk v jednotlivých kategoriích jsem vyhodnotila pomocí t-testu.

3.6.6 Vliv látek na morfologii buněk migrujících ze sféroidů

Příprava sféroidů

Sféroidy jsem připravila následujícím způsobem. Smíchala jsem 0,4 g agarózy a 20 ml PBS a vařila v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění agarózy. 500 μ l 60-70 °C agarózy jsem pak napipetovala do mikro-formy od firmy Microtissues (Obr.9) a nechala ztuhnout při 37 °C. Poté jsem opatrně vyjmula odlitky z formy a ty vložila do jamek 6-jamkové destičky. Tyto odlitky jsou někdy označovány jako 3D Petriho misky, já dále používám dle mého názoru smysluplnější termín agarózové misky, sloužící jako prostředí pro tvorbu sféroidů. K agarózovým miskám jsem přidala kultivační médium (2,5 ml na jamku) a inkubovala 15 minut. Odsála jsem médium a přidala nové. Opět inkubovala 15 minut. Postup přípravy agarózové misky je zobrazen na Obr. 10.

Mezitím jsem si připravila suspenzi buněk (500000 buněk/200 μ l). Z agarózové misky jsem odsála médium a přidala 200 μ l buněčné suspenze. Kolem agarózové misky jsem dala čisté médium a 6-jamkovou destičku vložila do inkubátoru.

Po 24 hodinách jsem odsála médium z agarózové misky. Do nové 6-jamkové destičky jsem dala 1 ml čistého média, opatrně vytáhla agarózovou misku, překlopila ji do jamky s médiem a promyla. Tím se z agarózové misky do média uvolnily sféroidy.

Vlastní test invazivity se sféroidy

Připravila jsem si roztok kolagenu s inhibitorem (2 mg/ml – viz materiál a metody, výsledná koncentrace inhibitoru 10 μ mol/l). Pipetovala jsem 60 μ l roztoku kolagenu do 96-jamkové destičky. Po jeho ztuhnutí jsem do každé jamky pipetovala 1 sféroid v 10 μ l média. Nakonec jsem na sféroid pipetovala 40 μ l roztoku kolagenu s inhibitorem. Po jeho ztuhnutí jsem tento „kolagenový sendvič“ převrstvila 80 μ l média s inhibitorem a vložila do inkubátoru. Následující den jsem pořídila fotografie pomocí mikroskopu TE2000-S (Nikon) a sledoval morfologii buněk migrujících ze sféroidu do okolí.



Obr. 9 – Mikro-forma firmy Microtissues pro přípravu 3D Petriho misky z agarózy
(Převzato z <http://www.microtissues.com>)



Obr. 10 – Postup přípravy agarózové 3D Petriho misky
(Převzato a překresleno z <http://www.microtissues.com>)

3.6.7 Efekt na fosforylaci vybraných substrátů ROCK (MLC a kofilin)

K testování ROCK inhibice v buňkách (linie A375m², A2058, HT1080) jsem použila 3 potenciální (1944, 3625, 4686) a dva standardní ROCK inhibitory (fasudil a Y-27632). Jako kontrola sloužilo DMSO vehikulum. Experiment zahrnoval napěstování, otravu a sklízení buněk, izolaci proteinu, denaturační elektroforézu v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE), westernový přenos a imunodetekci cílového proteinu pomocí primární a sekundární protilátky s navázanou křenovou peroxidázou umožňující následnou chemiluminiscenční detekci.

Den předem před přidáním látek jsem vysela buňky do 6-jamkových destiček. Následující den jsem je otrávila inhibitory v koncentraci 10 a 50 μmol/l. Jako kontrola sloužily neotrávené buňky. Buňky jsem sklídila po 6, případně po 24 hodinách. Pro dělení proteinů jsem použila 10% polyakrylamidový gel. Gel jsem použila pro western blot. Po blotování následovalo promývání membrán v TBS/T. Po promytí jsem membrány blokovala v BSA/TBS, opláchla v TBS/T a vložila do vaničky s příslušnou primární protilátkou v BSA. Ve vaničce jsem nechala membrány plavat přes noc při 4 °C na kývačce.

Druhý den jsem membrány opláchla v TBS/T. Následovala inkubace v sekundární protilátce. Poté jsem membrány opět opláchla a položila na plastovou fólii. K chemiluminiscenční detekci jsem použila komerční roztok ECL, kterým jsem převrstvila osušené membrány. Po minutě jsem membrány osušila, přiklopila a vložila do přístroje LAS-4000 (FUJIFILM).

Použité protilátky a jejich ředění:

- primární protilátky:

králičí protilátka proti kofilinu (Cell Signalling, #3318), ředění 1:1000 v 5% BSA

králičí protilátka proti fosforylovanému kofilinu (Ser3) (Cell Signalling, #3313), ředění 1:1000 v 5% BSA

králičí protilátka proti MLC2 (Cell Signalling, #3672), ředění 1:1000 v 5% BSA

myší protilátka proti fosforylovanému MLC2 (Cell Signalling, #3675), ředění 1:1000 v 1x TBS

- sekundární protilátky s navázanou křenovou peroxidázou:

králičí protilátka proti myšimu IgG (Abcam, ab97046), ředění 1:20000 v 1x TBS

kozí protilátka proti králičimu IgG (Santa Cruz, sc-2030), ředění 1:5000 v 5% BSA

4. VÝSLEDKY

Kinázový test

Schopnost látek inhibovat rekombinantní ROCK2 byla hodnocena v testu založeném na sledování inhibice inkorporace ^{33}P pocházejícího z ATP do oligopeptidu LRRWSLG odpovídajícímu části rozpoznávané sekvence. Hodnoty IC₅₀ byly vypočteny z dávkových křivek pro 10 koncentrací inhibitoru. Jako pozitivní kontroly sloužily fasudil a Y-27632. Výsledky jsou shrnuty v tabulce. Většina látek byla otestována v letech 2013 a 2014. Novější deriváty spolu s některými vybranými staršími deriváty byly testovány v roce 2015. V této době z ne zcela jasných důvodů test začal poskytovat daleko vyšší hodnoty IC₅₀. Rozdíly v chování testu v čase omezují možnost srovnat absolutní hodnoty IC₅₀. Jedním z důvodů nečekaného chování může být stárnutí rekombinantního enzymu. Nejde ale o vliv opakovaného rozmrazování a zamrazování, neboť enzym byl před zmražením rozaliquotován.

V souboru testovaných látek byla identifikována látka s aktivitou srovnatelnou s pozitivní kontrolou (3607) a několik látek s aktivitou řádově nižší – viz Tab. 2.

| Látka | 2013-2014 | | 2015 | |
|---------|-------------------------|------------------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| | medián IC ₅₀ | jednotlivá měření IC ₅₀ | medián IC ₅₀ | jednotlivá měření IC ₅₀ |
| 1944 | 8,02 | 7,14; 9,16; 8,02 | 22,83 | >50; 22,83; 17,26 |
| 1948 | 6,28 | 5,88; 6,28; 23,14 | | |
| 2859 | 5,41 | 5,12; 8,64; 5,41 | | |
| 3604 | 8,03 | 6,39; 9,67 | | |
| 3605 | 11,60 | 15,19; 8,01 | | |
| 3606 | 4,02 | 4,02 | | |
| 3607 | 0,80 | 0,61; 0,99 | 6,02 | 6,02 |
| 3625 | 3,00 | 4,25; 1,74 | 14,27 | 19,29; 14,27; 8,99 |
| 3626 | 30,92 | 21,66; 40,17 | | |
| 3698 | 23,08 | 22,13; 24,02 | | |
| 3699 | 11,88 | 10,10; 13,66 | 24,53 | 24,53 |
| 3958 | | | 79,13 | 79,13; 60,39; >100 |
| 3959 | | | 16,29 | 13,66; 18,92 |
| 3960 | | | >50 | >50; >50 |
| 3961 | | | 43,58 | 49,43; 37,72 |
| 4683 | | | 63,65 | 63,65 |
| 4686 | | | 4,92 | 4,92 |
| Fasudil | 0,938 | 0,702; 0,79; 1,08; 1,18 | 6,31 | 7,52; 6,31; 3,64 |
| Y-27632 | 0,75 | 0,43; 0,66; 0,84; 1,10 | | |

Tab. 2 - Hodnoty IC₅₀ testovaných látek pro ROCK2. Hodnoty jsou uvedeny v $\mu\text{mol/l}$.

Testování toxicity

Toxicita 72-hodinového působení látek byla hodnocena na primární linii ARPE-19, immortalizovaných fibroblastech HaCaT a na nádorových liniích SH-SY5Y, K562 a MCF-7. Zatímco v případě K562 a MCF-7 jsem použila kalceinový test, pro linie testované později jsem použila nově zavedený levnější test založený na redukci resazurinu. Ten je možné díky mechanismu do značné míry považovat za ekvivalent MTT, oproti kterému je méně pracný. Výsledky ukazuje tabulka 3.

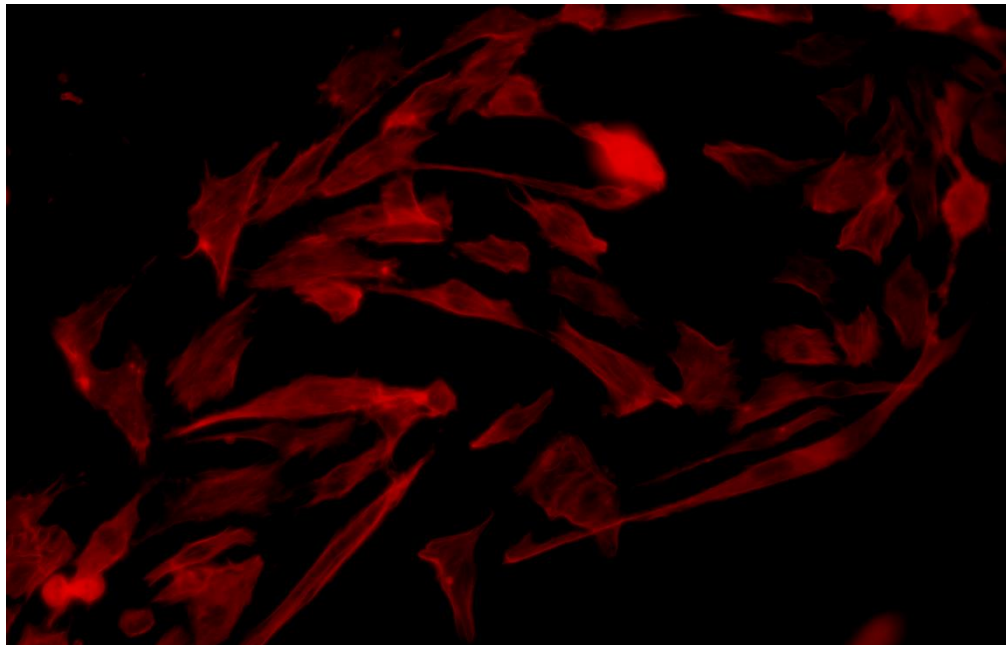
| látka | Linie | | | | |
|---------|------------|------------|------------|------|------|
| | SH-SY5Y | HaCaT | ARPE-19 | K562 | MCF7 |
| 1944 | >100; >100 | >100; >100 | >100; >100 | >100 | >100 |
| 1948 | >100; >100 | >100; >100 | >100; >100 | >100 | >100 |
| 2859 | >100; >100 | >100; >100 | >100; >100 | >100 | >100 |
| 3604 | >100; >100 | >100; >100 | >100; >100 | >100 | >100 |
| 3605 | >100; >100 | >100; >100 | >100; >100 | >100 | >100 |
| 3606 | >100; >100 | >100; >100 | >100; >100 | >100 | >100 |
| 3607 | >100; >100 | >100; >100 | >100; >100 | >100 | >100 |
| 3625 | >100; >100 | >100; >100 | >100; >100 | >100 | >100 |
| 3626 | >100; >100 | >100; >100 | >100; >100 | >100 | >100 |
| 3698 | >100; >100 | >100; >100 | >100; >100 | >100 | >100 |
| 3699 | >100; >100 | >100; >100 | >100; >100 | >100 | >100 |
| 3958 | >100; >100 | >100; >100 | >100; >100 | >100 | >100 |
| 3959 | >100; >100 | >100; >100 | >100; >100 | >100 | >100 |
| 3960 | >100; >100 | >100; >100 | >100; >100 | >100 | >100 |
| 3961 | >100; >100 | >100; >100 | >100; >100 | >100 | >100 |
| 4683 | >100; >100 | >100; >100 | >100; >100 | >100 | >100 |
| 4686 | 67,1; 62,0 | >100; >100 | >100; >100 | >100 | >100 |
| Fasudil | 98,3; >100 | >100; >100 | >100; >100 | >100 | >100 |
| Y-27632 | 93,8; 81,5 | >100; >100 | >100; >100 | >100 | >100 |

Tab. 3 – Hodnocení toxicity na buněčných liniích. Hodnoty IC50 jsou uvedeny v $\mu\text{mol/l}$.

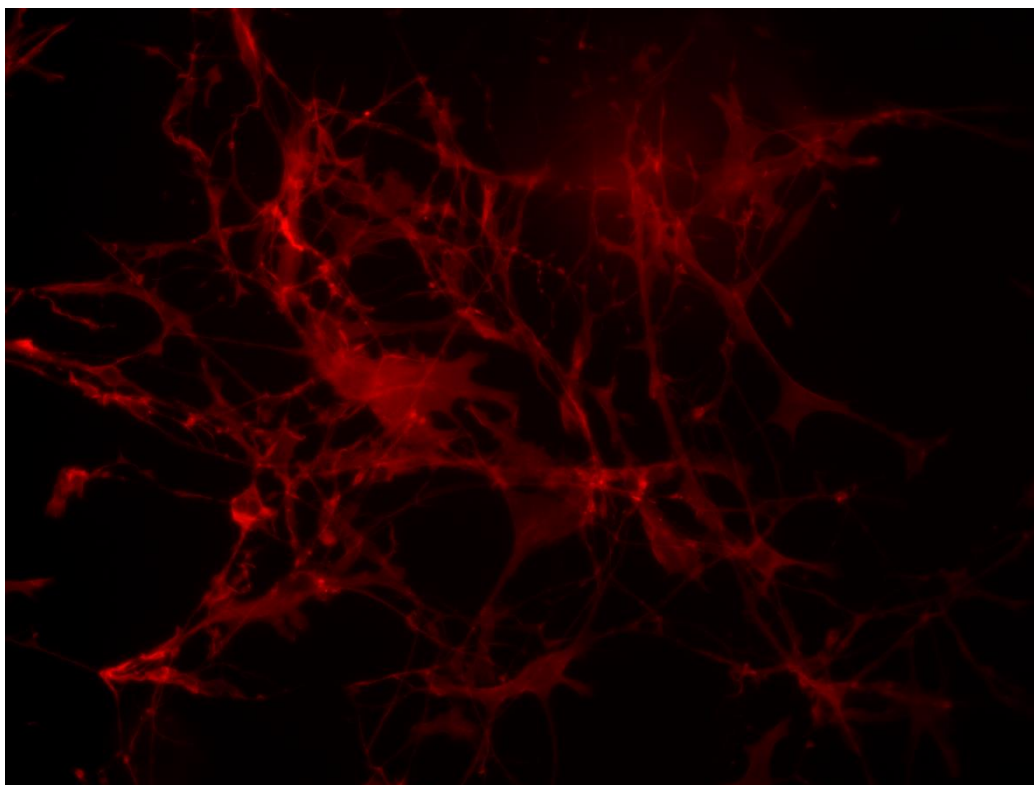
Fluorescenční mikroskopie aktinového cytoskeletu

Efekt látek (20 + 2 $\mu\text{mol/l}$; 100 + 10 $\mu\text{mol/l}$ a 100 $\mu\text{mol/l}$) na aktinový cytoskelet fibroblastů BJ, které byly vysety v nízké koncentraci (3000 buněk na jamku 96-jamkové destičky, otrava 24 hodin po nasazení), jsem hodnotila po 24 hodinách ve fluorescenčním mikroskopu po obarvení aktinu TRITC-faloidninem. Jako kontrolu jsem použila fasudil a Y-27632 (20 a 2 $\mu\text{mol/l}$). Tento test, který jsem zavedla v rámci bakalářské práce (Komárková, 2013), slouží jako hrubý fenotypový screening. Viditelnost efektu totiž závisí silně na hustotě buněk a vyhodnocení je do značné míry subjektivní.

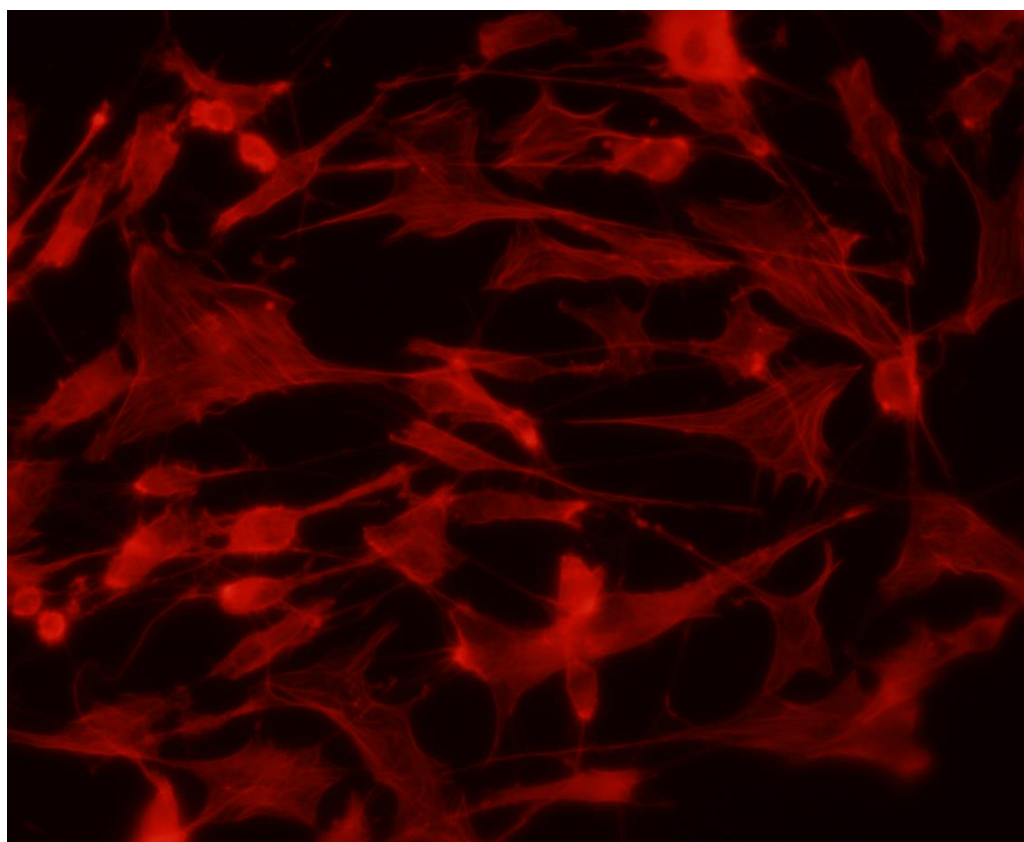
Jednoznačný efekt typický pro ROCK inhibitory jsem pozorovala pro látku 3625 a 4686 (Obr. 11, 12, 13, 14, 15).



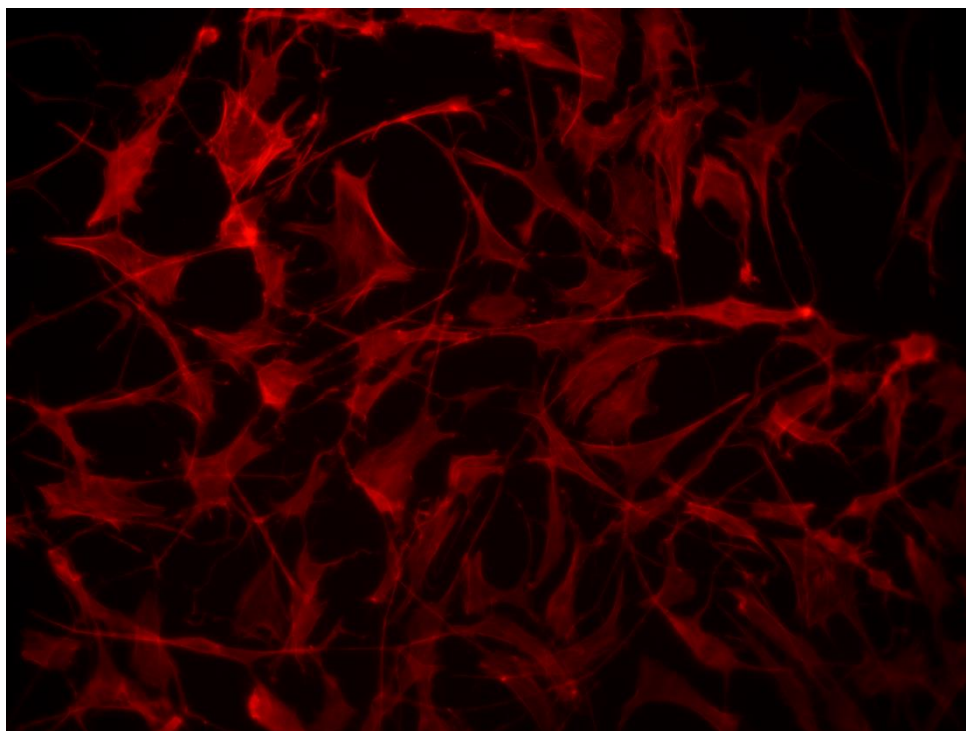
Obr. 11 – Kontrolní buňky, zvětšení 10x



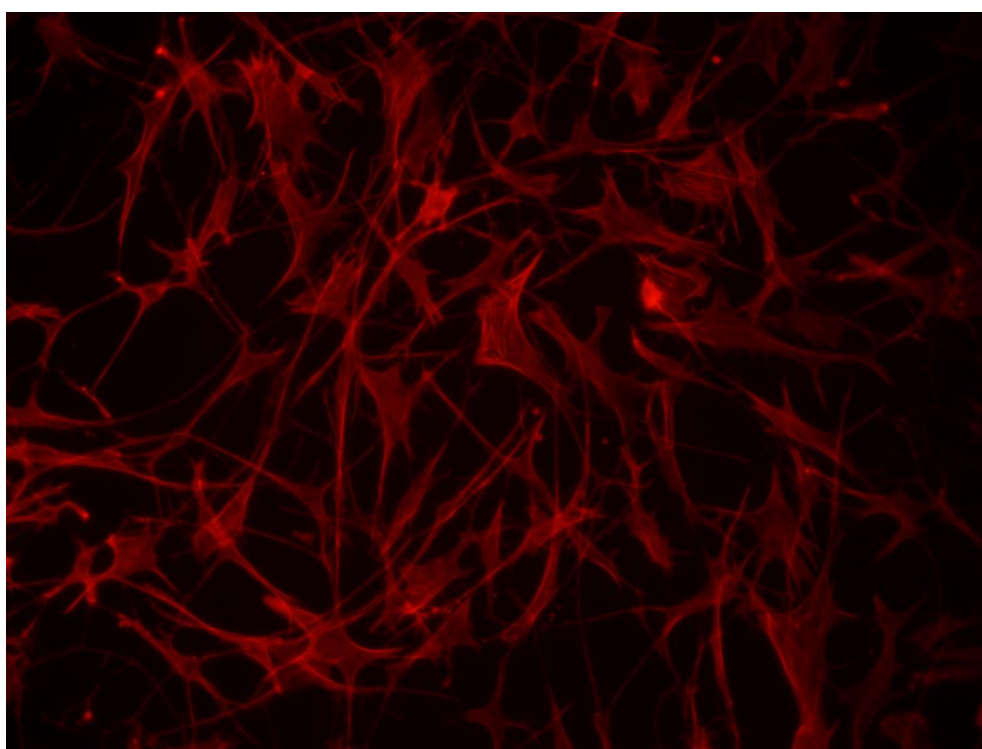
Obr. 12 – Y-27632, koncentrace 20 $\mu\text{mol/l}$, zvětšení 10x



Obr. 13 – Fasudil, koncentrace 20 $\mu\text{mol/l}$, zvětšení 10x



Obr. 14 – Látka 3625, 100 $\mu\text{mol/l}$, zvětšení 10x



Obr. 15 – Látka 4686, 100 $\mu\text{mol/l}$, zvětšení 10x

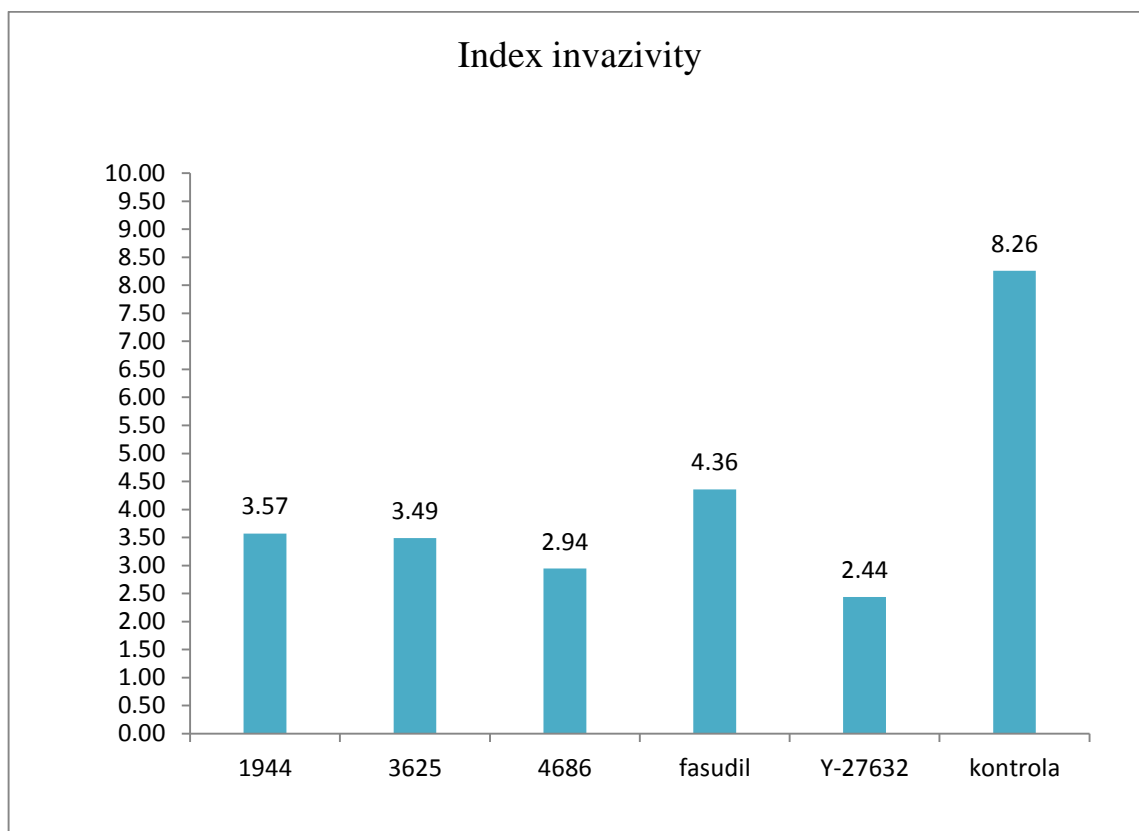
Hodnocení invazivity v kolagenní matrix v kultivačních komůrkách

Schopnost vybraných inhibitorů (1944, 3625, 4686) ovlivňovat invazivitu buněk byla hodnocena v testu založeném na sledování schopnosti buněk pronikat do kolagenní matrix (kryší kolagen 1,5 mg/ml). Z počtu buněk v jednotlivých vrstvách (hloubkách ostroži) byl po 72 hodinách vypočten index invazivity. Nové inhibitory a kontrolní látky fasudil a Y-27632 v koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ ho výrazně snižovaly oproti kontrole v případě améboidních linií A375m² a A2058. Aktivita nových látek a komerčních inhibitorů byla srovnatelná. Efekt na migraci nebyl pozorován v případě mezenchymální linie HT1080. Zde k poklesu indexu invazivity (o asi 20 %) vedlo pouze působení Y-27632. Inhibitor 1944 invazivitu výrazně zvyšoval. Pozorovaný efekt na linie améboidní ale ne na mezenchymální linii je v souladu s předpokládanou inhibicí ROCK v buňkách (Tab. 4, 5, 6) (Graf 1, 2, 3).

Zjištěné hodnoty indexu invazivity také potvrzují to, že A2058 je agresivnější než A375m².

| | index invazivity | poměr ke kontrole | s.d. | koncentrace inhibitoru |
|----------|------------------|-------------------|------|------------------------|
| 1944 | 3,57 | 0,43 | 0,50 | 10 $\mu\text{mol/l}$ |
| 3625 | 3,49 | 0,42 | 0,73 | 10 $\mu\text{mol/l}$ |
| 4686 | 2,94 | 0,36 | 0,14 | 10 $\mu\text{mol/l}$ |
| Fasudil | 4,36 | 0,53 | 1,16 | 10 $\mu\text{mol/l}$ |
| Y-27632 | 2,44 | 0,30 | 0,06 | 10 $\mu\text{mol/l}$ |
| kontrola | 8,26 | 1 | 0,72 | 0 $\mu\text{mol/l}$ |

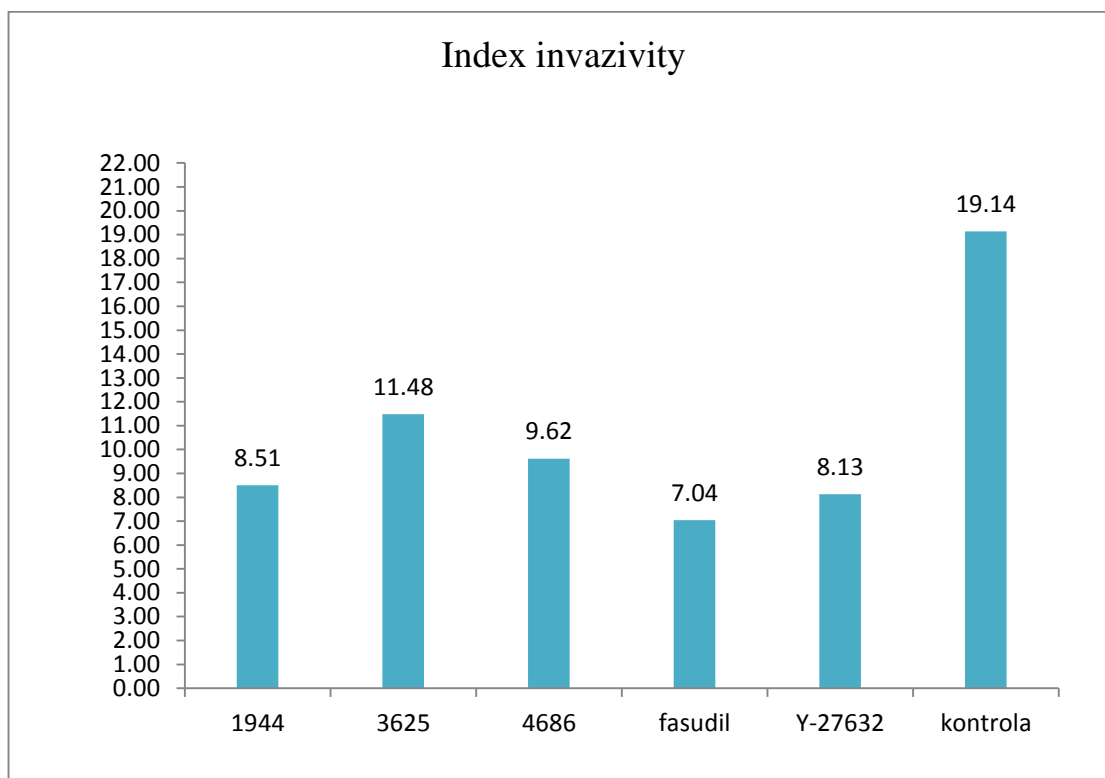
Tab. 4 – Získané hodnoty při hodnocení invazivity pro linii A375m²



Graf č. 1 – Index invazivity buněk linie A375m² po aplikaci inhibitoru

| | index invazivity | poměr ke kontrole | s.d. | koncentrace inhibitoru |
|----------|------------------|-------------------|------|------------------------|
| 1944 | 8,51 | 0,44 | 1,00 | 10 $\mu\text{mol/l}$ |
| 3625 | 11,48 | 0,60 | 0,62 | 10 $\mu\text{mol/l}$ |
| 4686 | 9,62 | 0,50 | 1,35 | 10 $\mu\text{mol/l}$ |
| Fasudil | 7,04 | 0,37 | 0,63 | 10 $\mu\text{mol/l}$ |
| Y-27632 | 8,13 | 0,43 | 1,01 | 10 $\mu\text{mol/l}$ |
| kontrola | 19,14 | 1 | 7,57 | 0 $\mu\text{mol/l}$ |

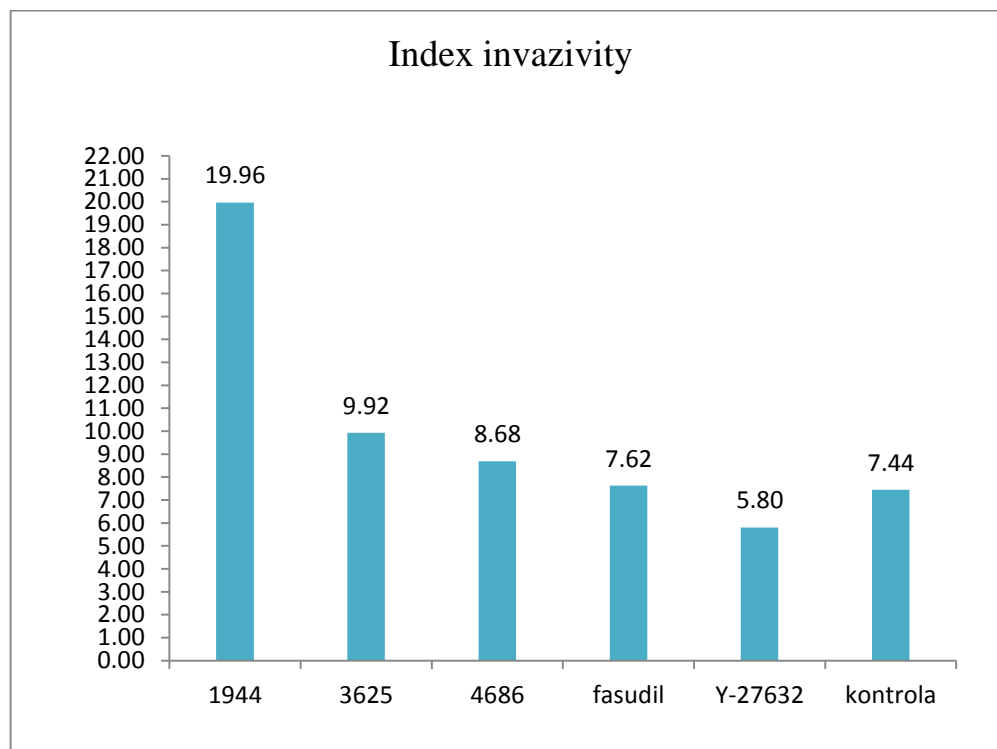
Tab. 5 – Získané hodnoty při hodnocení invazivity pro linii A2058



Graf č. 2 – Index invazivity buněk linie A2058 po aplikaci inhibitoru

| | index invazivity | poměr ke kontrole | s.d. | koncentrace inhibitoru |
|----------|------------------|-------------------|------|------------------------|
| 1944 | 19,96 | 2,68 | 1,72 | 10 $\mu\text{mol/l}$ |
| 3625 | 9,92 | 1,33 | 1,69 | 10 $\mu\text{mol/l}$ |
| 4686 | 8,68 | 1,17 | 0,61 | 10 $\mu\text{mol/l}$ |
| Fasudil | 7,62 | 1,02 | 0,67 | 10 $\mu\text{mol/l}$ |
| Y-27632 | 5,80 | 0,78 | 0,28 | 10 $\mu\text{mol/l}$ |
| kontrola | 7,44 | 1 | 1,08 | 0 $\mu\text{mol/l}$ |

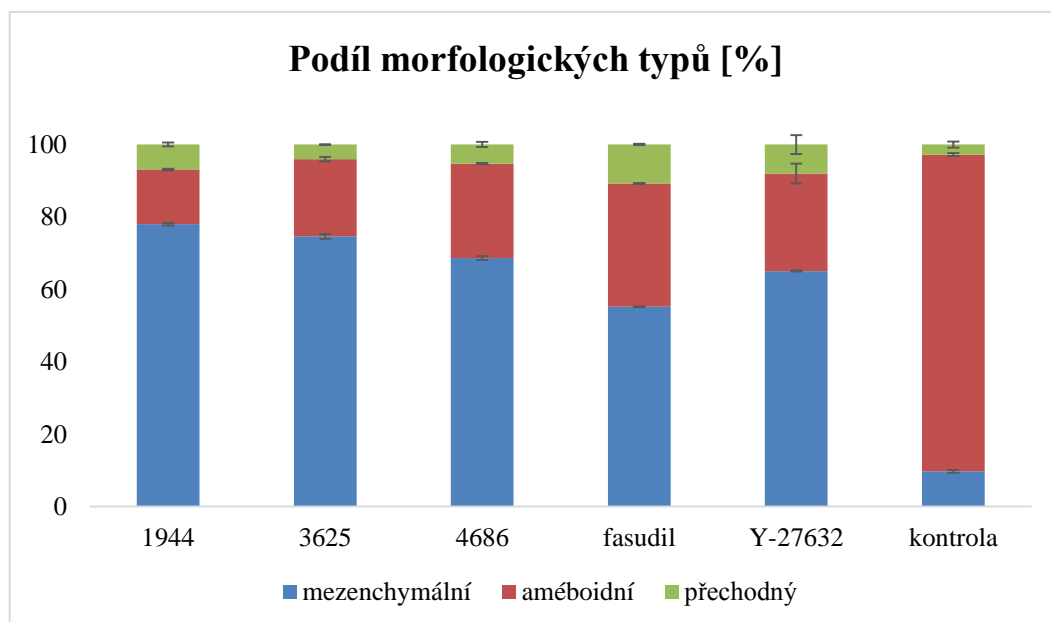
Tab. 6 – Získané hodnoty při hodnocení invazivity pro linii HT1080



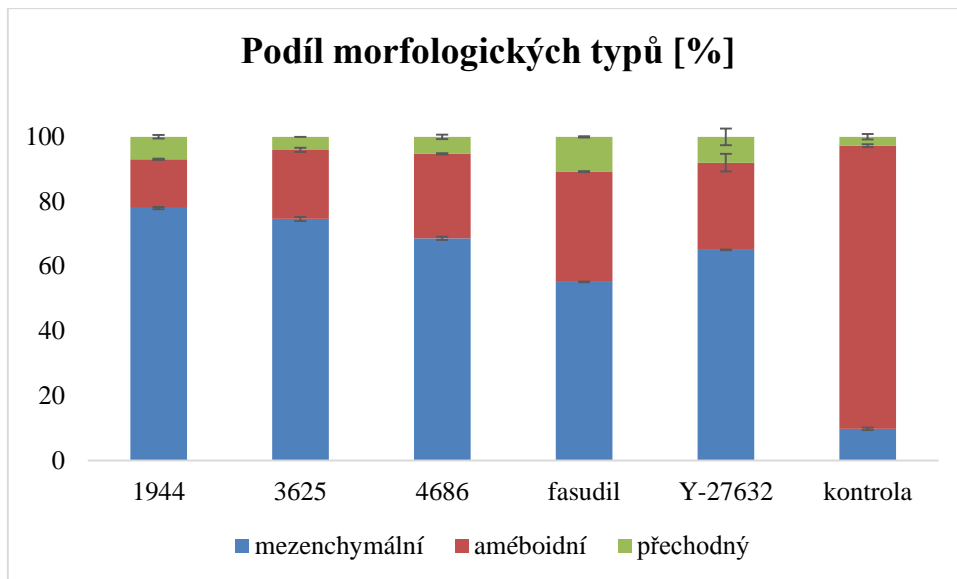
Graf č. 3 – Index invazivity buněk linie HT1080 po aplikaci inhibitoru

Hodnocení vlivu na morfologii buněk v kolagenní matrix

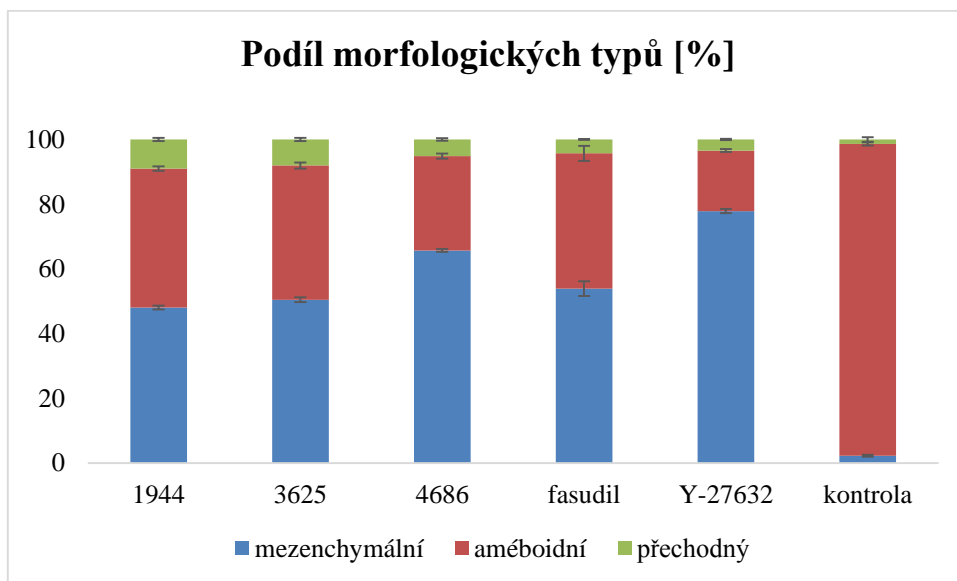
Schopnost vybraných inhibitorů (1944, 3625, 4686) ovlivňovat morfologii buněk v kolagenní matrix (kryší kolagen, 1,5 mg/ml) byla hodnocena po 24 hodinách. Buňky byly vyfotografovány a přiřazeny do jedné z kategorií (protáhlé mezenchymální, kulaté améboidní a přechodný typ) (Obr. 16 – 33) v programu pro analýzu obrazu ImageJ. Nové inhibitory a kontrolní látky fasudil a Y-27632 (10 $\mu\text{mol/l}$) indukovaly výraznou změnu morfologie améboidních linií A375m² a A2058. V buňkách neovlivněných inhibitory dominují améboidní buňky (> 85 %) (Graf č. 4, 5, 6, 7, 8, 9). Působením inhibitorů převládnu buňky mezenchymální. Efekt byl pozorován i v opakovaném experimentu. Ve všech případech byl efekt statisticky významný ($p < 0,01$). Látky neměly vliv na morfologii mezenchymální linie H1080. Pozorovaný efekt na migraci améboidních linií a absence efektu na mezenchymální linii je v souladu s předpokládanou inhibicí ROCK v buňkách.



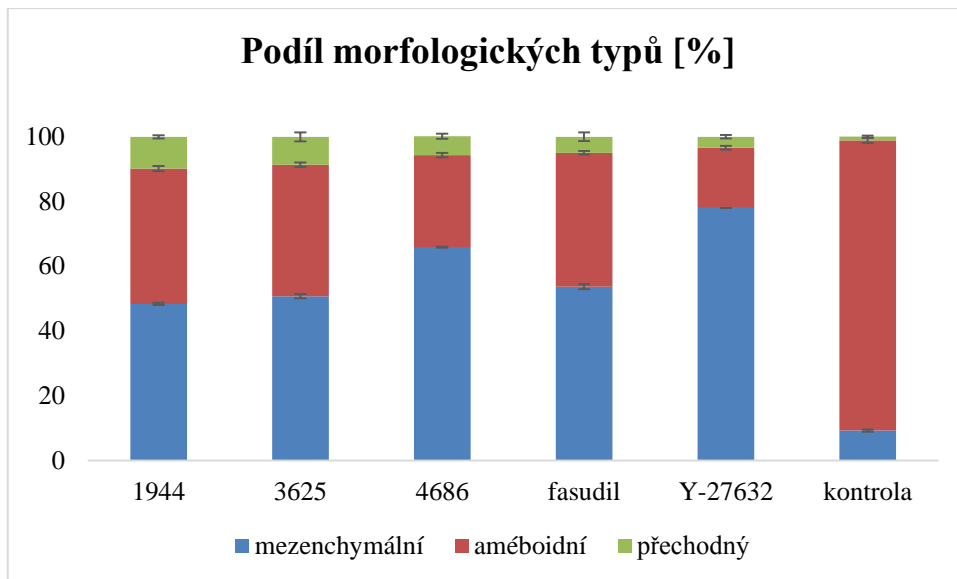
Graf č. 4 – Linie A375m², experiment 1, podíl morfologických typů [%]



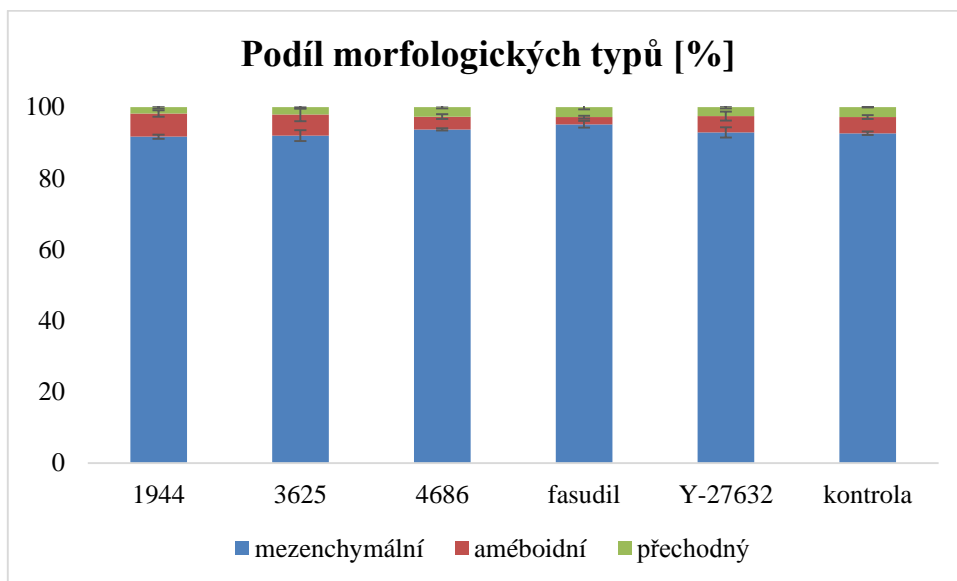
Graf č. 5 – Linie A375m², experiment 2, podíl morfologických typů [%]



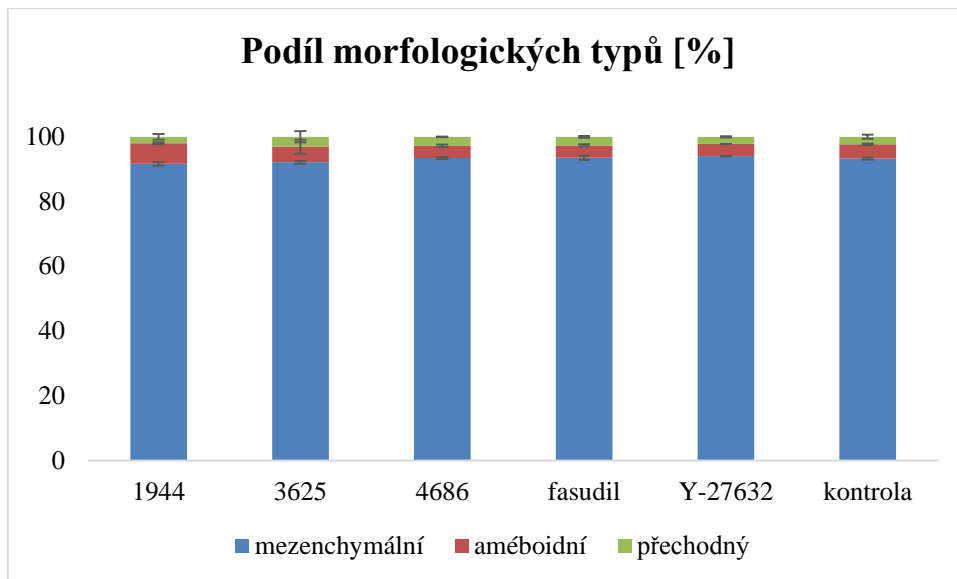
Graf č. 6 – Linie A2058, experiment 1, podíl morfologických typů [%]



Graf č. 7 – Linie A2058, experiment 2, podíl morfologických typů [%]

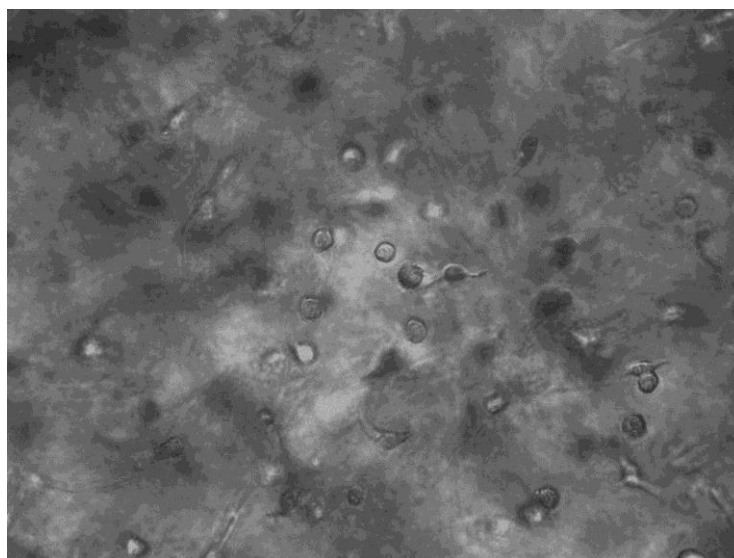


Graf č. 8 – Linie HT1080, experiment 1, podíl morfologických typů [%]

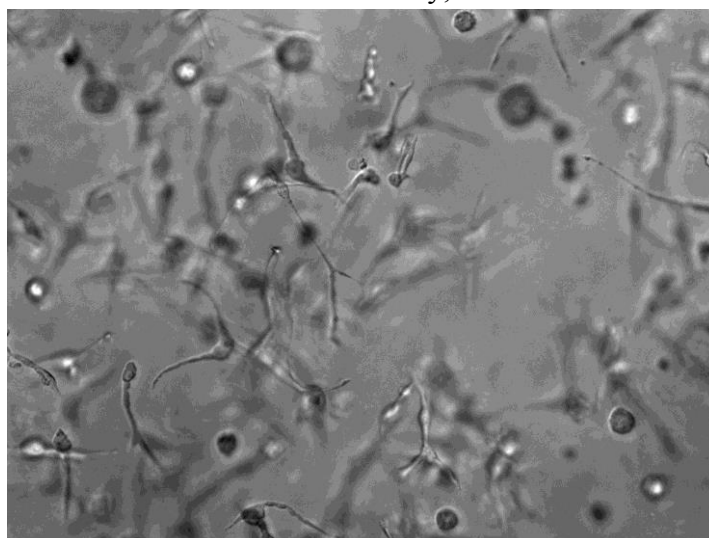


Graf č. 9 – Linie HT1080, experiment 2, podíl morfologických typů [%]

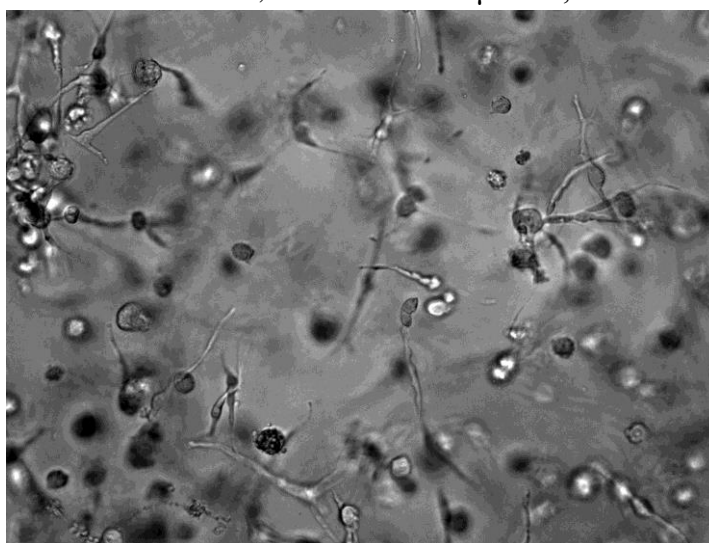
Reprezentativní fotografie zobrazující vliv látek na morfologii:
linie A375m²



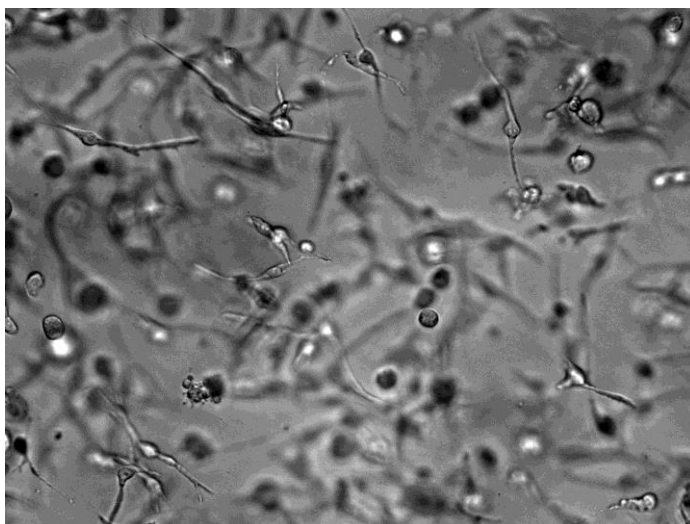
Obr. 16 – Kontrolní buňky, zvětšení 10x



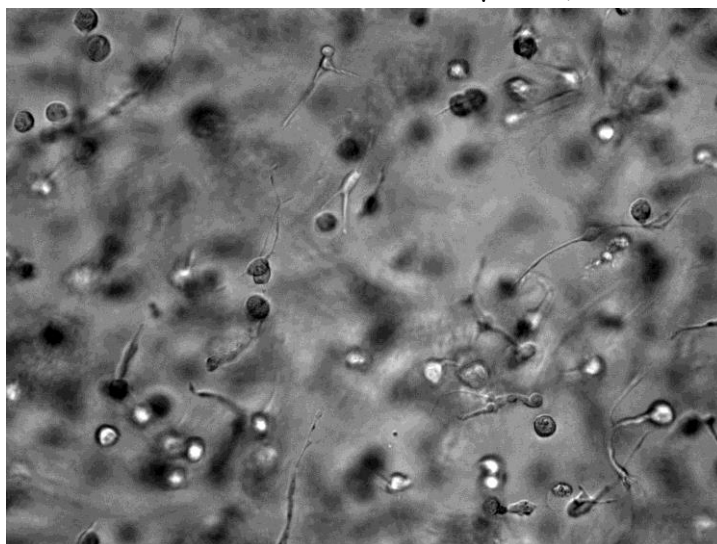
Obr. 17 – Látka 1944, koncentrace 10 μmol/l, zvětšení 10x



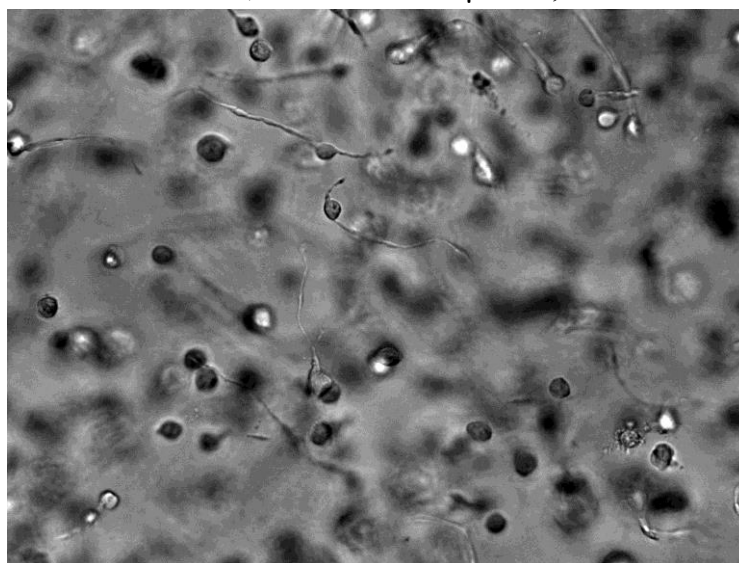
Obr. 18 – Látka 3625, koncentrace 10 μmol/l, zvětšení 10x



Obr. 19 – Látka 4686, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, zvětšení 10x

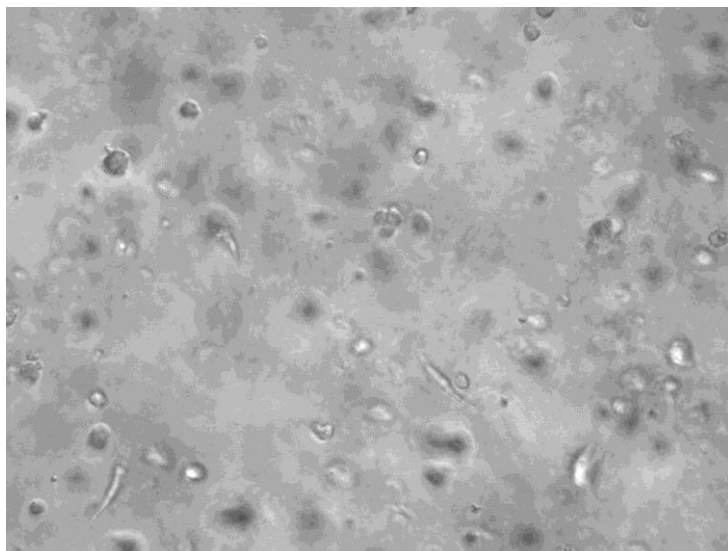


Obr. 20 – Fasudil, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, zvětšení 10x

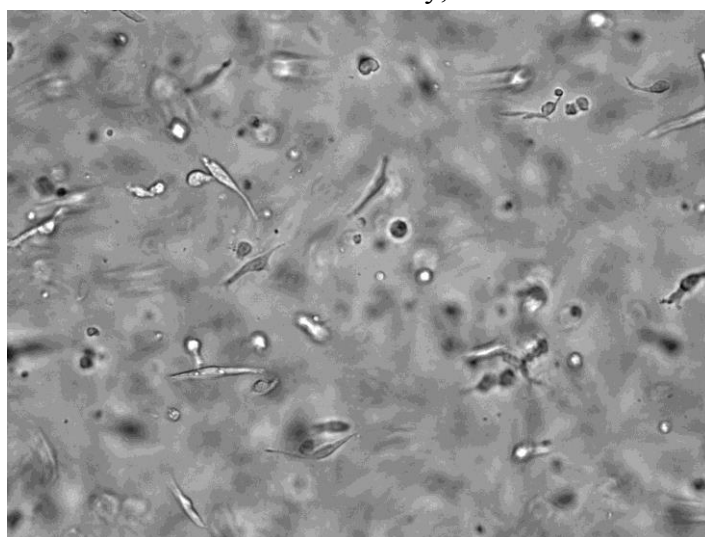


Obr. 21 – Y-27632, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, zvětšení 10x

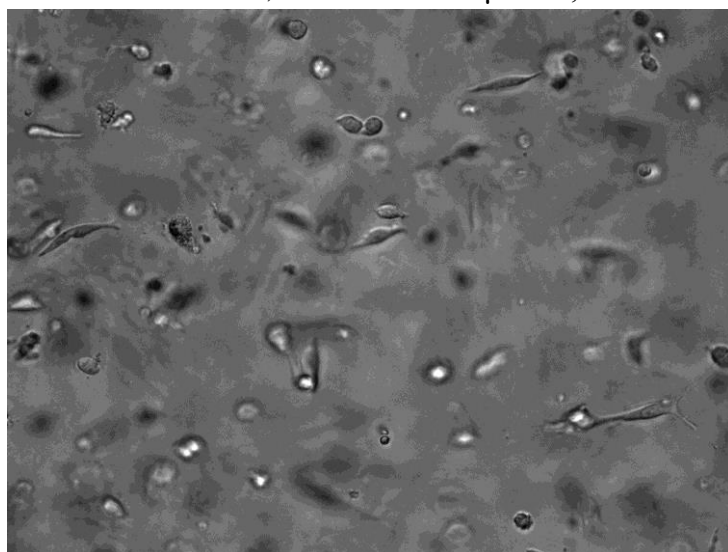
linie A2058



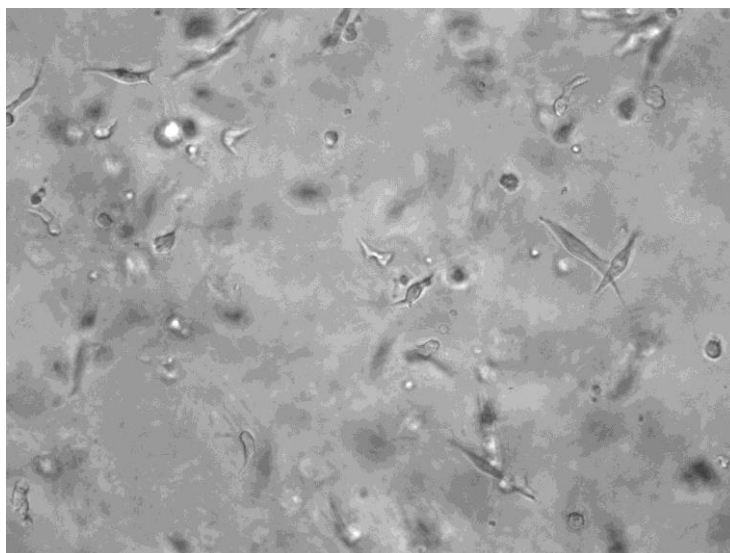
Obr. 22 – Kontrolní buňky, zvětšení 10x



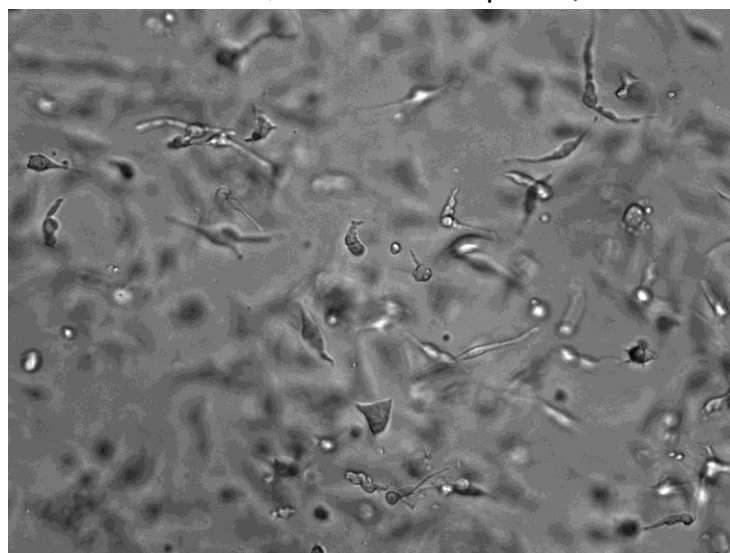
Obr. 23 – Látka 1944, koncentrace 10 μmol/l, zvětšení 10x



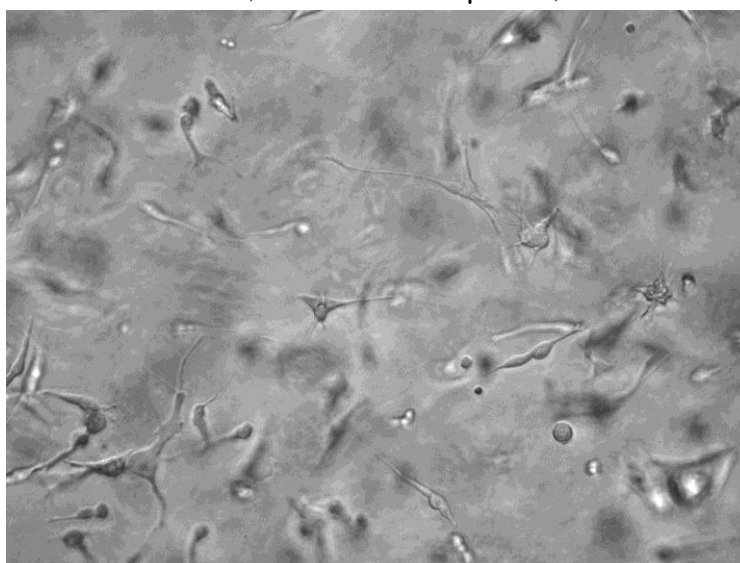
Obr. 24 – Látka 3625, koncentrace 10 μmol/l, zvětšení 10x



Obr. 25 – Látka 4686, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, zvětšení 10x

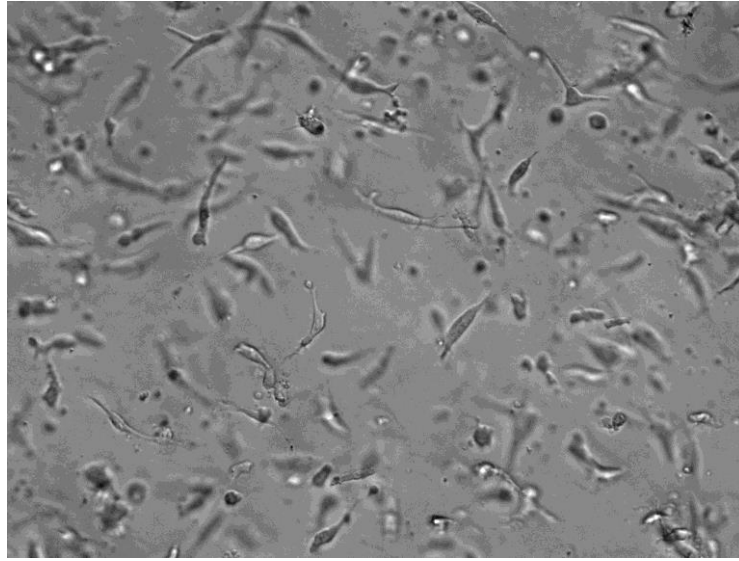


Obr. 26 – Fasudil, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, zvětšení 10x

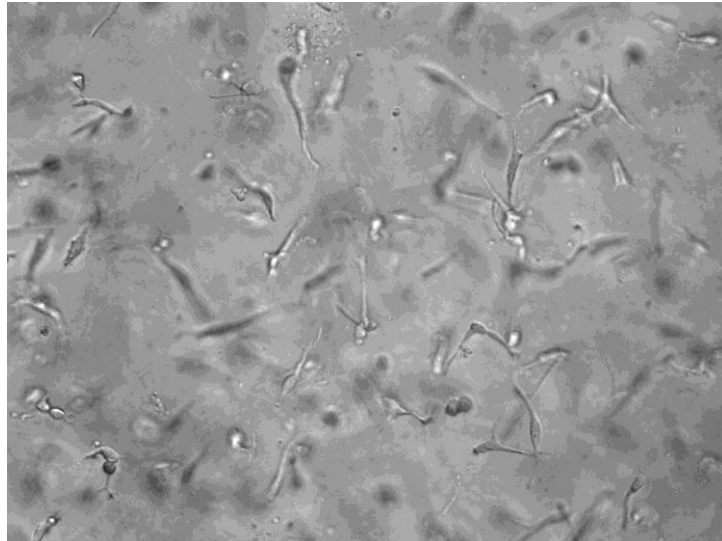


Obr. 27 – Y-27632, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, zvětšení 10x

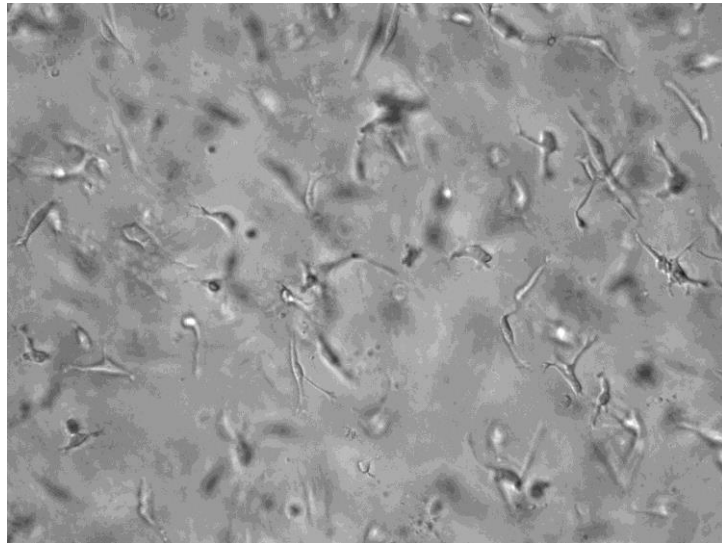
linie HT1080



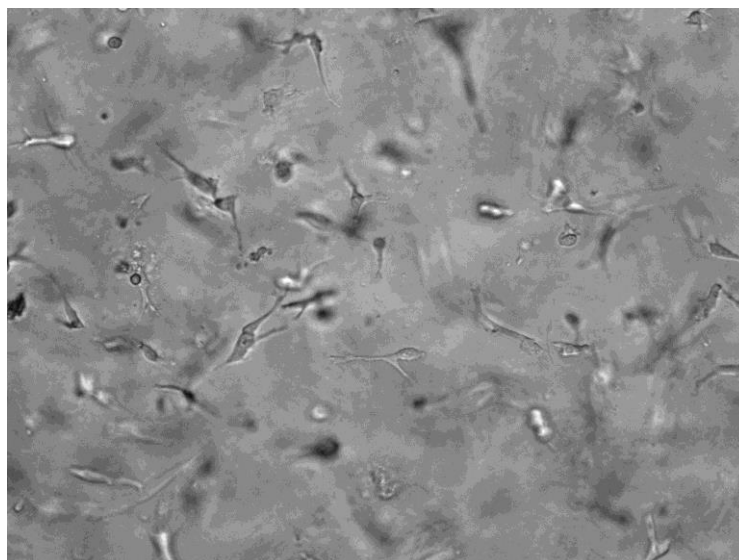
Obr. 28 – Kontrolní buňky, zvětšení 10x



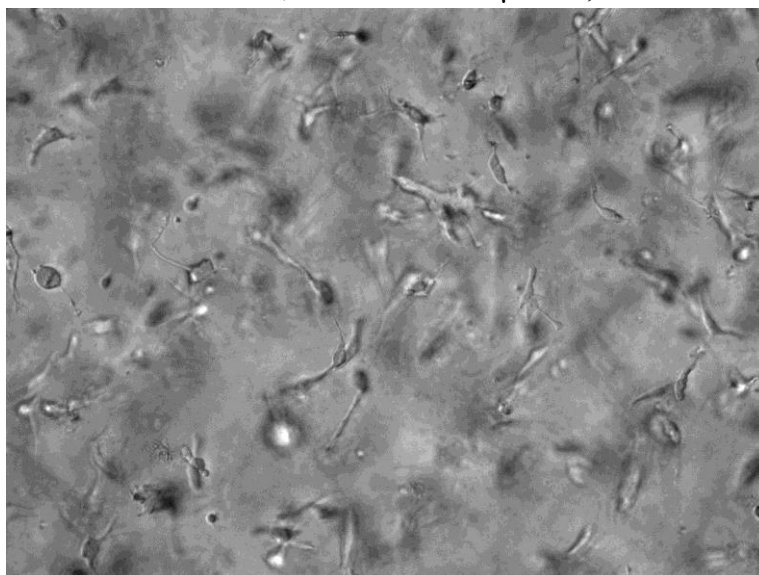
Obr. 29 – Látka 1944, koncentrace 10 µmol/l, zvětšení 10x



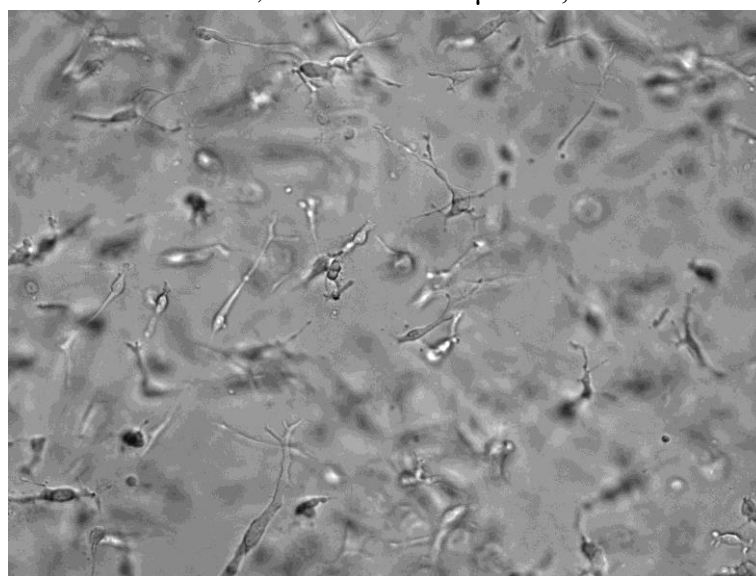
Obr. 30 – Látka 3625, koncentrace 10 µmol/l, zvětšení 10x



Obr. 31 – Látka 4686, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, zvětšení 10x



Obr. 32 – Fasudil, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, zvětšení 10x



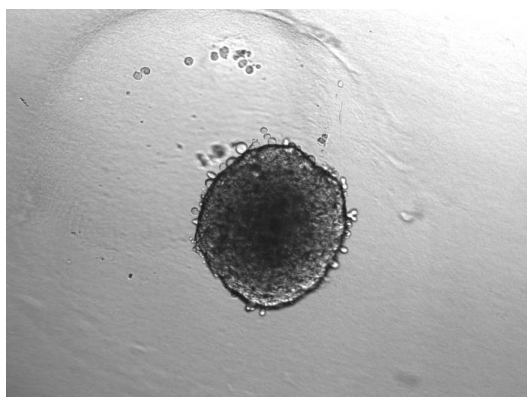
Obr. 33 – Y-27632, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, zvětšení 10x

Vliv látek na morfologii buněk migrujících ze sféroidů

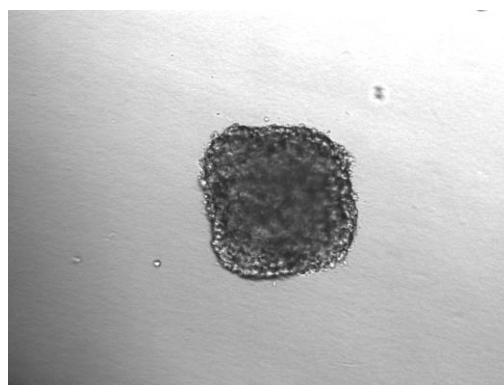
Testovala jsem také efekt látek (1944, 3625, 4686, koncentrace 10 a 50 $\mu\text{mol/l}$) na morfologii buněk migrujících ze sféroidů připravených z mezenchymální linie H1080 a ameboidních linií A375m² and A2058. Experiment byl vyhodnocen po 48 hodinách (v případě HT1080 po 24 hodinách). Působení látek indukovalo změnu morfologie obou ameboidních linií, ale ne linie mezenchymální (Obr. 34 – 67). Změny byly pozorovány po aplikaci 10 $\mu\text{mol/l}$ inhibitoru, pouze v případě látky 1944 byla k vyvolání efektu na rychleji migrující linii A2058 třeba koncentrace 50 $\mu\text{mol/l}$. Vzhledem k neoptimální velikosti připravených sféroidů jsem neprovedla kvantifikaci invazivity.

Pozorovaný efekt na morfologii ameboidních linií a absence efektu na mezenchymální linii je v souladu s předpokládanou inhibicí ROCK v buňkách.

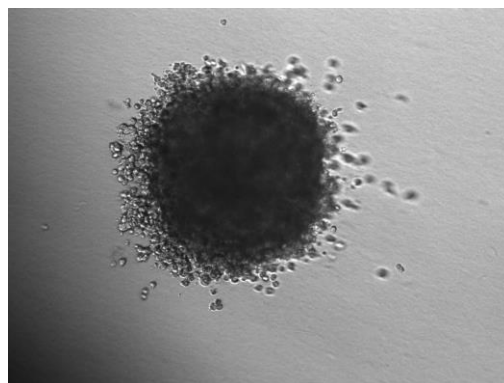
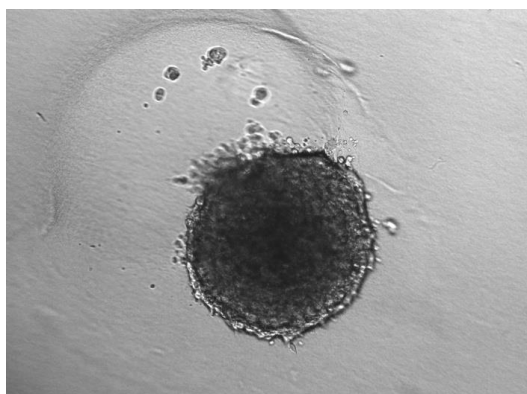
linie A375m²



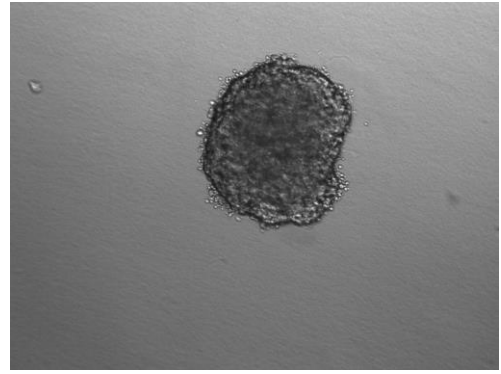
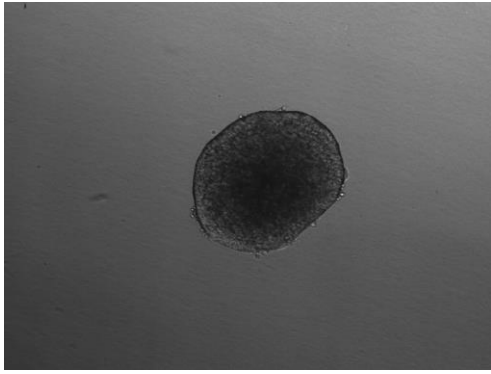
linie A2058



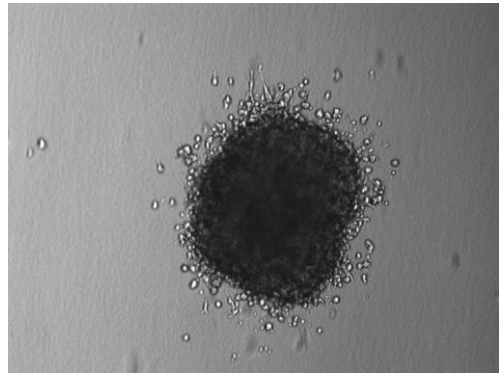
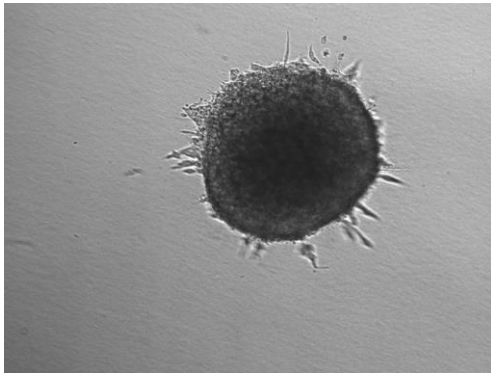
Obr. 34 – Kontrolní buňky, foceno po 6 hodinách, zvětšení 10x



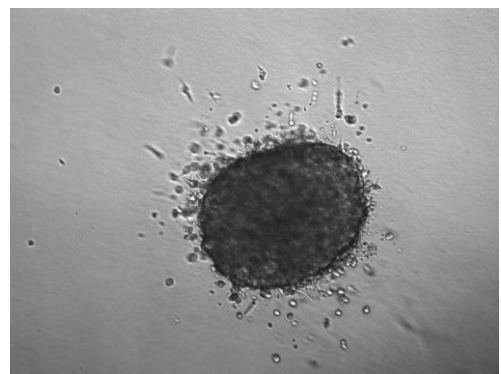
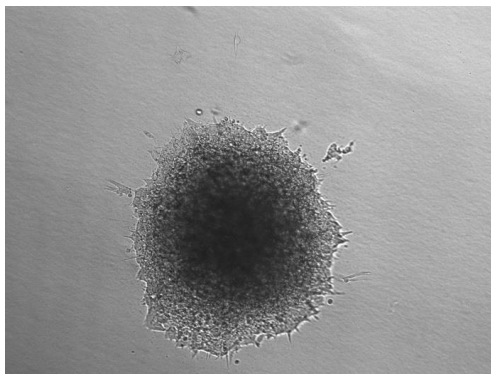
Obr. 35 – Kontrolní buňky, foceno po 48 hodinách, zvětšení 10x



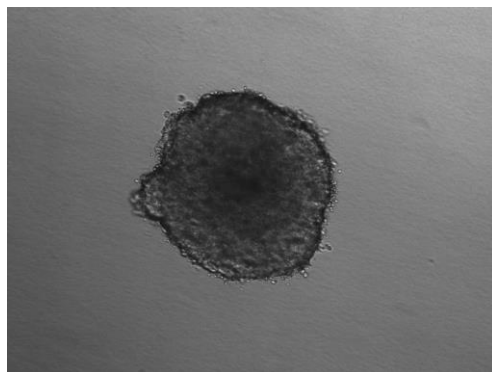
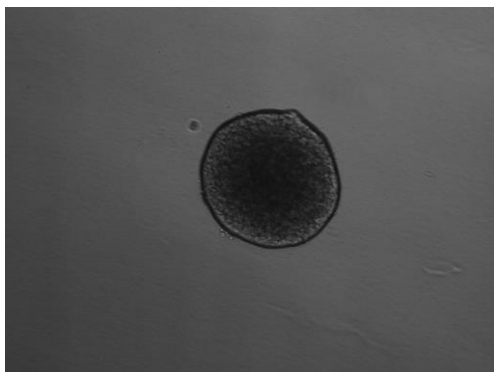
Obr. 36 – Látka 1944, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 6 hodinách, zvětšení 10x



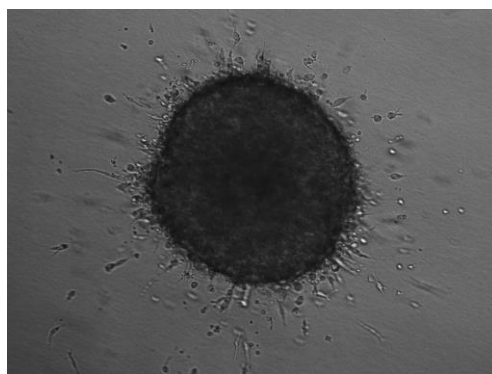
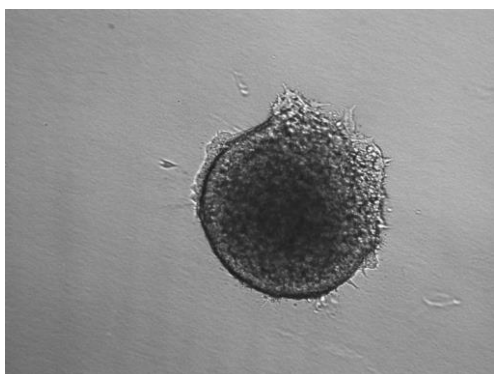
Obr. 37 – Látka 1944, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 48 hodinách, zvětšení 10x



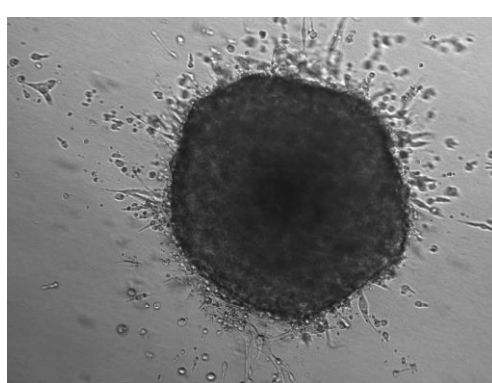
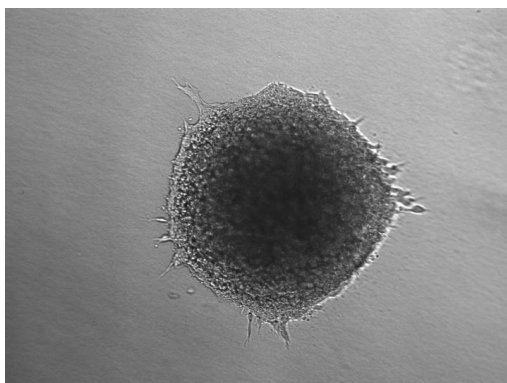
Obr. 38 – Látka 1944, koncentrace 50 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 48 hodinách, zvětšení 10x



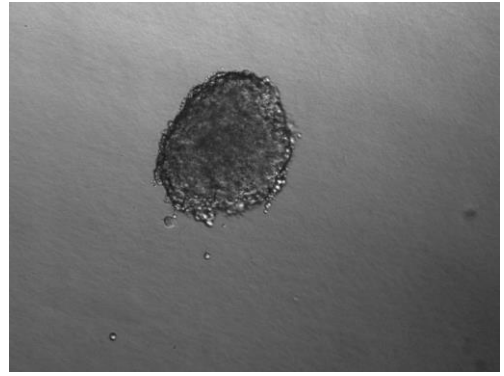
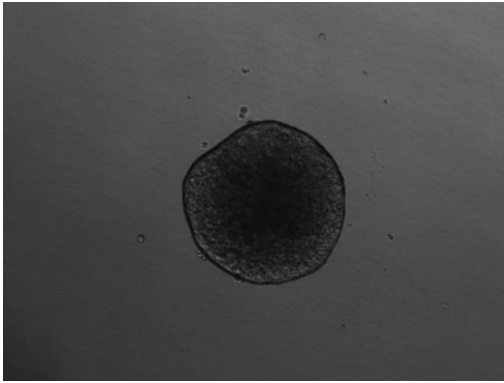
Obr. 39 – Látka 3625, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 6 hodinách, zvětšení 10x



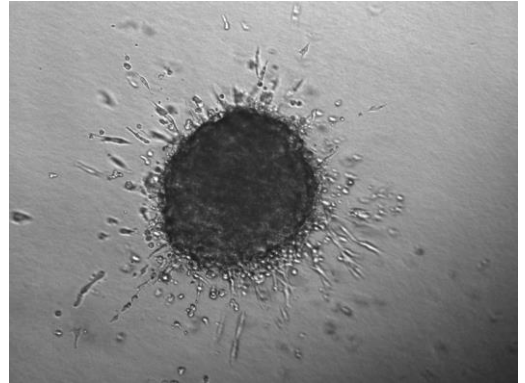
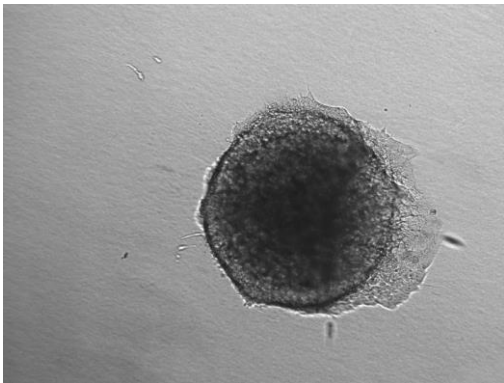
Obr. 40 – Látka 3625, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 48 hodinách, zvětšení 10x



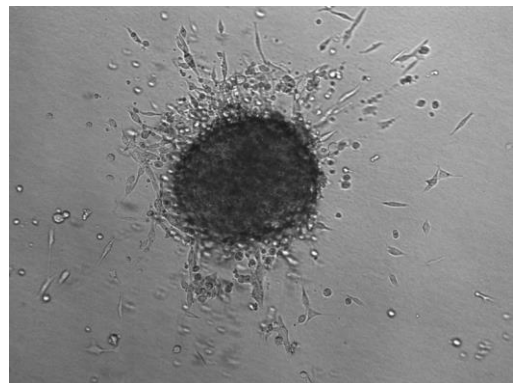
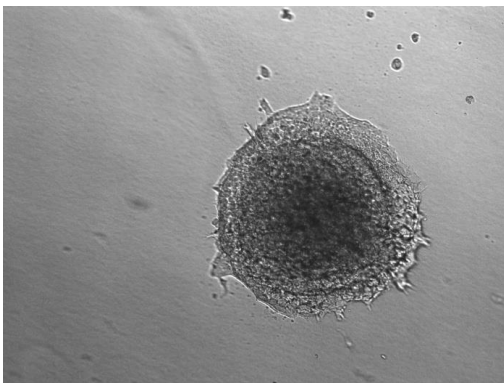
Obr. 41 – Látka 3625, koncentrace 50 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 48 hodinách, zvětšení 10x



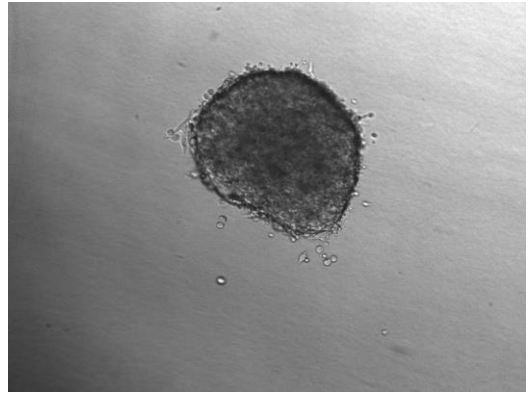
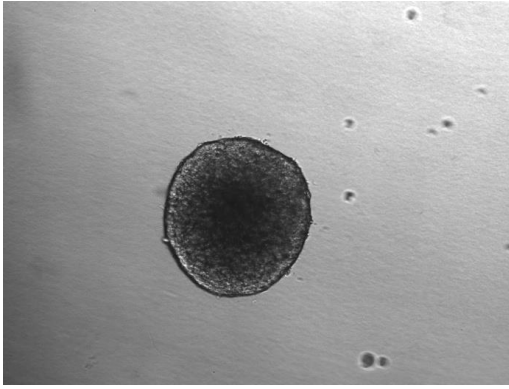
Obr. 42 – Látka 4686, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 6 hodinách, zvětšení 10x



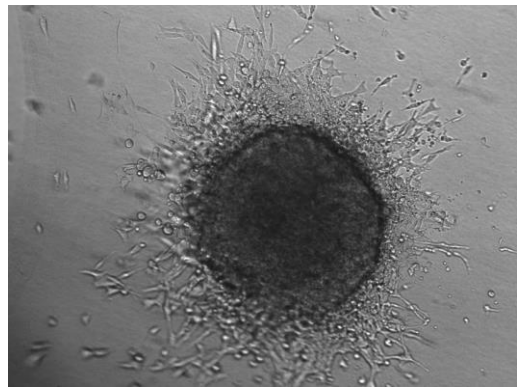
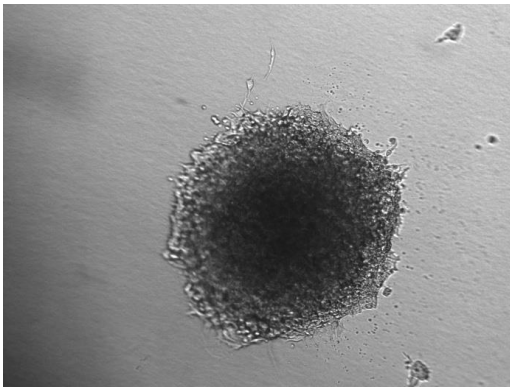
Obr. 43 – Látka 4686, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 48 hodinách, zvětšení 10x



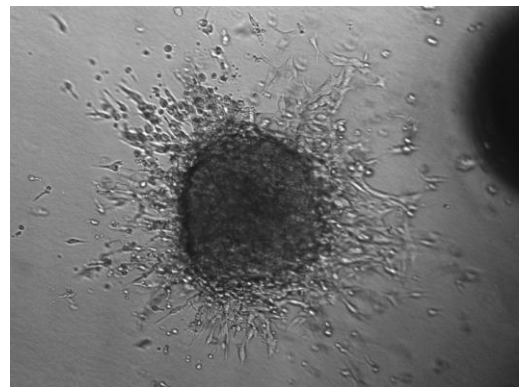
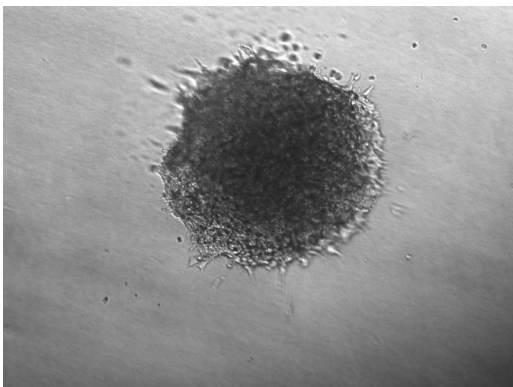
Obr. 44 – Látka 4686, koncentrace 50 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 48 hodinách, zvětšení 10x



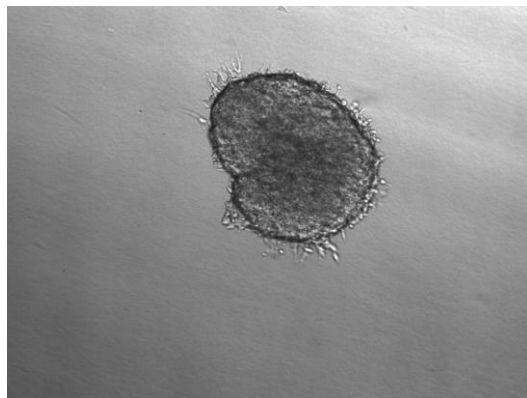
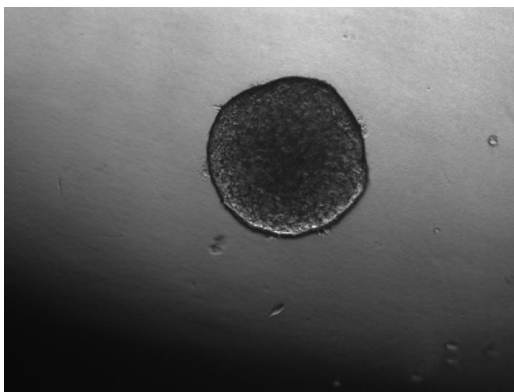
Obr. 45 – Fasudil, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 6 hodinách, zvětšení 10x



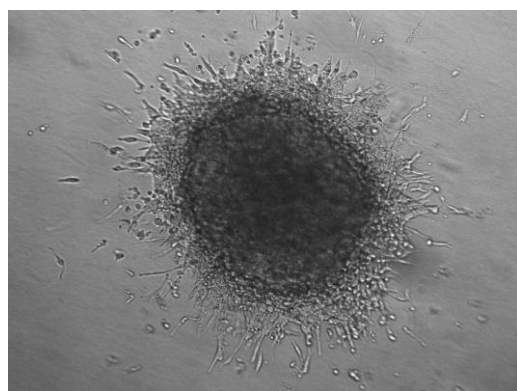
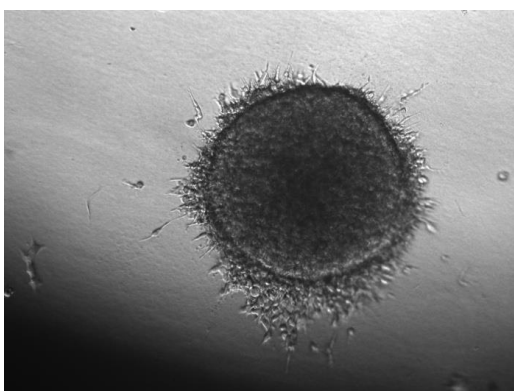
Obr. 46 – Fasudil, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 48 hodinách, zvětšení 10x



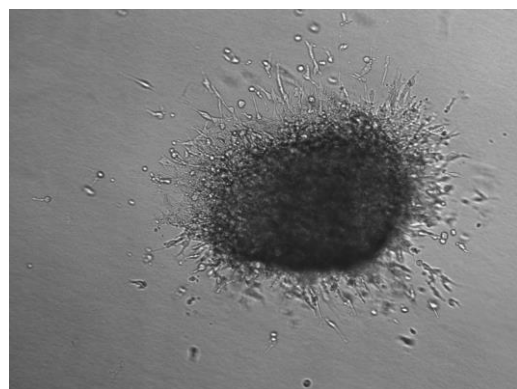
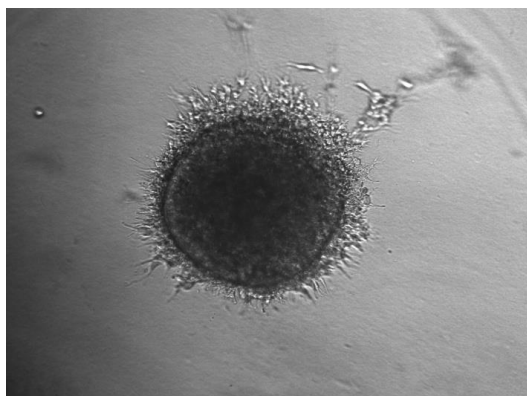
Obr. 47 – Fasudil, koncentrace 50 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 48 hodinách, zvětšení 10x



Obr. 48 – Y-27632, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 6 hodinách, zvětšení 10x

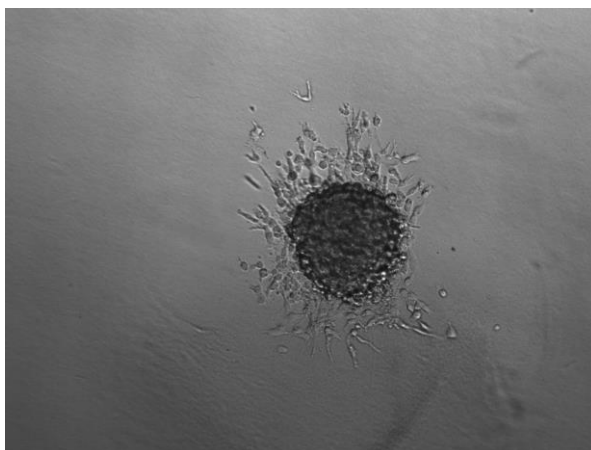


Obr. 49 – Y-27632, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 48 hodinách, zvětšení 10x

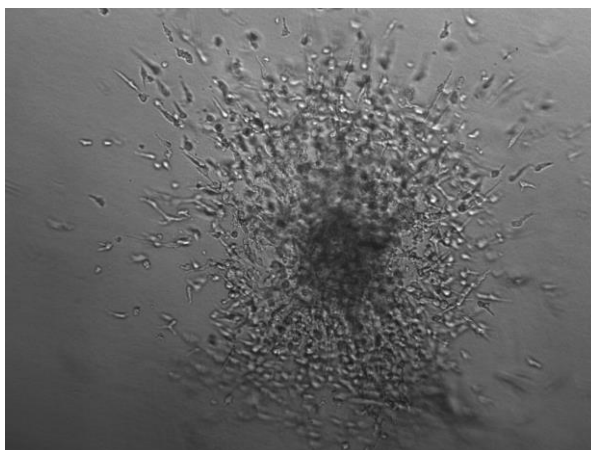


Obr. 50 – Y-27632, koncentrace 50 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 48 hodinách, zvětšení 10x

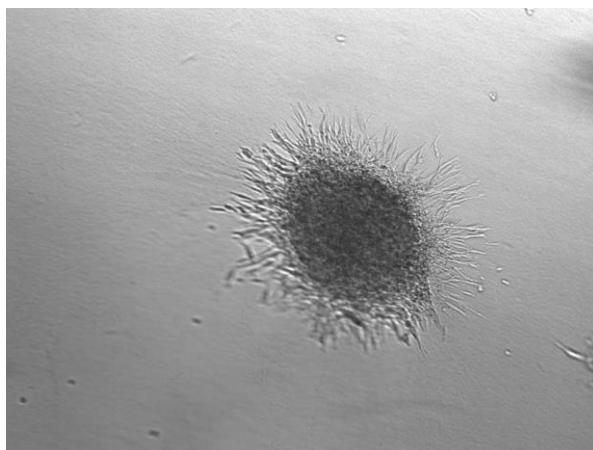
linie HT1080



Obr. 51 – Kontrolní buňky, foceno po 6 hodinách, zvětšení 10x



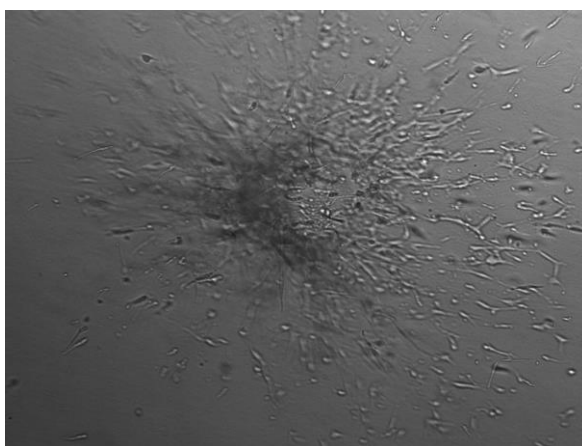
Obr. 52 – Kontrolní buňky, foceno po 24 hodinách, zvětšení 10x



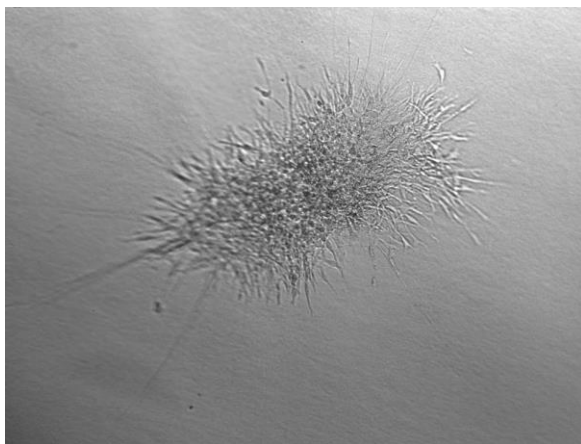
Obr. 53 – Látka 1944, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 6 hodinách, zvětšení 10x



Obr. 54 – Látka 1944, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 24 hodinách, zvětšení 10x



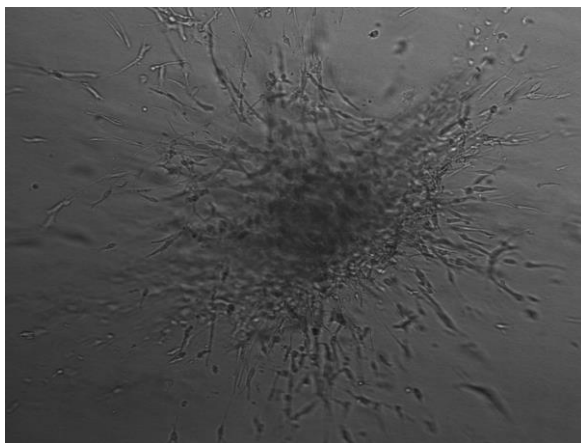
Obr. 55 – Látka 1944, koncentrace 50 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 24 hodinách, zvětšení 10x



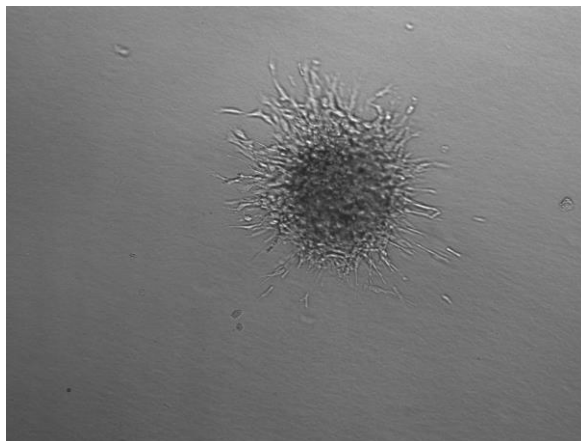
Obr. 56 – Látka 3625, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 6 hodinách, zvětšení 10x



Obr. 57 – Látka 3625, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 24 hodinách, zvětšení 10x



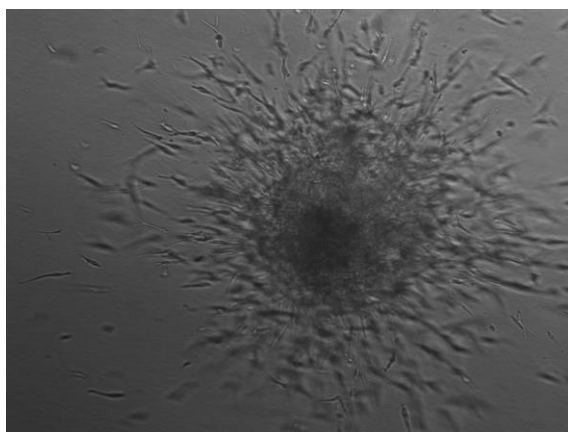
Obr. 58 – Látka 3625, koncentrace 50 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 24 hodinách, zvětšení 10x



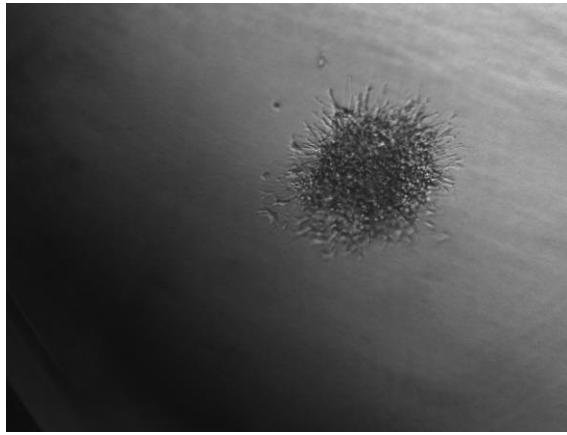
Obr. 59 – Látka 4686, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 6 hodinách, zvětšení 10x



Obr. 60 – Látka 4686, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 24 hodinách, zvětšení 10x



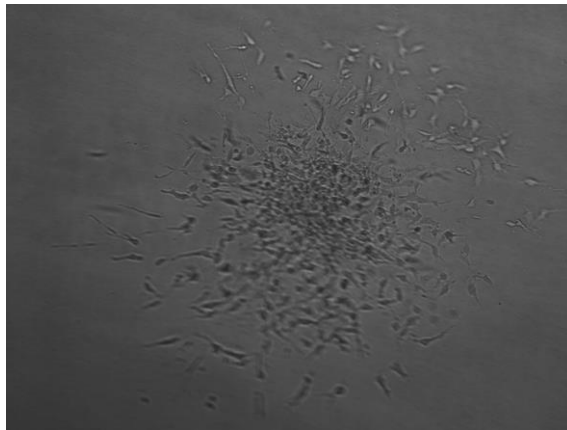
Obr. 61 – Látka 4686, koncentrace 50 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 24 hodinách, zvětšení 10x



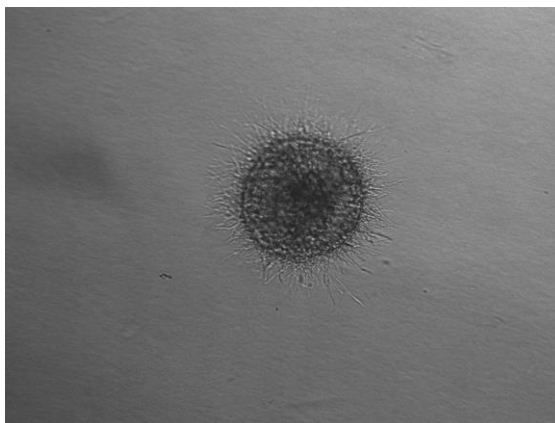
Obr. 62 – Fasudil, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 6 hodinách, zvětšení 10x



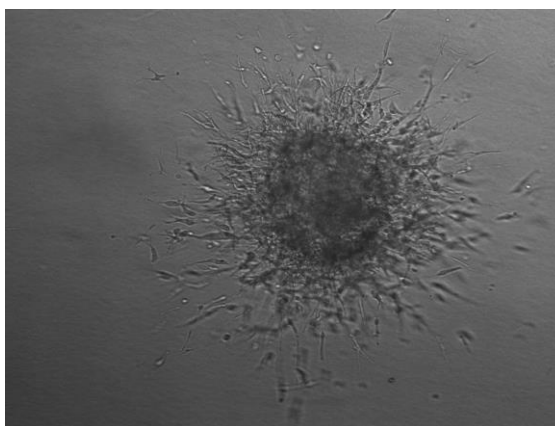
Obr. 63 – Fasudil, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 24 hodinách, zvětšení 10x



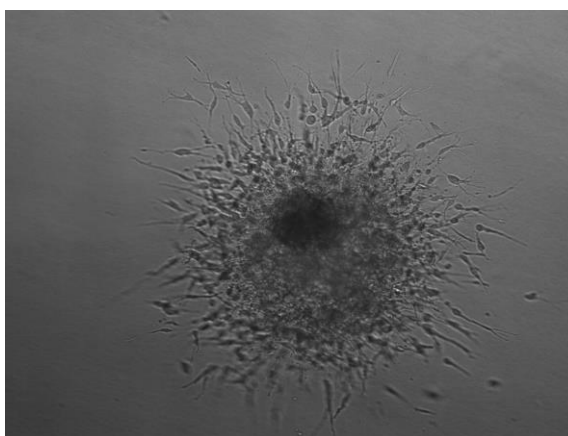
Obr. 64 – Fasudil, koncentrace 50 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 24 hodinách, zvětšení 10x



Obr. 65 – Y-27632, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 6 hodinách, zvětšení 10x



Obr. 66 – Y-27632, koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 24 hodinách, zvětšení 10x



Obr. 67 – Y-27632, koncentrace 50 $\mu\text{mol/l}$, foceno po 24 hodinách, zvětšení 10x

Efekt na fosforylaci vybraných substrátů ROCK (MLC a kofilin)

Buňky linií A375m², A2058 a HT1080 ovlivněné inhibitory (1944, 3625, 4686, fasudil, Y-27632; koncentrace 10 a 50 μmol/l) jsem sklídila po 6 a 24 hodinách. Vyizolovala jsem protein a provedla denaturační gelovou elektroforézu SDS-PAGE. Po westernovém přenosu jsem na membránách detekovala celkovou a fosforylovanou formu MLC (Ser19) a kofilinu (Ser3). Nepodařilo se mi pozorovat očekávaný vliv na fosforylaci cílových proteinů a to ani po aplikaci pozitivních kontrol fasudilu a Y-27632. Vzhledem k tomu, že imunodetekce neposkytly žádný interpretovatelný výsledek, nelze vyloučit, že šlo o technický (nefunkční protilátka) nebo metodický problém. Obrázky membrán nezahrnuji.

5. DISKUZE A ZÁVĚR

Aberantní aktivita Rho kináz (ROCK) hraje roli v patogenezi řady lidských nemocí mj. aterosklerózy, hypertenze, neurodegenerace a neurotraumatu, glaukomu a rakoviny. Inhibitory ROCK proto mají potenciálně široké uplatnění v terapii. Zatím jsou ale schváleny jen v Japonsku v terapii glaukomu a cerebrálního vazospazmu při subarachnoidálním krvácení. Obecným a ne zcela řešitelným problémem kinázových inhibitorů kompetujících s ATP je neoptimální selektivita a z ní plynoucí toxicita. V případě ROCK inhibitorů by byla žádoucí schopnost selektivně inhibovat jednotlivé izoformy enzymu. Proto je vývoj ROCK inhibitorů zajímavou oblastí výzkumu.

V této práci jsem studovala soubor 19 potenciálních inhibitorů ROCK připravených v Laboratoři růstových regulátorů v Olomouci. Jako pozitivní kontroly sloužily dva nejvíce prostudované ROCK inhibitory Y-27632 a klinicky používaný fasudil. Výzkum navazuje na mou bakalářskou práci, ve které jsem optimalizovala některé z použitých metod (kinázový test, barvení cytoskeletu).

Schopnost látek inhibovat rekombinantní ROCK2 byla hodnocena v testu založeném na sledování inhibice inkorporace ³³P pocházejícího z ATP do oligopeptidu LRRWSLG odpovídajícímu části rozpoznávané sekvence. ROCK2 byla původně zvolena kvůli dobré dostupnosti rekombinantního enzymu od spolehlivého výrobce. Látky byly testovány v několika skupinách tak, jak byly postupně syntetizovány, aby bylo možno navrhnout další deriváty. I z mé zkušenosti test poskytoval obdobné hodnoty jak pro látky kontrolní, tak pro nové látky testované opakovaně. Při testování poslední série ale vycházely hodnoty IC₅₀ podstatně vyšší možná proto, že enzym byl skladován příliš dlouho. To komplikuje přímé srovnání aktivity látek. Přesto je z dat možno říci, že v sérii se nachází 1 látka (3607) s aktivitou srovnatelnou s pozitivními kontrolami (submikromolární IC₅₀ v testu před ztrátou citlivosti) a několik látek s aktivitou 5-10x nižší. Problém pravděpodobně vyřeší nákup nového enzymu, z časových důvodů už k tomu nedošlo.

Soubor látek byl také testován na cytotoxicitu (72 h) na panelu linií zahrnujícím primární linii ARPE-19 (buňky oční sítnice), immortalizované keratinocyty HaCaT a nádorové linie SH-SY5Y, K562 a MCF-7. Zatímco v případě K562 a MCF-7 jsem použila kalceinový test, pro linie testované později jsem použila nově zavedený levnější test založený na redukci resazurinu. Ten je možné díky mechanismu do značné míry považovat za ekvivalent MTT, oproti kterému je méně pracný. Hodnoty IC₅₀ obvykle byly vyšší než maximální testovaná

koncentrace (obvykle 100 $\mu\text{mol/l}$). Dávkové křivky byly použity pro odhad koncentrací vhodných pro následující testy.

Jako orientační fenotypový skrínig sloužilo mikroskopické pozorování aktinového cytoskeletu fibroblastů BJ barveného značeným faloidinem. Viditelnost efektu zde bohužel závisí silně na hustotě buněk a vyhodnocení je do značné míry subjektivní. Jednoznačný efekt typický pro ROCK inhibitory jsem pozorovala pro látku 3625 a 4686.

V případě nádorových onemocnění aktivita Rho–ROCK dráhy ovlivňuje kromě přežívání a programované buněčné smrti také angiogenezi a metastazování. V bakalářské práci jsem se pokoušela zavést metody hodnocení angiogeneze *in vitro* pro testování ROCK inhibitorů, efekt jsem bohužel neviděla ani v případě pozitivních kontrol. V diplomové práci jsem se proto zaměřila na daleko lépe dokumentovaný vliv ROCK inhibice na metastazování. ROCK jsou klíčovými pozitivními regulátory améboidní migrace, na migraci mezenchymální mají jen omezený vliv. Potenciální anti-metastatickou terapii komplikuje to, že v nádoru se můžou nacházet buňky obojího typu a buňky mohou svůj způsob pohybu měnit.

Experimenty sledující vliv inhibitorů na migraci a invazivitu jsem dělala v Laboratoři invazivity nádorových buněk na Přírodovědecké fakultě UK vedené doc. Janem Brábkem a Dr. Danielem Röslem. Jako model sloužily dvě améboidní linie - A375m² a A2058 (buňky agresivního melanomu) a mezenchymální linie HT1080 (fibrosarkom). Na testování jsme se školitelem vybrali tři deriváty (1944, 3625, 4686). Výběr zohledňoval nejen aktivitu v kinázovém testu, ale i chemickou strukturu.

Všechny látky významně snižovaly index invazivity (o 40 a více %) u obou améboidních linií v kolagenní matrix – efekt byl srovnatelný s fasudilem a a Y-27632. U mezenchymální linie invazivitu snižoval pouze Y-27632 (o asi 20 %). Všechny látky měly také markantní efekt v testu sledujícím morfologii buněk améboidních linií migrujících v kolagenní matrix – v populaci převládly buňky s mezenchymální morfologií. Efekt byl pozorován i v opakovaném experimentu a ve všech případech byl statisticky signifikantní ($p < 0,01$). Na morfologii mezenchymální linie HT1080 látky neměly vliv. Schopnost indukovat změnu morfologie obou améboidních linií na rozdíl od linie mezenchymální byla pozorována i v pilotním experimentu se sféroidy. Uvedené chování je vysvětlitelné inhibicí ROCK, která je klíčová pro améboidní, ale ne pro mezenchymální migraci. Bylo by ale vhodné tyto experimenty ještě zopakovat.

K průkazu inhibice ROCK v améboidních buňkách jsem se také pokusila sledovat vliv inhibitorů na fosforylaci některých cílů ROCK jmenovitě MLC (Ser19) a kofilinu (Ser3) pomocí imunodetekce po elektroforéze (SDS-PAGE) a westernovém přenosu. Nepodařilo

se mi ale sledovat očekávané změny a to ani po aplikaci standardních ROCK inhibitorů. Na podobný problém jsem narazila během bakalářské práce, kdy jsem se neúspěšně snažila sledovat fosforylaci MYPT-1 a MLC v několika liniích. Úspěšná detekce pravděpodobně bude vyžadovat nalezení správného časového okna – z literatury je známo, že vliv farmakologické inhibice kináz (včetně ROCK) na fosforylaci cílových proteinů může být pouze dočasný.

Jako další krok bych navrhla testování vybraných derivátů na širším panelu proteinkináz zahrnujícím mj. ROCK1 a také další kinázy z AGC rodiny. Bude pak možné srovnat inhibiční spektra testovaných látek se známými inhibitory ROCK.

V souboru 19 nových látek syntetizovaných jako potenciální ROCK inhibitory jsem pomocí kinázového testu s rekombinantní ROCK2 identifikovala 1 látku s aktivitou srovnatelnou s nejvíce studovanými inhibitory Y-27632 a fasudilem. Několik dalších látek mělo aktivitu 5-10x nižší. Vybrané deriváty (podobně jako Y-27632 a fasudil) efektivně snižovaly invazivitu améboidních nádorových linií a měnily jejich morfologii na mezenchymální. Na invazivitu a morfologii mezenchymální linie vliv neměly. Tyto experimenty ukazují, že studované látky jsou sto dosáhnout v buňkách koncentrací dostatečných pro inhibici ROCK. Zatím ale chybí průkaz inhibice ROCK v buňkách na molekulární úrovni – nepodařilo se mi pozorovat vliv na fosforylaci substrátů ROCK.

6. LITERATURA

- Abe, K., Shimokawa, H., Morikawa, K., Uwatoku, T., Oi, K., Matsumoto, Y., Hattori, T., Nakashima, Y., Kaibuchi, K., Sueishi, K., Takeshita, A. (2004): Long-Term Treatment with a Rho-Kinase Inhibitor Improves Monocrotaline-Induced Fatal Pulmonary Hypertension in Rats. *Circulation Research*, 94, 385–393.
- Abe, K., Tawara, S., Oi, K., Hizume, T., Uwatoku, T., Fukumoto, Y., Yoshihiro, ,Kaibuchi, K., Kozo, J., Shimokawa, H. (2006): Long-term inhibition of Rho-kinase ameliorates hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 48, 280–285.
- Ahima, R. S. (2011): Digging deeper into obesity. *Journal of Clinical Investigation*, 121(6), 2076–2079
- Ahima, R. S., Saper, C. B., Flier, J. S., Elmquist, J. K. (2000): Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 21, 263–307.
- Amano, M., Nakayama, M., Kaibuchi, K. (2010): Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*, 67(9), 545–54.
- Amin, E., Dubey, B. N., Zhang, S. C., Gremer, L., Dvorsky, R., Moll, J. M., Ahmadian, M. R. (2013): Rho-kinase: Regulation, (dys)function, and inhibition. *Biological Chemistry*, 394(11), 1399–1410.
- Aukrust, P., Halvorsen, B., Yndestad, A., Ueland, T., Øie, E., Otterdal, K., Gullestad, L., Damås, J. K. (2008): Chemokines and cardiovascular risk. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1909-1919.
- Banks, W. A. (2012): Role of the blood-brain barrier in the evolution of feeding and cognition. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1264, 13–19.
- Banks, W. A., Coon, A. B., Robinson, S. M., Moinuddin, A., Shultz, J. M., Nakaoka, R., Morley, J. E. (2004): Triglycerides Induce Leptin Resistance at the Blood-Brain Barrier. *Diabetes*, 53, 1253–1260.
- Bao, W., Hu, E., Tao, L., Boyce, R., Mirabile, R., Thudium, D. T., Ma, X.L., Willette, R.N., Yue, T. L. (2004): Inhibition of Rho-kinase protects the heart against ischemia/reperfusion injury. In *Cardiovascular Research*, 61, 548–558.
- Bivalacqua, T. J., Champion, H. C., Usta, M. F., Cellek, S., Chitaley, K., Webb, R. C., Lewis, R.L., Mills, T.M., Hellstrom, W. J. G., Kadowitz, P. J. (2004): RhoA/Rho-kinase suppresses endothelial nitric oxide synthase in the penis: a mechanism for diabetes-associated erectile dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 9121–9126.
- Boerma, M., Fu, Q., Wang, J., Loose, D. S., Bartolozzi, A., Ellis, J. L., McGonigle, S., Paradise, E., Sweetnam, P., Fink, L. M., Vozenin-Brotons, M.-C., Hauer-Jensen, M. (2008): Comparative gene expression profiling in three primary human cell lines after

- treatment with a novel inhibitor of Rho kinase or atorvastatin. *Blood Coagulation & Fibrinolysis : An International Journal in Haemostasis and Thrombosis*, 19, 709–718.
- Bryan, B. A., Dennstedt, E., Mitchell, D. C., Walshe, T. E., Noma, K., Loureiro, R., D'Amore, P. A. (2010): RhoA/ROCK signaling is essential for multiple aspects of VEGF-mediated angiogenesis. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24, 3186–3195.
- Bucolo, C., Salomone, S., Drago, F., Reibaldi, M., Longo, A., Uva, M. G. (2013): Pharmacological management of ocular hypertension: Current approaches and future prospective. *Current Opinion in Pharmacology*, 13, 50–55.
- Butruille, L., Mayeur, S., Duparc, T., Knauf, C., Moitrot, E., Fajardy, I., Valet, P., Storme, L., Deruelle, P., Lesage, J. (2012): Prenatal fasudil exposure alleviates fetal growth but programs hyperphagia and overweight in the adult male rat. *European Journal of Pharmacology*, 689, 278–284.
- Büyükaşar, K., Arıkan, O., Ark, M., Kubat, H., Özveren, E. (2004): Upregulation of Rho-kinase (ROCK-2) expression and enhanced contraction to endothelin-1 in the mesenteric artery from lipopolysaccharide-treated rats. *European Journal of Pharmacology*, 498, 211–217.
- Croft, D. R., Sahai, E., Mavria, G., Li, S., Tsai, J., Lee, W. M. F., Olson, M. F. (2004): Conditional ROCK activation in vivo induces tumor cell dissemination and angiogenesis. *Cancer Research*, 64, 8994–9001.
- Dahal, B. K., Kosanovic, D., Pamarthi, P. K., Sydykov, A., Lai, Y.-J., Kast, R., Schirok, H., Stasch, J.-P., Ghofrani, H. A., Weissmann, N., Grimminger, F., Seeger, W., Schermuly, R. T. (2010): Therapeutic efficacy of azaindole-1 in experimental pulmonary hypertension. *The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 36, 808–818.
- Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M., Cohen, P. (2000): Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *The Biochemical Journal*, 351, 95–105.
- Do e, Z., Fukumoto, Y., Takaki, A., Tawara, S., Ohashi, J., Nakano, M., Tada, T., Saji, K., Sugimura, K., Fujita, H., Hoskikawa, Y., Nawata, J., Kondo, T., Shimokawa, H. (2009): Evidence for Rho-kinase activation in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society*, 73, 1731–1739.
- Duong-Quy, S., Bei, Y., Liu, Z., Dinh-Xuan, A. T. (2013): Role of Rho-kinase and its inhibitors in pulmonary hypertension. *Pharmacology and Therapeutics*, 137, 352–364.
- Fagan, K. A., Oka, M., Bauer, N. R., Gebb, S. A., Ivy, D. D., Morris, K. G., McMurtry, I. F. (2004): Attenuation of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction and hypoxic pulmonary hypertension in mice by inhibition of Rho-kinase. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 287, L656–L664.

- Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Foreman, D., Mathers, C., Parkin, D. M. (2010): Cancer Incidence and Mortality Worldwide. *International Agency for Research on Cancer*, 1–5.
- Flegal, K. M. (2012): Prevalence of Obesity and Trends in the Distribution of Body Mass Index Among US Adults, 1999-2010. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 491.
- Francis, B. A., Singh, K., Lin, S. C., Hodapp, E., Jampel, H. D., Samples, J. R., Smith, S. D. (2011): Novel glaucoma procedures: A report by the American Academy of ophthalmology. *Ophthalmology*, 118, 1466–1480.
- Frederich, R. C., Hamann, A., Anderson, S., Löllmann, B., Lowell, B. B., Flier, J. S. (1995): Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nature Medicine*, 1, 1311–1314.
- Friedl, P., Wolf, K. (2003): Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews. Cancer*, 3, 362–374.
- Fujita, H., Fukumoto, Y., Saji, K., Sugimura, K., Demachi, J., Nawata, J., Shimokawa, H. (2010): Acute vasodilator effects of inhaled fasudil, a specific Rho-kinase inhibitor, in patients with pulmonary arterial hypertension. *Heart and Vessels*, 25, 144–149.
- Fukumoto, Y., Matoba, T., Ito, A., Tanaka, H., Kishi, T., Hayashidani, S., Abe, K., Takeshita, A., Shimokawa, H. (2005): Acute vasodilator effects of a Rho-kinase inhibitor, fasudil, in patients with severe pulmonary hypertension. *Heart (British Cardiac Society)*, 391–392.
- Ghoreschi, K., Laurence, A., O’Shea, J. J. (2009): Selectivity and therapeutic inhibition of kinases: to be or not to be? *Nature America*, 10 (4), 356-360.
- Ghosh, K., Thodeti, C. K., Dudley, A. C., Mammoto, A., Klagsbrun, M., Ingber, D. E. (2008): Tumor-derived endothelial cells exhibit aberrant Rho-mediated mechanosensing and abnormal angiogenesis in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 11305–11310.
- Girgis, R. E., Mozammel, S., Champion, H. C., Li, D., Peng, X., Shimoda, L., Tuder, R. M., Johns, R. A., Hassoun, P. M. (2007): Regression of chronic hypoxic pulmonary hypertension by simvastatin. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 292, L1105–L1110.
- Goldhagen, B., Proia, A. D., Epstein, D. L., Rao, P. V. (2012): Elevated Levels of RhoA in the Optic Nerve Head of Human Eyes With Glaucoma. *Journal of Glaucoma*, 530-538.
- Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G. L., Hunter, C., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., Edkins, S., O’Meara, S., Vastrik, I., Schmidt, E. E., Avis, T., Barthorpe, S., Bhamra, G., Buck, G., Choudhury, B., Clements, J., Cole, J., Dicks, E., Forbes, S., Gray, K., Halliday, K., Harrison, R., Hills, K., Hinton, J., Jenkinson, A., Jones, D., Menzies, A., Mironenko, T., Perry, J., Raine, K., Richardson, D., Shepherd, R., Small, A., Tofts, C., Varian, J., Webb, T., West, S., Widaa, S., Yates, A., Cahill, D. P., Louis, D. N., Goldstraw, P., Nicholson, A. G., Brasseur, F., Looijenga,

- L., Weber, B. L., Chiew, Y. E., DeFazio, A., Greaves, M. F., Green, A. R., Campbell, P., Birney, E., Easton, D. F., Chenevix-Trench, G., Tan, M. H., Khoo, S. K., Teh, B. T., Yuen, S. T., Leung, S. Y., Wooster, R., Futreal, P. A., Stratton, M. R. (2007): Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*, 446, 153–158.
- Grise, F., Bidaud, A., Moreau, V. (2009): Rho GTPases in hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta.*, 1795, 137–151.
- Guilluy, C., Eddahibi, S., Agard, C., Guignabert, C., Izikki, M., Tu, L., Savale, L., Humbert, M., Fadel, E., Adnot, S., Loirand, G., Pacaud, P. (2009): RhoA and Rho kinase activation in human pulmonary hypertension: Role of 5-HT signaling. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 179, 1151–1158.
- Guo, Crawley, L., Zamir, S. M., Cordeiro, M. F. (2012): Clinical Options for the Reduction of Elevated Intraocular Pressure. *Ophthalmology and Eye Diseases*, 43.
- Hahmann, C., Schroeter, T. (2010): Rho-kinase inhibitors as therapeutics: From pan inhibition to isoform selectivity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 171-177.
- Halaas, J. L., Gajiwala, K. S., Maffei, M., Cohen, S. L., Chait, B. T., Rabinowitz, D., Lallone, R. L., Burley, S. K., Friedman, J. M. (1995): Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science (New York, N.Y.)*, 269, 543–546.
- Hanahan, D., Coussens, L. M. (2012): Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*, 309-322.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 646-674.
- Hattori, T., Shimokawa, H., Higashi, M., Hiroki, J., Mukai, Y., Kaibuchi, K., Takeshita, A. (2004): Long-Term Treatment with a Specific Rho-Kinase Inhibitor Suppresses Cardiac Allograft Vasculopathy in Mice. *Circulation Research*, 94, 46–52.
- Heikkila, T., Wheatley, E., Crighton, D., Schroder, E., Boakes, A., Kaye, S. J., Mezna, M., Pang, L., Rushbrooke, M., Turnbull, A. (2011): Co-crystal structures of inhibitors with MRCK β , a key regulator of tumor cell invasion. *PLoS One*, 6(9), e24825.
- Herskowitz, J. H., Feng, Y., Mattheyses, A. L., Hales, C. M., Higginbotham, L. a, Duong, D. M., Lah, J. J. (2013): Pharmacologic inhibition of ROCK2 suppresses amyloid- β production in an Alzheimer's disease mouse model. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33, 19086–98.
- Hiroki, J., Shimokawa, H., Higashi, M., Morikawa, K., Kandabashi, T., Kawamura, N., Kubota, T., Ichiki, T., Amano, M., Kaibuchi, K., Takeshita, A. (2004): Inflammatory stimuli upregulate Rho-kinase in human coronary vascular smooth muscle cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 37, 537–546.
- Hirooka, Y., Shimokawa, H. (2005): Therapeutic potential of Rho-kinase inhibitors in cardiovascular diseases. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, 31-39.

- Hollanders, K., van Bergen, T., Kindt, N., Castermans, K., Leysen, D., Vandewalle, E., Moons, L., Stalmans, I. (2015): The effect of AMA0428, a novel and potent ROCK inhibitor, in a model of neovascular age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 56(2), 1335-48.
- Hu, E., Lee, D. (2005): Rho kinase as potential therapeutic target for cardiovascular diseases: opportunities and challenges. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 9, 715–736.
- Huang, H., Kong, D., Byun, K. H., Ye, C., Koda, S., Lee, D. H., Oh, B.-Ch., Lee, S. W., Lee, B., Zabolotny, J. M., Kim, M. S., Bjørnbæk, Ch., Lowell, B. B., Kim, Y.-B. (2012). Rho-kinase regulates energy balance by targeting hypothalamic leptin receptor signaling. *Nature Neuroscience*, 1391-1398.
- Huang, H., Lee, D. H., Zabolotny, J. M., & Kim, Y. B. (2013): Metabolic actions of Rho-kinase in periphery and brain. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 24, 506-514.
- Huang, H., Lee, S. H., Ye, C., Lima, I. S., Oh, B. C., Lowell, B. B., Zabolotny, J. M., Kim, Y. B. (2013): ROCK1 in AgRP neurons regulates energy expenditure and locomotor activity in male mice. *Endocrinology*, 154, 3660–3670.
- Chen, B. H., Tzen, J. T. C., Bresnick, A. R., Chen, H. (2002): Roles of Rho-associated kinase and myosin light chain kinase in morphological and migratory defects of focal adhesion kinase-null cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 33857–33863.
- Chen, W., Mao, K., Liu, Z., Dinh-xuan, A. T. (2014): The role of the RhoA/Rho kinase pathway in angiogenesis and its potential value in prostate cancer. *Oncology letters*, 8, 1907-1911.
- Cheng, K. W., Agarwal, R., Mills, G. B. (2009): Ras-superfamily GTP-ases in ovarian cancer. *Cancer Treat Res.*, 149, 229–240.
- Chun, K.-H., Choi, K.-D., Lee, D.-H., Jung, Y., Henry, R. R., Ciaraldi, T. P., Kim, Y.-B. (2011): In vivo activation of ROCK1 by insulin is impaired in skeletal muscle of humans with type 2 diabetes. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 300, E536–E542.
- Iizuka, M., Kimura, K., Wang, S., Kato, K., Amano, M., Kaibuchi, K., Mizoguchi, A. (2012): Distinct distribution and localization of Rho-kinase in mouse epithelial, muscle and neural tissues. *Cell Structure and Function*, 155-175.
- Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I. (2011): Opportunities and challenges in developing Alzheimer disease therapeutics. *Acta Neuropathologica*, 543-549.
- Ishikura, K., Yamada, N., Ito, M., Ota, S., Nakamura, M., Isaka, N., Nakano, T. (2006): Beneficial acute effects of rho-kinase inhibitor in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation Journal*, 70, 174–178.
- Ito, K., Hirooka, Y., Kishi, T., Kimura, Y., Kaibuchi, K., Shimokawa, H., Takeshita, A. (2004): Rho/Rho-Kinase Pathway in the Brainstem Contributes to Hypertension Caused by Chronic Nitric Oxide Synthase Inhibition. *Hypertension*, 43, 156–162.

- Ito, K., Ichiki, T., Ohi, K., Egashira, K., Ohta, M., Taguchi, K., Takeshita, A. (2003): Pulmonary capillary hemangiomas with severe pulmonary hypertension. *Circulation Journal : Official Journal of the Japanese Circulation Society*, 67, 793–795.
- Itoh, K., Yoshioka, K., Akedo, H., Uehata, M., Ishizaki, T., Narumiya, S. (1999): An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nature Medicine*, 5, 221–225.
- Jiang, B. H., Tawara, S., Abe, K., Takaki, A., Fukumoto, Y., Shimokawa, H. (2007): Acute vasodilator effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 49, 85–89.
- Jiang, Z. Y., Zhou, Q. L., Coleman, K. A., Chouinard, M., Boese, Q., Czech, M. P. (2003): Insulin signaling through Akt/protein kinase B analyzed by small interfering RNA-mediated gene silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 7569–7574.
- Kamai, T., Kawakami, S., Koga, F., Arai, G., Takagi, K., Arai, K., Tsujii, T., Yoshida, K. I. (2003): RhoA is associated with invasion and lymph node metastasis in upper urinary tract cancer. *BJU International*, 91, 234–238.
- Kass, M. A., Heuer, D. K., Higginbotham, E. J., Johnson, C. A., Keltner, J. L., Miller, J. P., Parrish, R. K., Wilson, M. R., Gordon, M. O. (2002): The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. *Archives of ophthalmology*, 120, 701–713.
- Kikuchi, Y., Yamada, M., Imakiire, T., Kushiyama, T., Higashi, K., Hyodo, N., Yamamoto, K., Oda, T., Suzuki, S., Miura, S. (2007): A Rho-kinase inhibitor, fasudil, prevents development of diabetes and nephropathy in insulin-resistant diabetic rats. *Journal of Endocrinology*, 192, 595–603.
- Kim, Y. B., Nikoulina, S. E., Ciaraldi, T. P., Henry, R. R., Kahn, B. B. (1999): Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 104, 733–741.
- Kishore, R., Qin, G., Luedemann, C., Bord, E., Hanley, A., Silver, M., Gavin, M., Goukassain, D., Losordo, D. W. (2005): The cytoskeletal protein ezrin regulates EC proliferation and angiogenesis via TNF- α -induced transcriptional repression of cyclin A. *Journal of Clinical Investigation*, 115, 1785–1796.
- Kolavennu, V., Zeng, L., Peng, H., Wang, Y., Danesh, F. R. (2008): Targeting of RhoA/ROCK signaling ameliorates progression of diabetic nephropathy independent of glucose control. *Diabetes*, 57, 714–723.
- Komárková, J. (2013): Hodnocení aktivity inhibitorů lidských ROCK kinas
- Koumura, A., Hamanaka, J., Kawasaki, K., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Hozumi, I., Inuzuka, T., Hara, H., J. (2011): *Pharmacol. Exp. Ther.*, 338, 337–344.

- Lane, J., Martin, T. A., Watkins, G., Mansel, R. E., Jiang, W. G. (2008): The expression and prognostic value of ROCK I and ROCK II and their role in human breast cancer. *Int J Oncol*, 33, 585–593.
- Lara-Castro, C., Garvey, W. T. (2008): Intracellular Lipid Accumulation in Liver and Muscle and the Insulin Resistance Syndrome. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 841-856.
- Laufs, U., Liao, J. K. (1998): Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem*, 273, 24266–24271.
- Lee, Y. J., Hsu, T. C., Du, J. Y., Valentijn, A. J., Wu, T. Y., Cheng, C. F., Yang, Z., Streuli, C. H. (2009): Extracellular matrix controls insulin signaling in mammary epithelial cells through the RhoA/Rok pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 220, 476–484.
- Li, F., Xia, W., Li, A., Zhao, C., Sun, R. (2007): Long-term inhibition of Rho kinase with fasudil attenuates high flow induced pulmonary artery remodeling in rats. *Pharmacological Research*, 55, 64–71.
- Li, F., Xia, W., Yuan, S., Sun, R. (2009): Acute inhibition of Rho-kinase attenuates pulmonary hypertension in patients with congenital heart disease. *Pediatric Cardiology*, 30, 363–366.
- Liao, J. K., Seto, M., Noma, K. (2007): Rho kinase (ROCK) inhibitors. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 50, 17–24.
- Libby, P., Ridker, P. M., Maseri, A. (2002): Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 105, 1135–1143.
- Lin, G., Craig, G. P., Zhang, L., Yuen, V. G., Allard, M., McNeill, J. H., MacLeod, K. M. (2007): Acute inhibition of Rho-kinase improves cardiac contractile function in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovascular Research*, 75, 51–58.
- Ling, L., Lobie, P. E. (2004): RhoA/ROCK activation by growth hormone abrogates p300/histone deacetylase 6 repression of Stat5-mediated transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 32737–32750.
- Liu, P. Y., Chen, J. H., Lin, L. J., Liao, J. K. (2007): Increased Rho Kinase Activity in a Taiwanese Population With Metabolic Syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*, 49, 1619–1624.
- Liu, X., Choy, E., Hornicek, F. J., Yang, S., Yang, C., Harmon, D., Mankin, H., Duan, Z. (2011): ROCK1 as a potential therapeutic target in osteosarcoma. *Journal of Orthopaedic Research*, 29, 1259–1266.
- Lochhead, P. A., Wickman, G., Mezna, M., Olson, M. F. (2010): Activating ROCK1 somatic mutations in human cancer. *Oncogene*, 29, 2591–2598.

- Mallat, Z., Gojova, A., Sauzeau, V., Brun, V., Silvestre, J. S., Esposito, B., Merval, R., Groux, H., Loirand, G., Tedgui, A. (2003): Rho-Associated Protein Kinase Contributes to Early Atherosclerotic Lesion Formation in Mice. *Circulation Research*, 93, 884–888.
- Marquis, R. E., Whitson, J. T. (2005): Management of glaucoma: Focus on pharmacological therapy. *Drugs and Aging*, 1-21.
- Masumoto, A., Mohri, M., Shimokawa, H., Urakami, L., Usui, M., Takeshita, A. (2002): Suppression of coronary artery spasm by the Rho-kinase inhibitor fasudil in patients with vasospastic angina. *Circulation*, 105, 1545–1547.
- Matsuoka, T., Yashiro, M. (2014): Rho/ROCK signaling in motility and metastasis of gastric cancer. *World J Gastroenterol.*, 20, 13756-13766.
- McNamara, P. J., Murthy, P., Kantores, C., Teixeira, L., Engelberts, D., van Vliet, T., Kavanagh, B. P., Jankov, R. P. (2008): Acute vasodilator effects of Rho-kinase inhibitors in neonatal rats with pulmonary hypertension unresponsive to nitric oxide. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 294, L205–L213.
- Mishra, R. K., Alokam, R., Sriram, D., Yogeewari, P. (2013): Potential role of Rho Kinase inhibitors in combating diabetes-related complications including diabetic neuropathy--a review. *Current Diabetes Reviews*, 9, 249–266.
- Montague, C. T., Farooqi, I. S., Whitehead, J. P., Soos, M. A., Rau, H., Wareham, N. J., Sewter, C. P., Digby, J. E., Mohammed, S. N., Hurst, J. A., Cheetham, C. H., Earley, A. R., Barnett, A. H., Prins, J. B., O’Rahilly, S. (1997): Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*, 387, 903–908.
- Montalvo, J., Spencer, C., Hackathorn, A., Masterjohn, K., Perkins, A., Doty, C., Bryan, B. A. (2013): Rock1 and 2 Perform Overlapping and Unique Roles in Angiogenesis and Angiosarcoma Tumor Progression. *Curr Mol Med*, 1, 205–219.
- Montani, D., Huertas, A., Dorfmler, P., Humbert, M. (2012): Pulmonary veno-occlusive disease. *Progress in Respiratory Research*, 41, 149–160.
- Morgan-Fisher, M., Wewer, U. M., Yoneda, A. (2013): Regulation of ROCK activity in cancer. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 61, 185–98.
- Mouchaers, K. T. B., Schalij, I., De Boer, M. A., Postmus, P. E., Van Hinsbergh, V. W. M., Van Nieuw Amerongen, G. P., Vonk Noordegraaf, A., Van Der Laarse, W. J. (2010): Fasudil reduces monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension: Comparison with bosentan and sildenafil. *European Respiratory Journal*, 36, 800–807.
- Mueller, B. K., Mack, H., Teusch, N. (2005): Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 4, 387–398.
- Musch, D. C., Gillespie, B. W., Niziol, L. M., Lichter, P. R., Varma, R. (2011): Intraocular pressure control and long-term visual field loss in the collaborative initial glaucoma treatment study. *Ophthalmology*, 118, 1766–1773.

- Nagaoka, T., Fagan, K. A., Gebb, S. A., Morris, K. G., Suzuki, T., Shimokawa, H., McMurtry, I. F., Oka, M. (2005): Inhaled rho kinase inhibitors are potent and selective vasodilators in rat pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 171, 494–499.
- Nagaoka, T., Gebb, S. A., Karoor, V., Homma, N., Morris, K. G., McMurtry, I. F., Oka, M. (2006): Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in pulmonary hypertension of the fawn-hooded rat. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 100, 996–1002.
- Nakajima, M., Hayashi, K., Katayama, K. ichi, Amano, Y., Egi, Y., Uehata, M., Goto, N., Kondo, T. (2003): Wf-536 prevents tumor metastasis by inhibiting both tumor motility and angiogenic actions. *European Journal of Pharmacology*, 459, 113–120.
- Noma, K., Kihara, Y., Higashi, Y. (2012): Striking crosstalk of ROCK signaling with endothelial function. *Journal of Cardiology*, 60, 1-6.
- Olson, M. F. (2008): Applications for ROCK kinase inhibition. *Current Opinion in Cell Biology*, 242-248.
- Pan, P., Shen, M., Yu, H., Li, Y., Li, D., Hou, T. (2013): Advances in development of Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitors. *Drug Discov. Today*, 18 (23-24), 1323-33.
- Paňková, K., Rösel, D., Novotný, M., Brábek, J. (2010): The molecular mechanisms of transition between mesenchymal an amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cellular and molecular life science*, 67(1), 63-71.
- Patel, A., Ozsahin, M., Mirimanoff, R. O., Bhatia, S., Chang, K., Miller, R. C. (2012): The rare cancer Network: Achievements from 1993 to 2012. *Rare Tumors*, 4, 110–114.
- Quigley, H. A., Broman, A. T. (2006): The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *The British Journal of Ophthalmology*, 90, 262–267.
- Raad, M., El Tal, T., Gul, R., Mondello, S., Zhang, Z., Boustany, R. M., Guingab, J., Wang, K. K., Kobeissy, F. (2012). Neuroproteomics approach and neurosystems biology analysis: ROCK inhibitors as promising therapeutic targets in neurodegeneration and neurotrauma. *Electrophoresis*, 3659-3668.
- Rader, D. J. (2007). Effect of insulin resistance, dyslipidemia, and intra-abdominal adiposity on the development of cardiovascular disease and diabetes mellitus. *The American Journal of Medicine*, 120, S12–S18. <http://doi.org/10.1016/j.amjmed.2007.01.003>
- Rekhter, M., Chandrasekhar, K., Gifford-Moore, D., Huang, X. D., Rutherford, P., Hanson, J., Kauffman, R. (2007): Immunohistochemical analysis of target proteins of Rho-kinase in a mouse model of accelerated atherosclerosis. *Exp Clin Cardiol*, 12, 169–174.
- Ridley, A. J. (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends in Cell Biology*, 522-529.
- Ridley, A. J. (2012): Historical overview of Rho GTPases. *Methods Mol Biol.*, 827, 3–12.

- Riento, K., Ridley, A. J. (2003): Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4, 446–456.
- Rikitake, Y., Kim, H. H., Huang, Z., Seto, M., Yano, K., Asano, T., Moskowitz, M. A., Liao, J. K. (2005): Inhibition of Rho kinase (ROCK) leads to increased cerebral blood flow and stroke protection. *Stroke*, 36, 2251–2257.
- Rikitake, Y., Liao, J. K. (2005): ROCKs as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 3, 441–451.
- Sahai, E., Marshall, C. J. (2003): Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nature Cell Biology*, 5, 711–719.
- Samples, J. R., Singh, K., Lin, S. C., Francis, B. A., Hodapp, E., Jampel, H. D., Smith, S. D. (2011): Laser trabeculoplasty for open-angle glaucoma: A report by the American academy of ophthalmology. *Ophthalmology*, 118, 2296–2302.
- Satoh, S. I., Utsunomiya, T., Tsurui, K., Kobayashi, T., Ikegaki, I., Sasaki, Y., Asano, T. (2001): Pharmacological profile of hydroxy fasudil as a selective rho kinase inhibitor on ischemic brain damage. *Life Sciences*, 69, 1441–1453.
- Shibata, R., Kai, H., Seki, Y., Kusaba, K., Takemiya, K., Koga, M., Jalalidin, A., Tokuda, K., Tahara, N., Niiyama, H., Nagata, T., Kuwahara, F., Imaizumi, T. (2003): Rho-kinase inhibition reduces neointima formation after vascular injury by enhancing Bax expression and apoptosis. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 42 Suppl 1, S43–S47.
- Shibuya, M., Hirai, S., Seto, M., Satoh, S., Ohtomo, E. (2005): *Effects of fasudil in acute ischemic stroke: results of a prospective placebo-controlled double-blind trial*. *Journal of the neurological science*, 238, 31–39.
- Shifrin, V., Al, E. (2005): Effects of SLx-2119, a novel small molecule inhibitor of Rho-associated kinase ROCK (ROK), on growth of human tumor xenografts in nude mice. *AACR*, 46.
- Shimokawa, H., Morishige, K., Miyata, K., Kandabashi, T., Eto, Y., Ikegaki, I., Asano, T., Kaibuchi, K., Takeshita, A. (2001): Long-term inhibition of Rho-kinase induces a regression of arteriosclerotic coronary lesions in a porcine model in vivo. *Cardiovascular Research*, 51, 169–177.
- Shimokawa, H., Seto, M., Katsumata, N., Amano, M., Kozai, T., Yamawaki, T., Kuwata, K., Kandabashi, T., Egashira, K., Ikegaki, I., Asano, T., Kaibuchi, K., Takeshita, A. (1999): Rho-kinase-mediated pathway induces enhanced myosin light chain phosphorylations in a swine model of coronary artery spasm. *Cardiovascular Research*, 43, 1029–1039.
- Shimokawa, H., Takeshita, A. (2005): Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1767–1775.

- Singh, P., Carraher, C., Schwarzbauer, J. E. (2010): Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 26, 397–419.
- Skarp, K.-P., Vartiainen, M. K. (2010): Actin on DNA-an ancient and dynamic relationship. *Cytoskeleton*, 67, 487–495.
- Somlyo, A. V., Bradshaw, D., Ramos, S., Murphy, C., Myers, C. E. (2000): Rho-kinase inhibitor retards migration and in vivo dissemination of human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 269, 652–659.
- Sommer, N., Dietrich, A., Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Gudermann, T., Schulz, R., Seeger, W., Grimminger, F., Weissmann, N. (2008): Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms. *The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 32, 1639–1651.
- Sugiyama, T., Shibata, M., Kajiura, S., Okuno, T., Tonari, M., Oku, H., Ikeda, T. (2011): Effects of fasudil, a Rho-associated protein kinase inhibitor, on optic nerve head blood flow in rabbits. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 52, 64–69.
- Suzuki, Y., Shibuya, M., Satoh, S., Sugiyama, H., Seto, M., Takakura, K. (2008): Safety and efficacy of fasudil monotherapy and fasudil-ozagrel combination therapy in patients with subarachnoid hemorrhage: sub-analysis of the post-marketing surveillance study. *Neurologia Medico-Chirurgica*, 48, 241–247.
- Takamura, M., Sakamoto, M., Genda, T., Ichida, T., Asakura, H., Hirohashi, S. (2001): Inhibition of intrahepatic metastasis of human hepatocellular carcinoma by Rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632. *Hepatology*, 33, 577–581.
- Tang, B. L., Liou, Y. C. (2007): Novel modulators of amyloid-beta precursor protein processing. *Journal of Neurochemistry*, 100, 314–323.
- Tang, Y., Olufemi, L., Wang, M. T., Nie, D. (2008): Role of Rho GTPases in breast cancer. *Front Biosci.*, 13, 759–776.
- Taniguchi, C. M., Emanuelli, B., Kahn, C. R. (2006): Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7, 85–96.
- Tanihara, H., Inoue, T., Yamamoto, T., Kuwayama, Y., Abe, H., Araie, M. (2013): Phase 2 randomized clinical study of a Rho kinase inhibitor, k-115, in primary open-angle glaucoma and ocular hypertension. *American Journal of Ophthalmology*, 156.
- Tawara, S., Fukumoto, Y., Shimokawa, H. (2007): Effects of combined therapy with a Rho-kinase inhibitor and prostacyclin on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 50, 195–200.
- Torka, R., Thuma, F., Herzog, V., Kirfel, G. (2006): ROCK signaling mediates the adoption of different mode of migration and invasion in human mammary epithelial tumor cells. *Experimental cell research*, 312(19), 3857-71.

- Toshima, Y., Satoh, S., Ikegaki, I., Asano, T. (2000): A new model of cerebral microthrombosis in rats and the neuroprotective effect of a Rho-kinase inhibitor. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, *31*, 2245–2250.
- Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M., Narumiya, S. (1997): Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*, *389*, 990–994.
- Van Nieuw Amerongen, G. P., Vermeer, M. A., van Hinsbergh, V. W. (2000): Role of RhoA and Rho kinase in lysophosphatidic acid-induced endothelial barrier dysfunction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *20*, E127–E133.
- Vasanth Rao, P., Deng, P. F., Kumar, J., Epstein, D. L. (2001): Modulation of aqueous humor outflow facility by the Rho kinase-specific inhibitor Y-27632. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *42*, 1029–1037.
- Vemula, S., Shi, J., Hanneman, P., Wei, L., Kapur, R. (2010): ROCK1 functions as a suppressor of inflammatory cell migration by regulating PTEN phosphorylation and stability. *Blood*, *115*, 1785–1796.
- Wang, S. K., Chang, R. T. (2014): An emerging treatment option for glaucoma: Rho kinase inhibitors. *Clinical Ophthalmology*, *8*, 883–890.
- Ward, Y., Yap, S. F., Ravichandran, V., Matsumura, F., Ito, M., Spinelli, B., Kelly, K. (2002): The GTP binding proteins Gem and Rad are negative regulators of the Rho- Rho kinase pathway. *J Cell Biol*, *157*, 291–302.
- White, M. F. (2002): IRS proteins and the common path to diabetes. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *283*, E413–E422.
- Wingard, C., Fulton, D., Husain, S., Traish, A. (2007): Altered penile vascular reactivity and erection in the Zucker obese-diabetic rat. *Journal of Sexual Medicine*, *4*, 348–363.
- Wolfrum, S., Dendorfer, A., Rikitake, Y., Stalker, T. J., Gong, Y., Scalia, R., Dominiak, P., Liao, J. K. (2004): Inhibition of Rho-kinase leads to rapid activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt and cardiovascular protection. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *24*, 1842–1847.
- Wong, C. C. L., Wong, C. M., Tung, E. K. K., Man, K., Ng, I. O. L. (2009): Rho-kinase 2 is frequently overexpressed in hepatocellular carcinoma and involved in tumor invasion. *Hepatology*, *49*, 1583–1594.
- Xu, E. Z., Kantores, C., Ivanovska, J., Engelberts, D., Kavanagh, B. P., McNamara, P. J., Jankov, R. P. (2010): Rescue treatment with a Rho-kinase inhibitor normalizes right ventricular function and reverses remodeling in juvenile rats with chronic pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *299*, H1854–H1864.

- Yin, L., Morishige, K.-I., Takahashi, T., Hashimoto, K., Ogata, S., Tsutsumi, S., Kurachi, H. (2007): Fasudil inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro and in vivo. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6, 1517–1525.
- Ying, H., Biroc, S. L., Li, W. W., Alicke, B., Xuan, J. A., Pagila, R., Ohashi, Y., Okada, T., Kamata, Y., Dinter, H. (2006): The Rho kinase inhibitor fasudil inhibits tumor progression in human and rat tumor models. *Mol Cancer Ther*, 5, 2158–2164.
- Zhang, K., Zhang, L., Weinreb, R. N. (2012): Ophthalmic drug discovery: novel targets and mechanisms for retinal diseases and glaucoma. *Nature Reviews Drug Discovery*, 541-559.
- Zhang, Z., Yang, M., Chen, R., Su, W., Li, P., Chen, S., Hu, C. (2013): IBP regulates epithelial-to-mesenchymal transition and the motility of breast cancer cells via Rac1, RhoA and Cdc42 signaling pathways. *Oncogene*, 3374–3382.
- Zhou, Q., Gensch, C., Liao, J. K. (2011): Rho-associated coiled-coil-forming kinases (ROCKs): Potential targets for the treatment of atherosclerosis and vascular disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 32, 167-173.
- Zhou, Q., Liao, J. K. (2009). Statins and cardiovascular diseases: from cholesterol lowering to pleiotropy. *Current Pharmaceutical Design*, 15, 467–478.
- Zhou, Q., Liao, J. K. (2009): Rho kinase: an important mediator of atherosclerosis and vascular disease. *Current Pharmaceutical Design*, 15, 3108–3115.
- Zhou, Q., Liao, J. K. (2010): Pleiotropic effects of statins. - Basic research and clinical perspectives -. *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society*, 74, 818–826.
- Zhou, Y., Su, Y., Li, B., Liu, F., Ryder, J. W., Wu, X., Gonzalez-DeWhitt, P. A., Gelfanova, V., Hale, J. E., May, P. C., Paul, S. M., Ni, B. (2003): Nonsteroidal anti-inflammatory drugs can lower amyloidogenic A β 42 by inhibiting Rho. *Science* 302, 1215-1217.
- Ziino, A. J. A., Ivanovska, J., Belcastro, R., Kantores, C., Xu, E. Z., Lau, M., McNamara, P. J., Tanswell, A. K., Jankov, R. P. (2010): Effects of rho-kinase inhibition on pulmonary hypertension, lung growth, and structure in neonatal rats chronically exposed to hypoxia. *Pediatric Research*, 67, 177–182.

7. INTERNETOVÉ ZDROJE

- všechny obrázky a tabulky převzaty dne 20. 4. 2015

http://ibidi.com/xtproducts/media/images/category/popup/S_8150X_Angiogenesis_RGB.jpg

http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=3547&loc=ec_rcs

http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=448042&loc=ec_rcs

http://www.microtissues.com/_images/Micro-moldflowchart.jpg

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4194559/figure/F1/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4194559/table/T1/>

<https://www.pinterest.com/microtissues/products/>