

Univerzita Palackého v Olomouci

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Olomouc 2017

Bc. Karolína Poulíková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vliv vybraných ATP-kompetitivních
inhibitorů mTOR kinázy na signalizaci
aryluhlovodíkovým receptorem (AhR)**

Diplomová práce

Karolína Poulíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2017

Vedoucí práce: doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. Ing. Radima Vrzala, Ph.D. za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

Bc. Karolína Poulíková

Souhrn

Aryluhlovodíkový receptor (AhR) je ligandy aktivovaný transkripční faktor zodpovědný za regulaci exprese enzymů metabolizujících xenobiotika. Aktivita tohoto receptoru je ovlivňována vazbou ligandu a posttranslačními modifikacemi, především fosforylací. V bakalářské práci jsem ukázala, že inhibice serin/threoninové kinázy mTOR látkou rapamycinem potencuje signalizaci AhR v přítomnosti ligandu. Signální dráha mTOR je zodpovědná za velké množství nitrobuněčných procesů jako jsou proliferace, apoptóza či organizace buněčného cytoskeletu. Deregulace této dráhy je spojená s procesem karcinogeneze, tudíž se její inhibice stala nadějí léčby nádorových onemocnění.

V diplomové práci byl zkoumán vliv duálních ATP-kompetitivních inhibitorů mTOR kinázy, INK 128, AZD2014 a OSI-027, na signalizaci AhR v přítomnosti jeho ligandů v buněčné linii HepG2 odvozené od hepatocelulárního karcinomu. Nejprve byly určeny netoxické koncentrace testovaných látek metodou MTT a následně stanoveny inhibiční účinky na komplexy mTORC1/C2 metodou Western blotting. Úroveň aktivity AhR byla detekovaná metodou Gene reporter assay a enzymová aktivita CYP1A1 metodou EROD. Hladina CYP1A1 mRNA byla stanovena metodou real-time PCR.

Bylo zjištěno, že komplex mTORC2 není za daných podmínek v buněčné linii aktivován, tudíž nebylo možné prokázat duální účinek inhibitorů. Kombinace testovaných látek s aktivátorem AhR 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem (TCDD) potencovala transkripční aktivitu AhR a expresi CYP1A1 mRNA v závislosti na zvyšující se koncentraci látek. Byla také pozorována indukce katalytické aktivity CYP1A1, která ovšem s rostoucí koncentrací testovaných látek klesala. Samotné inhibitory mTOR neměly vliv na hladinu CYP1A1 mRNA, enzymovou aktivitu CYP1A1 ani na aktivitu AhR.

Tato práce ukázala, že ATP-kompetitivní inhibitory mTOR kinázy potencují účinek aktivace AhR ligandem dioxinem a že mTOR signální dráha ovlivňuje regulaci AhR.

Summary

Aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-activated transcription factor involved in regulation of xenobiotic-metabolizing enzymes. It is activated by ligands or post-transcriptional modifications, especially phosphorylation. In my bachelor thesis, I found that serine/threonine-specific protein kinase mTOR affected dioxin-inducible AhR-dependent CYP1A1 expression in the presence of mTOR inhibitor, rapamycin. AhR regulator which affects its signaling in the presence of ligands. mTOR signaling pathway is responsible for a large number of intracellular processes such as proliferation, apoptosis and cytoskeletal organization. Deregulation of this pathway is associated with a carcinogenesis and its inhibition can be considered as a cancer treatment.

This thesis focuses on the influence of ATP-competitive inhibitors of mTOR, namely INK 128, AZD2014 and OSI-027, on signalisation mediated by the AhR in HepG2 cell line derived from hepatocellular carcinoma. Firstly, the non-toxic concentrations of the substances were determined by MTT method and then the inhibitor's effects on complexes mTORC1/C2 by Western blotting. The level of AhR activity was detected by Reporter gene assay and the enzymatic activity of CYP1A1 by EROD method. CYP1A1 mRNA levels were monitored by real-time PCR.

Complex mTORC2 is not activated in the cell line under these condition. Therefore a dual effect of inhibitors was not proved. The substances were tested itself and in the combination with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). The TCDD-inducible level of CYP1A1 mRNA and transcriptional activity of AhR were increased in the presence of mTOR inhibitors in dose-dependent manner. The induction of TCDD-inducible catalytic activity of CYP1A1 was also observed. However, it was decreased in dose-dependent manner of tested substances. mTOR inhibitors itself had no effect on CYP1A1 mRNA, CYP1A1 enzyme activity and AhR activity.

The results suggest that ATP-competitive inhibitors of mTOR potentiate effect of AhR signaling activation in the presence of its ligand dioxin and that mTOR affects AhR signalling.

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. Ing. Radimu Vrzalovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a věcné připomínky, které mi v průběhu zpracování diplomové práce poskytl. Chtěla bych také poděkovat kolektivu Laboratoře molekulární toxikologie a molekulární farmakologie za ochotu vždy mi pomoci. V neposlední řadě patří velké poděkování mé rodině, která je mi silnou oporou a podporou nejen v dobách studia.

Děkuji také za finanční podporu projektu IGA PrF-2016-003.

Obsah

ÚVOD.....	7
1 BIOTRANSFORMACE.....	8
1.1 Fáze I.....	9
1.1.1 Cytochromy P450	9
1.1.2 Cytochrom CYP1A1	11
1.2 Fáze II.....	11
1.3 Fáze III	12
2 REGULACE EXPRESE ENZYMŮ METABOLIZUJÍCÍCH XENOBIOTIKA ...	13
2.1 Aryluhlovodíkový receptor	13
2.1.1 Signální dráha AhR.....	14
2.1.2 Vliv postranslačních modifikací na aktivitu AhR	15
3 mTOR.....	17
3.1 Komplexy mTORC1 a mTORC2.....	18
3.2 Dráha mTOR a její regulace	19
4 INHIBITORY mTOR.....	21
4.1 Rapamycin a další alosterické inhibitory mTOR (rapalogy)	22
4.2 Duální (ATP-kompetitivní) inhibitory mTOR.....	24
4.3 Duální mTOR/PI3K inhibitory	26
5 CÍL PRÁCE.....	27
6 MATERIÁL A PŘÍSTROJE	28
6.1 Biologický materiál.....	28
6.2 Chemikálie a použité roztoky.....	28
6.3 Laboratorní přístroje.....	30
7 METODIKA.....	31
8 VÝSLEDKY.....	37
9 DISKUZE	46
ZÁVĚR	50
LITERATURA	51
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	58

ÚVOD

Lidská populace je neustále vystavena působení velkého množství cizorodých látek. Ty, které nejsou pro organismus užitečné, nebo jsou dokonce škodlivé, jsou z těla eliminovány detoxifikačním procesem zvaným biotransformace. V průběhu dochází k biochemickým reakcím za účelem snadnějšího vyloučení cizorodé látky z organismu. Biotransformace se dělí do tří částí. V první fázi se zvyšuje polární charakter látky odkrytím či vnesením substituentů v její struktuře za účasti enzymů, mezi které patří i cytochromy P450. Ve druhé fázi dochází ke konjugačním reakcím s endogenní molekulou, při nichž je připojena hydrofilní skupina a posledním krokem je eliminace hydrofilního metabolitu z organismu.

Na regulaci biotransformačních enzymů se podílejí jaderné receptory, mezi které patří i aryluhlovodíkový receptor (AhR). Je to ligandy aktivovaný transkripční faktor, který reguluje mnoho fyziologických dějů buňky a tím pomáhá organismus chránit před nepříznivými vlivy okolí. Aktivace tohoto receptoru je ovlivňována nejen vazbou ligandu, ale i posttranslačními modifikacemi, především fosforylací. Jak bylo poukázáno v mé bakalářské práci, na signalizaci AhR v přítomnosti receptorových ligandů působí serin/threoninová kináza mTOR, která je součástí dvou komplexů (mTORC1/C2) a je významným regulátorem velkého množství nitrobuněčných procesů. Pomocí fosforylace substrátů ovlivňuje translaci, cytoskeletární organizaci, autofagii, apoptózu, proliferaci a růst buňky. Je součástí signální dráhy PI3K/Akt/mTOR, která je deregulována u velkého množství nádorových onemocnění.

S cílem potenciální léčby rakoviny bylo započato velké množství studií zabývajících se inhibicí mTOR signalizační dráhy. V současné době jsou atraktivní ATP-kompetitivní duální inhibitory mTOR kinázy, které jsou schopny inhibovat oba dva komplexy mTOR. Tyto látky naznačují lepší výsledky suprese celé signální dráhy, inhibice syntézy proteinů a indukce zastavení buněk v G1 fázi buněčného cyklu než je tomu u látek, které byly schopny zainhibovat pouze mTORC1 komplex.

V praktické části diplomové práce byl sledován vliv vybraných ATP-kompetitivních inhibitorů mTOR kinázy na signalizaci AhR.

1 BIOTRANSFORMACE

Organismy jsou neustále vystaveny působení velkého množství vlivů z okolního prostředí. Mezi ně můžeme zařadit i cizorodé látky neboli xenobiotika, která mohou způsobit při dlouhodobém působení až nevratné poškození organismů. Je tudíž nutné, aby se s nimi dokázaly samy vypořádat. Proti těmto vlivům si organismy během evoluce vytvořily obranný systém, který nyní odborně nazýváme biotransformací.

Biotransformace neboli metabolismus xenobiotik je komplexní a složitý proces zbavování se nežádoucích látek organismem. Tento děj zahrnuje vstup xenobiotik do těla, transport k buňkám a do buněk, jejich zpracování a konečné vyloučení, což se dá shrnout do pojmu ADME (adsorpce, distribuce, metabolismus, eliminace) (Tsaïoun *et al.*, 2016). Často jsou rozeznávány jen dvě fáze biotransformace, které jsou pro tento proces nejpodstatnější. V současné době se uvádí i třetí fáze zabývající se eliminací metabolitů z buňky ven (Nakata *et al.*, 2006).

Většina xenobiotik, která vstupují do organismu, je lipofilních. Biotransformace má za cíl deaktivovat cizorodou sloučeninu zvýšením jejího polárního charakteru, přeměnit ji na hydrofilní metabolity, které lze poté jednodušeji z těla vyloučit. Látky se po organismu distribuují krevním řečištěm k cílovým tkáním. Do buněk jsou transportovány pasivně, volnou či zprostředkovanou difuzí po směru gradientu koncentrace, endocytosou nebo aktivně za spotřeby energie ve formě adenosintrifosfátu (ATP) proti koncentračnímu gradientu (Knejzlík *et al.*, 2000; Dostálek *et al.*, 2006).

Biotransformační procesy jsou ovlivňovány řadou faktorů. Mezi vnější faktory se řadí například kouření, životní prostředí, výživa a mezi vnitřní faktory věk, pohlaví, patologický stav, těhotenství, genetické predispozice nebo interakce mezi léčivy navzájem ať už se jedná o indukci či inhibici jejich účinku.

Hlavním biotransformačním orgánem jsou játra. S nárůstem věku dochází k poklesu prokrvení jater, což má za následek i snížení biotransformační aktivity organismu. Podobně je tomu tak i při patologických stavech. Onemocnění jater způsobí snížení účinku biotransformace a tím se prodlouží i poločas eliminace léčiv (Dostálek *et al.*, 2006; Jančová *et al.*, 2010).

1.1 Fáze I

První fáze biotransformace je charakteristická probíhajícími chemickými reakcemi, které zvyšují polaritu cizorodé látky pomocí oxidačních, redukčních a hydrolytických reakcí za účasti enzymů typických pro tuto fázi. Nejvýznamnější jsou cytochromy P450, dále také flavinové monooxidázy, reduktázy, alkoholdehydrogenázy, peroxidázy, hydrolázy, esterázy aj. Díky chemickým reakcím dochází k odhalení funkčních skupin nebo k zavedení nových do molekuly xenobiotika, především karboxylových (-COOH), merkapto- (-SH), hydroxy- (-OH), amino- (-NH₂) a karbonylových (=CO) (Dostálek *et al.*, 2006). Mezi takové řadíme N- a S- oxidace, deaminace, N- a O- dealkylace a alifatické a aromatické hydroxylace (Jančová *et al.*, 2010).

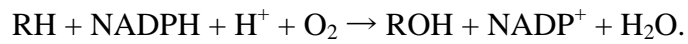
1.1.1 Cytochromy P450

Označení cytochromy P450, zkráceně CYP, zahrnuje velkou skupinu hemoproteinových enzymů obsahujících ve své molekule nekovalentně vázaný protoporfyrin IX. Tyto enzymy hrají významnou roli při metabolismu cizorodých látek. Název P450 získaly díky schopnosti absorpce redukované formy červeného pigmentu (odtud označení P) v játrech s navázaným oxidem uhelnatým světla o 450 nm (Glue *et al.*, 1999). Cytochromy P450 byly poprvé objeveny v roce 1955 v krysích jaterních mikrozomech. V nejvyšší koncentraci se tyto enzymy nacházejí v játrech a tenkém střevě. Intracelulárně jsou lokalizovány na cytozolické straně v membráně hladkého endoplazmatického retikula a v membráně mitochondrií nebo jádra (Mittal *et al.*, 2015; Vrzal *et al.*, 2004; Dostálek *et al.*, 2006).

Termín P450 byl poprvé použit v roce 1962 (Omuta *et al.*, 1962). Díky velkému množství různých CYP byla v roce 1987 navržena nomenklatura a záznamy o enzymech jsou od té doby neustále aktualizovány (Hodgson, 2004). Názvosloví CYP se řídí homologií enzymů v aminokyselinových sekvencích a pro snadnou orientaci se používají arabské číslice a písmena. Členové jedné rodiny sdílejí více než 40% homologii a tato příslušnost je značena číslicí za CYP (např. CYP1). Pokud je rodinu potřeba ještě více rozčlenit, definují se podrodiny na základě vyšší sekvenční podobnosti, v tomto případě více než 55 % (např. CYP1A). Posledním stupněm nomenklatury je dělení na jednotlivé členy (např. CYP1A1), u kterých se sekvence liší o více než 3 % (Mittal *et al.*, 2015; Anzenbacher *et al.*, 2001). U člověka

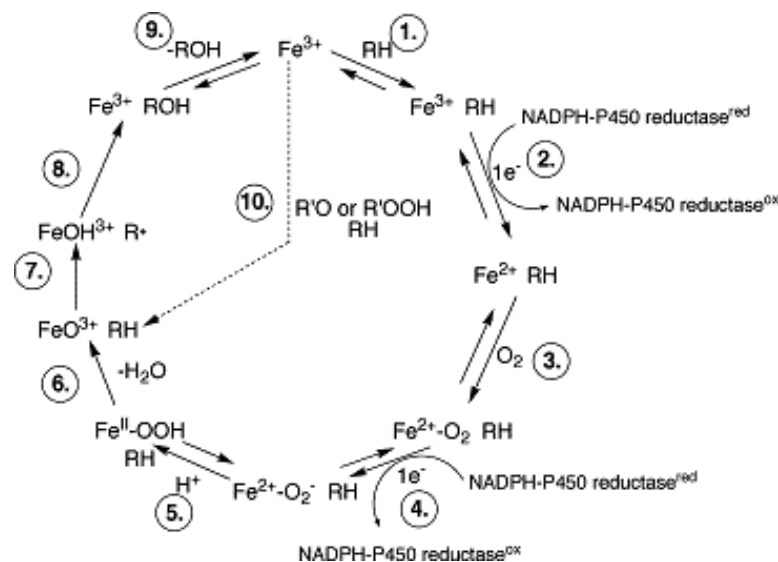
bylo identifikováno 57 genů a více než 59 pseudogenů, které jsou dále rozděleny do 18 rodin a 48 podrodin na základě jejich aminokyselinové sekvence (Mittal *et al.*, 2015).

CYP patří mezi monooxygenázy, což jsou enzymy ze skupiny oxidoreduktáz, které katalyzují vstup jednoho atomu kyslíku do substrátu (RH), s nímž poté vytváří produkt (ROH). CYP ale váží dva atomy kyslíku, druhý se váže do molekuly vody. Katalyzují reakci:



Jsou závislé na dostupnosti nikotinamidadenin dinukleotidfosfátu (NADPH), který představuje zdroj elektronů pro tuto reakci (Sevior *et al.*, 2012; Hodgson, 2004).

Katalytický cyklus je znázorněn na Obrázku 1. Proces začíná navázáním substrátu (RH) na oxidovanou formu železa Fe^{3+} (Bod 1). Vzniká tak komplex $\text{Fe}^{3+}(\text{RH})$, na který je poté přenesen elektron pomocí enzymu NADPH-450 reduktázy a vytváří se $\text{Fe}^{2+}(\text{RH})$ (Bod 2). Do komplexu se naváže kyslík a NADPH-P450 reduktáza je oxidována a komplex přijme elektron a vznikne $\text{Fe}^{2+}-\text{O}_2(\text{RH})$ (Bod 3). V následujícím kroku (Body 5 a 6) dochází k reakci protonu s komplexem a uvolní se první produkt, voda. Vytvoří se komplex $\text{Fe}^{3+}(\text{RH})$ a rozpadne se vazba O-O (Bod 7). Kyslík, dříve vázaný v komplexu s Fe, se dále váže na molekulu RH a vytvoří se druhý produkt, ROH (Bod 8). Posledním krokem (Bod 9) je vytvoření oxidované formy enzymu s Fe^{3+} a dojde k uzavření cyklu (Zuber *et al.*, 2002; Isin *et Guengerich*, 2007).



Obr. 1: Katalytický cyklus cytochromu P450 (Převzato z: Isin *et Guengerich*, 2007)

1.1.2 Cytochrom CYP1A1

Cytochrom CYP1A1 je mikrosomální isoenzym patřící, ještě spolu s CYP1A2, k podrodině CYP1A. Hraje významnou roli v aktivaci karcinogenních polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) a heterocyklických aromatických aminů a amidů (HAA), které vedou k toxicitě a vzniku rakovinného bujení (Ma *et al.*, 2007). Používá se také jako marker aktivace aryluhlovodíkového receptoru (AhR).

Exprese CYP1A1 je indukovaná PAH, například 3-methylchloranthrenem (3-MC), benzo[a]pyrenem (BP), a dioxiny, z nichž nejznámější je 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), přes AhR (Pávek *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2007). Zdrojem prokarcinogenu BP, ligandu AhR, který zvyšuje riziko rozvoje rakoviny plic pro kuřáky, je například cigaretový kouř (Yan *et al.*, 2006).

Gen CYP1A1 se nachází na chromozomu 15q22–q24 (Mittal *et al.*, 2015). Enzym je lokalizován zejména v mimojaterních tkáních, ale i zde se v malém množství nachází. Významná je u něj i substrátová specifita, která z něj dělá jeden z důležitých enzymů detoxikačních procesů organismu.

1.2 Fáze II

Účelem druhé fáze biotransformace, též nazývané jako konjugační fáze, je zvýšení polaritě xenobiotika připojením jiné polární molekuly. Enzymy účastnící se této fáze jsou především transferázy: UDP-glukoronyltransferázy, sulfotransferázy, N-acetyltransferázy, glutathion-S-transferázy a metyltransferázy (Jančová *et al.*, 2010). Obvykle tato fáze slouží jako detoxikační krok v metabolismu cizorodých látek, na druhé straně konjugační reakce mohou hrát také důležitou roli v toxicitě mnoha chemických látek, jelikož se v průběhu mohou tvořit toxické metabolity, například reaktivní elektrofilny (Jančová *et al.*, 2012).

Konjugační reakce obvykle zahrnují metabolické aktivace pomocí meziprojektu o vysoké energii a jsou rozděleny do dvou základních typů. V prvním typu (např. glukoronidace a sulfatace) dochází k reakci mezi substrátem a konjugačním činidlem za vzniku konjugátu. Pro druhý typ (např. konjugace s aminokyselinami) je charakteristická aktivace substrátu a poté kombinace s aminokyselinou, čímž se získá výsledný produkt (Hodgson, 2004).

1.3 Fáze III

Třetí fáze je poslední fází metabolismu xenobiotik a popisuje export metabolitů z buňky ven pomocí transmembránových pump a jejich vyloučení z organismu močí nebo žlučí. Aktivním působením pump dochází ke snižování koncentrace cizorodých látek v intracelulárním prostoru buňky pomocí P-glykoproteinů, OATP (organických aniontů přenášejících polypeptidy) a OCT (organických kationtových přenašečů) a tím k udržení homeostázy organismu (Faber *et al.*, 2003, 2004; Gibson *et Skett*, 2001).

P-glykoprotein, označovaný též jako MDR1 (multidrug resistance 1), je ABC transportér (ATP binding cassette subfamily B member 1) patřící do rodiny transportérů léčiv. Poprvé byl identifikován na základě jeho nadměrné exprese u multirezistentních nádorových buněk, odtud MDR (Scoto, 2003; Juliano *et Ling*, 1976). Skládá se ze dvou velmi podobných podjednotek, z nichž každá obsahuje šest transmembránových segmentů a vazebného místa pro ATP (Schinkel *et Jonker*, 2012).

Konjugáty s kyselinou glukoronovou, sulfátem a glutathionem jsou z buněk vylučovány pomocí peptidů přenášejících organické anionty – OATP. Jsou to transportéry amfipatických organických látek a jsou exprimovány v tenkém střevě, játrech, plicích, placentě, srdci a v řadě jiných tkání (Faber *et al.*, 2003).

2 REGULACE EXPRESE ENZYMŮ METABOLIZUJÍCÍCH XENOBIOTIKA

Biotransformační enzymy jsou regulovány na úrovni transkripce jadernými receptory. Jsou to ligandy aktivované transkripční faktory, které regulují cílové geny spuštěním transkripce v jejich promotorové oblasti nebo navázáním na specifické rekogniční místo zesilovače. Řadíme mezi ně aryluhlovodíkový receptor (AhR), pregnanový X receptor, konstitutivní androstanový receptor, receptor pro kyselinu cis-retinovou, receptor pro kyselinu trans-retinovou, glukokortikoidní receptor nebo receptor pro vitamín D (Nakata *et al.*, 2006).

2.1 Aryluhlovodíkový receptor

Aryluhlovodíkový receptor (AhR) je velmi významným regulátorem exprese enzymů metabolizujících xenobiotika. Poprvé byl identifikován v myších játrech v roce 1976 Polandem a jeho kolegy pomocí radioaktivně značeného TCDD (Poland *et al.* 1976). Patří k bHLH/PAS rodině (basic helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim) a reguluje expresi lidských CYP1A1/2 a CYP1B1 a také některých enzymů druhé fáze biotransformace (UDP- glukoronyltransferáz, glutathion-S-transferáz aj.) (Mimura *et al.*, 2003; Nebert *et al.*, 2000). K této rodině se řadí také AhR nukleární translokátor (ARNT) a AhRR (AhR represor) (Nakata *et al.*, 2006).

Typickými exogenními ligandy AhR jsou PAH a TCDD. To jsou látky, které mohou vyvolat řadu toxických účinků na organismus jako imunosupresi, karcinogenezi, hepatotoxicitu, teratogenezi, epiteliární hyperplazii nebo endokrinní disrupci u hlodavců (Barouki *et Morel*, 2001; Nakata *et al.*, 2006). Mezi endogenní ligandy patří například indirubin, equilenin, tryptofanové metabolity a metabolity kyseliny arachidové a hemu. Aktivace AhR je vyvolaná také tryptofanovými produkty ultrafialového záření, 6-formylindolo[3,2-b]carbazol (FICZ) a 6,12-diformylindolo[3,2-b]carbazol (dFICZ) (Nguyen *et Bradfield*, 2008).

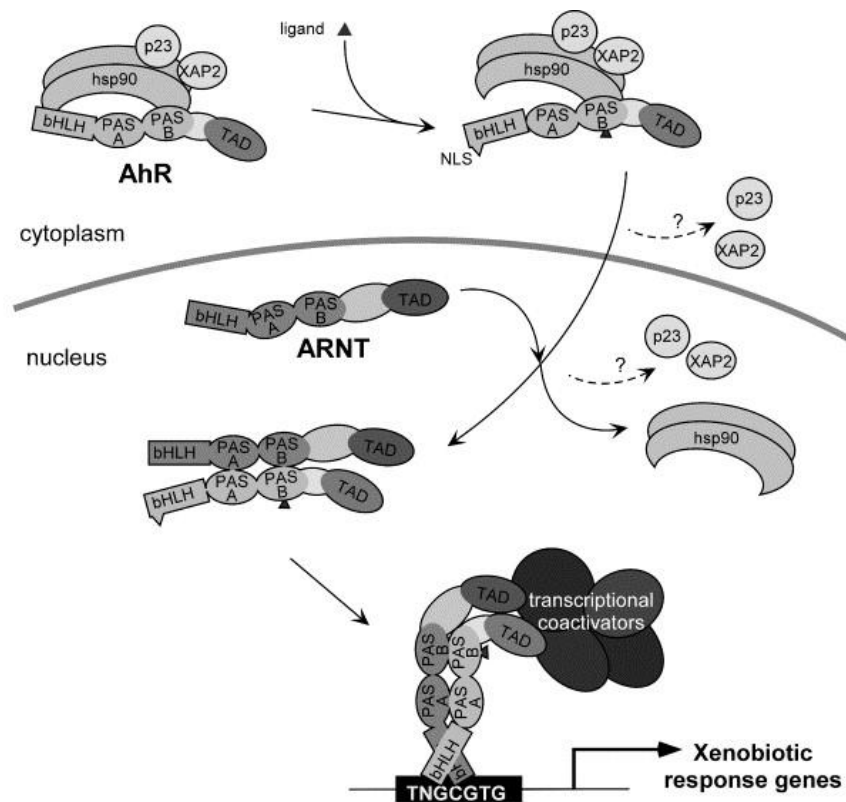
Gen AhR je lokalizován na chromozomu 7p15 (Micka *et al.*, 1997). Na N-terminálním konci proteinu je lokalizovaná doména bHLH složená ze dvou amfipatických α -šroubovic oddělených nespíralovitou smyčkou. Její funkcí je vazba na specifickou sekvenci DNA. Následuje PAS doména, která je složena ze dvou repetitivních o asi 130 aminokyselinách, PAS A a PAS B. Jejím úkolem je zajistit vazbu ligandů, podílet se na tvorbě heterodimeru AhR-ARNT (viz dále) a interakci s Hsp90 (heat shock

protein 90 kDa). Poslední doménou je transaktivační doména na C-terminálním konci, která je bohatá na glutaminové zbytky, které jsou nezbytné pro transkripční aktivitu AhR (Skálová *et al.*, 2011; Kewley *et al.*, 2004).

2.1.1 Signální dráha AhR

Aktivací AhR dochází k expresi cílových genů. Schéma aktivace lze vidět na Obrázku 2. V neaktivní formě je AhR v cytoplazmě v komplexu se dvěma proteiny Hsp90, jedním XAP2 (aryl hydrocarbon receptor interacting protein) a jedním p23 (prostaglandin E syntasa 3). Vazbou ligandu dojde k jeho aktivaci. Změní se konformace a uvolní se Hsp90 a XAP2. AhR se následně translokuje do jádra, kde vytvoří heterodimer s ARNT. Aktivní AhR/ARNT se váže do promotorové oblasti DNA s přesně definovanou sekvencí definované sekvencí 5'-TNGCGTG-3' na xenobiotický (XRE) nebo dioxinový responzivní element (DRE) a spustí se transkripce cílových genů (Hankinson, 2005; Skálová *et al.*, 2011; Mimuraa *et al.*, 2003, Kewley *et al.*, 2004).

Existují i procesy, které mohou AhR signální dráhu zainhibovat. Nadměrná transkripce může vést k produkci vyššího počtu proteinů včetně CYP1A a AhRR. V případě tvorby AhRR může dojít ke kompetici s AhR o vazbu s ARNT. Začnou se tvořit transkripčně inaktivní dimery AhRR/ARNT a signální dráha se zastaví. V případě CYP1A dojde k metabolizaci ligandů a tvoří se aktivní metabolity, které vytvářejí nebezpečné adukty s DNA. Zároveň se tvoří peroxid vodíku, který vede k oxidativnímu stresu buňky. Peroxid vodíku společně s cytokiny aktivují NF- κ B faktor (nuclear factor kappa B), který inhibuje AhR, což má za následek inhibici produkce CYP1A (Renton, 2001).



Obr. 2: Schéma signální dráhy aryluhlovodíkového receptoru (Kewley *et al.*, 2004).

2.1.2 Vliv postranslačních modifikací na aktivitu AhR

Posttranslační modifikace (PTM) jsou biochemickými procesy, v nichž jsou zbytky aminokyselin v proteinu kovalentně modifikovány, a to nejen po jejich konečné syntéze, ale i během ní. Modifikovány mohou být postranní řetězce aminokyselin nebo může dojít ke štěpení peptidové vazby proteinu. Výsledkem jsou jedinečné vlastnosti proteinů. Rozlišujeme dva druhy PTM, reverzibilní (acetylace, ubikvitinylace, fosforylace aj.) a ireverzibilní (prenylace, lipidové modifikace) (Walsh *et al.*, 2015; Prabakaran *et al.*, 2012). Genová exprese je ovlivňována především aktivací receptorů vazbou ligandů, ale velmi významně se na ní podílí i PTM.

Fosforylace je proces, při kterém dochází k zavádění zbytků kyseliny fosforečné do organické sloučeniny, a to především na aminokyselinových zbytcích serinu (Ser), threoninu (Thr) a tyrosinu (Tyr). Donorem PO_3^{2-} je ATP (Prabakaran *et al.*, 2012). Fosforylace jsou katalyzovány kinázami. Tato kovalentní modifikace kontroluje transkripční aktivitu, intracelulární distribuci a stabilitu AhR. Probíhá na C-terminálním konci AhR *in vitro* a je katalyzovaná například proteinkinázou C (PKC) a mitogeny aktivovanými protein kinázami (MAPKs) (Henklová *et al.*, 2008; Delescluse *et al.*,

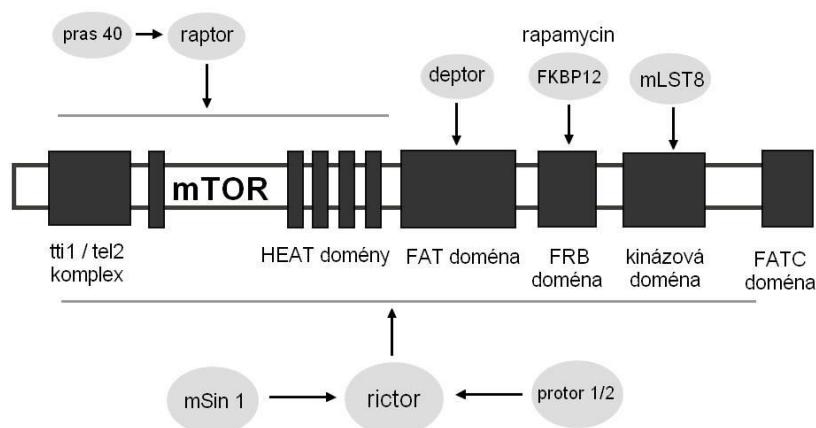
2000). AhR i ARNT patří mezi fosfoproteiny a oba tyto proteiny jsou fosforylovány na threoninových zbytcích. Existují studie, které ukazují důležitost PKC pro aktivitu AhR, především pro vazbu do DNA a genovou transaktivaci. Inhibitory PKC (např. staurosporin) inhibují transkripci CYP1A1 indukovanou dioxinem a 3-MC (Chen *et Tukey*, 1996). Fosforylace je důležitá i pro transformaci inaktivního AhR do aktivního dimeru AhR/ARNT (Li *et Dougherty*, 1997) a ovlivňuje i vazebnou aktivitu heterodimeru do promotorové oblasti DNA (Puga *et al.*, 2002).

Inhibitory serin/threoninových fosfatáz (např. kyselina okadaiová) zvyšují genovou expresi řízenou AhR, což naznačuje zapojení serin/threoninové kinázy v aktivaci AhR signální dráhy (Park *et al.*, 2000; Li *et al.*, 1997; Ikuta *et al.*, 2004).

3 mTOR

Protein mTOR (mammalian target of rapamycin), savčí rapamycinový cíl, je serin-threoninová kináza o velikosti 289 kDa patřící do rodiny fosfatidylinositol 3-kináza (PI3K) příbuzných protein kináz (PIKK). Hraje důležitou roli v regulaci růstu buňky, jejím přežití a v celé řadě dalších buněčných procesů (Sun, 2013).

mTOR je složena z 2549 aminokyselin a zahrnuje několik konzervativních strukturních domén (viz Obr. 3). Na N-terminálním konci se nachází 20 tandemově se opakujících HEAT domén (Huntingtin-Elongation factor 3-regulatory subunit A of PP2A-TOR1 repeats). Každá doména je složena ze dvou α helixů o asi 40 aminokyselinách a specifických hydrofilních a hydrofobních zbytcích. Na C-konci mTOR se nachází FATC doména (FRAP-ATM-TTRAP doména), se kterou interaguje mLST8 (viz kapitola komplexy mTORC1 a mTORC2) a také kinázová doména, která je sekvenčně podobná s katalytickou doménou fosfatidylinositol-3-kinázy. Dále se na mTOR kináze nachází FAT doména (FAT-carboxy terminal doména) a FRB doména (FKBP12-rapamycin binding domain) (Hay *et* Sonenberg, 2016; Laplante *et* Sabatini, 2012).



Obr. 3: Schématické znázornění mTOR kinázy a její interakční místa (nakresleno podle Laplante *et* Sabatini, 2012)

3.1 Komplexy mTORC1 a mTORC2

V důsledku rozdílné senzitivity k rapamycinu, funkci a ve vazbě dalších proteinů se mTOR dělí na dva odlišné multiproteinové komplexy: mTORC1 a mTOR2 (Liao, 2014). Jsou to dva velké proteinové komplexy, které spolu sdílí serin/threoninovou kinázu mTOR, dektor (DEP domain containing mTOR-interacting protein), mLST8 (mammalian lethal with sec-13 protein 8, GβL) a Tti1/Tel2 komplex. Komplex mTORC1 navíc obsahuje protein raptor (regulatory-associated protein of mTOR) a protein pras40 (proline-rich Akt substrate 40 kDa). Naopak pro mTORC2 jsou typické proteiny rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), mSin1 (mammalian stress-activated map kinase-interacting protein) a protor 1/2 (protein observed with rictor 1 and 2) (Laplante *et al.*, 2012).

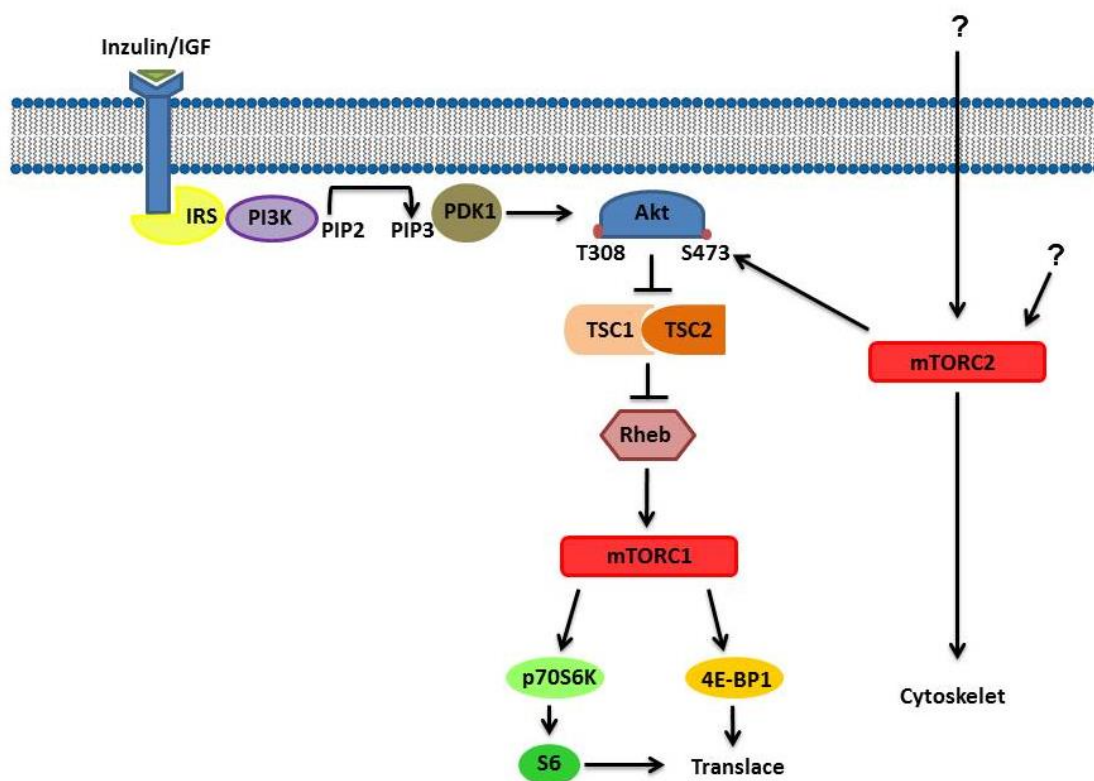
Komplex mTORC1 je aktivní pokud jsou buňce k dispozici živiny. Dochází poté ke stimulaci anabolických procesů, jako jsou syntéza bílkovin a lipogeneze, zatímco je autofagie potlačena. Komplex může být aktivován nesčetným množstvím aminokyselin, cytokinů, přítomností kyslíku nebo růstových faktorů. Jedním z významných růstových faktorů je inzulin nebo inzulinu podobný růstový faktor-1 (IGF-1), které projevují svůj účinek na mTORC1 prostřednictvím tyrosinkináz a PI3K/Akt a Ras-Raf-Mek-Erk signální dráhy (Matter *et al.*, 2014). mTORC1 podněcuje buněčný růst pomocí regulace translace proteinů skrz fosforylaci S6 kinázy 1 (S6K, p70S6K, 70-kDa ribosomal protein S6 kinase-1) a eIF4E-vazebného proteinu 2 (4E-BP1, elongation factor 4E binding protein 1) (Liao, 2014; Chiang *et al.*, 2007). Fosforylaci je 4E-BP1 inhibován, naopak S6K1 je aktivována (Thomas *et al.*, 1997).

Pro uvedení do funkčního stavu mTORC2 nejsou potřeba živiny, na rozdíl od mTORC1 jsou pro něj důležité pouze růstové faktory, které jej aktivují. Jeho role spočívá v cytoskeletární organizaci, regulaci metabolismu a přežití buňky (Matter *et al.*, 2014). mTORC2 je také důležitý pro regulaci růstu, proliferaci a angiogenezi nádorových buněk vzhledem k jeho podílu na fosforylaci protein kinázy B (Akt) na Ser⁴⁷³ zbytcích, které jsou nezbytné pro maximální aktivaci Akt (Liao, 2014). Na mTORC2 se komplex FKBP12-rapamycin vázat nemůže, což znamená, že tento komplex je rezistentní k inhibici rapamycinem (Sarbasov *et al.*, 2004). Ovšem při chronické expozici rapamycinu může být narušena jeho struktura a dojde k inhibici sestavení mTORC2 a ke snížení fosforylace Akt (Laplante *et al.*, 2012; Sarbasov *et al.*, 2006).

3.2 Dráha mTOR a její regulace

mTOR je součástí signální dráhy PI3K/Akt/mTOR, která je jednou z hlavních drah v procesu karcinogeneze. Jelikož odchylky v jednotlivých složkách byly objeveny u velkého množství nádorových onemocnění, stala se tato dráha nadějí onkologické terapie (Študentová *et* Melichar, 2010). Samotná mTOR signalizační dráha je často aktivovaná skrz aktivaci nadřazené signální dráhy PI3K/Akt, která je deregulovaná ve více než 50 % všech typů rakoviny (Sun, 2013; Basu *et al.*, 2015). Existuje spousta mechanismů, které normální funkci dráhy mohou narušit. Jedná se například o mutace nebo ztrátu regulátorů dráhy PI3K/Akt/mTOR (Študentová *et* Melichar, 2010). Mimo nádorové onemocnění se deregulace mTOR vyskytuje i u dalších lidských onemocnění, mezi něž patří i diabetes mellitus 2. typu, neurodegenerace či obezita (Laplane *et* Sabatini, 2012). Hlavním úkolem dráhy mTOR je regulovat proteosyntézu, degradovat nepotřebné či poškozené proteiny nebo organizovat buněčný cytoskelet (Študentová *et* Melichar, 2010).

Signální dráha, znázorněná na Obrázku 4, je aktivovaná vazbou ligandu na receptor. Ligandem mohou být hormony či růstové faktory, např. IGF (insulin-like growth factor) (Študentová *et* Melichar, 2010). Po navázání těchto látek je receptor aktivován a dochází k přenosu signálu do intracelulárního prostředí buňky pomocí adaptorového proteinu IRS (insulin receptor substrate) a aktivaci PI3K, která fosforyluje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂) na fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát (PIP₃). Dochází k aktivaci PDK1 (Phosphoinositide-dependent kinase 1), která fosforyluje Akt na Thr³⁰⁸. Další možností aktivace Akt je aktivace mTORC2 komplexu, který fosforyluje Akt na Ser⁴⁷³. Aktivací Akt je dosaženo inhibice komplexu tuberózní sklerózy (TSC1/2), který inaktivuje GTPázu Rheb, klíčového regulátora aktivity mTORC1 komplexu. Následně dochází ke stimulaci mTORC1 komplexu, který fosforyluje p70S6K a 4E-BP1. Fosforylací p70S6K dochází k aktivaci 40S ribozomálního proteinu S6 a poté k úspěšné translaci. Protein 4E-BP1 je v klidovém stavu vázán s proteiny eIF-E4 (eukaryotic translation initiation factor 4E). Fosforylace je v tomto případě inhibiční. Dojde k disociaci těchto dvou proteinů a tím se umožní interakce 4E-BP1 s jinými proteiny potřebnými pro syntézu proteinů, což vede ke stimulaci translace (Laplane *et* Sabatini, 2012; Zoncu *et al.*, 2011; Lamming *et al.*, 2013).



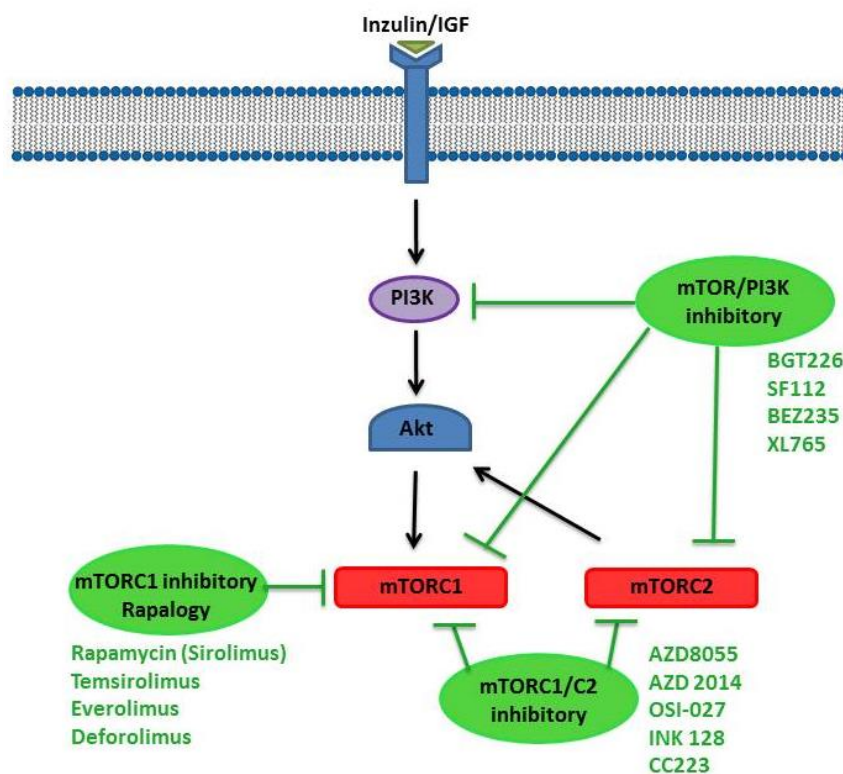
Obr. 4: Signální dráha mTOR (překresleno podle URL: <http://qian.human.cornell.edu/Research-mTOR.htm> [cit. 2017-02-18])

Protein mTOR je zodpovědný za udržování homeostázy celého organismu. Jeho deregulace vede k metabolickým poruchám či karcinomům. Snížením aktivity signální dráhy mTOR dochází k útlumu procesu stárnutí, jelikož je důležitým senzorem živin a růstových faktorů buňky. Tento objev dává do budoucna naději pacientům čelit procesům stárnutí, ale především nemocem souvisejícím s věkem (Cornu *et al.*, 2013). Aktivací mTORC1 se podporuje syntéza proteinů a také dochází k vyčerpávání kmenových buněk organismu (Castilho *et al.*, 2009), čímž se sníží i schopnost opravy tkání a objeví se tkáňové dysfunkce. Navíc aktivace inhibuje autofagii. Časem tyto procesy mohou mít za následek buněčný stres (nadměrnou agregaci proteinů, oxidativní stres, dysfunkci organel), který může vést k akumulaci poškození, snížením funkčnosti buňky a tím podpořit rozvoj nemocí souvisejících se stárnutím obyvatelstva (např. neurodegenerace, rakovina). Zabránit stárnutí a schopností regulovat tyto nežádoucí procesy by měla pomoci nutriční dieta nebo právě použití inhibitorů, především rapamycinu (Laplante *et al.*, 2012).

4 INHIBITORY mTOR

Velká většina studií zabývajících se mTOR signalizační dráhou v souvislosti s potenciální léčbou rakoviny se především zabývala rapamycinem a jeho deriváty (rapalogy), které ovšem inhibují pouze mTORC1 komplex, ale ne mTORC2. V současné době byl započat výzkum s duálními inhibitory mTOR, které jsou schopny inhibovat oba dva komplexy. Předpokladem je lepší protinádorová aktivita duálních inhibitorů než u rapamycinu a jeho analogů (Benjamin, 2011). Duální inhibitory jsou navrženy tak, aby soutěžily o vazebné místo pro ATP na mTOR kináze a naznačují lepší výsledky suprese fosforylace Akt na C-terminálním hydrofobním motivu (Feldman *et al.*, 2009), inhibice syntézy proteinů a indukce zastavení buněk v G1 fázi buněčného cyklu než je tomu tak u rapamycinu (Yu *et al.*, 2009). Dalším příkladem jsou duální mTOR/PI3K inhibitory (Lamming *et al.*, 2013). Všechny třídy inhibitorů, včetně jejich zástupců, jsou znázorněny na Obrázku 5.

Samotná mTOR dráha je chybně aktivována v 50 % případů lidského hepatocelulárního karcinomu, a proto se stala atraktivním cílem pro vývoj léčiv, inhibitorů mTOR, u této nemoci (Liao *et al.*, 2014).



Obr. 5: Inhibitory mTOR signalizační dráhy a jejich příklady (zdroj inhibitorů Matter *et al.*, 2014)

4.1 Rapamycin a další alosterické inhibitory mTOR (rapalogy)

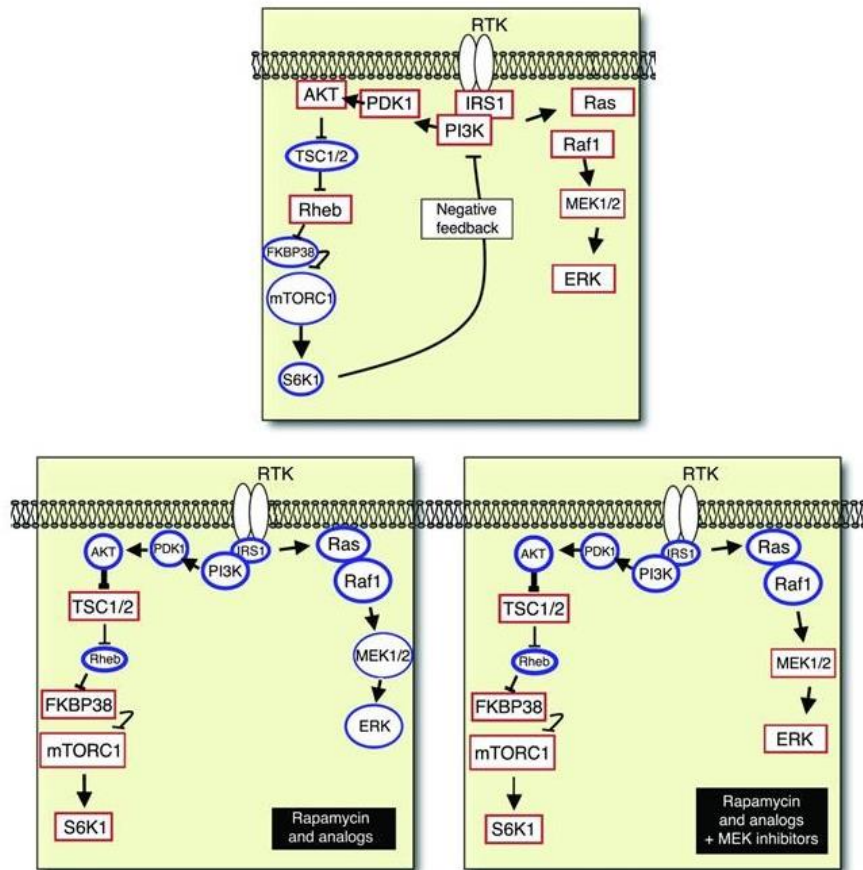
Rapamycin (sirolimus) a jeho analogy (rapalogy) jsou alosterické inhibitory mTOR, které účinkují skrz vazbu na protein FKBP12, imunofilin s prolyl isomerázovou aktivitou, který se váže na FRB doménu mTOR (Sun, 2013; Basu *et al.*, 2015). Pro dosažení lepších farmakologických vlastností byly vyvinuty další rapamycinové deriváty. Některé z nich, například CCI-779 (temsirolimus) a RAD001 (everolimus), již byly testovány a byl demonstrován jejich povzbuzující klinický účinek v léčbě pacientů s metastazujícím karcinomem ledviny (Amato *et al.*, 2009) a neuroendokrinní nádory pankreatu (Yao *et al.*, 2011).

Rapamycin byl objeven v 70. letech 19. století v půdních vzorcích na Velikonočním ostrově jako sloučenina produkovaná kvasinkou *Streptomyces hygroscopicus*, která byla schopná inhibovat proliferaci kvasinky *Candida albicans*, ale neměla žádný vliv na růst bakterií (Viklický *et al.*, 2008; Basu *et al.*, 2015). V roce 1991 byly identifikovány další dva nezbytné proteiny pro jeho aktivitu v kvasinkách a byly nazvány jako cíl rapamycinu 1 (TOR1) a cíl 2 (TOR2). Během let 1994 a 1995 tři nezávislé skupiny vědců izolovaly kinázu o velikosti 289 kDa, která byla zainhibována rapamycin-FKBP12 komplexem v savčích buňkách. Tato kináza je nyní již známá jako mTOR a je přibližně ve 40 % homologní s TOR proteiny *Saccharomyces cerevisiae* (Brown *et al.*, 1994; Sabatini *et al.*, 1994; Sabers *et al.*, 1995; Basu *et al.*, 2015).

U savců bylo zjištěno, že rapamycin inhibuje imunitní reakci. Nyní se v lékařství používá jako imunosupresivum, které má zabránit odmítnutí štěpů u pacientů po transplantaci a pro léčbu autoimunitních poruch (Ingle *et al.*, 2000). Rapamycin také inhibuje proliferaci a růst savčích buněk, což z něj dělá střed zájmu pro jeho možné použití v léčbě rakoviny (Lamming *et al.*, 2013).

Existuje několik důvodů, proč rapalogy působí jen omezeně. Blokováním mTORC1 způsobíme inhibici buněčného růstu, nikoliv však buněčnou smrt (Matter *et al.*, 2014) a dochází jen k inhibici S6K1, ale 4E-BP1 je jen nedostatečně blokován, tudíž nedochází k celkové represí translace mRNA (Choo *et al.*, 2008). Výzkum alosterických inhibitorů při studiu pacientů s hepatocelulárním karcinomem neukázal žádné signifikantní klinické použití pravděpodobně kvůli nedostatku inhibice mTORC2 a právě to byl důvod k syntéze a výzkumu duálních inhibitorů nejen u této nemoci (Liao *et al.*, 2014).

Je známo také propojení mTOR signální dráhy s MAP kinázovou dráhou, které je znázorněno na Obrázku 6. Inhibicí mTORC1 se zruší negativní zpětnovazebná smyčka, která aktivuje PI3K/Akt signální dráhu, což vede k aktivaci MAP kinázové (mitogeny aktivované protein kinázy) signální dráhy. MAP kinázy patří mezi serin/threoninové kinázy, které regulují transkripci, dělení, diferenciaci a růst buněk. Buňka v tomto přijímá signál přes tyrosinkinázový receptor (RTK), který předává signál na IRS, dochází k aktivaci PIK3 a následně i PDK1, která fosforyluje Akt. Aktivace mTORC1 vede k inhibici PI3K a MAP kinázové dráhy pomocí negativní zpětné vazby vycházející z aktivované S6K1 (horní část Obrázku 6). Modré kruhy reprezentují aktivované proteiny, červené obdélníky naopak ty inhibované. Léčba zahrnující inhibitory mTORC1, rapamycin a jeho rapalogy, vede k aktivaci MAP kinázové dráhy. Signál aktivuje dráhu Ras-Raf1-MEK1/2-ERK (spodní levá část Obrázku 6). Kombinace inhibitorů MEK1/2 a mTORC1 může poskytnout terapeutický přínos v léčbě některých nádorových onemocnění, a to prostřednictvím inhibice negativní zpětné vazby a inhibice MAP kinázové dráhy (spodní pravá část Obrázku 6). Tyto výsledky byly pozorovány na vzorcích nádorové tkáně od pacientů s pokročilým stadiem nemoci léčených farmakem RAD001. Léčba RAD001 vedla k aktivaci MAP kinázové dráhy, což bylo pozorováno na myším modelu s rakovinou prostaty. Inhibice MAP kinázové dráhy signifikantně zvýšila protinádorový účinek inhibice mTORC1 rapamycinem u nádorových buněk *in vitro* i v myším modelu (Carracodo *et al.*, 2008).



Obr. 6: Propojení mTOR signální dráhy a MAP kinázové dráhy (Carracodo *et al.*, 2008)

4.2 Duální (ATP-kompetitivní) inhibitory mTOR

S cílem vyplnit nedostatky rapalogů, byly vytvořeny duální mTORC1/C2 ATP-kompetitivní inhibitory. Jejich výhody spočívají v blokaci fosforylace všech známých cílů obou komplexů (Matter *et al.*, 2014). Vzhledem k podobnosti kinázových domén mTOR a PI3K jsou některé z těchto sloučenin navíc schopné inhibovat i PI3K. Tyto sloučeniny tedy vykazují široký inhibiční účinek, který je schopný zablokovat zpětnou aktivaci PI3K/Akt signalizace (Carracodo *et al.*, 2008).

Do této skupiny patří i následující tři sloučeniny, které byly v této práci dále zkoumány.

INK128

Chemický název INK128 je 3-(2-amino-5-benzoxazolyl)-1-(1-methylethyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-amin (strukturní vzorec viz Obrázek 7). Tato látka je také označovaná jako MLN-0128 a byla vyvinuta společností Intellikine Inc/Takeda. Její účinek spočívá ve snížení účinku proteinů rictor a raptor. INK128 je mnohem účinnější v inhibici mnohočetného myelomu ve srovnání s rapamycinem (Maiso *et al.*, 2011; Sun, 2013) a vykazuje vysokou účinnost v preklinických testech při akutní lymfoblastické leukémii. Hodnota IC_{50} pro mTOR je 1 nM (Janes *et al.*, 2013).

První klinická studie pro vyhodnocení bezpečnosti, snášenlivosti a určení tolerované dávky léčiva byla provedena u 39 pacientů s mnohočetným myelomem, non-Hodgkinovým lymfomem a Waldenströmovou makroglobulinémií. Maximální tolerovaná orální dávka byla stanovena na 4 mg dvakrát denně nebo 9 mg podávaných 3 dny po sobě s následnou 4denní pauzou. INK 128 nevykazuje akumulaci v krvi pacientů a průměrný poločas eliminace léčiva z krevní plazmy je 6–8 hodin (Ghobrial *et al.*, 2016).

OSI-027

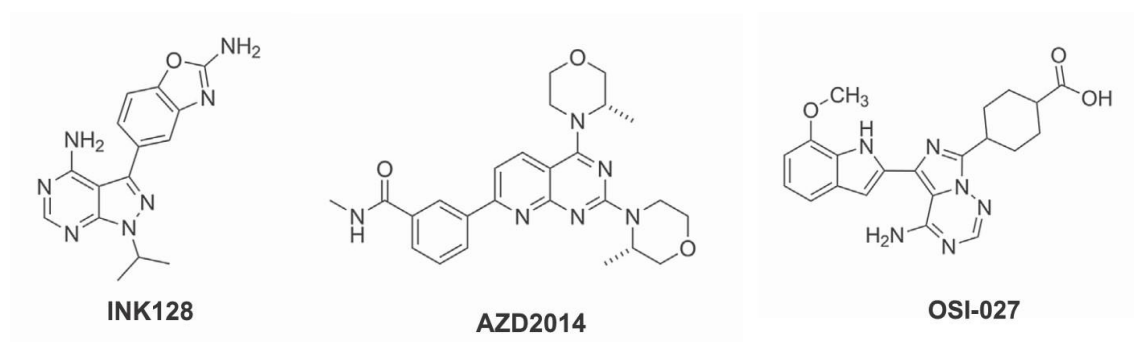
Chemický název sloučeniny OSI-027 je 4,5,7-trisubstituted imidazo[5,1-f]triazin (strukturní vzorec viz Obrázek 7) a byla vyvinuta společností OSI Pharmaceuticals (Farmingdale, NY). Ve srovnání s rapamycinem má tato látka silné protinádorové účinky u různých druhů lidských xenograftových modelů reprezentujících různé tkáně, například rakoviny prsu, vaječnicků, prostaty a plic (Sun, 2013). Tento inhibitor s IC_{50} (mTORC1) 22 nM a IC_{50} (mTORC1) 65 nM (Bhagwat *et al.*, 2011) výrazně snižuje proliferaci a indukuje apoptózu u mnoha typů lymfoidních buněčných linií, konkrétně u akutní lymfoblastické leukémie nebo lymfomu plášťových buněk (Gupta *et al.*, 2012; Sun, 2013).

AZD2014

Chemický název AZD2014 je 3-[2,4-bis(3S)-3-methylmorpholin-4-yl]pyrido[5,6-e]pyrimidin-7-yl]-N-methylbenzamid (strukturní vzorec viz Obrázek 7). Tento inhibitor s IC_{50} (mTOR) 2,8 nM vznikl optimalizací látky AZD8055, u které byla snaha o vylepšení účinku v lidských hepatocytech. Nyní je látka lépe rozpustná a je u ní snížena míra fluktuace při inkubaci s lidskými hepatocyty (Sun, 2013). V lidských

hepatocytech je AZD2014 metabolizován pomocí CYP3A5 a CYP2C8 s malým příspěvkem u enzymu CYP3A4 (Basu *et al.*, 2015). Ve srovnání s rapamycinem, AZD2014 je schopný kompletní inhibice komplexu mTORC1 a inhibice mTORC2, která je prevencí zpětnovazebné aktivace Akt signalizace u lidských buněk hepatocelulárního karcinomu. Má také za následek důkladnější potlačení proliferace, apoptózy, autofagie a zastavení buněčného cyklu v G1 fázi buněčného cyklu (Liao *et al.*, 2014).

Podle uveřejněných výsledků z první fáze testování týmem Basu a kolektivu (2015), kdy byla podávána 56 pacientům orální dávka léčiva mezi 25 a 100 mg dvakrát denně, bylo zjištěno, že je doporučená optimální orální dávka 50 mg dvakrát denně pro druhou fázi testů. Testu se zúčastnilo 19 mužů a 37 žen v průměrném věku 59 let (od 33 do 76 let). Nejvíce zastoupeným typem nádoru byla rakovina prsu. Při této dávce by mělo být možné prokázat relevantní koncentraci léčiva v plazmě a vliv na inhibici nádorového bujení (Basu *et al.*, 2015).



Obr. 7: Strukturální vzorce vybraných duálních ATP-kompetitivních inhibitorů mTOR (Sun, 2013)

4.3 Duální mTOR/PI3K inhibitory

Inhibice dráhy PI3K/Akt/mTOR na jejích různých úrovních může vést k vysoce efektivní léčbě, a to především narušením zpětnovazebné smyčky. Mezi takové inhibitory řadíme mimo jiné BGT226, SF1126, BEZ235, XL765, wortmannin, WJD008 aj. (Matter *et al.*, 2014).

5 CÍL PRÁCE

Účelem diplomové práce bylo zjistit vliv ATP-kompetitivních inhibitorů mTOR kinázy na signalizaci aryluhlovodíkovým receptorem. K dosažení výsledků bylo nutné určit netoxické koncentrace vybraných inhibitorů metodou MTT a s těmi následně pracovat. Cílem bylo též stanovit inhibiční účinky na komplexy mTORC1/2 metodou Western blotting, stanovit aktivitu AhR metodou gene reporter assay, analyzovat hladinu CYP1A1 mRNA metodou real-time PCR a stanovit enzymovou aktivitu CYP1A1.

6 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

6.1 Biologický materiál

- Adherentní buněčná linie HepG2 odvozená od hepatocelulárního karcinomu (ECACC, 85011430)
- Adherentní stabilně transfekovaná reportérová buněčná linie AZ-AhR odvozená od HepG2 buněk pro stanovení transkripční aktivity AhR. Byla získána po transfekci plazmidem pGL-4.27 obsahujícím dioxinové responzivní elementy připojenými k luciferázovému reportérovému genu (Novotná *et al.*, 2011).

6.2 Chemikálie a použité roztoky

- 10% dodecylsírán sodný (Sigma-Aldrich, L3771)
- 10x reakční pufr (Biolabs, F-572B)
- 10x TBS (pH = 7,5; 500ml dH₂O; 15,1 g Tris; 58,4 g NaCl)
- 10x tris-glycin pufr (Bio Basic, A0029)
- 10x tris-glycin-SDS pufr (Bio Basic, A0031)
- 1x fosfátový pufr (PBS, pH = 7,5) (500 ml dH₂O; 4 g NaCl; 0,1 g KCl; 1,605 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O; 0,1g KH₂PO₄)
- 1x migrační pufr (100 ml 10x Tris-glycin-SDS pufr; 900 ml dH₂O)
- 1x TBS/Tween (900 ml dH₂O; 100 ml 10x TBS; 0,5 ml Tween20)
- 1x transferový pufr (100 ml Tris-glycin pufr 10x; 200 ml methanol; 700 ml dH₂O)
- 2,3,7,8-tetrachlordibenop-dioxin (ULTRA Scientific, 48599)
- 2x loading pufr (2,5 ml 4x zaostřovací pufr; 4 ml 10% SDS; 2 mg bromfenolová modř; 2 ml glycerol; 0,31 g DTT; 10 ml dH₂O)
- 40% Akrylamid/bis-akrylamid (Bio Basic, A0007)
- 4x dělicí pufr (pH = 8,8; 72,6 g 1,5M Tris/HCl; 400 ml dH₂O)
- 4x zaostřovací pufr (pH = 6,8; 24 g 0,5M Tris/HCl; 400 ml dH₂O)
- 75% ethanol (Sigma Aldrich, 459844)
- 7-ethoxyresorufin; 2mM (Sigma-Aldrich, E3763)
- AZD2014; 5 mg (Santa Cruz Biotechnology, F1713, sc-354420)
- Bovinní sérový albumin BSA (Sigma-Aldrich, A2153)
- Bradfordovo činidlo (Sigma Aldrich, B6916)
- Deionizovaná voda (dH₂O)
- Dikumarol; 10 mM (Sigma-Aldrich, M1390)
- Dimethylsulfoxid (Lach-Ner s.r.o., 20022-CT0)
- dNTP; 10 mM (Takara; dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
- Fetální bovinní sérum (Sigma Aldrich, F6178)
- Chloroform (Sigma Aldrich, C2432)
- Inhibitor RNA (BioLabs, M0307L)
- INK 128; 5 mg (Santa Cruz Biotechnology, G1015, sc-364511)

- Inzulin; 50 mg (Sigma Aldrich, I6634)
- Izopropanol (Lab-Nev s.r.o., 20037-AT0)
- L-glutamin (Sigma Aldrich, G8513)
- Lyzační pufr pH=7,5 (50 mM HEPES; 5 mM EDTA; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100)
- Lyzační pufr pro Gene reporter assay (5x lyzační pufr, dH₂O)
- Médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma Aldrich, D6546)
- Methanol (Sigma-Aldrich, 65542)
- M-MuLV reverzní transkriptáza (BioLabs, M0253L)
- N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin (Bio Basic, TB0508)
- Neesenciální aminokyseliny (Sigma Aldrich, M7145)
- OSI-027; 10 mg (Santa Cruz Biotechnology, G1315, sc-364557)
- Penicilin-streptomycin antibiotika (Sigma Aldrich, P4333)
- Ponceau S (Sigma Aldrich, P3504)
- Primární protilátka aktin (I-19), koží polyklonální IgG (Santa Cruz Biotechnology, sc-1616)
- Primární protilátka CYP1A1 (H-70), králičí polyklonální IgG (Santa Cruz Biotechnology, sc-20772)
- Primery pro CYP1A1 (GeneriBiotech, Hradec Králové)
 - Sekvence primeru (forward): 5' - CCAGGCTCCAAGAGTCCA - 3'
 - Sekvence primeru (reverse): 5' - GATCTTGGAGGTGGCTGCT - 3'
- Primery pro GAPDH (GeneriBiotech, Hradec Králové)
 - Sekvence primeru (forward): 5' - CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC - 3'
 - Sekvence primeru (reverse): 5' - ACGACCAAATCCGTTGACTC - 3'
- Probes Master (Roche, 04707494001)
- Pufr Dulbecco's Phosphate Buffered Saline PBS (Biosera, LM-S2041)
- Pufr reverzní transkripce M-MuLV (BioLabs, B0253S)
- Random Primer (TaKaRa, 3801)
- Rapamycin (Sigma Aldrich, R8781)
- Sekundární protilátka koží proti králičí IgG (Santa Cruz Biotechnology, sc-2004)
- Sekundární protilátka králičí proti koží IgG (Santa Cruz Biotechnology, sc-2768)
- Substrát pro luciferázu (5 mg D-luciferinu, 9,6 mg ATP, 6,38 mg koenzymu A, 168 mg DTT, 1,32 ml 1mol/l TRIS-acetátu (pH 7,8), 1,23 mg EDTA, 30,3 mg MgSO₄·7H₂O, doplnit do 30 ml dH₂O)
- Sušené mléko (Laktino)
- Tablety complete Mini (Roche, 04693124001)
- Tablety PhosSTOP (Roche, 04906837001)
- TRI reagent (Sigma Aldrich, T9424)

- Triton X-100 (Serva 37 240)
- Trypanová modř (Sigma Aldrich, T6146)
- Trypsin-EDTA; 0,25% (Sigma Aldrich, T4049)
- UPL sonda č. 33 pro CYP1A1 (Roche, 04687663001)
- UPL sonda č. 60 pro GAPDH (Roche, 04688589001)
- WesternSure Premium Chemiluminiscent Substrate (LI-COR, P/N 926-95010)

6.3 Laboratorní přístroje

- Analytické váhy ABS 80-4 (Kern)
- Blotovací přístroj Trans-Blot, SD Semi-Dry transfer cell (Biorad)
- C-Digit Blot Scanner (LI-COR)
- Centrifuga 5415 R (Eppendorf)
- Dry Bath Incubator (Major Science)
- Hlubokomrazicí box MDF-U53V(Sanyo)
- Laboratorní houpačka Rocker Shaker MR-12 (Biosan)
- Laminární flowbox Class II Type A2 (ESCO)
- LightCycler 480 II (Roche)
- Mikroskop inverzní IMT-2 (Olympus)
- Nanodrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific)
- Spektorfotometr Infinite M200 (Tecan)
- Spektorfotometr Infinite M200 Pro (Tecan)
- Stolní centrifuga 5415 R (Eppendorf)
- Termoblok MD-02N (BioTech)
- Vodní lázeň LCB11D (LabTech)
- Vortex Relax top D-91126 (Heidolph)
- Výrobník ledu F100 (Compact)
- Zdroj napětí 300V Enduro (Labnet Internacional)

7 METODIKA

Kultivace buněk

Buněčné linie HepG2 i AZ-AhR byly kultivovány v plastové kultivační lahvi s DMEM médiem obohaceném o 5 ml roztoku 100 U/ml penicilin/streptomycin, 5 ml 4 mM L-glutaminu, 50 ml 10% fetalního bovinního séra a 1% neesenciálních aminokyselin. Lahev byla umístěná v inkubátoru při 37 °C v atmosféře s obsahem 5% CO₂ a vysokou vlhkostí vzduchu. Do média k buňkám AZ-AhR byl každou třetí pasáž přidán hygromycin v konečné koncentraci 0,3 mg/l.

Pasážování a počítání buněk

Pasážování buněk je proces, který musí být prováděn ve sterilním prostředí laminárního boxu přibližně každé tři dny. Z kultivační lahve bylo nejprve odsáto staré médium. Adherentní buněčná linie byla omyta roztokem PBS, který byl následně také odsát. Na celou vnitřní plochu lahve s buňkami byl aplikován 1 ml 0,25% roztoku trypsinu. Lahev byla dána na pět minut do inkubátoru, dokud nedošlo k rozrušení buněčných kontaktů s povrchem lahve a mezi sebou navzájem. Následně bylo přidáno nové médium DMEM (dle velikosti lahve – např. do kultivační lahve o obsahu 75 cm² bylo přidáno 9 ml média) a byla vytvořena homogenní suspenze. Bylo odebráno 10 µl suspenze, která byla smíchána v mikrozkuhavce s 90 µl roztoku trypanové modři. Množství buněk v 1 ml bylo vypočítáno pomocí Bürkerovy komůrky.

Pro metody Real-time PCR a Western blot byly buňky vysety na 6jamkovou destičku a to tak, aby byl 1 milion buněk v jamce ve 2 ml média. Pro metody MTT, Gene reporter assay a EROD jsem použila 96jamkovou destičku, kde bylo vyseto 25 000 buněk na jamku v 200 µl média.

AZ-AhR buněčná linie byla použita pro Gene reporter assay a na zbylé metody HepG2 buňky.

Příprava roztoků a aplikace testovaných látek

Druhý den po vysetí buněk byly na buňky aplikovány ATP-kompetitivní inhibitory mTOR (INK 128, OSI-027 a AZD2014 o koncentracích v ng/ml), TCDD (5 nM) a rapamycin (1 ng/ml). Látky byly rozpuštěny v DMSO. Jako pozitivní kontrola byl použit TCDD (5 nM), jako negativní kontrola 0,1% roztok DMSO.

Inkubace byla ukončena ve třech rozdílných časech v závislosti na použité metodě. Inkubace 30 minut byla použita pro izolaci proteinů a následnou SDS-PAGE. Inkubace 24 hodin byla použita pro izolaci mRNA s následnou real-time PCR a Gene reporter assay a 48 hodin pro detekci katalytické aktivity a MTT test.

Nejprve byly stanoveny vhodné netoxické koncentrace vybraných ATP-kompetitivních inhibitorů mTOR kinázy (INK 128, OSI-027 a AZD2014) pomocí MTT testu a ty byly následně použity pro další metody.

MTT test

Test MTT je metoda, která se používá pro sledování poklesu viability buněk, která je způsobená toxicickým účinkem testované látky na buněčnou kulturu. Jedná se o test životnosti buněk, kdy metabolicky aktivní buňky mají funkční mitochondriální dehydrogenázy, naopak v mrtvých či poškozených jsou neaktivní. Buňky byly inkubovány přibližně 30 minut se žlutým roztokem 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT). Pokud jsou buňky metabolicky aktivní, jsou jejich schopné změnit ve fialovo-modré krystalky formazánu. Roztok MTT byl poté z 96jamkové destičky odstraněn a krystalky na dně jamek byly rozpuštěny pomocí DMSO. Následně byl výsledek vyhodnocen pomocí spektrofotometrické analýzy při vlnové délce 570 nm. Platí, čím vyšší je intenzita modro-fialového zbarvení, tím vyšší je i aktivita mitochondriálních dehydrogenáz, tudíž i životaschopnost buněk. Jako pozitivní kontrola byl použit DMSO a jako nedativní Triton-X100.

Izolace RNA, reverzní transkripce

Pro izolaci RNA byly buňky vysety na 6jamkovou kultivační destičku (jeden milion buněk/jamka). Jamky byly po 24hodinové inkubaci promyty PBS. Následně byl do jamek přidán TRI Reagent a izolace celkové RNA pokračovala dle pokynů výrobce. Na přístroji NanoDrop1000 byla změřena koncentrace RNA, což je údaj, který byl poté použit pro přepis na cDNA.

cDNA byla syntetizována z 1 000 ng celkové buněčné RNA. Pro reverzní transkripci byla použita M-MuLV reverzní transkriptáza a chemikálie, které jsou uvedeny v Tabulce č. 1 po dobu jedné hodiny při 42 °C.

Tabulka č. 1: Příprava reakční směsi pro reverzní transkripci pro jeden vzorek

Reagencie	Objem pro 1 vzorek [μ l]
M-MuLV (reverzní transkriptáza)	0,6
Inhibitor RNAs	0,3
dNTP (10 mM zásobní roztok)	0,6
10x reakční pufr	1,2
Přečištěná voda	3,3
Celkem	6

Real-time PCR (Kvantitativní polymerázová řetězová reakce)

Real-time PCR je metoda, která umožňuje kvantifikovat mRNA. Jako templát se používá cDNA, čímž můžeme sledovat amplifikaci DNA v reálném čase. Pro detekci se používají sondy nebo interkalační barviva. Přístroj termocycler snímá intenzitu emitované fluorescence navázaných sond do molekuly DNA v každém cyklu reakce. Pro vyhodnocení kvantifikace se používá, mimo námi hledaného genu, i referenční gen.

V našem případě byly detekovány gen CYP1A1 a jako referenční gen byl použit GAPDH. Sekvence primerů pro jednotlivé geny se nachází v kapitole 6.2. Nastavení PCR, počty a časy jednotlivých cyklů, jsou uvedeny v Tabulce č. 2 a složení PCR směsi v Tabulce č. 3.

Výsledná data byla zpracována pomocí metody $\Delta\Delta C_t$, díky které došlo ke srovnání úrovně relativní exprese RNA jednotlivých vzorků. Vypočítána byla i hodnota fold induction, která reprezentuje zvýšení exprese oproti negativní kontrole a která byla použita k vytvoření grafu.

Tabulka č. 2: Nastavení PCR

Formát detekce	Mono Color Hydrolysis Probe/UPL Probes		
Objem	10 μ l		
Cyklus	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas	Počet cyklů
Preinkubace	95	10 min	1
Amplifikace	95	10 s	45
	60	30 s	
Chlazení	40	30 s	1

Tabulka č. 3: Složení PCR směsi pro detekci genu pro jeden vzorek

Reagencie	Objem [μl] pro 1 jamku 96jamkové desky
UPL sonda (pro daný gen)	0,2
Směs primerů F+R (pro daný gen)	0,8
2x Probe Master	5
Voda	2
cDNA	3

7-ethoxyresorufin deethylasová aktivita (EROD)

Metoda EROD se používá pro detekci katalytické aktivity enzymu. Buňky byly vysety na 96jamkovou destičku a látky na ní byly aplikovány na 48 hodin. Po uplynuté době bylo médium odstraněno a vyměněno za médium s dikumarolem a ethoxyresorufinem (viz Tabulka č. 4). Následovala inkubace 30 minut a poté bylo smícháno 75 μl obsahu každé jamky spolu se 125 μl methanolu. Nakonec byla změřena fluorescence (excitace 530 nm, emise 590 nm).

Tabulka č. 4: Složení média pro detekci katalytické aktivity CYP1A1 pro 96jamkovou destičku

Reagencie	Objem
Médium DMEM	10 ml
Ethoxyresorufin 2 mM (zásobní roztok 2 mM v DMSO)	40 μl
Dikumarol (zásobní roztok 10 mM v 0,1 M NaOH)	10 μl

Izolace proteinů, stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové

Pro izolaci proteinů byly použity buňky vyseté na 6jamkové destičce s testovanými látkami, které byly inkubovány 30 minut. Buňky byly opláchnuty vychlazeným PBS a poté seškrábnuty do vychlazeného PBS a centrifugovány centrifugací (13 000 RPM/3 min/4 °C). K získanému peletu byl přidán lyzační pufr, rozsuspendován a promíchán vortexem při nízkých otáčkách. Následovala centrifugace (13 000 RPM/13 min/4 °C). Supernatant byl odebrán a použit pro stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové při 586 nm.

Vzorky pro stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové byly zředěny 5krát (5 μl supernatantu + 20 μl vody). Jako kontrola byla použita voda a bovinní

sérový albumin o koncentracích 0,25 µg/µl a 0,5 µg/µl. Výsledná směs byla použita pro přípravu vzorků na SDS-PAGE. Vzorky dle stanovené koncentrace byly naředěny vodou na výsledný objem 15 µl a poté bylo ke každému přidáno 15 µl 2x loading pufru. Vzorky byly denaturovány v termobloku (5 min/95 °C).

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE)

Byl připraven polyakrylamidový gel smícháním potřebných reagensů (viz Tabulka č. 5). Chemikálie TEMED a APS byly přidány nakonec. Do první jamky gelu byly aplikovány 3 µl markeru molekulové hmotnosti a poté 29 µl každého připraveného vzorku. Elektroforetická aparatura byla připojena ke zdroji elektrického napětí, kdy pro zakoncentrování proteinů byl nastaven proud 15 mA/gel, a poté byl zvýšen na 30 mA/gel.

Pro detekci normální i fosforylované formy proteinů p70S6K, Akt a aktinu byl použit 10% dělicí gel. Pro detekci normální i fosforylované formy proteinu 4E-BP1 byl použit 12% gel. V obou případech byl použit 4% zaostřovací gel. Složení gelů a jejich množství je uvedeno v Tabulce č. 5.

Tabulka č. 5: Reagencie a jejich množství pro přípravu dvou 1,5 mm gelů na SDS-PAGE

Reagencie	Dělicí gel (10%)	Dělicí gel (12%)	Zaostřovací gel (4%)
4x dělicí pufr	5 ml	5 ml	-
4x zaostřovací pufr	-	-	2 ml
40% Akrylamid/bis-akrylamid	5 ml	6,25 ml	0,8 ml
dH ₂ O	9,6 ml	8,55 ml	5,12 ml
10% SDS	200 µl	200 µl	80 µl
10% APS	20 µl	20 µl	4 µl
TEMED	200 µl	200 µl	80 µl

Western blotting, imunodetekce a vizualizace proteinů fixovaných na membráně

Proteiny z gelu byly přeneseny na PVDF membránu pomocí Semi-dry blotovací aparatury. Následně byla membrána obarvena Ponceau S a vysušena. Další den byla provedena imunodetekce.

Membrána byla rehydratována methanolem a poté blokována jednu hodinu v 5% roztoku odtučněného mléka v 1x TBS/Tween pufru při laboratorní teplotě. Následně bylo mléko vyměněno za roztok 5% BSA v TBS/Tween pufru s primární protilátkou a membrána byla inkubovaná tři hodiny. Všechny primární protilátky byly ředěny 1 : 1000. Po uplynutí doby byla membrána omyta 3krát 5 minut v TBS/Tweenu. K membráně byl dán roztok 2,5% odtučněného mléka v TBS/Tween se sekundární protilátkou. Pokud byla primární protilátka monoklonální, byla sekundární protilátka ředěna v poměru 1 : 2000, pokud byla polyklonální, byla ředěna 1 : 5000. Detekce byla provedena na skeneru Li-COR (software Image Studio Digits v 3.1 dodávaný výrobcem skeneru) pomocí WesternSure Premium Chemiluminiscent Substrate.

Gene reporter assay (GRA)

Pro GRA byly buňky AZ-AhR vysety na 96jamkovou destičku. Po aplikaci testovaných látek byly inkubovány 24 hodin. Následně byly buňky zbaveny média a promyty PBS. Do každé jamky bylo přidáno 25 μ l lyzačního pufru pro GRA a destička byla uložena do -80°C na minimálně 30 minut. Po této době byla destička rozmrazena při laboratorní teplotě. Roztok v jamkách byl zhomogenizován a poté byly odebrány 3 μ l z každé jamky do černé 96jamkové desky a k nim bylo přidáno 25 μ l luciferázového substrátu. Pomocí spektrofotometru byla detekována aktivita enzymu luciferázy.

8 VÝSLEDKY

V této práci byl testován vliv vybraných ATP-kompetitivních inhibitorů mTOR kinázy na signalizaci AhR. Látky INK 128, AZD2014 a OSI-027 byly vybrány z důvodu schopnosti inhibovat oba komplexy mTORC1 i C2 a rozdílného mechanismu účinku na mTOR na rozdíl od rapamycinu, jehož vliv byl sledován v mé bakalářské práci. Rapamycin působí skrz vazbu na protein FKBP12, který se váže na FRB doménu mTOR a inhibuje pouze komplex mTORC1, zatímco testované látky se vážou přímo, jsou ATP-kompetitivní a jsou schopné zainhibovat oba dva komplexy mTORC1 i C2. Pro testování byla použita HepG2 buněčná linie odvozená od hepatocelulárního karcinomu a stabilně transfekovaná reportérová buněčná linie AZ-AhR odvozená od HepG2 buněk. Kromě samotných inhibitorů byl aplikován také rapamycin, inhibitor mTORC1 komplexu, v kombinaci s TCDD pro srovnání výsledků pocházejících z mé bakalářské práce a výsledků nově získaných. Rapamycin o koncentraci 1 ng/ml v kombinaci s TCDD statisticky významně indukoval hladinu mRNA CYP1A1 ve srovnání s TCDD samotným. Dále byla také pozorována po jeho aplikaci zvýšená exprese CYP1A1 proteinu i katalytická aktivita enzymu CYP1A1 oproti samotnému TCDD, čímž bylo dokázáno, že potencuje účinek aktivace AhR ligandem dioxinem (Poulíková, 2015).

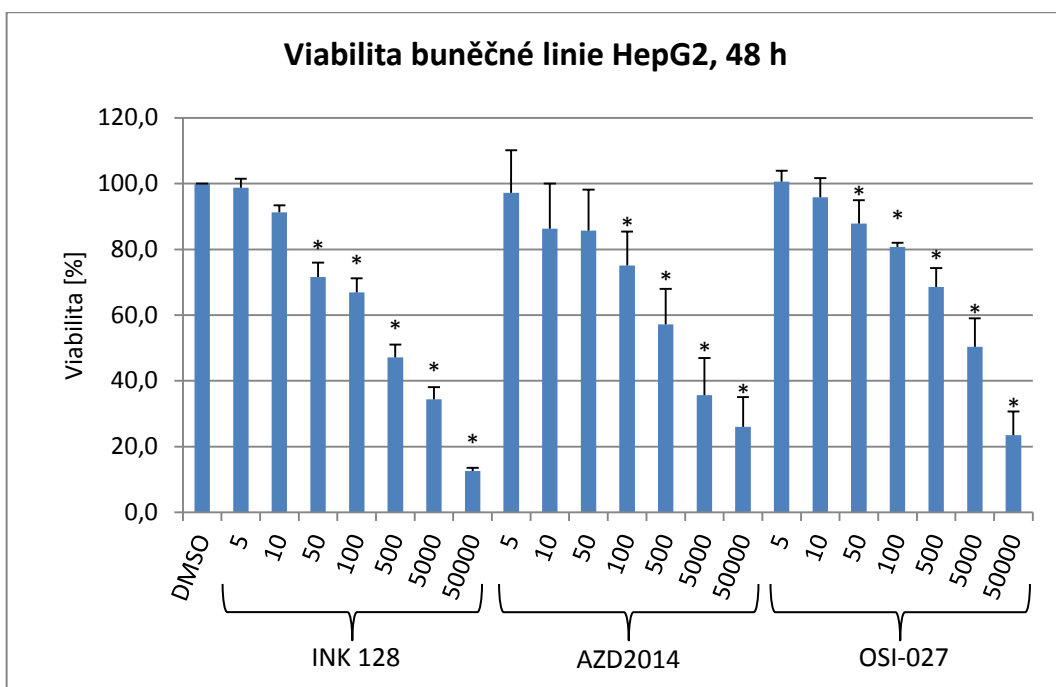
Stanovení netoxických koncentrací vybraných ATP-kompetitivních inhibitorů mTOR kinázy metodou MTT

Nejprve byly u duálních inhibitorů mTOR kinázy stanoveny jejich netoxické koncentrace. Látky byly aplikovány v koncentrační řadě od 5 ng/ml do 50 000 ng/ml a jejich cytotoxicita byla stanovena po 48 hodinách pomocí MTT testu na buněčné linii HepG2. Výsledné zbarvení dokazující životnost buněk bylo měřeno spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm. Po aplikaci testovaných inhibitorů byla změna viability buněk vztažena k negativní kontrole, 0,1% roztoku DMSO. Jako pozitivní kontrola byl použit 2% Triton X-100. Výsledky zobrazené v Grafu č. 1 jsou průměrem tří nezávislých experimentů.

U INK 128 je pozorovatelný významný pokles viability buněk od koncentrace 50 ng/ml a vyšší, což byl důvod, aby byla koncentrace 25 ng/ml vybrána jako nejvyšší netoxická pro další výzkum. Naopak u AZD2014 a OSI-027 vykazují buňky po aplikaci koncentrace 50 ng/ml viabilitu stále větší než 80 %. Cytotoxický účinek je výrazný

u koncentrací 50–50000 ng/ml AZD2014 i OSI-027. Tyto poklesy životnosti buněk byly vyhodnoceny jako statisticky významné.

Pro následné testy vlivu inhibitorů mTOR na signalizaci aryluhlovodíkovým receptorem (AhR) byly vybrány tyto netoxické koncentrace: pro INK 128 – 1, 10 a 25 ng/ml, pro AZD2014 koncentrace 1, 10, 50 ng/ml a pro OSI-027 1, 10, 50 ng/ml.

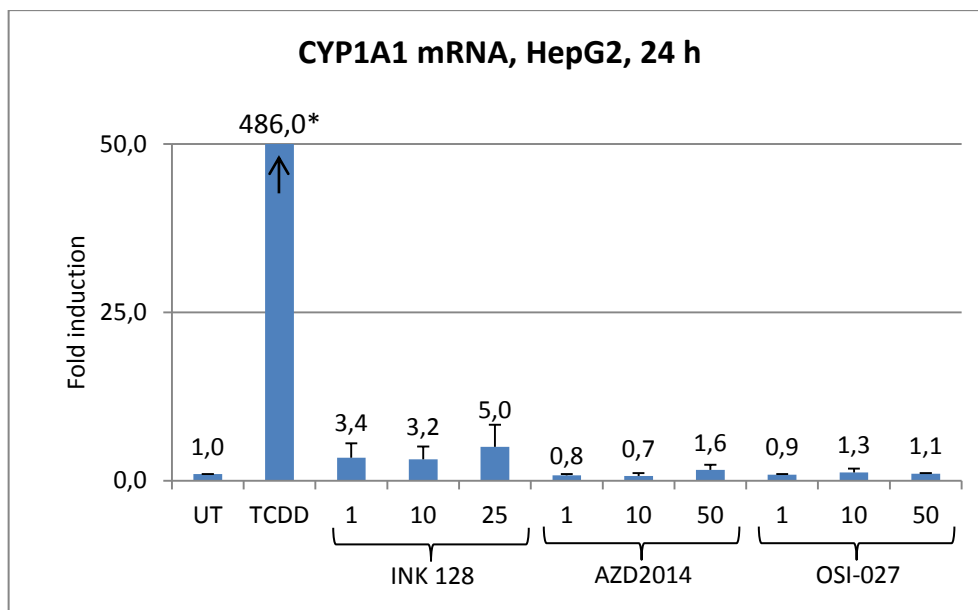


Graf 1: Viabilita buněčné linie HepG2 po aplikaci ATP-kompetitivních inhibitorů mTOR kinázy po 48 hodinách.

Buněčná linie byla inkubována 48 hodin s negativní kontrolou UT (0,1% roztok DMSO), s INK 128 o koncentracích 5–50000 ng/ml, s AZD2014 o koncentracích 5–50000 ng/ml a s OSI-027 o koncentracích 5–50000 ng/ml. Úroveň viability byla vztažena k negativní kontrole, která představuje 100% viabilitu. Hodnoty označené [*] jsou statisticky významné ($P < 0,05$) oproti UT.

Analýza hladiny CYP1A1 mRNA metodou real-time PCR

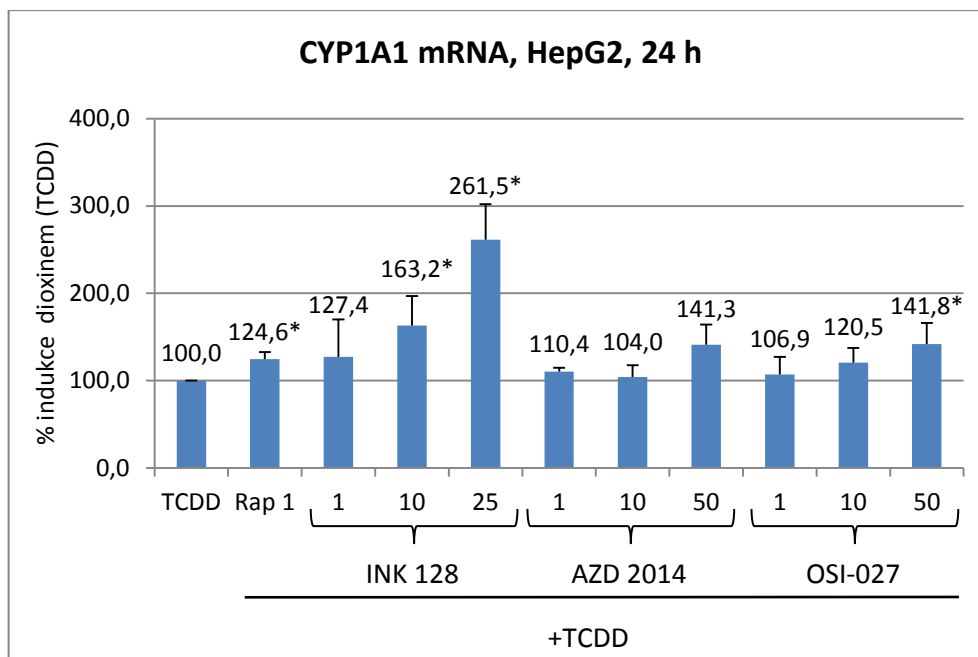
Hladina CYP1A1 mRNA byla detekovaná metodou real-time PCR a buněčná linie HepG2 byla inkubována 24 hodin s testovanými látkami. Jako negativní kontrola byl použit 0,1% roztok DMSO a jako pozitivní 5 nM TCDD. Měření genové exprese bylo provedeno po inkubaci se samotnými inhibitory – agonistický mód (viz Graf 2) i v jejich kombinaci s TCDD a dále také s rapamycinem s TCDD – antagonistický mód (viz Graf 3). Výsledky exprese CYP1A1 mRNA jsou průměrem tří nezávislých experimentů.



Graf 2: Vliv ATP-kompetitivních inhibitorů mTOR kinázy na expresi CYP1A1 mRNA v buněčné linii HepG2. Agonistický mód.

Buněčná linie byla inkubována 24 hodin s negativní kontrolou UT (0,1% roztok DMSO), pozitivní kontrolou 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem (TCDD; 5 nM), s INK 128 o koncentracích 1, 10 a 25 ng/ml, s AZD2014 o koncentracích 1, 10, 50 ng/ml a s OSI-027 o koncentracích 1, 10, 50 ng/ml. Data v grafu jsou normalizována na expresi GAPDH a jsou vyjádřena jako fold induction, násobek indukce oproti kontrolnímu vzorku (UT). Hodnoty označené [*] jsou statisticky významné ($P < 0,05$) oproti UT.

V Grafu č. 2 je vidět, že žádná z testovaných látek ani koncentrací samostatně neindukují hladinu mRNA CYP1A1. V porovnání s TCDD jsou tyto hodnoty zanedbatelné. Oproti tomu kombinace inhibitorů s TCDD (viz Graf 3) zvyšuje úroveň genové exprese. U INK 128 dochází k výrazné potenciaci genové exprese v závislosti na zvyšující se koncentraci. U koncentrace 25 ng/ml je to více než 2,5krát ve srovnání se samotným TCDD. U AZD2014 i OSI-027 je indukce patrná, ale nijak výrazná na rozdíl od TCDD. Výsledky exprese CYP1A1 mRNA jsou průměrem pěti nezávislých experimentů.



Graf 3: Vliv ATP-kompetitivních inhibitorů mTOR kinázy a rapamycinu na expresi CYP1A1 mRNA v buněčné linii HepG2 po 24 hodinách. Antagonistický mód.

Buněčná linie byla inkubována s negativní kontrolou UT (0,1% roztok DMSO), pozitivní kontrolou 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem (TCDD; 5 nM), s rapamycinem o koncentraci 1 ng/ml v kombinaci s TCDD a s ATP-kompetitivními inhibitory mTOR kinázy v kombinaci s TCDD ve všech koncentracích: INK 128 o koncentracích 1, 10 a 25 ng/ml, AZD2014 o koncentracích 1, 10, 50 ng/ml a OSI-027 o koncentracích 1, 10, 50 ng/ml. Data v grafu jsou normalizována na expresi GAPDH a jsou vyjádřena jako procentuální indukce dioxinem (TCDD). Hodnoty označené [*] jsou statisticky významné ($P < 0,05$) oproti TCDD.

Stanovení inhibičních účinků na komplexy mTORC1/2 metodou Western blotting

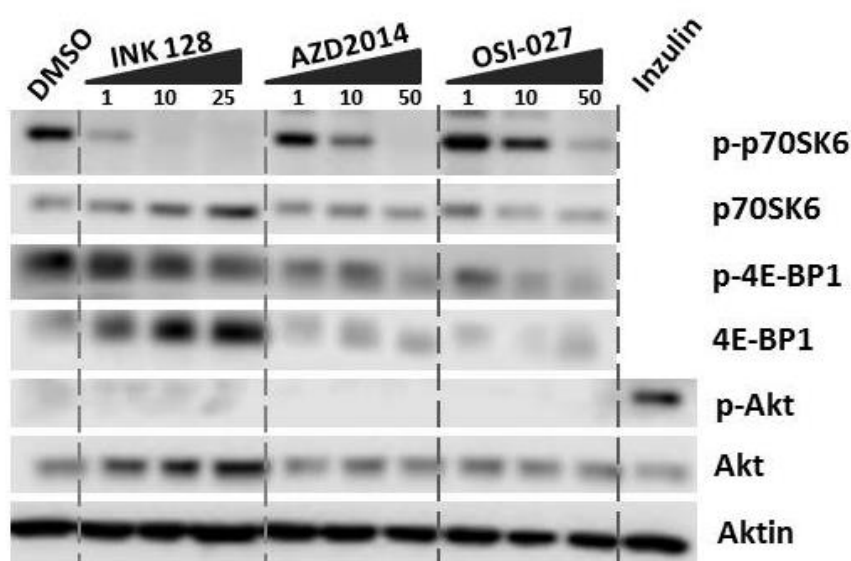
Vzhledem k omezenému koncentračnímu rozsahu bylo třeba ověřit, zda potenciace indukce CYP1A1 může souviset s inhibicí mTOR signalizační dráhy. Proto byla linie HepG2 inkubována 30 minut s testovanými inhibitory mTOR kinázy. Detekovány byly proteiny p70S6K, 4E-BP1 a Akt normální i fosforylované formy (viz Obr. 8) a pro verifikaci byla provedena detekce aktinu. Aktivita mTORC1 byla demonstrována pomocí p70S6K a 4E-BP1, zatím co aktivace mTORC2 pomocí fosforylace Akt. Výsledek je reprezentativní ze dvou detekcí.

Se zvyšující se koncentrací inhibitorů se hladina fosforylované p70S6K kinázy snižovala. U INK 128 je pozorován znatelný úbytek fosforylace na proteinu už při koncentraci 1 ng/ml. Zajímavý je i výsledek detekce fosforylovaného proteinu 4E-BP1. Inhibitory AZD2014 a OSI-027 výrazně snižují hladinu fosforylace tohoto proteinu na rozdíl od INK 128, kde byla detekovaná hladina stále celkem vysoká. INK 128 v nejnižší koncentraci 1 ng/ml neinhibuje fosforylaci 4E-BP1, ale se zvyšující se

koncentrací látky došlo ke snížení hladiny fosforylace. Detekce fosforylace substrátů mTORC1 potvrdila, že všechny testované látky inhibují fosforylaci těchto proteinů.

Při detekci hladiny nefosforylovaného proteinu 4E-BP1 byla zjištěná zvýšená hladina po aplikaci INK 128, což může být způsobené kumulací proteinu v buňce nebo použitím méně kvalitní protilátky.

Neméně podstatná je i úroveň fosforylované Akt kinázy. Bylo zjištěno, že v HepG2 buňkách za standardních kultivačních podmínek není fosforylovaná Akt aktivovaná, tím pádem pravděpodobně ani mTORC2 komplex. Pro ověření účinku protilátky byla hladina p-Akt detekovaná i po inkubaci buněk s inzulinem.

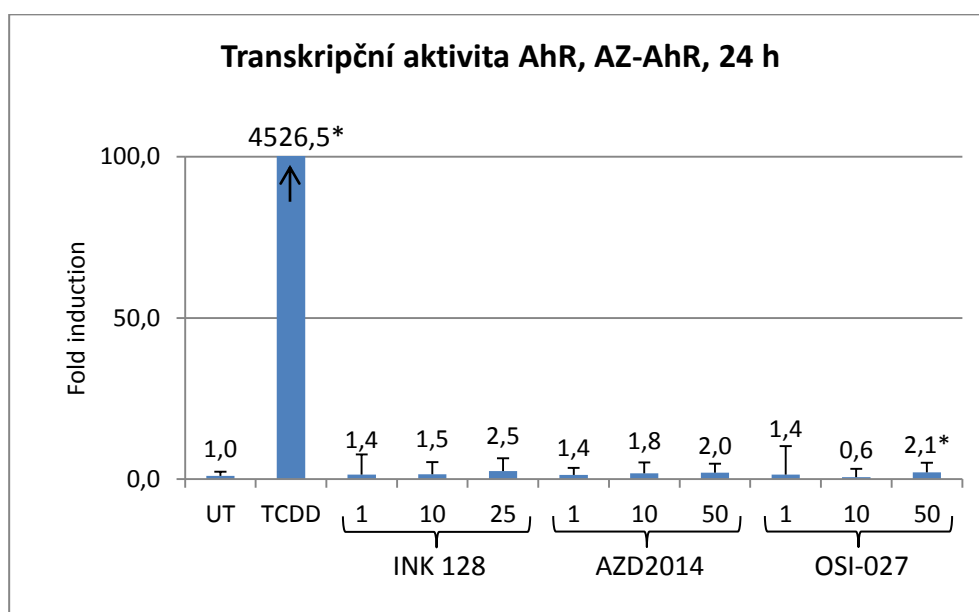


Obr. 8 Hladiny detekovaných proteinů mTOR signální dráhy v buněčné linii HepG2 po 30 minutách.

Buněčná linie byla inkubována 30 minut s negativní kontrolou UT (0,1% roztok DMSO), s INK 128 o koncentracích 1, 10 a 25 ng/ml, s AZD2014 o koncentracích 1, 10, 50 ng/ml, a s OSI-027 o koncentracích 1, 10, 50 ng/ml.

Stanovení aktivity AhR metodou Gene reporter assay

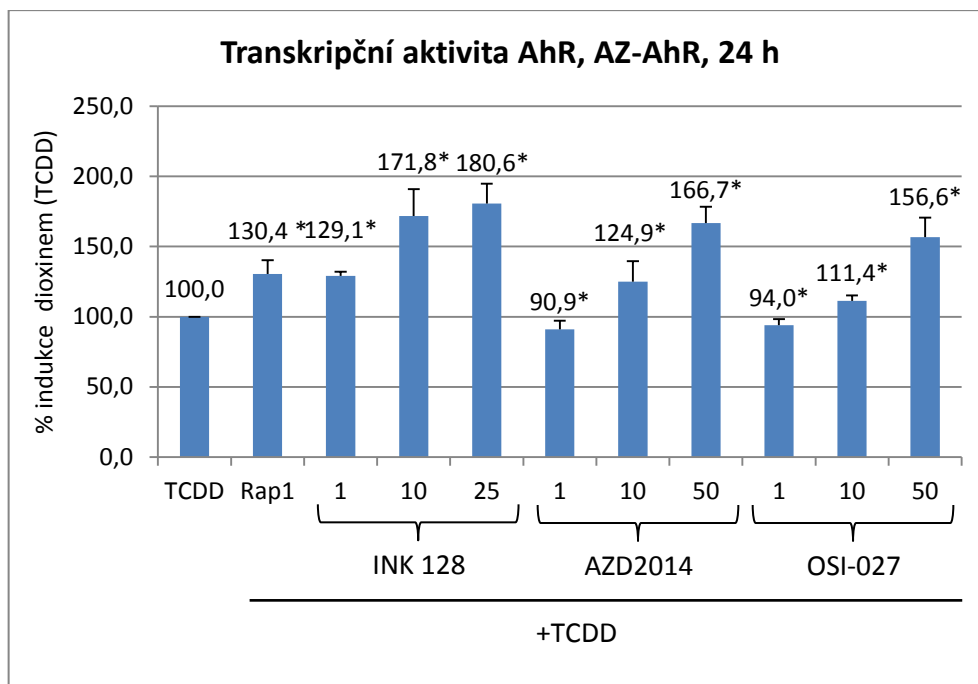
Transkripční aktivita AhR byla stanovena metodou Gene reporter assay. Buněčná linie AZ-AhR byla inkubovaná s testovanými inhibitory 24 hodin. Výsledky v Grafech 4 a 5 jsou vyjádřeny jako fold induction, násobek indukce oproti kontrolnímu vzorku (UT) či pozitivní kontrole (TCDD) a jsou průměrem tří nezávislých experimentů. Měření transkripční aktivity bylo provedeno v agonistickém, se samotnými inhibitory, i antagonistickém módu, s inhibitory v kombinaci s TCDD.



Graf 4: Vliv ATP-kompetitivních inhibitorů mTOR kinázy na transkripční aktivitu AhR v buněčné linii AZ-AhR po 24 hodinách. AhR-závislá luciferázová aktivita. Agonistický mód.

Buněčná linie byla inkubována s negativní kontrolou UT (0,1% roztok DMSO), pozitivní kontrolou 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem (TCDD; 5 nM) a s INK 128 o koncentracích 1, 10 a 25 ng/ml, AZD2014 o koncentracích 1, 10, 50 ng/ml a OSI-027 o koncentracích 1, 10, 50 ng/ml. Data v grafu jsou vztažena k negativní kontrole a jsou vyjádřena jako fold induction, násobek indukce oproti kontrolnímu vzorku (UT). Hodnoty označené [*] jsou statisticky významné ($P < 0,05$) oproti UT.

Výrazně zvýšená transkripční aktivita AhR byla pozorována u TCDD a rapamycinu v kombinaci s TCDD (viz Graf 4 a 5). Z Grafu 4 je patrné, že samotné inhibitory mTOR kinázy aktivují receptor jen ve velmi malé míře. Naopak v kombinaci s TCDD dochází k výrazné indukci. Hodnoty jsou statisticky významné (viz Graf 5). INK 128 už v nejnižší koncentraci s TCDD zvýšil indukci o 29 % oproti samotnému TCDD a tato indukce s rostoucí koncentrací stoupá. U AZD2014 a OSI-027 je patrný mírný statisticky významný pokles transkripční aktivity AhR u koncentrací 1 ng/ml oproti samotnému TCDD, ale u koncentrací 10 a 50 ng/ml je transkripční aktivita vyšší než u samotného TCDD.



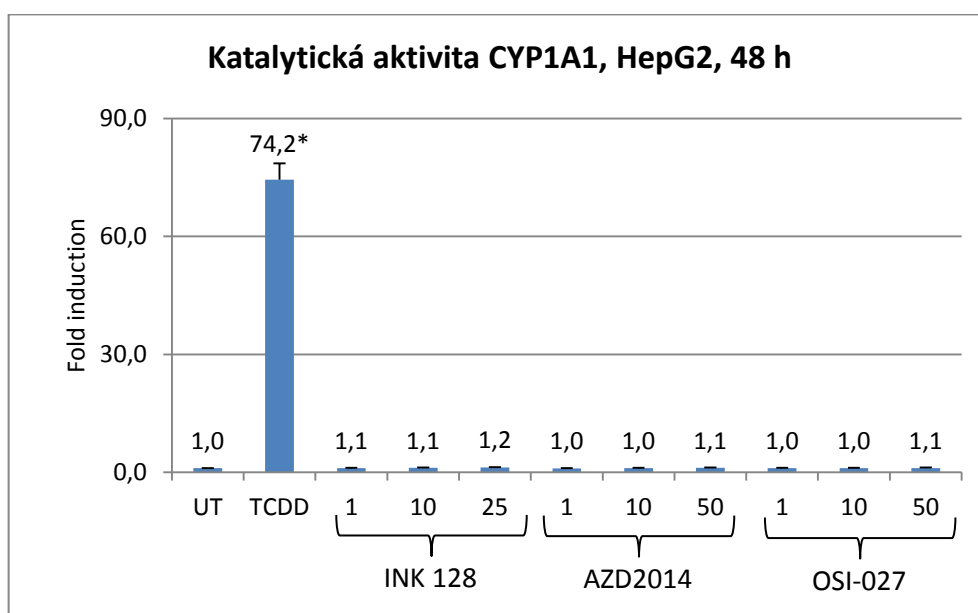
Graf 5: Vliv ATP-kompetitivních inhibitorů mTOR kinázy a rapamycinu na transkripční aktivitu AhR v buněčné linii AZ-AhR po 24 hodinách. TCDD-indukovaná AhR-závislá luciferázová aktivita. Antagonistický mód.

Buněčná linie byla inkubována s negativní kontrolou UT (0,1% roztok DMSO), pozitivní kontrolou 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem (TCDD; 5 nM), s rapamycinem o koncentraci 1 ng/ml v kombinaci s TCDD a s ATP-kompetitivními inhibitory mTOR kinázy v kombinaci s TCDD ve všech koncentracích: INK 128 o koncentracích 1, 10 a 25 ng/ml, AZD2014 o koncentracích 1, 10, 50 ng/ml a OSI-027 o koncentracích 1, 10, 50 ng/ml. Data v grafu jsou vyjádřena jako procentuální indukce dioxinem (TCDD). Hodnoty označené [*] jsou statisticky významné ($P < 0,05$) oproti TCDD.

Stanovení enzymové aktivity CYP1A1

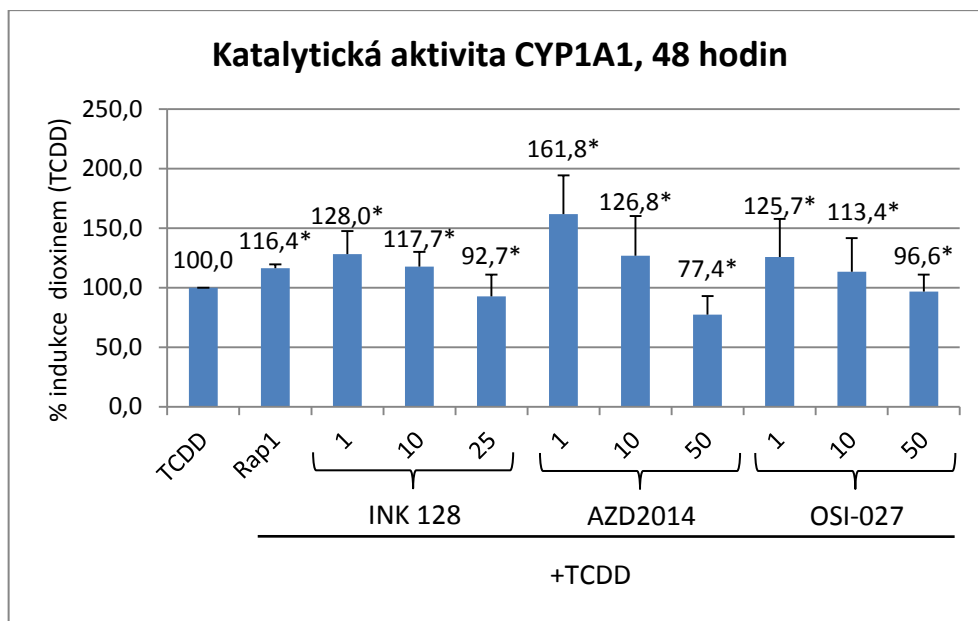
Detekce katalytické aktivity byla provedena metodou EROD. Buněčná linie HepG2 byla inkubovaná s testovanými inhibitory 48 hodin. Detekovaná byla fluorescence (excitace 530 nm, emise 590 nm). Měření enzymatické aktivity bylo stejně jako u předchozích metod provedeno v agonistickém módu, se samotnými inhibitory, i antagonistickém módu, s inhibitory v kombinaci s TCDD. Výsledky v Grafech 7 a 8 jsou vyjádřeny jako fold induction, násobek indukce oproti kontrolnímu vzorku (UT) nebo pozitivní kontrole (TCDD) a jsou průměrem tří nezávislých experimentů.

Z Grafu 7 je patrné, že samotné testované látky nejsou induktory katalytické aktivity na rozdíl od rapamycinu v kombinaci s TCDD a samotného TCDD, které ji výrazně indukují. Vliv na katalytickou aktivitu CYP1A1 má také kombinace testovaných látek s TCDD (viz Graf 8). Všechny inhibitory vykazují stejné vlastnosti. Nejvyšší hodnota po detekci katalytické aktivity CYP1A1 je pozorovatelná u všech látek v koncentraci 1 ng/ml a s nárůstem koncentrace klesá. Všechny hodnoty jsou statisticky významné oproti kontrolnímu vzorku, TCDD.



Graf 7: Vliv ATP-kompetitivních inhibitorů mTOR kinázy na katalytickou aktivitu enzymu CYP1A1 v buněčné linii HepG2 za 48 hodin.

Buněčná linie byla inkubována 48 hodin s negativní kontrolou UT (0,1% roztok DMSO), pozitivní kontrolou 5nM 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem (TCDD) a s INK 128 o koncentracích 1, 10 a 25 ng/ml, AZD2014 o koncentracích 1, 10, 50 ng/ml a OSI-027 o koncentracích 1, 10, 50 ng/ml. Data v grafu jsou vyjádřena jako fold induction, násobek indukce oproti kontrolnímu vzorku (UT). Hodnoty označené [*] jsou statisticky významné ($P < 0,05$) oproti UT.



Graf 8: Vliv ATP-kompetitivních inhibitorů mTOR kinázy a rapamycinu na katalytickou aktivitu enzymu CYP1A1 v buněčné linii HepG2 za 48 hodin.

Buněčná linie byla inkubována s negativní kontrolou UT (0,1% roztok DMSO), pozitivní kontrolou 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem (TCDD; 5 nM), s rapamycinem o koncentraci 1 ng/ml v kombinaci s TCDD a s ATP-kompetitivními inhibitory mTOR kinázy v kombinaci s TCDD ve všech koncentracích: INK 128 o koncentracích 1, 10 a 25 ng/ml, AZD2014 o koncentracích 1, 10, 50 ng/ml a OSI-027 o koncentracích 1, 10, 50 ng/ml. Data v grafu jsou vyjádřena jako procentuální indukce dioxinem (TCDD). Hodnoty označené [*] jsou statisticky významné ($P < 0,05$) oproti TCDD.

9 DISKUZE

Proteinkináza mTOR je součástí signální kaskády PI3K/Akt/mTOR, která reguluje velké množství nitrobuněčných procesů. Její hyperstimulace a deregulace hrají důležitou roli v procesu karcinogeneze a inhibice dráhy se stala nadějí léčby nádorových onemocnění (Študentová *et al.*, 2010).

Aryluhlovodíkový receptor je ligandy aktivovaný transkripční faktor, který je zodpovědný za regulaci exprese enzymů metabolizujících xenobiotika, např. CYP1A1. Díky tomu pomáhá organismus chránit před nepříznivými vlivy okolí. Bylo zjištěno, že nejenom ligandy mají vliv na aktivitu AhR, ale i posttranslační modifikace. Především fosforylace, která je katalyzována kinázami, je schopná ovlivnit translokaci AhR do jádra i vazbu heterodimeru AhR/ARNT na DNA (Puga *et al.*, 2002). A právě serin/threoninová kináza mTOR má vliv na regulaci funkce AhR tím, že ovlivňuje jeho signalizaci v přítomnosti ligandů tohoto receptoru.

Klinické studie zabývající se rapamycinem a rapalogy potvrdily, že inhibice mTOR je slibný proinádorový cíl. Nicméně účinky rapamycinu a rapalogů jsou značně omezené, jelikož tyto látky nejsou schopné inhibovat mTORC2 signální dráhu a inhibice mTORC1 je limitovaná. Stále tedy dochází k aktivaci Akt prostřednictvím uvolňování S6K1 z mTORC1 (Bhagwat *et al.*, 2011; Liao *et al.*, 2014). Významným znakem rapamycinu je také schopnost inhibovat činnost imunitního systému. V lékařství je používán jako imunosupresivum především při transplantacích nebo v léčbě autoimunitních poruch (Ingle *et al.*, 2000). Ovšem tato vlastnost je v některých případech také nevýhodou. Dlouhodobá léčba pacientů mimo sterilní prostředí je spojená s rizikem infekce (Lamming *et al.*, 2013). U pacientů po transplantaci se vyskytly také nežádoucí kožní účinky (Mahé *et al.*, 2005) a snížená fertilita u mužů (Zuber *et al.*, 2008). Studie na myších a primátech prokázala, že rapamycin zvyšuje funkci imunitního systému proti některým virům (Araki *et al.*, 2009). Z tohoto důvodu je intenzivně úsilováno o vyvinutí účinnějších inhibitorů mTOR, které by zainhibovaly oba komplexy a jejichž vedlejší účinky by byly minimální.

I kombinovaná expozice ligandů AhR a inhibitorů mTOR může být inovací v léčbě rakoviny. Bylo prokázáno, že samotný rapamycin inhibicí mTOR zvyšuje citlivost buněk k apoptóze (Guo *et al.*, 2013). Výzkumný tým Pal a kolektiv (2008) provedl experiment na myších, kterým byl podáván nejprve benzo[a]pyren (BP) a následně rapamycin. Prokarcinogen BP můžeme najít v cigaretovém kouři, který

představuje zvýšené riziko pro aktivní i pasivní kuřáky v rozvoji rakoviny plic. Terapie způsobila inhibici progresu nádoru o 84 % (Pal *et al.*, 2008). V tomto případě došlo nejspíše k potenciaci CYP1A1, který vedl k aktivaci BP a vzniku rakovinného bujení. Navozená rakovina plic byla následně léčena inhibítorem mTOR, rapamycinem. Jak již bylo zmíněno, mTOR je deregulovaná v nádorech a její inhibicí evidentně došlo k inhibici progresu nádoru, což může být považováno za nadějnou terapii.

Diplomová práce se zabývá vlivem vybraných ATP-kompetitivních inhibítorů mTOR kinázy na signalizaci AhR. Pro tyto účely byla použita buněčná linie HepG2 odvozená od hepatocelulárního karcinomu a stabilně transfekovaná reportérová buněčná linie AZ-AhR odvozená od HepG2 buněk. Vybrány byly INK 128, AZD2014 a OSI-027. Jako pozitivní kontrola byl použit 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), ligand AhR. Vliv inhibítorů byl zkoumán na úrovni CYP1A1 mRNA, na úrovni aktivity AhR a enzymové aktivity CYP1A1 .

Co se týče experimentů, při nichž byly testované látky aplikovány samostatně, nebyl pozorován znatelný vliv na hladinu CYP1A1 mRNA, ani na transkripční aktivitu AhR a katalytickou aktivitu CYP1A1.

Detekce fosforylace substrátů mTORC1, p70S6K a 4E-BP1 ukázala všechny testované látky jako inhibitory fosforylace těchto proteinů. U INK 128 byla pozorována slabší inhibice fosforylace 4E-BP1 než u AZD-2014 a OSI-027. Aktivace mTORC2 komplexu byla demonstrována pomocí fosforylace Akt, jejíž hladina ovšem nebyla vůbec detekovaná. Výsledek naznačuje, že za daných kultivačních podmínek není fosforylovaná Akt v HepG2 buňkách aktivována, tím pádem pravděpodobně ani mTORC2 komplex. Použitím inzulinu byl ověřen účinek protilátky a schopnost aktivace p-Akt, bohužel inzulin je pouze ligand receptoru spouštějící signální dráhu mTORC1, nikoliv C2. Jak bylo zmíněno v teoretické části práce, spouštěč signální dráhy mTORC2 není přesně znám, tudíž se nepodařilo zcela ověřit funkčnost mTORC2 komplexu, jelikož pro ověření funkčnosti protilátky byl použit právě inzulin. Vhodnější by bylo místo inzulinu použít např. epidermální růstový faktor (Masui *et al.*, 2014), upravit podmínky kultivace buněk nebo použít jinou buněčnou linii, kde by byl mTORC2 aktivován nebo se to alespoň dle konstitutivně fosforylované p-Akt předpokládá.

Účinek duální inhibice mTOR pomocí INK 128 byl potvrzen týmem Jiang *et Wang* (2015), který detekoval inhibici fosforylace substrátů mTORC1 i C2. Test byl

proveden na buněčných liniích PC-3 a LNCaP, kdy byla patrná inhibice hladiny všech fosforylovaných proteinů po působení INK 128. Především byla detekována hladina p-Akt u kontrolního vzorku na rozdíl od mých dat (Jiang *et Wang*, 2015). Tým Liao *et al.* (2014) se také zabýval inhibicí fosforylace proteinů po aplikaci AZD2014 v HepG2 buňkách. Na rozdíl od mnou získaných výsledků byla detekována hladina fosforylace Akt a dokonce se zvyšující koncentrací AZD2014 se snižovala (Liao *et al.*, 2014). Odchytky dat mohou být způsobeny buď použitím buněčné kultury HepG2 v jiném stadiu pasáže, jinými kultivačními podmínkami nebo sníženou citlivostí protilátky či nízkou hladinou proteinů na membráně. Lze tedy říci, že pravděpodobně z důvodu neaktivního mTORC2 komplexu v HepG2 buňkách za standardních kultivačních podmínek nelze posoudit jeho vliv na aktivitu AhR.

U INK 128 v kombinaci s TCDD byla pozorována výrazná indukce genové exprese, jednalo se o nárůst hladiny CYP1A1 mRNA o více než 2,6násobek oproti kontrolnímu TCDD. Výsledky potvrzuje i stanovení transkripční aktivity AhR. I AZD2014 a OSI-027 v kombinaci s TCDD indukují hladinu CYP1A1 mRNA a transkripční aktivitu AhR. V nejvyšší koncentraci 50 ng/ml s TCDD došlo k aktivaci úrovně katalytické aktivity CYP1A1 o více než 50 % oproti samotné pozitivní kontrole u obou látek. U všech testovaných inhibitorů mTOR v kombinaci s TCDD lze říci, že je partný vzrůstající trend CYP1A1 mRNA a naopak snižující se trend katalytické aktivity CYP1A1 v závislosti na zvyšující se koncentraci látek. Tento efekt je odlišný od působení rapamycinu v kombinaci s TCDD, kde v HepG2 buňkách byly hladiny CYP1A1 mRNA i katalytické aktivity upregulovány (Pouliková, 2015). Rozdíl může být způsoben inhibicí enzymu pomocí testovaných látek, i když tato varianta není příliš pravděpodobná z důvodu rozdílné struktury všech inhibitorů, není však nemožná. Další variantou je inhibice translace, která způsobí hromadění mRNA v buňce, která se nepřepisuje do proteinu. Tento efekt byl pozorován několika vědeckými týmy, které sledovaly vliv těžkých kovů na stabilitu CYP1A1. Těžké kovy modulují enzym CYP1A1 transkripcí, posttranskripčními a posttranslačními mechanismy. Bylo zjištěno, že posttranskripční mechanismy nemají vliv na stabilitu mRNA, zatímco posttranslační mechanismy výrazně snižují poločas rozpadu CYP1A1 proteinu, čímž vzniká nesoulad mezi katalytickou aktivitou a úrovní transkripce (Elbekai *et El-Kadi*, 2004; Elbekai *et El-Kadi*, 2007; Abdelhamid *et al.*, 2010)

Co se týče AZD2014, tým Liao *et al.* (2014) nastínil antitumorový efekt této látky na různé buněčné kultury hepatocelulárního karcinomu. Tento inhibitor indukuje apoptózu, autofagii a zastavení buněčného cyklu v G1 fázi u buněk hepatocelulárního karcinomu s větší účinností než je tomu tak u rapamycinu (Liao *et al.*, 2014).

OSI-027 je také schopný inhibovat proliferaci a buněčnou smrt v různých typech nádorových buněčných linií (Bhagwat *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2015). Předchozí studie ukázaly, že OSI-027 má silnou protinádorovou aktivitu v různých xenograftových modelech lidských karcinomů. Dále byla také prokázána schopnost indukovat smrt karcinogenních buněk s aktivní PI3K/Akt signalizací (Bhagwat *et al.*, 2011).

Antitumorové vlastnosti byly testovány v různých xenograftových modelech karcinomů také u INK 128. Stejně jako u ostatních inhibitorů byla potvrzena inhibice proliferace a inhibice mTORC1 i C2 komplexů (Gökmen-Polar *et al.*, 2012; Janes *et al.*, 2013).

Testované látky v přítomnosti TCDD potencují transkripční aktivitu AhR a s tím spojenou expresi CYP1A1 mRNA. Dochází i k indukci katalytické aktivity CYP1A1, která ovšem s rostoucí koncentrací látky klesá. Výsledky naznačují, že ATP-kompetitivní inhibitory mTOR kinázy významně ovlivňují signalizaci AhR v přítomnosti jeho ligandů.

ZÁVĚR

Diplomová práce se zaměřila na detekci vlivu ATP-kompetitivních inhibitorů mTOR kinázy, konkrétně INK 128, AZD2014 a OSI-027, na signalizaci aryluhlovodíkovým receptorem (AhR) v přítomnosti jeho ligandů v hepatomové buněčné linii HepG2.

V teoretické části byla popsána biotransformace a detailněji byly popsány enzymy P450 a regulátor exprese enzymů metabolizujících xenobiotika AhR. Další část byla věnovaná mTOR signalizační dráze a jejím inhibitorům.

V experimentální části byly stanoveny inhibiční účinky na komplexy mTORC1/C1. Za daných kultivačních podmínek HepG2 buněk není komplex mTORC2 aktivovaný, tudíž nebylo možné prokázat duální účinek inhibitorů na oba komplexy mTOR v této buněčné linii. Diplomová práce dále poskytla důkazy o tom, že v přítomnosti ligandu AhR inhibitory indukují transkripční aktivitu AhR a s tím spojenou expresi CYP1A1 mRNA. Dochází také k indukci katalytické aktivity CYP1A1, která ovšem s rostoucí koncentrací testovaných látek klesá. Samotné inhibitory mTOR nemají vliv na hladinu CYP1A1 mRNA, enzymovou aktivitu CYP1A1 ani na aktivitu AhR.

Diplomová práce ukázala, že ATP-kompetitivní inhibitory mTOR kinázy potencují účinek aktivace AhR ligandem dioxinem a že mTOR zapojena do jeho regulace.

LITERATURA

- Abdelhamid, G., Anwar-Mohamed, A., Badary, O. A., Moustafa, A. A., El-Kadi, A. O. (2010): Transcriptional and posttranscriptional regulation of CYP1A1 by vanadium in human hepatoma HepG2 cells. *Cell Biol Toxicol.* 26(5): 421-434.
- Amato, R. J., Jac, J., Giessinger, S., Saxena, S., Willis, J. P. (2009): A phase 2 study with a daily regimen of the oral mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) in with metastatic clear cell renal cell cancer. *Cancer.* 115(11): 2438-2446.
- Anzenbacher, P., Anzenbacherová, E. (2001): Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci.* 58(5-6): 737-747.
- Araki, K., Turner, A. P., Shaffer, V. O., Gangappa, S., Keller, S. A., Bachmann, M. F., Larsen Ch. P., Ahmed, R. (2009): mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature.* 460(7251): 108-112.
- Barouki, R., Morel, Y. (2001): Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications. *Biochem Pharmacol.* 61(5): 511-516.
- Basu, B., Deran, E., Puglisi, M., Greystoke, A., Ong, M., Burke, W., Cavallin, M., Bigley, G., Womack C., Harrington E. A., Green, S., Oelmann, E., de Bono, J. S., Ranson, M., Banerji, U. (2015): First-in-Human Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of the Dual m-TORC 1/2 Inhibitor AZD2014. *Clin Cancer Res.* 21(15): 3421-3429.
- Benjamin, D., Colombi, M., Moroni C., Hall, M. N. (2011): Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 10(11): 868-880.
- Bhagwat, S. V., Gokhale, P. C., Crew, A. P., Cooke, A., Yao, Y., Mantis, C., Workman, J., Bittner, M., Dudkin, L., Epstein, D. M., Gibson, N. W., Wild, R., Arnold, L. D., Houghton P. J., Pachter, J. A. (2011): Preclinical characterization of OSI-027, a potent and selective inhibitor of mTORC1 and mTORC2: distinct from rapamycin. *Mol Cancer Ther.*, 10(8): 1394-1406.
- Brown, E. J., Albers, M. W., Shin, T. B., Ichikawa, K., Keith, C. T., Lane, W. S. & Schreiber, S. L. (1994): A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature.* 369(6483): 756-758.
- Castilho, R. M., Squarize, C. H., Chodosh, L. A., Williams, B. O., Gutkind, J. S. (2009): mTOR mediates Wnt-induced epidermal stem cell exhaustion and aging. *Cell Stem Cell.* 5(3): 279-289.
- Carracedo, A., Ma L., Teruya-Feldstein, J., Rojo, F., Salmena, L., Alimonti, A., Egia, A., Sasaki, A. T., Thomas, G., Kozma, S. C., Papa, A., Nardella, C., Cantley, L. C., Baselga, J., Pandolfi, P. P. (2008): Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest.* 118(9): 3065-3074.

Cornell University. The Qian Laboratory. [online]. Poslední aktualizace 10. 7. 2009 [cit. 18. 2. 2017]. Dostupné z: <http://qian.human.cornell.edu/Research-mTOR.htm>

Cornu, M., Albert, V., Hall, M. N. (2013): mTOR in aging, metabolism, and cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 23(1):53-62.

Delescluse, C., Lemaire, G., de Sousa, G., Rahmani, R. (2000) Is CYP1A1 induction always related to AHR signaling pathway? *Toxicology.* 153(1-3): 73-82.

Dostálek, M., Janoštková, E., Juřica, J., Zahradníková, L. (2006): *Farmakokinetika.* Grada Publishing. Praha. ISBN: 80-247-1464-7.

Elbekai, R. H., & El-Kadi, A. O. (2004): Modulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated gene expression by arsenite, cadmium, and chromium. *Toxicology.* 202(3): 249-269.

Elbekai, R. H., El-Kadi, A. O. (2007): Transcriptional activation and posttranscriptional modification of Cyp1a1 by arsenite, cadmium, and chromium. *Toxicol Lett.* 172(3): 106-119.

Faber, K. N., Muller, M., Jansen, P. L. M. (2003): Drug transport proteins in the liver. *Adv Drug Deliv Rev.* 55(1): 107-124.

Feldman, M. E., Apsel, B., Uotila, A., Loewith, R., Knight, Z. A., Ruggero, D., Shokat, K. M. (2009): Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol.* 7(2): e1000038.

Ghobrial, I. M., Siegel, D. S., Vij, R., Berdeja J. G., Richardson P. G., Neuwirth, R., Patel C. G., Zohren, F., Wolf, J. L. (2016): TAK-228 (formerly MLN0128), an investigational oral dual TORC1/2 inhibitor: A phase I dose escalation study in patients with relapsed or refractory multiple myeloma, non-Hodgkin lymphoma, or Waldenström's macroglobulinemia. *Am J Hematol.* 91(4): 400-405.

Glue, P., Clement, R. P. (1999): Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism-basic concepts and methods of assessment. *Cell Mol Neurobiol.* 19(3): 309-323.

Gökmen-Polar, Y., Liu, Y., Toroni, R. A., Sanders, K. L., Mehta, R., Badve, S., Rommel, C., Sledge, G. W. Jr. (2012): Investigational drug MLN0128, a novel TORC1/2 inhibitor, demonstrates potent oral antitumor activity in human breast cancer xenograft models. *Breast Cancer Res Treat.* 136(3): 673-682.

Gupta, M., Hendrickson, A. E. W., Yun, S. S., Han, J. J., Schneider, P. A., Koh, B. D., Stenson M. J., Wellik, L. E., Shing J. C., Peterson, K. L., Flatten, K. S., Hess, A. D., Ingle, G. R., Sievers, T. M., Holt, C. D. (2000): Sirolimus: continuing the evolution of transplant immunosuppression. *Ann Pharmacother.* 34(9): 1044-1055.

Hankinson, O. (2005): Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch Biochem Biophys.* 433(2): 379-386.

- Henklová, P., Vrzal, R., Ulrichová, J., Dvořák, Z. (2008): Role of mitogen-activated protein kinases in aryl hydrocarbon receptor signaling. *Chem Biol Interact.* 172(2): 93-104.
- Hodgson, E. (2004): A textbook of modern toxicology: Third Edition, John Wiley & Sons, Inc. Publication, Canada, 557 s., ISBN 0-471-26508-x.
- Chen, B., Xu, M., Zhang, H., Xu, M. Z., Wang, X. J., Tang, Q. H., Tang, J. Y. (2015): The Antipancreatic Cancer Activity of OSI-027, a Potent and Selective Inhibitor of mTORC1 and mTORC2. *DNA Cell Biol.* 34(10): 610-617.
- Chen, Y. H., Tukey, R. H. (1996): Protein kinase C modulates regulation of the CYP1A1 gene by the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem.* 271(42): 26261-26266.
- Chiang, G. G., Abraham, R. T. (2007): Targeting the mTOR signaling network in cancer. *Trends Mol Med.* 13(10): 433-442.
- Choo, A. Y., Yoon, S. O., Kim, S. G., Roux, P. P., Blenis J. (2008): Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(45): 17414-17419.
- Ikuta, T., Kobayashi, Y., Kawajiri, K. (2004) : Phosphorylation of nuclear localization signal inhibits the ligand-dependent nuclear import of aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 317(2): 545-550.
- Isin, E. M., Guengerich, F. P. (2007): Complex reactions catalyzed by cytochrom P450 enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 1770(3): 314-329.
- Jančová, P., Azenbacher, P., Azenbacherová, E. (2010): Phase II Drug Metabolizing Enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 154(2): 103-116.
- Jančová, P., Šiller, M. (2012): Phase II Drug Metabolism, *Topics on Drug Metabolism*, InTech, 306 s., ISBN: 978-953-51-0099-7.
- Janes, M. R., Vu, C., Mallya, S., Shieh, M. P., Limon, J. J., Li, L. S., Jessen, K. A., Martin, M. B., Ren, P., Lilly, M. B., Sender, L. S., Liu, Y., Rommel, C., Frumav, D. A. (2013): Efficacy of the investigational mTOR kinase inhibitor MLN0128/INK128 in models of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 27(3): 586-594.
- Jiang, S. J., Wang, S. (2015): Dual targeting of mTORC1 and mTORC2 by INK-128 potently inhibits human prostate cancer cell growth in vitro and in vivo. *Tumour Biol.* 36(10): 8177-8184.
- Juliano, R. L., Ling, V. (1976): A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* 455(1): 152-162.
- Kewley, R. J., Whitelaw, M. L., Chapman-Smith, A. (2004): The mammalian basic helix- loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 36(2): 189-204.

- Krejzlík, Z., Káš, J., Ruml, T. (2000): Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chem. listy*. 94: 913-918.
- Laplante, M., Sabatini, D. M. (2012): mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 149: 274-293.
- Li, S. Y., Dougherty, J. J. (1997) : Inhibitors of serine/threonine-specific protein phosphatases stimulate transcription by the Ah receptor/Arnt dimer by affecting a step subsequent to XRE binding. *Arch Biochem Biophys*. 340(1):7 3-82.
- Liao, H., Huang, Y., Guo, B., Liang, B., Liu, X., Ou, H., Yang, D. (2014): Dramatic antitumor effects of the dual mTORC1 and mTORC2 inhibitor AZD2014 in hepatocellular carcinoma. *American journal of cancer research*. 5(1): 125-139.
- Ma, Q., Lu, A. Y. H. (2007): CYP1A Induction and Human Risk Assessment: An Envolving Tale of in Vitro and in Vivo Studies. *Drug Metab Dispos*. 35(7): 1009-1016.
- Mahé, E., Morelon, E., Lechaton, S., Sang, K. H., Mansouri, R., Ducasse, M. F., Mamzer-Brunell M. F., de Prost, Y., Kreis, H., Bodemer, C. (2005): Cutaneous adverse events in renal transplant recipients receiving sirolimus-based therapy. *Transplantation*. 79(4): 476-482.
- Maiso, P., Liu, Y., Morgan, B., Azab, A. K., Ren, P., Martin, M. B., Zhang, Y., Liu, Y., Ngo, H., Azab, F., Quang, P., Rodiq, S. J., Lin, C. P., Roccaro, A. M., Rommel, C., Ghobrial, I. M. (2011): Defining the role of TORC1/2 in multiple myeloma. *Blood*. 118(26): 6860-6870.
- Masui, K., Cavenee, W. K., Mischel, P. S. (2014): mTORC2 in the center of cancer metabolic reprogramming. *Trends Endocrinol Metab*. 25(7): 364-373.
- Matter, M. S., Decaens, T., Andersen, J. B., Thorgeirsson, S. S. (2014): Targeting the mTOR pathway in hepatocellular carcinoma: Current state and future trends. *J Hepatol*. 60(4): 855-865.
- Micka, J., Milatovich, A., Menon, A., Grabowski, G. A., Puga, A., Nebert, D. W. (1997): Human Ah receptor (AHR) gene: localization to 7p15 and suggestive correlation of polymorphism with CYP1A1 inducibility. *Pharmacogenetics*. 7(2): 95-101.
- Mimuraa, J., Kuriyama, Y. F. (2003): Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta*. 1619(3): 263-268.
- Nakata, K., Tanaka, Y., Nakano, T., Adachi, T., Tanaka, H., Kaminuma, T., Ishikawa, T. (2006): Nuclear receptor-mediated transcriptional regulation in Phase I, II, and III xenobiotic metabolizing systems. *Drug Metab Pharmacokinet*. 21: 437-457.
- Nebert, D. W., Roe, A. L., Dieter, M. Z., Solis, W. A., Yang, Y., Dalton, T. P. (2000): Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem Pharmacol*. 59(1): 65-85.

- Nguyen, L. P., Bradfield, Ch. A. (2008): The Search for Endogenous Activators of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Chem Res Toxicol.* 21(1): 102-116.
- Novotná, A., Pávek, P., Dvořák, Z. (2011): Novel stably transfected gene reporter human hepatoma cell line for assessment of aryl hydrocarbon receptor transcriptional activity: construction and characterization. *Environ Sci Technol.* 45(23): 10133-10139.
- Omura, T., Sato, R. (1962): A new cytochrome in liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 237, 1375-1376.
- Pal, S. K., Figlin, R. A., Reckamp, K. L. (2008): The role of targeting mammalian target of rapamycin in lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 9(6): 340-345.
- Park, S., Henry, E. C., Gasiewicz, T. A. (2000): Regulation of DNA binding activity of the ligand-activated aryl hydrocarbon receptor by tyrosine phosphorylation. *Arch Biochem Biophys.* 381(2): 302-312.
- Pávek, P., Dvořák, Z. (2008): Xenobiotic-induced transcriptional of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Curr Drug Metab.* 9(2): 129-143.
- Poland, A., Glover, E., Kende, A. S. (1976): Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J Biol Chem.* 251(16): 4936-4946.
- Pouliková, K. (2015): Vliv mTOR signální dráhy na indukovatelnou expresi biotransformačního enzymu CYP1A1 v lidském hepatocelulárním karcinomu. Olomouc. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta.
- Prabakaran, S., Lippens, G., Steen, H., Gunawardena, J. (2012): Post-translational modification: nature's escape from genetic imprisonment and the basis for dynamic information encoding. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 4(6): 565-583.
- Puga, A., Xia, Y., Elferink, C. (2002): Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. *Toxicology.* 181-182: 171-177.
- Renton K. W. (2001): Alteration of drug biotransformation and elimination during infection and inflammation. *Pharmacol Ther.* 92 (2-3): 147-63.
- Sabatini, D. M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., Snyder, S. H. (1994): RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell.* 78(1): 35-43.
- Sabers, C. J., Martin, M. M., Brunn, G. J., Williams, J. M., Dumont, F. J., Wiederrecht, G., Abraham, R. T. (1995): Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J Biol Chem.* 270(2): 815-822.
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Kim, D. H., Guertin, D. A., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D. M. (2004): Rictor, a novel binding partner of

mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol.* 14(14): 1296-1302.

Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Sen Gupta, S., Sheen, J. H., Hsu, P. P., Bagley, A. F., Markhald, A. L., Sabatini, D. M. (2006): Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell.* 22(2): 159-168.

Scotto, K. W. (2003): Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene.* 22(47): 7496-7511.

Sevior, D. K., Pelkonen, O., Ahokas, J. T. (2012): Hepatocytes: the powerhouse of biotransformation. *Int J Biochem Cell Biol.* 44(2): 257-261.

Schinkel, A. H., Jonker, J. W. (2003): Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev.* 55(1): 3-29.

Skálová, L., Boušová, I., Machala, M., Pávek, P., Podlipná, R., Souček, P., Szotáková, B., Vondráček, J., Wsól, V. (2011): *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik.* Karolinum. Praha. ISBN-13: 978-80-246-1917-0.

Smith, B. D., Karp, J. E., Barr, S., Witzig, T. E., Kaufmann, S. H. (2012): Dual mTORC1/mTORC2 inhibition diminishes Akt activation and induces Puma-dependent apoptosis in lymphoid malignancies. *Blood.* 119(2): 476-487.

Sun, S. Y. (2013): mTOR kinase inhibitors as potential cancer therapeutic drugs. *Cancer Letters.* 340(1): 1-8.

Študentová, H., Melichar, B. (2010): Nový mechanismus v léčbě karcinomu ledviny: m-TOR – nová cílová struktura. *Onkologie.* 4(3): 185-188.

Thomas, G., and Hall, M. N. (1997): TOR signalling and control of cell growth. *Curr Opin. Cell Biol.* 9(6): 782-787.

Tsaioun, K., Blauboer, B. J., Hartung, T. (2016): Evidence-based absorption, distribution, metabolism, excretion (ADME) and its interplay with alternative toxicity methods. *ALTEX.* 33(4): 343-358 .

Viklický, O., Janoušek, L., Baláž, P. (2008): *Transplantace ledvin v klinické praxi.* Grada Publishing. Praha. ISBN: 978-80-247-2455-3.

Vrzal, R., Ulrichová, J., Dvořák, Z. (2004): Aromatic hydrocarbon receptor status in the metabolism of xenobiotics under normal and pathophysiological conditions. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 148(1): 3-10.

Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S., Gatto, G. J. (2005): Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl.* 44(45): 7342-7372.

Yan, Y., Wang, Y., Tan, Q., Hara, Y., Yun, T. K., Lubert, R. A., Xou, M. (2006): Efficacy of polyphenon E, red ginseng, and rapamycin on benzo(a)pyrene-induced lung tumorigenesis in A/J mice. *Neoplasia.* 8(1): 52-58.

Yao, J. C., Shah, M. H., Ito, T., Bohas, C. L., Wolin, E. M., Van Cutsem, E., Hobday, T. J., Okusaka, T., Capdevila, J., de Vries, E. G., Tomassetti, P., Pavel, M. E., Hoosen, S., Haas, T., Lincy, J., Lebwohl, D., Oberg, K. (2011): Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N. Engl. J. Med.* 364(6): 514-523.

Yu, K., Toral-Barza, L., Shi, C., Zhang, W. G., Lucas, J., Shor, B., Kim, J., Verheljen, J., Curran, K., Malwitz, D. J., Cole, D. C., Ellingboe, J., Ayril-Kaloustian, S., Mansour, T. S., Gibbons, J. J., Abraham, R. T., Nowak, P., Zask, A. (2009): Biochemical, cellular, and in vivo activity of novel ATP-competitive and selective inhibitors of the mammalian target of rapamycin. *Cancer Res.* 69(15): 6232-6240.

Zoncu, R., Efeyan, A., Sabatini, D. M. (2011): mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12(1): 21-35.

Zuber, J., Anglicheau, D., Elie, C., Bererhi, L., Timsit, M. O., Mamzer-Bruneel, M. F., Ciroldi, M., Martinez, F., Snanoudj, R., Hiesse, C., Kreis, H., Eustache, F., Laborde, K., Thervet, E., Legendre, C. (2008): Sirolimus may reduce fertility in male renal transplant recipients. *Am Jof Transplantat.* 8(7): 1471-1479.

Zuber, R., Anzenbacherová, E., Anzenbacher, P. (2002): Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J Cell Mol Med.* 6(2): 189-198.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

3-MC	3-methylchloranthren
4E-BP1	elongation factor 4E binding protein 1
ABC	transportér, ATP binding cassette subfamily B member 1
AhR	aryluhlovodíkový receptor
AhRR	AhR represor
Akt	protein kinase B
APS	persíran amonný
ARNT	AhR nukleární translokátor
ATP	adenosintrifosfát
AZD2014	3-[2,4-bis(3S)-3-methylmorpholin-4-yl]pyrido[5,6-e]pyrimidin-7-yl]-N-methylbenzamid
bHLH	basic helix-loop-helix transkripční faktor
BP	benzo[a]pyren
BSA	bovinní sérový albumin
CCI-779	temsirolimus
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CO ₂	oxid uhličitý
CYP	cytochrom P450
deptor	DEP domain containing mTOR-interacting protein
dFICZ	6,12-diformylindolo[3,2-b]carbazol
dH ₂ O	deionizovaná voda
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
DRE	dioxinový responzivní element
ERK	protein kináza součástí mitogeny aktivované protein kinázové dráhy
EROD	7-ethoxyresorufin deethylasová aktivita
EROD	metoda detekce 7-ethoxyresorufin deethylasové aktivity
FAT	FAT-carboxy terminal doména
FATC	FRAP-ATM-TTRAP doména
Fe	železo
FICZ	6-formylindolo[3,2-b]carbazol
FKBP12	imunofilin s prolyl isometázovou aktivitou
FKBP12	intracellular 12-kDa FK506-binding protein
FRB	FKBP12-rapamycin binding doména
GRA	gene reporter assay
GTP	guanosintrifosfát
HAA	heterocyklické aromatické aminy a amidy
HEAT	Huntingtin-Elongation factor 3-regulatory subunit A of PP2A- <i>TOR1</i> repeats
HepG2	buněčná linie odvozená od hepatocelulárního karcinomu
Hsp90	90 kDa heat-shock protein
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration, koncentrace látky kdy dochází k 50% inhibici dané biologické aktivity
IGF	insulin-like growth factor
INK128	3-(2-amino-5-benzoxazolyl)-1-(1-methylethyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-amin

IRS	insulin receptor substrate
MAPKs	mitogeny aktivované protein kinázy
MDR1	multidrug resistance 1, p-glykoprotein
MEK1/2	protein kináza součástí mitogeny aktivované protein kinázové dráhy
mLST8	mammalian lethal with sec-13 protein 8
M-MuLV	reverzní transkriptáza
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
mSin1	proline-rich Akt substrate 40 kDa
mTOR	savčí rapamycinový cíl, serin/threoninová kináza
NADP	nikotinamidadeninukleotidfosfát – oxidovaná forma
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát – redukováná forma
NF- κ B	nuclear factor kappa B
OATP	organické anionty přenášející polypeptidy
OCT	organický kationtový přenašeč
OSI-027	4,5,7-trisubstituted imidazo[5,1-f]triazin
p23	ko-chaperon pro Hsp90, prostaglandin E syntasa 3
p70S6K	70-kDa ribosomal protein S6 kinase-1, S6K
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PAS	Per-ARNT-Sim doména
PDK1	phosphoinositide-dependent kinase 1
PI3K	fosfatidylinositol 3-kináza
PIKK	fosfatidylinositol 3-kináza příbuzné protein kinázy
PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PIP3	fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát
PKC	protein kináza C
pras40	proline-rich Akt substrate 40 kDa
protor 1/2	protein observed with rictor 1 and 2
PTM	posttranslační modifikace
PVDF	polyvinylidendifluorid
RAD001	everolimus
Raf1	protein kináza součástí mitogeny aktivované protein kinázové dráhy
Rap	rapamycin
raptor	regulatory-associated protein of mTOR
Ras	p21 protein activator 1
RH	substrát
rictor	rapamycin-insensitive companion of mTOR
RNA	ribonukleová kyselina
ROH	produkt
RPM	otáčky za minutu, rychlost rotoru centrifugy
RTK	tyrosinkinázový receptor
S6K1	ribosomal protein S6 kinase-1
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
Ser	serin
Ser473	serin 473, S473
TBS	Tris pufr
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamin

Thr	threonin
Thr308	threonin 308, T308
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
TSC1/2	komplex tuberózní sklerózy
Tyr	tyrosin
UT	negativní kontrola (untreated)
XAP2	aryl hydrocarbon receptor interacting protein
XRE	xenobiotický responzivní element