



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

Studium inhibičního účinku derivátů pyrimidinu na RAGE signalizaci

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor

Kristýna Jedličková

Studijní program

B1501 Biologie

Studijní obor

Experimentální biologie

Forma studia

Prezenční

Vedoucí práce

Mgr. Ivo Frydrych, Ph.D.

Termín odevzdání práce

2014

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Kristýna Jedličková
Název práce	Studium inhibičního účinku derivátů pyrimidinu na RAGE signalizaci
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Ústav molekulární a translační medicíny
Vedoucí práce	Mgr. Ivo Frydrych, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2014
Jazyk	Český
Klíčová slova	Receptor RAGE, RAGE signalizace, JAK/STAT3, deriváty pyrimidinu, transdukce, senzorická buněčná linie, C6 buňky
Počet stran	52
Počet příloh	1 (CD ROM)

Abstrakt

RAGE (Receptor for Advanced Glycation End Products) je multiligandový povrchový receptor imunoglobulinového typu, který byl původně objeven jako receptor pro produkty pokročilé glykace proteinů (AGEs). Tento receptor hraje klíčovou roli v celé řadě patologických stavů zahrnujících cukrovku, Alzheimerovu chorobu a nádorová onemocnění. Zatímco za fyziologických podmínek je jeho exprese nízká, v postižených tkáních RAGE-příbuzných patogenních stavů dochází k výrazné overexpresi. Díky tomu představuje RAGE zajímavý terapeutický cíl. RAGE signalizace je značně komplexní a zahrnuje aktivaci různorodých transkripčních faktorů regulujících proliferaci, imunitní odpověď a zánět.

V chemické knihovně ÚMTM byla identifikována skupina látek strukturně odvozených od pyrimidinu, které vykazují protizánětlivé účinky a některé z nich působí jako účinné inhibitory RAGE signalizace. Tato bakalářská práce se zabývá stanovením účinku vybraných 4,5,6-trisubstituovaných-2-aminopyrimidinů na signální dráhu JAK/STAT3, která představuje významný cíl RAGE signalizace. Prostřednictvím připravené senzorické buněčné linie bylo prokázáno, že tyto látky významným způsobem inhibují JAK/STAT3 signalizaci.

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Kristýna Jedličková
Title of thesis	Exploration of pyrimidine derivatives inhibitory effect on RAGE signaling
Type of thesis	Bachelor
Department	Institute of molecular and translational medicine
Supervisor	Mgr. Ivo Frydrych, Ph.D.
The year of presentation	2014
Language	Czech
Keywords	RAGE receptor, RAGE signaling, JAK/STAT3, pyrimidine derivatives, transduction, sensor cell line, C6 cells
Number of pages	52
Number of appendices	1 (CD ROM)

Abstract

RAGE (Receptor for Advanced Glycation End Products) is a multiligand receptor and a member of the immunoglobulin superfamily of cell surface molecules. It was originally discovered as receptor for advanced glycation end products (AGEs). This receptor is crucial for many pathological conditions, including diabetes, Alzheimer's disease and cancer. While in physiological conditions the RAGE expression is low, in pathological conditions there is a significant over-expression. Therefore, RAGE is very interesting as therapeutic target. RAGE signaling is very complex and leads to the activation of many various transcriptional factors which regulate proliferation, immune answer and inflammation.

A group of substances structurally deduced from pyrimidine was identified in chemical library of UMTM. These substances possess anti-inflammatory properties and some of them work as effective inhibitors of RAGE signaling. This thesis aims at determining the effect of 4,5,6-trisubstituted-2-aminopyriminides on JAK/STAT3 (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription) signaling pathway, which represents an important target of RAGE signaling. With the aid of the prepared sensor cell line it has been proven that these substances inhibit JAK/STAT3 signaling.

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením Mgr. Ivem Frydrychem, Ph.D. za použití citované literatury.

V Olomouci, dne

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu bakalářské práce Mgr. Ivovi Frydrychovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, jeho cenné rady a připomínky. Můj dík patří také Mgr. Jiřímu Řehulkovi, Renatě Buriánové a ostatním zaměstnancům Laboratoře experimentální medicíny z Ústavu molekulární a translační medicíny LF Univerzity Palackého za ochotu a pomoc v laboratoři.

Infrastrukturální část projektu (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena Operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

OBSAH

Seznam použitých zkratk	8
1 Úvod	10
2 Cíle bakalářské práce	11
3 Teoretická část	12
3.1 RAGE	12
3.1.1 Struktura RAGE	12
3.1.2 RAGE ligandy	13
3.1.2.1 AGEs	13
3.1.2.2 S100 proteiny	13
3.1.2.3 Amyloid β (Abeta)	14
3.1.2.4 HMGBI (Amfoterin)	14
3.1.3 RAGE signalizace	15
3.1.3.1 Signální dráha JAK/STAT3	16
3.1.4 Fyziologická funkce RAGE	16
3.1.5 Úloha RAGE v patogenezi onemocnění	17
3.1.5.1 Zánět	17
3.1.5.2 Alzheimerova choroba	17
3.1.5.3 <i>Diabetes mellitus</i>	18
3.1.5.4 Exprese RAGE v nádorech	18
3.1.6 RAGE jako potenciální terapeutický cíl	19
3.1.7 Inhibitory RAGE receptoru	19
3.1.7.1 Proteinové inhibitory	19
3.1.7.2 Nízkomolekulární inhibitory	20
3.2 Transfekce a transdukce	23
3.2.1 Fyzikální metody	24
3.2.1.1 Mikroinjekce	24
3.2.1.2 Elektroporace	24
3.2.1.3 Genové dělo	24
3.2.2 Chemické metody	25
3.2.2.1 DEAE dextran a fosforečnan vápenatý	25
3.2.2.2 Kationtové lipidy (liposomy)	25
3.2.2.3 Kationtové polymery	25
3.2.3 Virální metody	26

3.2.3.1	Lentivirální vektory (LV)	26
3.3	Reportérové geny	27
4	Experimentální část	29
4.1	Materiál	29
4.1.1	Přístrojové vybavení	29
4.1.2	Chemikálie	29
4.1.3	Roztoky	30
4.1.4	Protilátky	31
4.1.5	Ligandy	31
4.1.6	Inhibitory RAGE signalizace	31
4.1.7	Použité buněčné linie	32
4.2	Metodika	33
4.2.1	Pasážování, počítání	33
4.2.2	Zamrazování	33
4.2.3	Rozmrazování	33
4.2.4	MTT test	34
4.2.5	Detekce exprese RAGE metodou western blot	35
4.2.5.1	Příprava vzorků	35
4.2.5.2	Elektorforéza, western blot	35
4.2.5.3	Imunodetekce na membráně	35
4.2.6	Transdukce lentivirovým reportérem, selekce a příprava klonů	36
4.2.7	Validace klonů	37
4.2.8	Testování potenciálního inhibičního účinku látek LEM814 a LEM815 na aktivaci STAT3	38
5	Výsledky	39
5.1	Výsledky western blotu	39
5.2	Výsledky MTT testu	39
5.3	Výsledky validace klonů	41
5.4	Výsledky testování potenciálního inhibičního účinku LEM814 a LEM815	43
5.4.1	Výsledky měření po 6. hodinové inkubaci	43
5.4.2	Výsledky měření po 24. hodinové inkubaci	43
6	Diskuze	47
7	Závěr	48
8	Použitá literatura	49

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAV	Adeno-Associated Virus, adeno-asociované viry
Abeta	Amyloid β
AGEs	Advanced Glycation Endproducts, produkty pokročilé glykace proteinů
AMP	Adenosine Monophosphate, adenosinmonofosfát
AP-1	Activator Protein 1, proteinový aktivátor 1
APS	Ammonium Persulfate; persíran amonný
ATCC	American Type Culture Collection; americká sbírka tkáňových a buněčných kultur
ATP	Adenosine Monophosphate, adenosintrifosfát
Bcl-2	B-cell lymphoma 2, antiapoptický gen
BIV	The Bovine Immunodeficiency Viruses, virus imunitní nedostatečnosti skotu
CAEV	Caprine Arthritis-Encephalitis Virus, virus artritidy a encefalitidy koz
Cdc42	Cell Division Cycle 42, protein zapojený do buněčného cyklu
cRAGE	cleaved RAGE, rozpustná forma RAGE, která vznikla proteolýzou RAGE
DEAE	2-(diethylamino)ether dextran
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
DOPE	L-dioleoylfosfatidylethanolamin
EIAV	Equine Infectious Anemia Virus, virus infekční anémie koní
ERK1/2	Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2, extracelulární signál-regulující kinasa 1/2
FCS	Foetal Calf Serum, fetální hovězí sérum
FIV	The Feline Immunodeficiency Viruses, virus kočičí imunitní nedostatečnosti
GFP	Green Fluorescent Protein, zelený fluorescenční protein
GUS	β -galaktosidasa
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus Type I, virus lidské imunitní nedostatečnosti typu I
HIV-2	Human Immunodeficiency Virus Type II, virus lidské imunitní nedostatečnosti typu II
HMGB1	High Mobility Group Box, amfoterin
HSV	herpes simplex viry
IC50	half maximal inhibitory concentration

JAK/STAT	Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription
JNK	c-Jun NH ₂ -Terminal Kinase, c-Jun N-terminální kinasa
lacZ	gen kódující enzym β -galaktosidázu
LTR	Long Terminal Repeats, dlouhé terminální repetice
LUC	světlušková luciferasa
LV	lentivirální vektor
MAPK	p38 Mitogen-Activated Protein Kinase, mitogenem aktivovaná protein kinasa
MOI	Multiplicity of Infection
m-RNA	messenger RNA, mediátorová RNA
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
NF- κ B	Nuclear Factor Kappa B, nukleární faktor kappa B
NK buňky	Natural Killer Cells, přirození zabíječi
ONPG	o-nitrofenol- β -D-galaktopyranosid
PAMAM	polyamidoamine dendrimers, dendrimery polyamidoaminu
PBS	Phosphate Buffered Saline, fosfátový pufr
PEI	polyethylenimin
PLL	poly-L-lysin
PPi	pyrofosfát
RAGE	Receptor for Advanced Glycation End Products, receptor pro AGEs
Ras	Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay Buffer
SAPK	Stress Activated Protein Kinases, stresem aktivované protein kinasy
SDS	dodecylsulfát sodný
SEAP	Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase, sekretovaná alkalická fosfatasa
S-gal	3,4-cyclohexenoesuletin- β -D-galaktopyranosid
SIV	Simian Immunodeficiency Virus
SMODCH	směrodatná odchylka
SPR	surface plasmon resonance, rezonance excitace povrchových plazmonů
sRAGE	soluble RAGE, rozpustná forma RAGE
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	tetramethylethylendiamin
X-gal	5-brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
β -Gal	β -glukuronidasa

1 ÚVOD

Tato bakalářská práce se zabývá v teoretické části problematice RAGE receptoru, jehož nadměrná exprese vede k aktivaci signálních drah a transkripčních faktorů podílejících se na zánětu a vzniku chronických onemocnění jako je cukrovka, Alzheimerova choroba a některé druhy rakoviny. RAGE receptor proto představuje poměrně atraktivní terapeutický cíl.

V odborné literatuře lze nalézt řadu studií zaměřených na inhibici RAGE receptoru účinkem inhibitorů proteinové povahy jako je rozpustná forma RAGE (sRAGE) nebo humanizované anti-RAGE protilátky. Další skupinu potenciálních RAGE inhibitorů představují nízkomolekulární látky. Jako velmi nadějně inhibitory z této skupiny se jeví látky strukturně odvozené od pyrimidinu.

Předmětem praktické části této bakalářské práce bylo studium potenciálního inhibičního účinku vybraných 4,5,6-trisubstituovaných-2-aminopyrimidinů na JAK/STAT3 signální dráhu, která je jednou z klíčových v rámci RAGE signalizace.

2 CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem bakalářské práce je zjistit, zda vybrané deriváty pyrimidinu s potenciálním inhibičním účinkem na RAGE signalizaci inhibují signální dráhu JAK/STAT3 a za tímto účelem připravit senzorkou buněčnou linii odvozenou od C6 buněk za použití komerčního lentivirového reportérového systému. Takto připravená senzorká buněčná linie bude sloužit k monitorování aktivace JAK/STAT3 signální dráhy. Na respondujících klonech senzorké linie budou finálně testovány vybrané deriváty pyrimidinu.

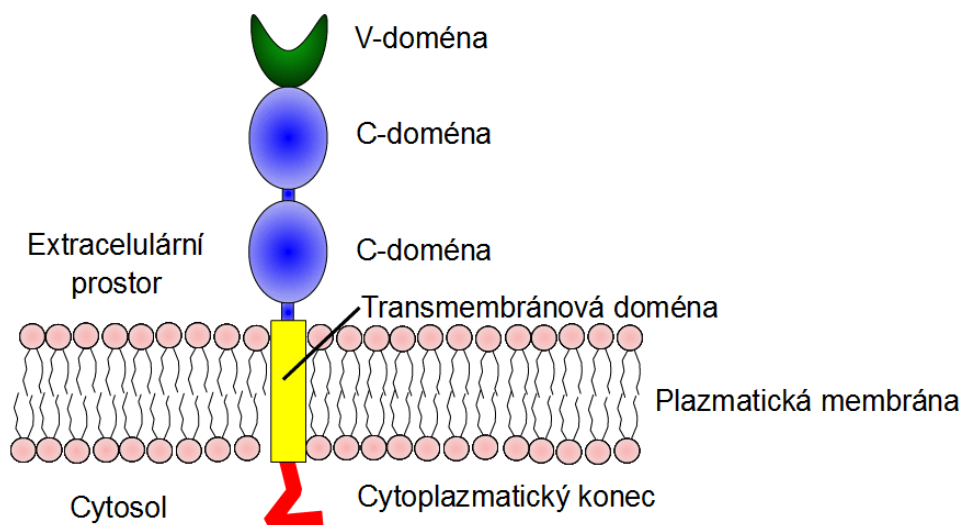
3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 RAGE

RAGE (Receptor for Advanced Glycation End Products, receptor pro produkty pokročilé glykace proteinů) je centrální signální molekula vrozeného imunitního systému podílející se na vzniku a udržování zánětlivé odpovědi. Tento receptor patří do skupiny receptorů rozeznávající molekulární vzory (Pattern Recognition Receptors), to znamená, že rozpoznává spíše společné rysy jako je β -struktura nebo α -helix než specifickou aminokyselinovou sekvenci. Ve zdravých tkáních je míra exprese RAGE ve většině případů nízká, naopak za patologických stavů je exprese zvýšená ^(Fritz, 2011).

3.1.1 Struktura RAGE

Gen kódující tento protein se nachází na chromosomu 6. RAGE receptor patří do skupiny imunoglobulinů a skládá se z jedné domény typu V, dvou domén typu C, transmembránové domény a z koncové oblasti směřované do cytosolu ^(Neeper *et al.*, 1992). Schéma RAGE je zaznamenán na obrázku 1. Za vazbu extracelulárního ligandu zodpovídá z velké části doména typu V, uplatňují se ale i domény typu C, které jsou také klíčové ve stabilizaci V-domény. Cytoplazmatická koncová část hraje klíčovou roli v intracelulární signalizaci. Byly identifikovány různé rozpustné izoformy RAGE, které se vyznačují absencí transmembránové domény nebo cytosolického konce. Všechny zkrácené formy RAGE jsou odvozené od jednoho genu, to znamená, že pre-mRNA je podrobena alternativnímu sestřihu ^(Bierhaus *et al.*, 2005).



Obr. 1: Schéma RAGE receptoru. Vlastní zpracování dle Logsdon *et al.*, 2007

3.1.2 RAGE ligandy

RAGE byl původně objeven jako receptor pro AGEs (Advanced Glycation End Products, produkty pokročilé glykace proteinů) později však bylo zjištěno, že interaguje i s jinými ligandy jako jsou někteří zástupci rodiny proteinů S100, amyloid β nebo protein HMGB1. Tyto ligandy se účastní chronických zánětlivých a imunitních reakcí a mají tendenci se akumulovat v tkáních v průběhu stárnutí a při chronických degenerativních onemocněních (Bierhaus *et al.*, 2005). Ligandy se váží k receptoru RAGE nejčastěji prostřednictvím V-domény pomocí elektrostatických sil, které vznikají mezi kladně nabitou ektodoménou RAGE a negativně nabitým ligandem (Fritz, 2011).

3.1.2.1 AGEs

AGEs ligandy tvoří heterogenní skupinu molekul, které vznikly neenzymatickou kondenzační a oxidační reakcí proteinů/peptidů s cukry. Zvýšené hladiny glykovaných bílkovin jsou pozorovány u stárnoucích osob a u pacientů s diabetem. AGEs se váží s vysokou afinitou k RAGE a aktivuje se tak prozánětlivá signalizační kaskáda. Aktivace RAGE prostřednictvím AGEs vede k řadě diabetických komplikací, ateroskleróze, kardiovaskulárním onemocněním, nefropatii a chronickému zánětu (Fritz, 2011). Dá se také očekávat, že v neoplastických buňkách bude zvýšený výskyt AGEs, protože tyto buňky se vyznačují vysokou mírou vychytávání glukosy (Logsdon *et al.*, 2007).

3.1.2.2 S100 proteiny

Je známo více než 25 různých lidských proteinů S100. Tyto proteiny mají kyselý charakter a obsahují dvě různá místa schopná vázat vápník. Většina S100 proteinů existuje ve formě homodimérů, ale existují i formy hetero nebo oligomerní. I když proteiny S100 představují evolučně mladou skupinu vyskytující se u obratlovců, tato proteinová rodina je charakterizována širokou diverzifikací, která se odráží v různých funkcích, expresi a časoprostorového rozložení v buňce. S100 jsou lokalizovány v cytoplazmě, kde působí jako citlivý senzor vápníku nebo se mohou vyskytovat i výhradně extracelulární typy vykazující vlastnosti podobné cytokinům. Vazba vápníku na S100 způsobuje konformační změnu, mění se tak povrchový náboj a dostupnost hydrofóbních zbytků. Vysoké koncentrace vápníku v extracelulárním prostoru vedou k vazbě na S100, což je nezbytné pro interakci s RAGE receptorem. Je známo, že *in vivo* i *in vitro* interagují s RAGE tyto proteiny: S100B, S100P, S100A1, S100A2, S100A4, S100A5, S100A6, S100A7,

S100A8/9, S100A12 a S100A13. Vykazují různou afinitu k receptoru a mohou vyvolat různé buněčné odpovědi (Fritz, 2011).

3.1.2.3 Amyloid β (Abeta)

Amyloid β je peptid skládající nejčastěji z 36-43 AMK a jeho akumulace v mozku v podobě amyloidních plaků je jednou z charakteristik Alzheimerovou choroby. Vyskytuje se v monomerní nebo rozpustné oligomerní formě, také může vytvářet nerozpustné agregáty a fibrily. V neuronech integrují oligomery a agregáty s V nebo C-doménou RAGE a generuje se tak oxidativní stres, který aktivuje NF- κ B (Sparvero *et al.*, 2009).

3.1.2.4 HMGBI (Amfoterin)

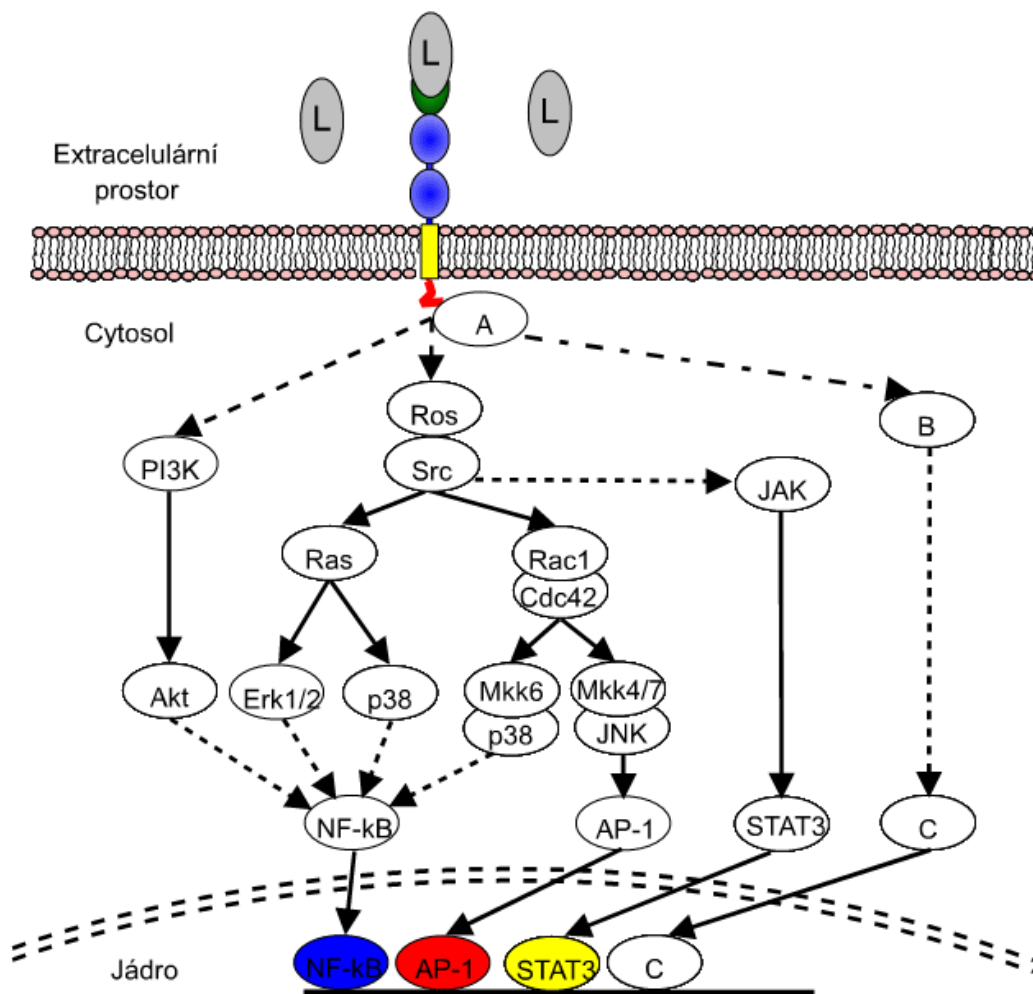
HMGBI je jediný zástupce ze skupiny HMGB (High Mobility Group), který je schopný aktivace RAGE receptoru. HMGBI se vyskytuje jak extracelulárně tak intracelulárně (v cytosolu nebo v jádře). Zvýšená exprese byla prokázána ve slezině, brzlíku a varlatech a v poškozených tkáních (Sparvero *et al.*, 2009).

Cytosolický HMGBI má pozitivní vliv na regulaci autofagie. Exprese tohoto proteinu se značně liší v závislosti na typu a stavu tkáně (Sparvero *et al.*, 2009).

Amfoterin je sekretován aktivně makrofágy, NK buňkami a zralými dendritickými buňkami, pasivně rovněž nekrotickými buňkami (Sparvero *et al.*, 2009). Působí jako silný prozánětlivý aktivátor, což přispívá k patogenezi nejrůznějších zánětlivých onemocnění (Logsdon *et al.*, 2007).

3.1.3 RAGE signalizace

Rage signalizace je poměrně komplexní. Bylo prokázáno, že vazba ligandu na RAGE receptor vede k aktivaci celé řady signálních drah, jako jsou **ERK1/2** (Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2), **Cdc42/Rac1** (Cell Division Cycle 42/Ras Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1), **SAPK/JNK** (Stress Activated Protein Kinase/c-Jun NH2-Terminal Kinase), **MAPK** (p38 Mitogen-Activated Protein Kinase), **JAK/STAT** (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription) ^(Fritz, 2011). Aktivace těchto rozmanitých signálních drah je způsobena jednak širokou škálou RAGE ligandů, ale i prostředím a typem buněk. Nemalá část RAGE signálních drah konverguje na úrovni aktivace **NF-κB** (Nuclear Factor Kappa B) transkripčního faktoru, dále mohou vést k aktivaci transkripčního faktoru **AP-1** (Activator Protein 1), **STAT3** (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) případně dalších ^(Bierhaus *et al.*, 2005). Zmíněné transkripční faktory se podílejí na regulaci transkripce zánětlivých cytokinů, proliferace, buněčné diferenciace, migrace, fagocytosy a autofágie ^(Sorci *et al.*, 2013).



Obr. 2: Schéma RAGE signalizace. Plná čára znázorňuje, že došlo k přímé aktivaci, přerušovaná čára znázorňuje nepřímou aktivaci. Vlastní zpracování dle Riehl *et al.*, 2009

3.1.3.1 Signální dráha JAK/STAT3

JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducers and Activator of Transcription) je signální dráha, jejíž regulace je zprostředkována řadou receptorů jako je například RAGE a některé cytokinové receptory. JAK patří do skupiny enzymů, který se vyznačuje tyrosin kinasovou aktivitou. U savců se rodina proteinu JAK skládá ze 4 členů: JAK1, JAK2, JAK 3 a TYK2. K aktivaci JAK dochází následkem konformační změny receptoru po navázání příslušného ligandu, tímto způsobem se dostanou do těsné blízkosti dvě molekuly JAK asociované s tímto receptorem a navzájem se fosforylují. Takto aktivovaný JAK dále fosforyluje STAT (Rawlings *et al.*, 2005).

STAT je transkripční faktor, který je umístěn v neaktivní formě v cytoplazmě. Existuje sedm savčích STAT (STAT 1, 2, 3, 4, 5a, 5b a 6), které nesou zbytek tyrosinu v blízkosti C konce, tento tyrosin je fosforylován JAK. Fosforylovaný STAT vstupuje ve formě diméru do jádra, kde se váže na specifické regulační sekvence vedoucí k aktivaci nebo potlačení transkripce cílových genů (Rawlings *et al.*, 2005).

3.1.4 Fyziologická funkce RAGE

Poté, co se zjistilo, že RAGE receptor váže AGEs se výzkum zaměřil nejen na patologické stavy, ale i na potenciální roli RAGE v homeostase. Studie prokázaly různou míru exprese RAGE v závislosti na typu tkání (Alexiou *et al.*, 2010). Zatímco se obecně zvýšená exprese nachází v embryonálních buňkách, v průběhu života ve většině tkání pozvolna klesá a v průběhu stárnutí se obvykle znovu zvyšuje (Bierhaus *et al.*, 2005).

Zvýšenou expresi vykazují buňky centrálního nervového systému během jeho vývoje. Fyziologickým ligandem nervových buněk je HMGB1 a S100, vazba těchto ligandů k RAGE vede ke zvýšení přežívání buněk prostřednictvím antiapoptického proteinu Bcl-2 (B-cell lymphoma 2). Bylo prokázáno, že aktivace RAGE vede ke zvýšené ochraně neuritů před škodlivými vlivy, k opravám neuronů v průběhu rané fáze a diferenciaci během vývoje. Dále bylo zjištěno, že RAGE má důležitou roli v regeneraci a plasticitě buněk periférního nervového systému (Alexiou *et al.*, 2010).

Zajímavé je, že byla nalezena vysoká hladina transkriptu RAGE, jak v endoteliálních, tak v alveolárních epitelárních plicních buňkách dospělých jedinců. Později bylo zjištěno, že se podílí na alveolární stabilitě a při efektivní výměně plynů. Inaktivace genu RAGE ve studiích na transgenních myších se však neprokázala v raných fázích jako letální. V pozdějším pozorování ztráta RAGE byla spojována s idiopatickou plicní fibrosou (Alexiou *et al.*, 2010).

V kosterním svalstvu byla prokázána zvýšená exprese, která je regulována v průběhu vývoje organismu a zcela chybí v dospělé tkáni. Fyziologickou funkcí v kosterním svalstvu je, že se podílí v prenatálním i postnatálním období na myogenezi. Inhibice funkce RAGE měla za následek zvýšenou proliferaci, migraci, invazivitu a sníženou apoptózu a adhesi. A v neposlední řadě bylo prokázáno, že RAGE se podílí na aktivaci a zrání osteoklastů a remodelaci kostí (Alexiou *et al.*, 2010).

3.1.5 Úloha RAGE v patogenezi onemocnění

Ačkoliv se RAGE účastní mnoha základních biologických procesů, jeho porucha exprese vede k narušení homeostasy a ke vzniku nejrůznějších chronických onemocnění zahrnující cukrovku, Alzheimerovou chorobu a nádorová onemocnění (Sparvero *et al.*, 2009). Za fyziologických podmínek endoteliální buňky, monocyty, makrofágy, buňky hladkého svalstva, fibroblasty a nervové buňky nevykazují významnou expresi RAGE, ale ta může být indukována v situacích, kdy se hromadí jeho ligandy nebo jsou aktivovány transkripční faktory regulující RAGE (Bierhaus *et al.*, 2005).

3.1.5.1 Zánět

RAGE je exprimován u mnoha typu buněk imunitního systému a podílí se na vzniku akutního a chronického zánětu, např. revmatoidní artritidy, arteriosklerózy a chronického onemocnění ledvin. V endotelových buňkách působí RAGE jako receptor pro adheze leukocytů a je indukován prozánětlivými RAGE ligandy. Při stresových podmínkách dochází k přechodné syntéze a uvolňování RAGE ligandů, které aktivují opravný mechanismus. Nicméně v prostředí chronického stresu dochází k nadměrné akumulaci ligandů, to vede ke spuštění trvalé buněčné odpovědi a následné tkáňové dysfunkci (Riehl *et al.*, 2009).

3.1.5.2 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je neurodegenerativní onemocnění mozku, při kterém dochází k postupné ztrátě kognitivních funkcí. V endotelu mozku zprostředkovává RAGE příliv Abeta do mozkové tkáně, které se akumulují ve formě plaků. Inhibice RAGE může vést k zlepšení kognitivních funkcí, ale je problém při jejich aplikaci, neboť spousta látek neprochází hematoencefalitickou bariérou (Deane *et al.*, 2012).

3.1.5.3 *Diabetes mellitus*

Diabetes mellitus je jedním z nejrozšířenějších chronických onemocnění na celém světě. Následkem chronické hyperglykémie, kterou trpí pacienti s diabetem, se zvyšuje produkce AGEs, které mohou za rozvoj mikrovaskulárních a makrovaskulární komplikací, jako je nefropatie, retinopatie a neuropatie, cévní mozková příhoda a akutní infarkt myokardu (Oliveira *et al.*, 2013)

3.1.5.4 **Expres RAGE v nádorech**

Přestože naše poznatky o molekulární funkci RAGE během karcinogeneze a maligní progresu je omezený, poslední experimentální údaje *in vitro* analýzy na myších modelech podporují přímou souvislost mezi aktivací RAGE a proliferací, migrací či invazivitou nádorových buněk. Je důležité zmínit, že nejen nadměrná exprese RAGE, ale i koncentrace nefyziologických tak fyziologických ligandů vede ke karcinogenezi. Bylo potvrzeno, že zamezení interakce ligand/RAGE inhibuje růst některých nádorů. Overexpres RAGE byla prokázána u mnoha typu nádorů, jako jsou nádory prostaty, vaječníku, žaludku, tlustého střeva, mozku, lymfomu a melanomu (Logsdon *et al.*, 2007; Riehl *et al.*, 2009)

Plicní nádory představují výjimku v expresi RAGE a jeho ligandů. Ve srovnání s jinými tkáněmi je exprese za fyziologických podmínek vysoká a potlačení souvisí s neoplastickou transformací buňky. V plicích jsou exprimovány ve vysokém množství ligandy S100A12 a HMGB1, velmi nízká exprese nebo jiné ligandy (S100P, S100A4) vedou ke karcinogenezi (Logsdon *et al.*, 2007)

V případě rakoviny tlustého střeva byla hlášena zvýšená exprese RAGE pouze v některých nádorech. U těchto nádorů je spojován RAGE s invazí a metastasemi. Signalizace je zprostředkována vazbou ligandů S100A8/A9, HMGB1, AGEs a S100P. Interakce S100A8/A9 s RAGE je spojována s kolitidou asociovanou s rakovinou (Alexiou *et al.*, 2010)

U rakoviny prsu je prokázána zvýšená exprese RAGE a RAGE ligandů jako jsou S100A4, S100P, HMGB1 a S1009. Vhodným markerem tohoto onemocnění se zdá být S100A4, který je detekován již při časných metastasích rakoviny prsu (Logsdon *et al.*, 2007)

Stimulace růstu pankreatických nádorových buněk bývá zprostředkována ligandy AGEs a S100P. Signalizace prostřednictvím vazby S100P/RAGE má vliv na motilitu, invazivitu a metastasy u 90% nádorů slinivky (Alexiou *et al.*, 2010)

3.1.6 RAGE jako potenciální terapeutický cíl

RAGE receptor je zapojen primárně ve fyziologických procesech podílejících se na udržení homeostasy. Na druhé straně jeho nadměrná exprese hraje velkou roli při patogenezi různých onemocnění. Četné studie dokazují, že zamezení interakce RAGE s jeho ligandy vede ke zmírnění či utlumení jejich příznaků. RAGE receptor proto představuje poměrně atraktivní terapeutický cíl (Logsdon *et al.*, 2007).

Experimentálně může být aktivita RAGE inhibována různými způsoby. Molekuly, jako jsou protilátky, nízkomolekulární látky a sRAGE, jsou schopné interagovat s ligandy, čímž je znemožněna jejich vazba k receptoru. Dalším způsobem může být obsazení vazebného místa RAGE receptoru pomocí antagonistů. Nedochozí tak ke spuštění biologické odpovědi. Mezi tyto antagonisty řadíme anti-RAGE protilátky, peptidy a nízkomolekulární látky. Posledním přístupem je aplikace antioxidantů a inhibitorů NF- κ B. Reaktivní formy kyslíku vedou ke spuštění signálních drah, které mohou aktivovat transkripční faktor NF- κ B podílející se na zánětu a vzniku některých chronických onemocnění. Použitím inhibitorů NF- κ B nebo antioxidantů můžeme narušit pozitivní zpětnovazebný systém zodpovědný za zvýšenou expresi RAGE (Logsdon *et al.*, 2007).

3.1.7 Inhibitory RAGE receptoru

3.1.7.1 Proteinové inhibitory

3.1.7.1.1 sRAGE

Mezi proteinové inhibitory RAGE patří rozpustné formy RAGE, které vznikly buď alternativním sestřihem genu pro RAGE (sRAGE, soluble RAGE) nebo proteolýzou RAGE vázaného v plazmatické membráně (cRAGE, cleaved RAGE). Řadíme je mezi tzv. decoy receptory, což jsou analogy receptorů RAGE, které postrádají cytoplazmatickou část, a po navázání ligandu nedojde k přenosu signálu do nitra buňky. V patologických stavech se sRAGE vyskytuje v nízké koncentraci až na několik málo výjimek, proto je sRAGE využíván jako biomarker různých onemocnění. Četné studie dokazují, že podání sRAGE vedlo k zabránění mikro a makrovaskulárních komplikací u diabetu, k inhibici růstu tumorů a jejich metastasí a k potlačení Alzheimerovy choroby (Alexiou *et al.*, 2010).

3.1.7.1.2 Anti-RAGE protilátky

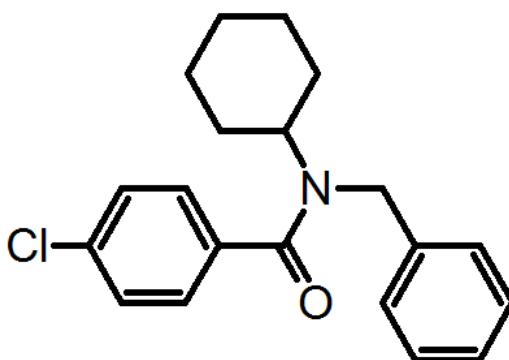
Vazbou protilátky na RAGE se zabrání navázání ligandu na tento receptor, a proto nedochází k šíření signálu do buňky. Použití těchto protilátek je unikátní ve vysoké

specifitě, ale je limitováno krátkým poločasem rozpadu. Ke zvýšení terapeutického potenciálu je nutná rovněž humanizace, neboť použití živočišných protilátek indukuje imunitní odpověď (Alexiou *et al.*, 2010).

3.1.7.2 Nízkomolekulární inhibitory

3.1.7.2.1 FPS-ZM1

FPS-ZM1 je látka odvozena od sloučeniny FPS2, která byla zkoumána během primární fáze testování inhibiční aktivity Abeta/RAGE, kdy se testovalo přibližně 5 000 látek. Ve srovnání s FPS2, vykazuje dvojnásobně vyšší afinitu k RAGE a přibližně 53 krát lépe penetroval přes hematoencefalickou bariéru. Molekulární hmotnost FPS-ZM1 činí 327 Da. Váže se do specifické oblasti V-domény RAGE receptoru, ale nikoliv do oblasti C1 a C2-domény. Afinita této látky po podání jiných ligandů (S100B, HMBG1) byla výrazně nižší než po podání Abeta. Po aplikaci látky FPS-ZM1 ve vysokých terapeutických dávkách do transgenních myši byly testy toxicity v rámci fyziologického rozmezí. Prokázáno bylo také, že po podání této látky je podstatně snížena hladina proteinů různých prozánětlivých cytokinů v kortexu a hipokampu (Deane *et al.*, 2012).



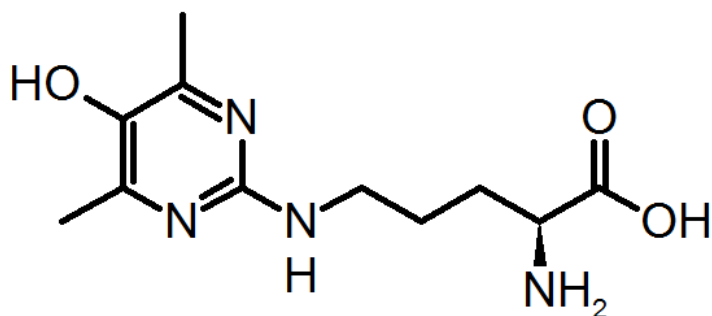
Obr. 3: Chemická struktura FPS-ZM1

3.1.7.2.2 PF-04494700

PF-04494700 je nízkomolekulární inhibitor, jehož struktura není zcela objasněna. Tento inhibitor dosáhl již klinické fáze II. Proces klinického testování byl ukončen po 12 měsících léčby pacientů v středně těžkém stádiu Alzheimerovy choroby na základě vedlejších účinků projevujících se při vyšších terapeutických dávkách. Nicméně podání nízkých terapeutických dávek mělo pozitivní efekt na kognitivní funkce pacientů (Han *et al.*, 2012; Perrone *et al.*, 2012).

3.1.7.2.3 Deriváty pyrimidinu

Studie korejských vědců se zaměřila na inhibitory, které byly inspirovány modifikací ligandu interagující s RAGE receptorem. Jelikož jsou ligandy RAGE ve většině případů makromolekulární látky, pro návrh těchto inhibitorů byl zvolen templát monomérní AGEs. Jako nejvhodnější kandidát byl zvolen argpyrimidin (obr. 4), který představuje oproti ostatním AGEs relativně snadnou syntézu a disponuje vlastnostmi blízkými léčivu (Han *et al.*, 2012).



Obr. 4: Chemická struktura argpyrimidinu

Han a kolektiv nasynthetizovali 60 derivátů pyrimidinu, které aplikovali v *in vitro* studiích. Pro *in vivo* testování vybrali celkem 3 deriváty, které vykazovaly vysokou inhibiční aktivitu. Jednalo se o látky označené číslem 53, 59 a 60. Názvy těchto látek jsou uvedeny v tabulce 1 (Han *et al.*, 2012).

Tab. 1: Látky aplikované *in vivo*

Číslo	Název
53	4-(4-(2-Cyklohexylethoxy)fenyl)-N-(3-(2-(diethylamino)ethoxy)-fenyl)-6-methylpyrimidin-2-amin
59	4,6-bis(4-chlorofenyl)-N-(3-(2-(diethylamino) ethoxy)fenyl)-pyrimidin-2-amin
60	4,6-bis(4-chlorofenyl)-N-(2-(2-(diethylamino) ethoxy) fenyl)-pyrimidin-2-amin

Nejprve byl myším standardního genotypu podán intraperitoneálně jeden z vybraných inhibitorů, následně injekce lidského Abeta. Hladina lidského Abeta byla sledována z extraktu mozkové tkáně, poté stanovena inhibiční aktivita testovaných inhibitorů. Všechny tři analogy vykazovaly významné snížení hladiny Abeta bez významné změny množství periferní lidské Abeta. Tato pozorování podporují

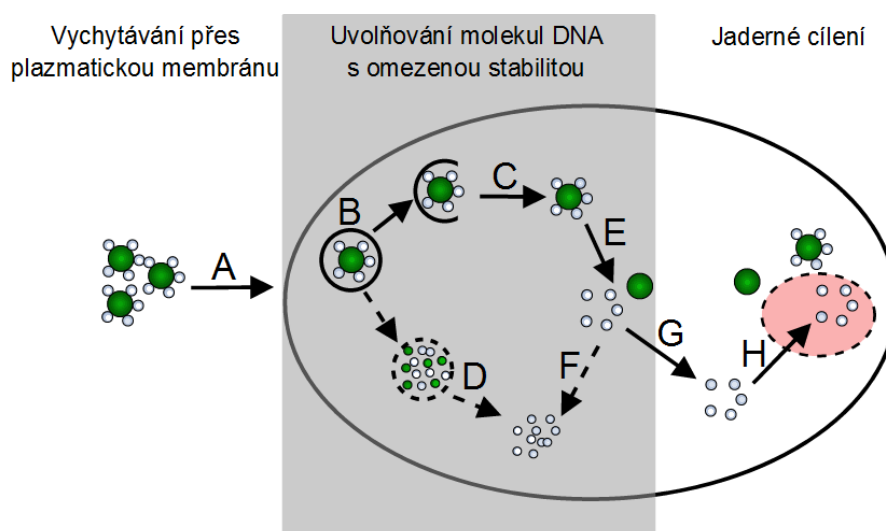
hypotézu, že snížení hladiny Abeta bylo způsobeno inhibicí RAGE receptoru interakcí s pyrimidinovými deriváty ^(Han et al., 2012).

Byly provedeny další dlouhodobé studie využívající transgenní myši s vyvolaným Alzheimerovým onemocněním pro ověření požadovaných terapeutických účinků pyrimidinových analogů. Účinnost analogů byla hodnocena na základě míry akumulace Abeta v mozku a sledování změn kognitivních funkcí. Nejsilnější inhibiční účinek vykazoval analog 59. Perorální podání tohoto derivátu po dobu 3 měsíců vedlo ke snížení akumulace Abeta v mozku a bylo sledováno výrazné zlepšení kognitivních funkcí bez významných vedlejších účinků ^(Han et al., 2012).

Mechanismus inhibice RAGE analogem 59 byl zkoumán pomocí rezonance povrchových plazmonů (SPR, surface plasmon resonance), což dokázalo přímou vazbu inhibitoru na V-doménu receptoru RAGE ^(Han et al., 2012).

3.2 Transfekce a transdukce

Transfekce a transdukce představují obecně proces vkládání cizorodé nukleové kyseliny do cílové buňky. Tyto dvě metody se liší způsobem vkládání vektoru. Transdukce využívá virální vektor a transfekce je definována použitím nevirálních, nejčastěji chemických a fyzikálních. Tyto technologie jsou nezbytnou součástí studia promotorů, transkripčních faktorů, m-RNA, protein-proteinových interakcí, translace a rekombinace (Groskreutz and Schenborn, 1997). Schopnost efektivně vnášet cizorodou DNA do buněk závisí na mnoha faktorech (Obr. 5). Počet exogenních DNA molekul se snižuje v každém kroku transportu do jádra třemi hlavními překážkami: nízké vychytávání přes plazmatickou membránu, nedostatečné uvolnění DNA s omezenou stabilitou a nedostatečné jaderné cílení (Luo and Saltzman, 1999).



Obr. 5: Schéma přenosu exogenní DNA do buňky: (A) transport DNA komplexu přes plazmatickou membránu. (B) Endocytosa. (C) Lýze endosomů. (D) Degradace v endosomu. (E) Intracelulární uvolnění komplexu. (F) Degradace v cytosolu. (G) Jaderné cílení. (H) Vstup do jádra a exprese. Vlastní zpracování dle Luo and Saltzman, 1999.

3.2.1 Fyzikální metody

Fyzikální metody jako jsou genové dělo, elektroporace a mikroinjekce využívají mechanických nebo elektrických vlivů, které způsobí přechodnou penetraci buněčné membrány, čímž se usnadní vstup nukleové kyseliny do cytoplazmy nebo do jádra cílových buněk (Luo and Saltzman, 1999). Každá z těchto technologií je popsána v následujících podkapitolách.

3.2.1.1 Mikroinjekce

Mikroinjekce je metoda využívající přímé vstříkávání nekomplexovaných nukleových kyselin do buněčného jádra za pomoci tenké jehly (Cappechi, 1980). Tato metoda je velmi účinná, ale jedna z nevýhod tohoto přístupu je, že pomocí mikroinjekce lze transfekovat pouze jednu buňku, což značně omezuje možnosti aplikace. Oproti jiným metodám je navíc poměrně pomalá a pracná, a rovněž nevhodná pro *in vivo* aplikace (Luo and Saltzman, 1999). Mikroinjekce se hojně využívá např. pro přenos DNA do embryonálních kmenových buněk sloužící k přípravě transgenních organismů (Bockamp *et al.*, 2002).

3.2.1.2 Elektroporace

Princip elektroporace je založen na aplikaci elektrického pulzu indukujícího vznik přechodných pórů v plazmatické membráně, které umožňují průchod molekul nukleových kyselin do cílové buňky (Shigekawa and Dower, 1988). Tato metoda byla poprvé popsána při studiu přenosu genů do myších buněk (Wong and Neumann, 1982). Pro jednotlivé typy buněk je klíčová optimalizace této metody, především délka a intenzita pulzu. Nevýhodou této metody je výrazná úmrtnost, proto je nutné použití většího počtu buněk. Elektroporace se často používá pro buňky, které lze obtížně transfekovat, jako jsou rostlinné protoplasty, dále se používá pro transfekci například kmenových buněk (Luo and Saltzman, 1999).

3.2.1.3 Genové dělo

Genové dělo (také Biolistic Particle Delivery) je metoda, při které jsou mikročástice zlata nebo wolframu o průměru 1-3 μm potažené plasmidovou DNA urychlovány na vysokou rychlost. Takto vystřelené mikroprojektily jsou schopné proniknout do cílových buněk (Ye *et al.*, 1990; Wolff *et al.*, 1992). Pomocí této metody lze transfekovat adherentní buněčné kultury, ale i rostlinné buňky (Luo *et al.*, 1999).

3.2.2 Chemické metody

Principem chemických metod transfekce je tvorba komplexu mezi záporně nabitou DNA a pozitivně nabitou chemickou látkou, obvykle polymérní povahy. K prvním chemickým látkám používaným při transfekci patří 2-(diethylamino)ether dextran (DEAE) a fosforečnan vápenatý. Dnes se využívají převážně činidla na bázi polykationtových lipidů, které usnadňují vstup nukleové kyseliny do buňky endocytosou (Luo and Saltzman, 1999).

Výhodou kondenzovaných komplexů je nejen usnadněná absorpce do cílových buněk, ale také tento komplex chrání DNA před intracelulární degradací zprostředkovanou nukleasami (Wang *et al.*, 2013).

3.2.2.1 DEAE dextran a fosforečnan vápenatý

Chemická metoda využívající k přenosu nukleové kyseliny těchto činidel je jednoduchá a efektivní, avšak omezená mírou cytotoxicity, tudíž není vhodná pro *in vivo* studie. Další nevýhodou je, že DEAE dextran neumožňuje stabilní transfekce (Luo and Saltzman, 1999).

3.2.2.2 Kationtové lipidy (liposomy)

Kationtové lipidy se obecně skládají ze tří základních částí: hydrofilní hlavičky, hydrofóbního konce a linkeru (Wang *et al.*, 2013). Kationtové lipidy tvoří lipidové dvojvrstvy, které ve vodě vytváří koloidní částice (Sessa and Weissmann, 1968). Negativně nabitě fosfáty nukleové kyseliny asociují s kladně nabitou hlavičkou lipidů pomocí elektrostatických sil a vzniká tzv. lipoplex. Buňky transfekované pomocí lipozomových technik jsou vhodné i pro dlouhodobé studie, které jsou založeny na integraci DNA do chromozomu. Metoda liposomů je také vhodná pro *in vivo* aplikace (Felgner *et al.*, 1995). Nejčastěji se využívají lipidy s výsledným kladným nábojem za fyziologického pH, ale mohou se kombinovat s neutrálním lipidem jako je L-dioleoylfosfatidylethanolamin (DOPE), který zlepšuje přenos genu některých syntetických kationtových lipidů (Felgner *et al.*, 1994; Wheeler *et al.*, 1996). Ke vstupu liposomálních komplexů do buňky může dojít endocytosou nebo fúzí s plazmatickou membránou (Gao a Huang, 1995).

3.2.2.3 Kationtové polymery

Do této skupiny patří přírodní polymery jako je chitosan, dendrimery polyamidoaminu (PAMAM), poly-L-lysin (PLL), polyethylenimin (PEI), polyphosphoester a další. Chemickou úpravou kationtových polymerů je možné docílit zvýšení jejich transfekovatelnosti a snížení toxicity. Podobně jako u kationtových lipidů dochází

k elektrostatické interakci kladně nabitých částí polymerů (aminové skupiny) s negativně nabitými fosfáty nukleové kyseliny a vytváří se tzv. polyplexy. Obvykle polyplexy mají vyšší stabilitu než lipoplexy ^(Wang *et al.*, 2013).

3.2.3 Virální metody

Virální metody využívají k přenosu genu různé třídy virů, jako jsou adenoviry, retroviry, lentiviry, adeno-asociované viry (AAV) a herpes simplex viry (HSV). Virální vektory jsou modifikovány odstraněním některých oblastí jejich genomu tak, aby jejich replikace byla kontrolovatelná a tak jsou tyto vektory bezpečnější. Nevýhodou je výrazná imunogenita, která způsobuje indukci zánětlivé reakce ^(Nayerossadat *et al.*, 2012) a riziko inzerční mutagenese, transaktivace sousední sekvence genomu a onkogenese. Inzerce virového vektoru do hostitelských buněk je čistě náhodná ^(Pauwels *et al.*, 2009).

3.2.3.1 Lentivirální vektory (LV)

Lentivirové vektory jsou odvozené od přirozeně se vyskytujících lentivirů (*Lentoviridae*), které řadíme do podtřídy retrovirů (*Retroviridae*). Ve srovnání s jinými virovými vektory vykazují schopnost infikovat dělicí i nedělicí se buňky, jsou vysoce efektivní a zajišťují dlouhodobou stabilní expresi transgenů. Nevýhodou je silný tropismus. ^(Nayerossadat *et al.*, 2012). Do skupiny *Lentoviridae* patří HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus Type I), HIV-2 (Human Immunodeficiency Virus Type II), SIV (Simian Immunodeficiency Virus), visna virus, EIAV (Equine Infectious Anemia Virus), CAEV (Caprine Arthritis-Encephalitis Virus) FIV a BIV (The Feline and Bovine Immunodeficiency Viruses). První vyvinuté lentivirové vektory byly založeny na viru HIV-1 ^(Cockrell and Kafri, 2007).

Na koncích virálního genomu začleňujícího se do genomu hostitelské buňky se nacházejí LTR (Long Terminal Repeats) ohraničující kódující oblast viru, které jsou nezbytné pro replikaci a transkripci genů. Dále obsahují sekvence kódující strukturální geny: GAG, POL a ENV. GAG sekvence kóduje matrix, kapsidu a nukleokapsid. POL sekvence kóduje 3 základní enzymy: proteasy, reverzní transkriptasu a invertasu. Genom LV obsahuje 2 regulační geny a to *tat* a *rev*, které jsou nezbytné pro replikaci a 4 doplňkové geny *vif*, *vpu*, *vpr*, *nef*, které jsou rovněž důležité pro replikaci a také v patogenezi ^(Pauwels *et al.*, 2009).

LV bývají speciálně upraveny tak, aby se snížila jejich patogenita a virulence. ^(Quinonez and Sutton, 2002). Aby bylo výrazně zvýšeno spektrum cílových buněk, jsou nahrazeny geny pro povrchové glykoproteiny geny jiného virového genomu např. viru vezikulární

stomatidy. Dále bývají deletovány určité geny a odstraněny terminální signální sekvence (Gardlík *et al.*, 2005).

3.3 Reportérové geny

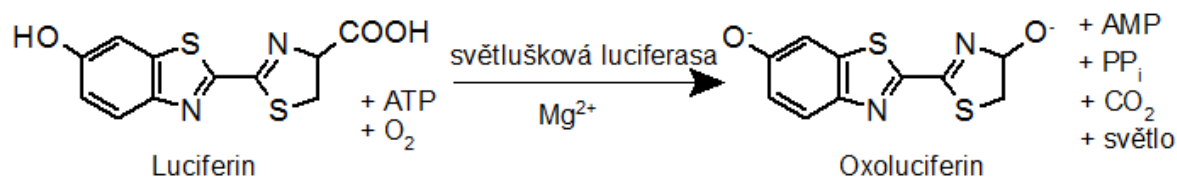
Reportérové geny se staly neocenitelným nástrojem při studiu genové exprese. Jsou široce využívány ve farmaceutickém a biomedicinském výzkumu, v molekulárně-biologických a biochemických aplikacích (Allard and Kopish, 2008).

RG slouží ke sledování změn genové exprese a nejjednodušším přístupem je tak kvantifikace finálního produktu genu: m-RNA nebo proteinu. Systém informující o genové expresi, tzv. *reporter gene assays* je molekulárně biologická technika, využívající rozsáhlý soubor nástrojů ke studiu regulačních sekvencí promotorů, enhancerů a transkripčních faktorů. Tato technika využívá nejčastěji eukaryotické buněčné linie transfekované přechodně nebo stabilně reportérovým plasmidem.

Reportérový plasmid se skládá ze dvou základních funkčních částí. První funkční oblast je DNA sekvence poskytující informace o proteinu, který je produkován. Druhá část je specifická DNA promotorová sekvence pro studovaný receptor. Promotor je fúzovaný s kódující sekvencí. Vazbou transkripčních faktorů nebo receptorů do této oblasti promotoru dochází ke spuštění nebo potlačení exprese genu (Liu *et al.*, 2009). Na základě správného designu reportérového systému odpovídá exprese reportérového genu transkripční aktivitě sledovaného receptoru nebo transkripčního faktoru.

Strukturní oblast RG je navržena tak, aby po expresi byl produkt snadno detekovatelný pomocí měření luminescence, absorbance či fluorescence. Nejčastěji se využívá geny pro světluškovou luciferasu (LUC), β -galaktosidasu (GUS), β -glukuronidasu (β -Gal), zelený fluorescenční protein (GFP, Green Fluorescent Protein) nebo sekretovanou alkalickou fosfatasu (SEAP, Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase).

Světlušková luciferasa (LUC) je enzym široce využívaný pro reportérové systémy, jelikož nevyžaduje posttranslační modifikace a proto je detekovatelný ihned po translaci. Reporterové systémy využívající světluškovou luciferasu jsou velmi citlivé a snadno kvantifikovatelné. Principem metody je detekce bioluminescence generované oxidací luciferinu v přítomnosti ATP a O_2 na oxyluciferinu, AMP, PP_i , CO_2 (Promega, Luciferase Assay System Protocol). Schéma reakce je zaznamenán na obrázku 6.



Obr. 6: Bioluminescenční reakce katalyzovaná světluškovou luciferasou za přítomnosti co-substrátu ATP a O₂. Převzato a upraveno z Luciferase Assay System, Promega.

Další RG využívající fúzovaný protein je gen kódující **SEAP (Secreted embryonic alkaline phosphatase)**. SEAP protein je extrémně tepelně stabilní a je vylučován do supernatantu buněčné kultury, což představuje výhodu oproti intracelulárním reportérům a také je vhodný pro studium kinetiky. Reportérová aktivita je detekována přidáním chemiluminescenčního substrátu bez nutnosti lýze buněk (Yang *et al.*, 1997).

GUS (β-galaktosidasa) kóvaný genem lacZ je enzym zodpovědný za hydrolýzu laktosy na glukosu a galaktosu, ale může hydrolyzovat i jiné substráty jako jsou chromogeny ONPG (o-nitrofenolu-β-D-galaktopyranosid), X-gal (5-brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid), resp. S-gal (3,4-cyclohexenoesculetin-β-D-galaktopyranosid) což se projeví typickým žlutým, modrým, resp. černým zbarvením (Ghim *et al.*, 2010).

Jako reportéry jsou také široce využívány **fluorescenční proteiny**, které jsou obecně stabilní. Mezi nejznámější patří zelený fluorescenční protein GFP (Green Fluorescent Protein), přičemž existuje více než 10 barevných variant tohoto proteinu (Ghim *et al.*, 2010).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Přístrojové vybavení

V experimentální části bylo použito následující přístrojové vybavení: analyzátor luminescence EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin Elmer Enspire), aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad), automatický čítač buněk ViCell XR (Beckmann Coulter), blotovací aparatura Transblot SD Semi Dry Transfer Cell (BioRad), centrifuga Rotina 420R (Hettich), CO₂ inkubátor Heracell 150i (Thermo Scientific), elektroforetický zdroj Power Pac HC (BioRad), flowbox s laminárním prouděním vzduchu MSC Advantage (Thermo Scientific), inverzní mikroskop IX51 (Olympus), inverzní mikroskop Primo Vert (Zeiss), IR spektrofotometr Direct Detect (Merck Millipore), laboratorní váha K0003 (AND), magnetická míchačka RTC Basic (IKA), mini centrifuga C-1200 (National Labnet Co.), pipetor (Hirschmann Laborgereate), přístroj na kvantifikaci exprese proteinů Odyssey Fc (Li-Cor), sada automatických pipet (Eppendorf), termo blok DB-2A (Techne), třepačka Titramax 100 (Heidolph), třepačka UNIMAX 1010 (Heidolph), vodní lázeň (Mettler), vortex Genie 2 (Scientific Industries).

4.1.2 Chemikálie

V experimentech byly použity následující chemikálie: 2-merkapt ethanol 98% (Sigma-Aldrich), Acryl/Bis 40% (Amresco), AGE-BSA (Millipore), APS (Sigma-Aldrich), DMEM médium (Sigma-Aldrich), DMSO (Sigma-Aldrich), FCS (Sigma-Aldrich), chemiluminiscenční substrát Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore), luciferázový pufr (Promega), lyofilizovaný substrát luciferázy (Promega), lyzační pufr Cell Culture Lysis Reagent (Promega), lyzační pufr Reporter Lysis Buffer (Promega), methanol (Lach-Ner), MTT (Sigma-Aldrich), Ponceau S (Amresco), proteinový marker Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard (Invitrogen), Puromycin (Sigma-Aldrich), S100B (Sigma-Aldrich), SDS (Sigma-Aldrich), SureENTRY (SABioscience), TEMED (Sigma-Aldrich), Tris (Sigma-Aldrich), Tryple (Gibco), Tween 20 (Sigma-Aldrich).

4.1.3 Roztoky

Při práci byly použity tyto roztoky:

- **blokovací pufr:** 5% sušené mléko v TBS s 0,1% Tween;
- **blotovací pufr:** 50 ml 10x TG, 200 ml deionizované vody, 100 ml methanolu, doplněno na 500 ml deionizovanou vodou;
- **dělicí gel (10%, 10 ml na 2 gely):** 4,9 ml H₂O; 2,5 ml Acryl/Bis 40%; 2,5 ml Tris pH 8,8; 4 µl TEMED; 200 µl APS;
- **DMEM médium:** 450 ml DMEM média, 50 ml FCS, přefiltrováno;
- **elektroforetický pufr:** 100 ml 10x TGS + 900 ml deionizované vody;
- **Laemmli pufr:** 625 mmol/l Tris-HCl pH 6,8; 10% glycerol; 1% LDS; 0,005%; 50mM DTT
- **PBS pufr:** 8 g NaCl + 800 ml H₂O, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄; upraveno pH na 7,4 a doplněno do 1 l H₂O;
- **RIPA-pufr:** 1% NP-40; 0,1% SDS; 50 mmol/l Tris-HCl pH 7,4; 150 mmol/l NaCl; 0,5% deoxycholát sodný; 1 mmol/l EDTA (Sigma-Aldrich);
- **roztok MTT:** 5mg/ml 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid v PBS;
- **TBS pufr + TWEEN:** 100 ml 10x TBS + 900 ml H₂O + 1 ml Tween 20,;
- **TG (10x):** 25 mM Tris, 192 mmol/l glycin, pH 8,3 (Bio-Rad);
- **TGS (10x):** 25 mmol/l Tris, 192 mmol/l glycin, 0,1% SDS, pH 8,3 (Bio-Rad);
- **TRIS/SDS pH = 6,8 (4x):** 15,13 g 0,5 M Tris, 1g 0,4 % SDS, rozpuštěno v deionizované vodě, upraveno pH a doplněno do 250 ml;
- **TRIS/SDS pH = 8,8 (4x):** 45,5 g 1,5 M Tris, 1g 0,4 % SDS, rozpuštěno v deionizované vodě, upraveno pH a doplněno do 250 ml;
- **zamrazovací médium:** 3,5 ml DMSO, 46,5 ml FCS, přefiltrováno.
- **zaostřovací gel (5%, 6 ml na 2 gely):** 3,1 ml H₂O; 625 µl Acryl/Bis 40%; 1,25 ml Tris pH 6,8; 5 µl TEMED; 100 µl APS;

4.1.4 Protilátky

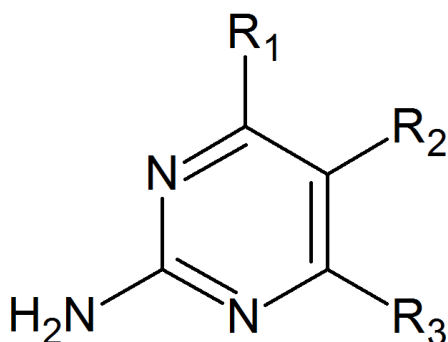
Všechny protilátky, které byly aplikované v experimentech, byly ředěné roztokem 5% sušeného mléka v TBS s 1% TWEENem. Primární protilátky králičí anti-RAGE (Sigma Aldrich) a myší anti- β -TUBULIN (Sigma Aldrich) byly ředěné 1:1000. K vizualizaci primárních protilátek byly použity sekundární protilátky anti-králik (Sigma Aldrich) a anti-myš (Sigma Aldrich) konjugované s křenovou peroxidasou. Sekundární protilátky byly ředěny 1:10000.

4.1.5 Ligandy

Pro aktivaci receptoru RAGE byly použity dva ligandy: AGE-BSA (Millipore) a S100B (Sigma Aldrich). Koncentrace zásobních roztoků ligandů činila 10 mg/ml a byly rozpuštěny v PBS.

4.1.6 Inhibitory RAGE signalizace

Byly testovány dva potenciální inhibitory RAGE s kodovým označením LEM814 a LEM815. Jednalo se o 4,5,6-trisubstituované-2-aminopyrimidiny (obr. 7), syntetizovány Dr. Kolmanem z ÚOCHAB. Koncentrace zásobních roztoků inhibitorů činila 10 mmol/l a byly rozpuštěny v DMSO.



Obr. 7: Obecná struktura 4,5,6-trisubstituovaných-2-aminopyrimidinů

4.1.7 Použité buněčné linie

K experimentu byla použita buněčná linie C6. Jedná se o adherentní linii odvozenou z glioblastomu potkana obecného (*Rattus norvegicus*). Veškerá práce byla provedena za sterilních podmínek ve flow boxu s laminárním prouděním vzduchu. Nádorová linie C6 byla kultivována v DMEM médiu (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) s přídavkem 10% FCS (Foetal Calf Serum) v CO₂ inkubátoru při 37°C, 5% CO₂.

K ověření exprese RAGE metodou western blotu byly využity také buněčné linie A549 a CHO. Obě tyto linie jsou adherentní, A549 je odvozená z lidského karcinomu plic. CHO byla odvozena z epiteliálních buněk vaječníku křečka čínského (*Cricetulus griseus*). Všechny zmíněné buněčné linie pocházely z americké sbírky tkáňových a buněčných kultur (ATCC).

4.2 Metodika

4.2.1 Pasážování, počítání

Na základě rychlého růstu byla buněčná linie pasážována 2 - 3x do týdne. Médium bylo slito do odpadu, láhev s buňkami promyta roztokem PBS a byl přidán malý objem TRYPL reagensie. Láhev byla ponechána v CO₂ inkubátoru při 37°C po dobu přibližně 3 minut. Po uvolnění buněk ze dna kultivační láhve byla reakce zastavena přidávkem nadbytku média. Denzita a viabilita buněk byla spočítána pomocí automatického analyzátoru ViCell.

4.2.2 Zamrazování

Po dosažení přibližně 80% konfluence byly buňky promyty PBS a přidáno malé množství TRYPLu. Přibližně po 3 minutách inkubace byla reakce zastavena nadbytkem média. Suspenze buněk byla přelita do falkony a centrifugována 5 minut při laboratorní teplotě, 1500 RPM. Supernatant byl slit do odpadu. Peleta byla resuspendována v malém množství 7% roztoku DMSO ve FCS a poté přidáno vhodné množství tohoto roztoku. Suspenze byla pipetována do kryozkumavek a uložena na -80°C.

4.2.3 Rozmrazování

Po vyjmutí zamrazené suspenze buněk z vysokomrazícího boxu byla kryozkumavka vložena do teplé vodní lázně nebo byla rozmrazená v dlani, poté byla přepipetována do falkony s přibližně 8 ml teplého média. Po přibližně 3-5 minutách byla falkona vložena do centrifugy na 5 minut při 1500 RPM. Po centrifugaci byl slit supernatant do odpadu, peleta byla suspendována v čistém médiu a poté přenesena do nadbytku média do kultivační nádoby, která byla následně přenesena do CO₂ inkubátoru.

4.2.4 MTT test

Pro určení vlivu zkoumaných látek na viabilitu a proliferaci C6 buněk byl použit MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid) test. Test je založený na redukci MTT dehydrogenasovým systémem mitochondrií na nerozpustné krystalky formazánu, které jsou dále rozpuštěny v roztoku SDS. Vlastnost redukce MTT má pouze živá buňka, proto rostoucí absorbance je přímo úměrná viabilitě (Mosmann, 1983).

Byla použita 96 jamková průhledná mikrotitrační destička. Do jamek B1-G1 bylo pipetováno 80 μ l média a do jamek B2-G11 80 μ l buněčné tak, aby na jamku připadalo 3000 buněk. Následující den bylo přidáno 20 μ l média do jamek B1-G2 a byla vytvořena koncentrační řada testované látky LEM 814 a LEM 815 dle následujícího schématu (faktor ředění: 2).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													
B	BLANK	KONTROLA	50.000 μ mol/l			0.781 μ mol/l			6.250 μ mol/l				
C			25.000 μ mol/l			0.391 μ mol/l			3.125 μ mol/l				
D			12.500 μ mol/l			0.195 μ mol/l			1.563 μ mol/l				
E			6.250 μ mol/l			50.000 μ mol/l			0.781 μ mol/l				
F			3.125 μ mol/l			25.000 μ mol/l			0.391 μ mol/l				
G			1.563 μ mol/l			12.500 μ mol/l			0.195 μ mol/l				
H													

Obr. 8: Schéma pipetování testovaných látek. Zeleně je znázorněná koncentrace LEM814, modře koncentrace LEM815.

Po 72 hodinové inkubaci bylo přidáno 10 μ l MTT do všech jamek. Mikrotitrační destička byla vložena na 2 minuty na třepačku a poté přenesena do inkubátoru. Po 3 hodinách inkubace byly krystalky formazánu rozpuštěny ve 100 μ l 10% SDS. Absorbance byla měřena při 540 nm pomocí spektrofotometru iEMS Reader MF (Labsystem). Pomocí programu Chemorezist byla stanovena hodnota IC50, která vyjadřuje koncentraci látky, po jejíž aplikaci dojde k usmrcení 50 % nádorových buněk.

4.2.5 Detekce exprese RAGE metodou western blot

4.2.5.1 Příprava vzorků

Buněčná kultura C6 byla naředěná na hustotu 70 000 buněk/ml, 10 ml takto naředěné kultury bylo kultivováno v Petriho misce. Po 4 dnech inkubace bylo médium slito a buněčná kultura byla promyta 4,5 ml vychlazeného PBS. Pomocí škrabky byly buňky ze dna misky seškrabány, bylo přidáno 4,5 ml vychlazeného PBS, přepipetováno do vychlazené falkony a vloženo do předem vychlazené centrifugy na 4°C / 1700 RPM / 4 minuty. Po centrifugaci byl odpipetován supernatant.

K peletě bylo přidáno 300 µl RIPA pufru a směs byla za občasného vortexování ponechána na ledu. Po 20 min. inkubace byla směs centrifugována 4°C/14 000 RPM/10 minut, poté byl supernatant přenesen do čisté vychlazené mikroskopické zkumavky a povařen (5 minut/95°C) se 100 µl Laemmliho pufru. Koncentrace proteinů byla stanovena metodou BCA. Stejný postup byl aplikován pro přípravu lyzátů z buněčných linií CHO a A549.

4.2.5.2 Elektroforéza, western blot

Elektroforéza proteinů byla provedena na polyakrylamidovém gelu. Byl použit 5% zaostřovací gel a 10% dělicí gel o tloušťce 0,75 mm. Do jamky bylo vždy nanášeno 20 µg proteinu. Nejprve probíhala separace při 80V 30 minut, po přechodu vzorků do dělicího gelu bylo napětí zvýšeno na 120 V po dobu přibližně 90 minut. Po dokončení separace byly bandy pomocí metody western blotu přeneseny na nitrocelulózovou membránu o velikosti pórů 0,45 µm. Přenos probíhal 35 minut při konstantním proudu 300 mA.

4.2.5.3 Imunodetekce na membráně

Membrány byly blokovány 5% roztokem sušeného mléka v TBS-T po dobu 60 minut. Následně promyty v TBS-T, 3x po dobu 10 minut a nakonec 10 minut v TBS. Membrány byly přeneseny na parafilm a byly na ně nanášeny primární protilátky ředěné 5% roztokem sušeného mléka v TBS-T, faktor ředění 1:1000. Na první membránu byly nanášeny králičí anti-RAGE protilátky na druhou membránu anti-β-tubulin. Inkubováno při 4°C do následujícího dne. Po inkubaci byly membrány promývány 3x po dobu 10 minut v TBS-T, a 10 minut promývány pouze v TBS. Na membrány byly nanášeny sekundární protilátky. Po hodinové inkubaci byla membrána promyta stejným způsobem jako po aplikaci primárních protilátek. Na membránu byl finálně nanášen substrát

pro peroxidasu (Luminata forte-Millipore), po 5 minutách se detekoval signál použitím přístroje pro kvantifikaci exprese proteinů Odyssey Fc (Li-Cor).

4.2.6 Transdukce lentivirovým reportérem, selekce a příprava klonů

Do šesti jamek 12 jamkové mikrotitrační destičky bylo napipetováno 1 ml buněčné suspenze o hustotě 10 000 buněk/ml, předpokládalo se, že počet buněk do následujícího dne se zdvojnásobil. Byly zvolené dvě hodnoty MOI (Multiplicity of Infection) a to 25 a 50, tato hodnota vyjadřuje počet virových částic na 1 buňku.

$$\text{MOI (Multiplicity of Infection)} = \frac{\text{počet transdukujících částic}}{\text{počet cílových buněk}}$$

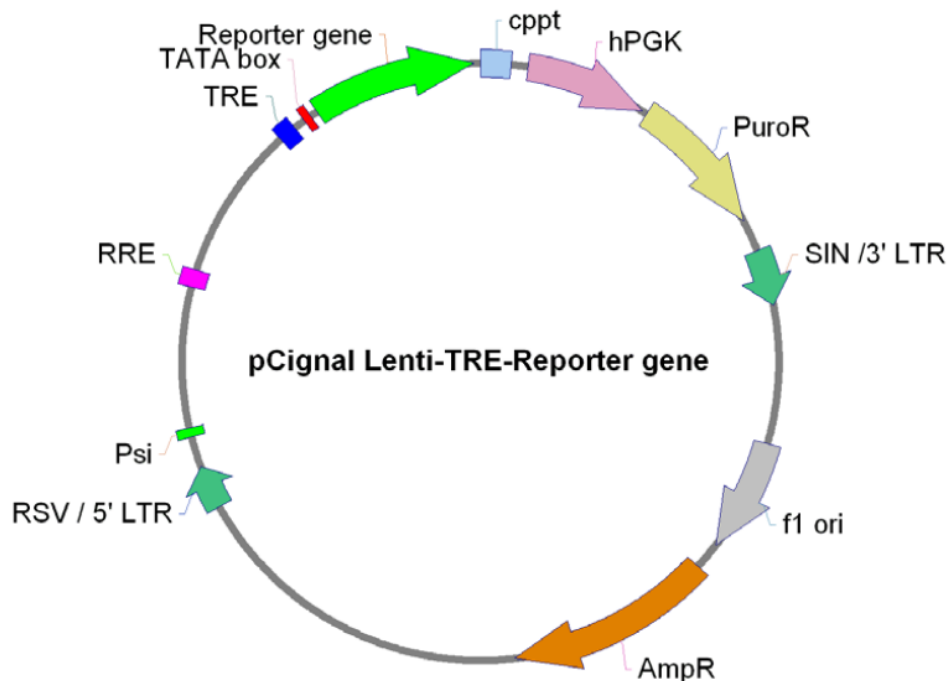
Médium bylo odebráno ze všech jamek a bylo přidáno 0,5 ml čistého média do všech jamek. Do čtyř jamek bylo přidáno SureENTRY, jehož konečná koncentrace činila 8 µg/ml. SureENTRY reagentie obsahuje kladně nabitě molekuly vážící se na povrch buněk, tím neutralizuje povrchový náboj a zvyšuje se tak transdukční účinnost lentivirových částic. Do prvních dvou jamek byla napipetována pozitivní kontrola (MOI 25 a 50) a do dalších dvou jamek lentivirové částice (MOI 25 a 50). Struktura lentivirového reportéru je zaznamenána na obrázku 8.

Následující den bylo médium odstraněno a napipetováno 1 ml čistého média.

Po 72 hodinách od transdukce byly transdukované buňky selektovány přidavkem puromycinu o konečné koncentraci 2 µmol/l. Koncentrace puromycinu byla zvolena na základě testování citlivosti netransdukované buněčné linie C6 (není ukázáno).

Po třech dnech takto selektovaná populace transdukovaných buněk byla rozpipetována do 96 jamkových mikrotitračních panelů tak, aby výsledná koncentrace buněčné suspenze činila 0,8 buněk/jamku.

Nejprve se vybíraly klony, které pokryly přibližně 50% jamky 96 jamkové destičky, následně se přemístily do 12 jamkové destičky a poté do malé kultivační láhve. Po dostatečném nárůstu, kdy buňky byly téměř konfluentní, byla buněčná linie zamrazená v zamrazovacím médiu do 5-6 kryozkumavek. Celkově bylo zamraženo 29 klonů.



Obr. 8: Struktura lentivirového reportéru, který byl aplikován při transdukcii. Převzato ze Cignal Lenti Reporter Handbook, 2012.

4.2.7 Validace klonů

Jednotlivé klony byly postupně rozmrazeny a testovány na citlivost k RAGE ligandům. Po týdenní kultivaci byly buňky nasazeny do 96 jamkového panelu v objemu 80 μ l o hustotě 80 000 buněk/ml. Vždy bylo pipetováno od každého klonu 12 jamek (3 sloupce, 4 řádky) ve dvou kopiích.

Třetí den bylo do prvního sloupce přidáno 20 μ l média (kontrola), do druhého sloupce ligand AGE-BSA a do třetího sloupce ligand S100B, konečná koncentrace obou ligandů činila 0,05 mg/ml. Po přidavku ligandů byly panely uloženy na třepačku po dobu 2 minut a poté vloženy na 6 nebo 24 hodin do inkubátoru.

Po 6 nebo 24 hodinách bylo médium z jamek odtáhnuto a jamky byly promyty 200 μ l PBS. Po pečlivém odstranění PBS bylo do jamek pipetováno 20 μ l lyzačního pufru, protřepáno 5 minut na třepačce a následně byla připravena luciferázová směs smícháním luciferázového pufru s lyofilizovaným luciferázovým substrátem. Do každé jamky bylo pipetováno 100 μ l substrátu a ihned po přidání substrátu se realizovalo měření pomocí analyzátoru luminescence EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin Elmer Enspire).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Konrola	AGE-BSA	S100B	Konrola	AGE-BSA	S100B	Konrola	AGE-BSA	S100B	Konrola	AGE-BSA	S100B
B	Konrola	AGE-BSA	S100B	Konrola	AGE-BSA	S100B	Konrola	AGE-BSA	S100B	Konrola	AGE-BSA	S100B
C	Konrola	AGE-BSA	S100B	Konrola	AGE-BSA	S100B	Konrola	AGE-BSA	S100B	Konrola	AGE-BSA	S100B
D	Konrola	AGE-BSA	S100B	Konrola	AGE-BSA	S100B	Konrola	AGE-BSA	S100B	Konrola	AGE-BSA	S100B
E	Konrola	AGE-BSA	S100B	Konrola	AGE-BSA	S100B	Konrola	AGE-BSA	S100B	Konrola	AGE-BSA	S100B
F	Konrola	AGE-BSA	S100B	Konrola	AGE-BSA	S100B	Konrola	AGE-BSA	S100B	Konrola	AGE-BSA	S100B
G	Konrola	AGE-BSA	S100B	Konrola	AGE-BSA	S100B	Konrola	AGE-BSA	S100B	Konrola	AGE-BSA	S100B
H	Konrola	AGE-BSA	S100B	Konrola	AGE-BSA	S100B	Konrola	AGE-BSA	S100B	Konrola	AGE-BSA	S100B

Obr. 9: Schéma pipetování ligandů AGE-BSA (žlutě) a S100B (modře).

4.2.8 Testování potenciálního inhibičního účinku látek LEM814 a LEM815 na aktivaci STAT3

Z celkově 29 klonů byl vybrán 1 klon, který po přidavku ligandů vykazoval nejvyšší nárůst relativní luciferasové aktivity. Experiment byl proveden analogicky jako validace klonů s tím rozdílem, že nejprve byly aplikovány látky LEM814/815 a po 30 minutách následně ligandy. Byly zvoleny 2 různé koncentrace ligandů: 0,1 a 0,05 mg/ml a dvě různé koncentrace LEM814 a LEM815 odpovídající koncentracím 1x resp. 2x IC₅₀.

5 VÝSLEDKY

5.1 Výsledky western blotu

K ověření exprese RAGE v C6 buňkách byla zvolena metoda western blotu. Jako negativní kontrola byla zvolena buněčná kultura CHO, jako pozitivní kontrola byla zvolena kultura A549. Přítomnost proteinu RAGE v C6 buňkách byla prokázána, což je patrné z obr. 4. Pro normalizaci množství naneseného proteinu byl použit β -tubulin (Obr. 10).

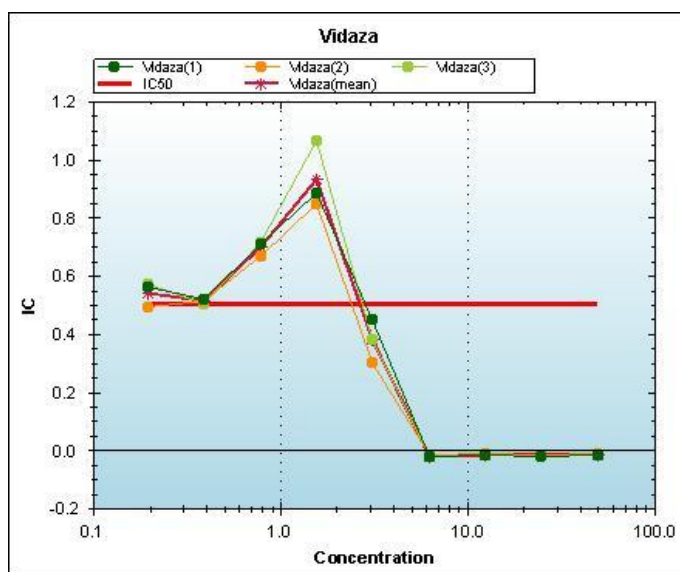


Obr. 10: Exprese proteinu RAGE. (1) lyzát buněčné linie CHO, (2) lyzát buněčné linie A549, (3) lyzát buněčné linie C6.

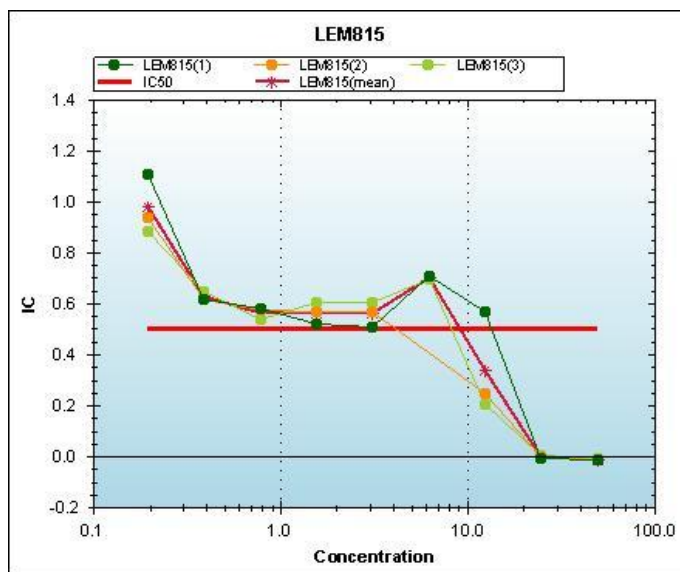
5.2 Výsledky MTT testu

Míra cytotoxické aktivity testovaných látek LEM814 a LEM815 byla stanovena za použití MTT testu. Jednotlivé koncentrace byly testovány ve třech opakování. Ředící řada testovaných látek, s faktorem ředění 2, začínala koncentrací 50 $\mu\text{mol/l}$ a končila koncentrací 0,195 $\mu\text{mol/l}$. Na základě změřených hodnot absorbance při 540 nm byl vytvořen graf závislosti viability na koncentraci testované látky (obr. 11 a obr. 12) a stanovena hodnota IC₅₀ pomocí programu Chemorezist. Výsledné průměrné hodnoty IC₅₀ a směrodatných odchylek byly sestaveny do tabulky (tab. 2).

V grafech jsou znázorněny výsledky 1-3 měření tmavě zeleně, oranžově a světle zeleně. Fialově jsou zaznamenány průměrné hodnoty těchto měření. Červeně je zaznamenána hodnota IC50.



Obr. 11: Grafické znázornění závislosti životaschopnosti buněk na koncentraci LEM814



Obr. 12: Grafické znázornění závislosti životaschopnosti buněk na koncentraci LEM815

Tab. 2: Výsledné průměrné hodnoty IC50 získané při vyhodnocování MTT testu. Hodnoty jsou uvedeny v μmol/l.

Buněčná linie	Testovaná látka	Průměr hodnot IC50 ± směrodatná odchylka
C6	LEM814	2,780 ± 0,438
	LEM815	9,701 ± 0,202

5.3 Výsledky validace klonů

Pro zvolení nejvhodnějšího klonu pro testování LEM814 a LEM815 byla nutná jejich validace, která byla provedena přidavkem ligandu o konečné koncentraci 0,05 mg/ml. Aktivace signální dráhy byla monitorována nárůstem relativní luciferasové aktivity.

Měření bylo provedeno ve 4 opakováních, z těchto hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka (SMODCH). Jako nejvhodnější klon pro testování vybraných derivátů pyrimidinu byl zvolen klon č. 20, který po přidání ligandů vykazoval nejvyšší nárůst relativní luciferasové aktivity u obou použitých ligandů (viz tab. 3 a tab. 4).

Tab. 3: Průměrné hodnoty relativní luciferasové aktivity po přidavku ligandů AGE-BSA a S100B o konečné koncentraci 0,05 mg/ml po 6. hodinách inkubace se směrodatnými odchylkami (SMODCH). Kontrola značí buňky bez přidavku ligandů. C6 jsou buňky netransdukované.

	Po 6. hodinách inkubace					
	Kontrola		AGE-BSA		S100B	
	Průměr	Smodch	Průměr	Smodch	Průměr	Smodch
C6	135	37	138	41	163	35
1	33097	2836	28243	1711	34335	3857
2	32000	585	30410	3323	30135	1382
3	35545	3768	28490	590	23827	1835
4	8258	728	6070	777	4873	881
5	12448	1274	13078	1258	13535	599
6	20398	1327	20813	1751	23477	2093
7	31410	3509	31080	2192	32527	4837
8	80960	12521	86893	6879	86293	9231
9	24868	318	25228	3145	24673	961
10	14268	1253	14033	1378	15890	2085
11	23805	1657	21948	445	19793	951
12	55510	2438	45953	4369	60117	1055
13	26320	1996	21723	2395	22045	1556
14	25210	1488	25383	3324	26950	3317
15	1300	256	1187	50	1060	187
16	6507	900	7010	1634	6660	961
17	31590	1486	31248	3234	33690	1556
18	123868	6310	79878	18021	108057	18526
19	11853	1117	10537	851	9448	797
20	142053	6208	190421	8153	178424	6558
21	9983	698	9983	698	9733	545
22	20693	864	21010	2303	21748	1085
23	48163	3178	44490	1620	49453	3314
24	5628	606	5843	622	6018	604
25	157605	11891	154343	8060	152908	5483
26	10991	597	10480	249	10375	319
27	24003	1799	24653	2876	15800	1103
28	60105	3627	62903	5579	62013	6855
29	31135	849	28683	1481	27570	1417

Tab. 4: Průměrné hodnoty relativní luciferasové aktivity po přidavku ligandů AGE-BSA a S100B o konečné koncentraci 0,05 mg/ml po 24. hodinách inkubace se směrodatnými odchylkami (SMODCH). Kontrola značí buňky bez přidavku ligandů. C6 jsou buňky netransdukované.

	Po 24. hodinách inkubace					
	Kontrola		AGE-BSA		S100B	
	Průměr	Smodch	Průměr	Smodch	Průměr	Smodch
C6	150	17	163	25	170	37
1	87373	6194	71143	2967	76363	4608
2	75265	2063	75115	2270	73280	2096
3	90618	5031	76385	7445	84375	7750
4	21458	986	19958	1042	20603	2431
5	28620	1198	23795	2843	25790	1637
6	27343	1830	26165	2426	21293	1982
7	111170	7750	101205	1981	93215	5920
8	255905	10466	240840	13982	228313	15113
9	50450	2068	50663	1586	53625	2917
10	43995	1742	42820	2032	37523	865
11	86793	5072	81608	3821	84268	2251
12	169588	4947	154153	12439	151788	16713
13	59925	1155	58493	3160	57523	1849
14	56270	2954	52063	1021	53967	3323
15	3070	488	2745	445	2493	362
16	12095	1101	12128	760	12298	1554
17	87760	2574	87540	4163	91365	5827
18	348538	17054	294320	21578	286453	34654
19	19178	1858	20828	3100	20490	2846
20	338213	44426	477432	23735	510860	85088
21	15295	444	14958	1924	14828	1257
22	47065	4811	47470	3286	54645	4432
23	101648	7258	102870	8976	100388	8515
24	16275	2000	16278	1365	18698	1782
25	260155	5613	249350	7888	240403	12363
26	27783	2310	25740	2186	26255	1554
27	33863	3696	38718	2953	34975	5162
28	97968	3295	92840	2749	92518	4212
29	101553	3052	103315	3936	109048	3289

5.4 Výsledky testování potenciálního inhibičního účinku LEM814 a LEM815

Po zvolení nejvhodnějšího klonu (č. 20) byly aplikovány nejprve testované látky a po 30 minutách ligandy v kombinacích. Po 6 a 24 hodinách bylo provedeno měření relativní luciferasové aktivity a výsledky byly zaznamenány do grafu (obr. 13 a 14), z naměřených hodnot byla také vypočtena procentuální inhibice luciferasové aktivity ligandy stimulovaných buněk po působení LEM814 a LEM815 (tab. 5 a 6).

5.4.1 Výsledky měření po 6. hodinové inkubaci

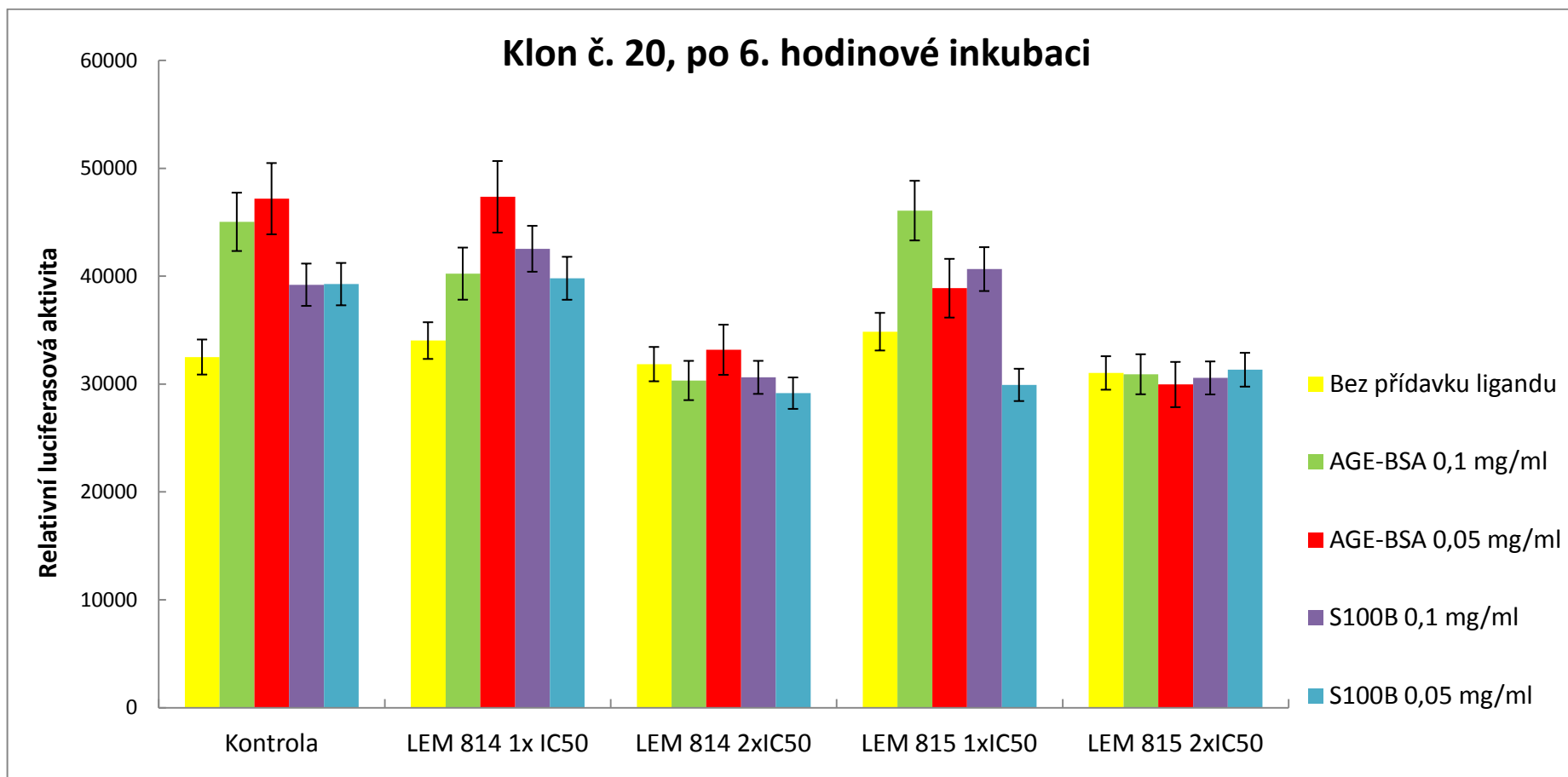
Po 6. hodinové inkubaci testovaná látka **LEM14** $1\times IC_{50}$ vykazovala pokles relativní luciferasové aktivity až na 49,5 % u AGE-BSA o koncentraci 0,1 mg/ml. U ostatních ligandů nevykazovala významné inhibice. LEM814 $2\times IC_{50}$ vykazovala u obou koncentrací ligandů vysokou míru inhibice, aktivita byla snížena na 9,1% až na aktivitu buněk neovlivněných.

Testovaná látka **LEM815** o koncentraci $1\times IC_{50}$ po aplikaci ligandů o vyšší koncentraci neměla významný inhibiční efekt. Aktivita byla snížena na 89,5 až 86,5% ve srovnání s aktivovanými kontrolními buňkami. Naopak tomu bylo u nižší koncentrace ligandů, kde byla aktivita výrazně snížena na 27,4 až 0%. LEM815 o koncentraci $2\times IC_{50}$ měla opět velmi významný inhibiční efekt, aktivita byla srovnatelná s neovlivněnými buňkami.

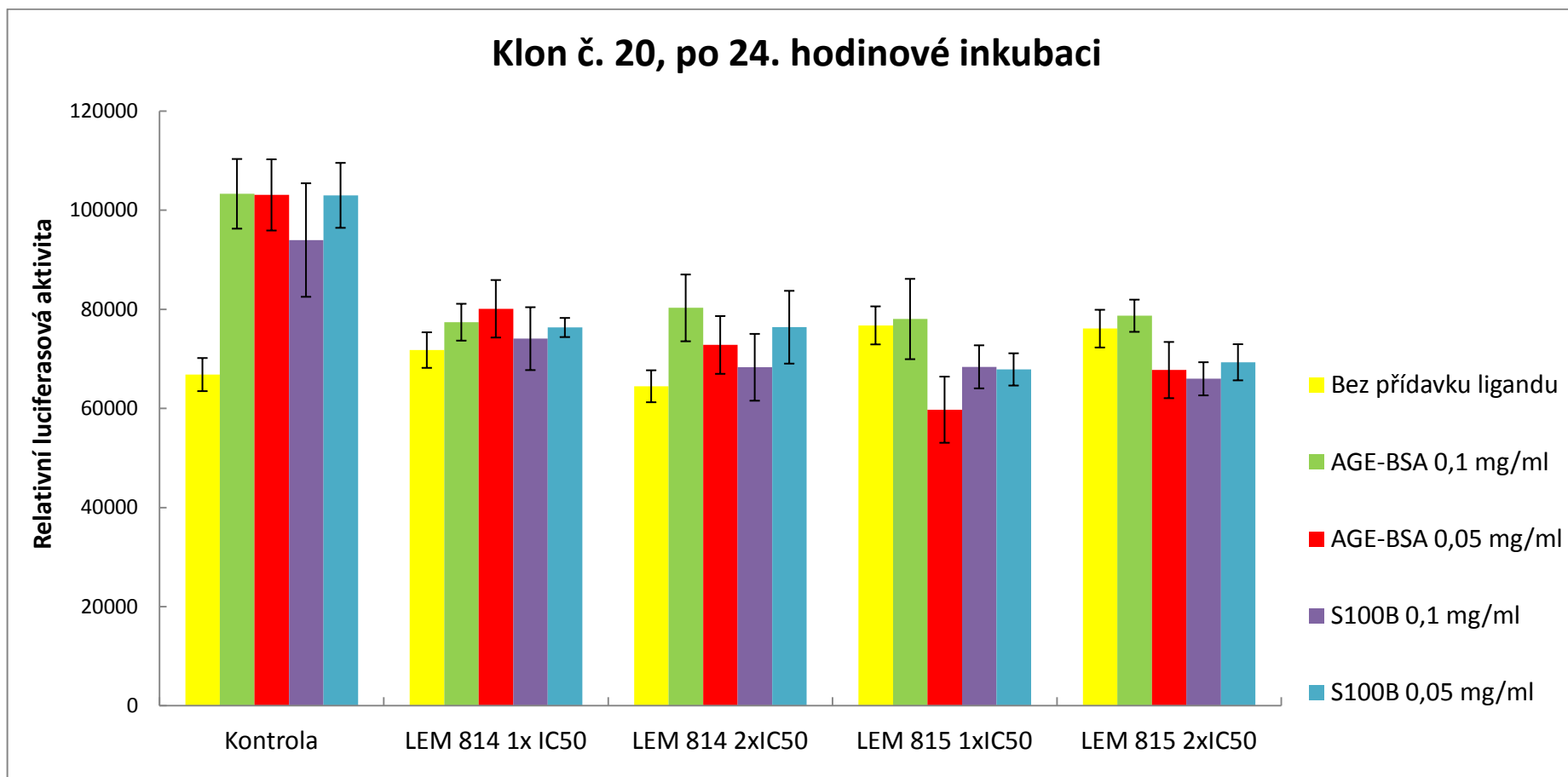
5.4.2 Výsledky měření po 24. hodinové inkubaci

Po 24. hodinové inkubaci testovaná látka **LEM814** o koncentraci $1\times IC_{50}$ a $2\times IC_{50}$ vykazovala významné inhibice u obou ligandů ve všech koncentracích. Inhibiční efekt byl pozorován na výrazném poklesu relativní luciferasové aktivity na 43,4 až 8,5%.

Testovaná látka **LEM815** měla významný inhibiční účinek u $1\times IC_{50}$ i $2\times IC_{50}$, snížení relativní luciferasové aktivity po podání ligandů bylo na 7,1% až na aktivitu kontrolních buněk.



Obr. 13: Graf závislosti relativní luciferázové aktivity na přídavku ligandů v kombinaci s LEM814 a LEM815 po 6. hodinách



Obr 14: Graf závislosti relativní luciferázové aktivity na přidavku ligandů v kombinaci s LEM814 a LEM815 po 24. hodinách

Tab. 5: Procentuální inhibice luciferasové aktivity ligandy stimulovaných buněk po působení látek LEM814 a LEM815 po 6. hodinách.

	AGE-BSA		S100-B	
	0,1mg/ml	0,05mg/ml	0,1mg/ml	0,05mg/ml
LEM 814 1× IC50	49.5	90.8	127.0	85.5
LEM 814 2×IC50	0.0	9.1	0.0	0.0
LEM 815 1×IC50	89.5	27.4	86.5	0.0
LEM 815 2×IC50	0.0	0.0	0.0	4.4

Tab. 6: Procentuální inhibice luciferasové aktivity ligandy stimulovaných buněk po působení látek LEM814 a LEM815 po 24. hodinách.

	AGE-BSA		S100-B	
	0,1mg/ml	0,05mg/ml	0,1mg/ml	0,05mg/ml
LEM 814 1× IC50	15.4	23.0	8.5	12.6
LEM 814 2×IC50	43.4	23.0	14.1	33.0
LEM 815 1×IC50	3.5	0.0	0.0	0.0
LEM 815 2×IC50	7.1	0.0	0.0	0.0

6 DISKUZE

Jedním z nejčastějších neurodegenerativních onemocnění je Alzheimerova nemoc charakterizovaná extracelulární akumulací plaků amyloidu β v mozkové tkáni. Bylo zjištěno, že koncentrace tohoto cytotoxického proteinu může být výrazně snížena aplikací RAGE inhibitorů. Zajímavou skupinou látek se jeví být v tomto ohledu deriváty pyrimidinu. V roce 2012 publikovala skupina korejských vědců inhibiční vliv skupiny 4,6-disubstituovaných-2-aminopyrimidinů na RAGE receptor *in vitro* a rovněž *in vivo* podmínkách (Han *et. al.*, 2012).

Na Ústavu molekulární a translační medicíny byla v nedávné době testována skupina 21 látek strukturně odvozených od pyrimidinu (4,5,6-trisubstituované-2-aminopyrimidiny), které vykazovaly významný inhibiční účinek na senzorické linii monitorující NF- κ B signální dráhu, která je v rámci RAGE signalizace patrně klíčová. Nejvyšší aktivitu vykazovaly deriváty LEM814 a LEM815, které byly následně vybrány pro další studie. Jednou z možností, jak nepřímo prokázat interakci těchto látek s RAGE je zjistit, zda tyto látky brání aktivaci dalších transkripčních faktorů v rámci RAGE signalizace. Předmětem této práce bylo zjistit, zda látky LEM814 a LEM815 ovlivňují aktivaci STAT3 transkripčního faktoru. Za tímto účelem byla připravena senzorická buněčná linie odvozená od buněk krysího glioblastomu (C6) s prokázanou expresí RAGE.

C6 buňky byly transdukovány komerčním lentivirovým vektorem kódujícím inducibilní STAT3 responsivní konstrukt exprimující luciferázu. Transdukované C6 buňky byly následně selektovány pomocí puromycinu pro získání homogenní populace pozitivních buněk a následně bylo provedeno limitní ředění pro získání klonální senzorické buněčné linie. Celkem 29 takto připravených individuálních klonů bylo validováno pomocí ligandů AGE-BSA a S100B. Klon vykazující nejvyšší nárůst relativní luciferasové aktivity po aplikaci obou ligandů byl zvolen k testování potenciálních inhibitorů RAGE.

Byly zvoleny dvě koncentrace inhibitorů odpovídající hodnotám $1 \times IC_{50}$ a $2 \times IC_{50}$ v kombinaci s ligandy AGE-GSA a S100B o koncentraci 0,1 nebo 0,5 mg/ml. Po 6. hodinové inkubaci byl nejvýraznější pokles relativní luciferasové aktivity u obou ligandů pro $2 \times IC_{50}$ a to až na aktivitu buněk nestimulovaných. Po 24 hodinovém působení inhibitorů byl prokázán nejvýraznější efekt jak po přidavku ligandů AGE-BSA nebo S100B ve všech koncentracích na 43,4 % až na aktivitu nestimulovaných buněk.

Výsledky tedy prokázaly významný inhibiční účinek obou testovaných látek na aktivaci STAT3 transkripčního faktoru, čímž byla nepřímo potvrzena interakce látek s RAGE receptorem.

7 ZÁVĚR

Cílem práce bylo ověřit, zda mají látky LEM814 a LEM815 inhibiční účinek na signální dráhu JAK/STAT3, která představuje jeden z významných downstream cílů RAGE signalizace. Experimenty byly provedeny na připravené senzorké buněčné linii odvozené od C6 buněk, u nichž byla pomocí western blotu prokázána exprese RAGE receptoru. Výsledky prokázaly významný inhibiční účinek obou testovaných látek na aktivaci STAT3 transkripčního faktoru, čímž byla nepřímo potvrzena interakce látek s RAGE receptorem. Cíle vytyčené v rámci této bakalářské práce byly splněny.

8 POUŽITÁ LITERATURA

Alexiou P, Chatzopoulou M, Pegklidou K, Demopoulos VJ (2010). RAGE: A Multi-Ligand Receptor Unveiling Novel Insights in Health and Disease. *Curr Med Chem* 21: 2232-52.

Allard STM, Kopish K; Promega Corporation (2008). Luciferase Reporter Assays: Powerful Adaptable Tools for Cell Biology Research. *Cell Notes* 21, 23-26.

Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern DM, Nawroth PP. (2005). Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med* 83: 876-886.

Bockamp E, Maringer M, Spangenberg C, Fees S, Fraser S, Eshkind L, Oesch F, Zabel B (2002). Of mice and models: Improved animal models for biomedical research. *Physiol. Genomics* 11, 115-32.

Cappechi MR (1980). High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* 22: 479-88.

Cockrell AS, Kafri T (2007). Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol Biotechnol* 36: 184-204.

Deane R, Singh I, Sagare AP, Bell RD, Ross NT, LaRue B, Love R, Perry S, Paquette N, Deane RJ, Thiyagarajan M, Zarcone T, Fritz G, Friedman AE, Miller BL, Zlokovic BV (2012). A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid β -mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest* 4: 1377-92.

Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tsai YJ, Border R, Ramsey P, Martin M, Felgner PL (1994) Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J. Biol. Chem* 269: 2550-61.

Felgner PL, Tsai YJ, Sukhu L, Wheeler CJ, Manthorpe M, Marshall J, Cheng SH (1995). Improved cationic lipid formulations for in vivo gene therapy. *Ann. NY Acad. Sci.* 772: 126-39.

- Fritz G (2011). RAGE: a single receptor fits multiple ligands. *Trends Biochem Sci* 36: 625-632.
- Gao X, Huang L (1995). Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther* 2: 710-22.
- Gardlík R, Pálffy R, Hodosy J, Lukács J, Turna J, Celec P (2005). Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med Sci Monit* 4: 110-21.
- Ghim CM, Lee SK, Takayama S, Mitchell RJ (2010). The art of reporter proteins in science: past, present and future applications. *BMB Rep* 7: 451-60.
- Groskreutz D, Schenborn ET (1997). Reporter systems. *Methods in Molecular Biology* 63, 11 ed. R. Tuan, Humana Press, NJ.
- Han YT, Choi GI, Son D, Kim NJ, Yun H, Lee S, Chang DJ, Hong HS, Kim H, Ha HJ, Kim YH, Park HJ, Lee J, Suh YG (2012). Ligand-Based Design, Synthesis, and Biological Evaluation of 2-Aminopyrimidines, a Novel Series of Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Inhibitors. *J Med Chem* 21: 9120-35.
- Liu AM, New DC, Lo RK, Wong YH (2009). Reporter Gene Assays. *Methods in Molecular Biology* 486: 109-123.
- Logsdon CD, Fuentes MK, Huang EH, Arumugam T (2007). RAGE and RAGE Ligands in Cancer. *Curr Mol Med.* 8: 777-89.
- Luo D, Saltzman WM (2000). Synthetic DNA delivery systems. *Nature biotechnology* 18: 33-37.
- Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
- Nayerossadat N, Maedeh T, Ali PA (2012). Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv Biomed Res* 1:27.

- Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D, Shaw A (1992). Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 267: 14998-5004.
- Oliveira MIA, Maltempi ES, Oliveira FP, Réa RR, Alves ASC, Picheth G, Rego FGM (2013). RAGE receptor and its soluble isoforms in *diabetes mellitus* complications. *J Bras Patol Med Lab* 49: 97-108.
- Pauwels K, Gijbbers R, Toelen J, Schambach A, Willard-Gallo K, Verheust C, Debyser Z, Herman P (2009) State-of-the-Art Lentiviral Vectors for Research Use: Risk Assessment and Biosafety Recommendations. *Curr Gene Ther* 6:459-74.
- Perrone L, Sbai O, Nawroth PP, Bierhaus A (2012). The Complexity of Sporadic Alzheimer's Disease Pathogenesis: The Role of RAGE as Therapeutic Target to Promote Neuroprotection by Inhibiting Neurovascular Dysfunction. *Int J Alzheimers Dis* 2012: Article ID 734956.
- Quinonez R, Sutton RE (2002) Lentiviral vectors for gene delivery into cells. *DNA Cell Biol* 12: 937-51.
- Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA (2004). The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science* 117: 1281-1283.
- Riehl A, Németh J, Angel P, Hess J (2009). The receptor RAGE: Bridging inflammation and cancer. *Cell Commun Signal* 7: 7-12.
- Sessa G, Weissmann G (1968). Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *J. Lipid Res* 9: 310-8.
- Shigekawa K, Dower WJ (1988). Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: A general approach to the introduction of macromolecules into cells. *BioTechniques* 6, 742-51.
- Sorci G, Riuzzi F, Giambanco I, Donato R (2013). RAGE in tissue homeostasis, repair and regeneration. *Biochim Biophys Acta* 1833: 101-109.

Sparvero LJ, Asafu-Adjei D, Kang R, Tang D, Amin N, Im J, Rutledge R, Lin B, Amoscato AA, Zeh HJ, Lotze MT (2009). RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE ligands, and their role in cancer and inflammation. *J Transl Med* 7.

Wang W, Li W, Ma N, Steinhoff G (2013). Non-viral gene delivery methods. *Curr Pharm Biotechnol* 1: 46-60.

Wheeler CJ, Sukhu L, Yang G, Tsai Y, Bustamente C, Felgner P, Norman J, Manthorpe M. (1996). Converting an alcohol to an amine in a cationic lipid dramatically alters the co-lipid requirement, cellular transfection activity and the ultrastructure of DNA-cytosine complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 1280: 1-11.

Wolff JA, Ludtke JJ, Acsadi G, Williams P, Jani A. Long term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet* 1992;1:363-9.

Wong TK, Neumann E (1982). Electric field mediated gene transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107, 584-7.

Yang TT, Sinai P, Kitts PA, Kain SR (1997). Quantification of Gene Expression with a Secreted Alkaline Phosphatase Reporter System. *BioTechniques* 23:1110-1114.

Ye GN, Daniell H, Sanford JC (1990). Optimization of delivery of foreign DNA into higher-plant chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* 15, 809-19.

INTERNETOVÉ ZDROJE

Luciferase Assay System

<https://worldwide.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/0/Luciferase%20Assay%20System%20Protocol.pdf> (staženo 3. 7. 2014)

Signal Lenti Reporter Handbook

<http://www.sabiosciences.com/Manual/1073762.pdf> (staženo 3. 7. 2014)