

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2014

Zdeněk Škrott

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká Fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vliv komplexu disulfiramu s mědí na proteazom
v buněčných liniích rakoviny prsu**

Diplomová práce
Zdeněk Škrott

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2014

Vedoucí práce:

Mgr. Boris Cvek, Ph.D.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně pod odborným vedením Mrg. Borise Cveka, Ph.D. a pouze s použitím citované literatury.

V Olomouci, 28 dubna 2014

.....

podpis

Tato práce byla vypracována v rámci projektu OP VK CZ.1.07/2.3.00/20.0062. Levný lék antabus jako protinádorové léčivo: mechanismus účinku a klinické testy.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Zdeněk Škrott

Název práce: Vliv komplexu disulfiram s mědí na proteazom v buněčných liniích rakoviny prsu

Typ práce: diplomová

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP Olomouc

Vedoucí práce: Mgr. Boris Cvek, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2014

Abstrakt

Znovuvyužití starých léků k novým účelům je jednou z nadějných cest vývoje léčiv. Disulfiram (Antabus), jakožto lék užívaný desítky let proti alkoholismu, by se mohl uplatit i v léčbě rakoviny. Za protirakovinným účinkem disulfiram pravděpodobně stojí jeho komplex s mědí, který vzniká v těle pacientů. Toxický efekt na nádorové buňky je spojován se schopností komplexu inhibovat ubikvitin-proteazomový systém, který je zodpovědný za degradaci většiny buněčných proteinů.

V této práci byl potvrzen silný efekt komplexu disulfiram mědí jak na ubikvitin-proteazomový systém, tak na viabilitu nádorových buněčných linií odvozených od rakoviny prsu. Nebyl zde ovšem prokázán účinek na proteolytickou část proteazomu, která byla v předchozí publikaci navržena jako cíl komplexu disulfiram s mědí. Inhibice ubikvitin-proteazomového systému byla dokázána akumulací ubikvitinovaných proteinů a stabilizací substrátů proteazomu. Komplex disulfiram s mědí inhiboval degradaci fyziologického substrátu I κ B α i umělého reportéru Ub(G76V)-GFP.

Získaná data potvrzují účinek disulfiram proti buněčným liniím odvozeným od rakoviny prsu a jako pravděpodobnou příčinu toxicity vůči nádorovým buňkám nabízejí inhibici ubikvitin-proteazomového systému, ovšem mechanismem odlišným od obvyklých proteazomových inhibitorů.

Klíčová slova: disulfiram, měď, ubikvitin-proteazomový systém, inhibitory proteazomu, rakovina prsu

Bibliographical Identification:

Author's first and sure name: Zdeněk Škrott

Title: The influence of disulfiram complex with copper on proteasome in breast cancer cell lines

Type of thesis: master

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc,

Supervisor: Mgr. Boris Cvek, Ph.D.

The year of presentation: 2014

Abstract

Drug repurposing is a new viable approach of drug development. Disulfiram (Antabuse), as an old drug used for decades in alcohol aversion therapy, shows promising anticancer activity. The potent disulfiram's antitumor effect is attributed to the complex formed from the reaction between disulfiram and copper in the human body. It is assumed that disulfiram-copper complex kills cancer cells by inhibition of ubiquitin-proteasome system, which is responsible for degradation of majority of cellular proteins.

Here, strong effect of disulfiram-copper complex toward ubiquitin-proteasome system and breast cancer cells survival was confirmed. In contrast to previous report, disulfiram-copper complex does not exhibit any inhibition of 20S core particle of the proteasome. On the other hand, disulfiram-copper complex induced notable accumulation of ubiquitinated proteins, indicating that the degradation of proteins was impaired. Moreover, the complex stabilized both, physiological proteasome substrate I κ B α , and artificial Ub(G76V)-GFP reporter.

Collectively, these data indicates that disulfiram's cancer cell killing activity is linked to the inhibition of the ubiquitin-proteasome system by a mechanism that is distinct to the conventional proteasome inhibitors.

Keywords: disulfiram, copper, ubiquitin-proteasome system, proteasome inhibitors, breast cancer

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěl poděkovat vedoucímu práce Mgr. Borisi Cvekovi, Ph.D. za odborné vedení a konzultace a Mgr. Jindřichu Sedláčkovi za seznámení s laboratorními technikami. Dále všem členům laboratoře profesora Q. Ping Doua na Karamanos Cancer Institute, Wayne State University, Detroit, zejména Daniele Buac. A také členům laboratoře profesora Raymonda Deshaiese na California Institute of Technology, Pasadena, zejména dr. Jing Li, Ph.D. za ochotu, odborné vedení a pomoc při stáži.

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	3
2.1	Disulfiram v léčbě rakoviny.....	3
2.2	Inhibice proteazomu při léčbě rakoviny.....	6
2.2.1	Struktura proteazomu.....	6
2.2.2	Ubikvitinace.....	8
2.2.3	Inhibice proteazomu.....	9
2.3	Ubikvitin-dependentní degradace (UDD).....	11
2.4	Ubikvitin-independentní degradace proteazomem (UID).....	13
2.5	Rostoucí komplexita UPS.....	16
3	CÍL PRÁCE.....	19
4	MATERIÁL A METODIKA.....	20
4.1	Kultivace buněčných linií.....	20
4.2	Určení cytotoxicity.....	20
4.3	Příprava buněčných lyzátů pro Western blotting (WB) a měření aktivity proteazomu.....	20
4.4	Měření koncentrace proteinů.....	21
4.5	Měření aktivity 20S proteazomu.....	21
4.6	Western blotting.....	21
4.7	Měření degradace Ub(G76V)-GFP.....	22
4.8	Biologický materiál.....	22
4.9	Chemikálie.....	22
4.10	Přístrojové vybavení.....	24
5	VÝSLEDKY.....	25
5.1	Vliv komplexu CuEt na proliferaci linií odvozených od rakoviny prsu.....	25
5.2	Vliv komplexu CuEt na aktivitu 20S proteazomu.....	27
5.3	Vliv komplexu CuEt na akumulaci ubikvitinovaných proteinů.....	30
5.4	Vliv komplexu CuEt na TNF α indukovanou degradaci proteinu I κ B α	32
5.5	Vliv komplexu CuEt na akumulaci proteinu p53.....	37
5.6	Vliv komplexu CuEt na degradaci Ub(G76V)-GFP reportéru.....	38
6	DISKUZE.....	41
7	ZÁVĚR.....	49
8	ZDROJE.....	51
9	SEZNAM ZKRATEK.....	70
10	PŘÍLOHY.....	73

1 ÚVOD

Rakovina prsu je i v dnešní době stále zcela zásadním problémem, neboť je u žen nejčastější příčinou úmrtí v souvislosti s rakovinným onemocněním. Zvláště metastatická forma onemocnění je doposud považována za neléčitelnou a stávající terapie si klade za cíl pouze život pacientky prodloužit, a pokud možno, zachovat v co nejvyšší míře kvalitu života. I přes horečný výzkum v této oblasti, je vývoj nových léčebných přístupů bolestně pomalý a prognóza patientek s pokročilým stádiem rakoviny prsu velmi nepříznivá.

Jedním z nadějných přístupů vývoje léčiv je i znovuvyužití starých léků k novým účelům. Preklinické studie naznačují, že nadějným adeptem je i Antabus. Tento lék známý též jako disulfiram se už několik desítek let používá k léčbě závislosti na alkoholu, ale ukazuje se, že by se mohl uplatnit i v léčbě maligních onemocnění. Na základě preklinických studií, ale i pozorování z klinické praxe se zdá, že by právě v případě rakoviny prsu mohl vykazovat nejslibnější aktivitu. Jakožto starý a nepatentovatelný lék je velmi levný, což s sebou ovšem přináší i problém, že investice do výzkumu takového léku je z ekonomického hlediska nerentabilní. Možným východiskem by mohla být idea „neziskového léku“, jehož vývoj by byl financován převážně z veřejných peněz nebo od dárců.

Protirakovinný mechanismus účinku disulfiramu není doposud plně objasněn. O jeho aktivitě *in vitro* vůči liniím odvozených od různých malignit bylo publikováno už několik desítek studií, ale doposud zde nepanuje obecný konsenzus. Obvyklou slabinou těchto prací je pozorování účinku disulfiramu po velmi dlouhé době, z čehož lze spíše usuzovat o důsledcích než o příčině jeho aktivity. Také zde zcela chybí studie, které by se zabývaly podstatou jeho účinku *in vivo*. Obecně je ovšem známo, že protirakovinná aktivita disulfiramu výrazně stoupá v přítomnosti mědi, nebo je na ni dokonce zcela závislá. Bylo zjištěno, že jedním z metabolitů disulfiramu je bis-(diethyldithiokarbamát) měďnatý komplex, který vzniká i po přidání disulfiramu do buněčné kultury. Zdá se tedy, že samotný disulfiram je pouze pro-lék a aktivní sloučeninou je ve skutečnosti jeho komplex s mědí. V případě směsi disulfiramu s mědí bylo zjištěno, že po relativně krátkém čase interferuje s ubikvitin-proteazomovým systémem, tedy buněčným systémem, který je zodpovědný za degradaci velké většiny všech proteinů. Inhibice proteazomu, centrální složky této dráhy, je už zavedeným přístupem v léčbě maligních onemocnění. Je tedy poměrně lehce představitelné, že právě inhibice některé složky ubikvitin-proteazomového systému komplexem disulfiramu s mědí je příčinou jeho nadějně protirakovinné aktivity.

Celý ubikvitin-proteazomový systém ovšem nabízí mnoho potencionálních cílů léčiv, z nichž mnohé jsou nyní testovány na experimentální nebo preklinické úrovni. V případě komplexu disulfiramu s mědí se uvažuje o inhibici proteazomu, ale jiným mechanismem než u doposud klinicky používaných inhibitorů. Pro objasnění přesného mechanismu a cíle léčiva je také nutné použít syntetický komplex, neboť aplikace směsi disulfiramu s měďnatými ionty, obvyklá v mnoha studiích o disulfiramu, může vést k nesespecifickým nebo obtížně interpretovatelným výsledkům.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Disulfiram v léčbě rakoviny

Oblast výzkumu a vývoje nových léčiv, zvláště těch proti rakovině, se nachází v krizi související s potřebou změny paradigmatu. Obrovský potenciál technologií umožňujících sekvenovat genomy nádorů, sledovat změny exprese na úrovni transkripce a proteinů, nebo high-throughput skríniny chemických knihoven se doposud nepodařilo přetavit v efektivní a rychlý vývoj nových a účinných léků [1]. V situaci, kdy vývoj léku vyžaduje stále více finančních prostředků a času, je nutné hledat nové přístupy, jedním z nich je i znovuvyužití starých léků na pro jiná onemocnění. Úspěšným příkladem tohoto způsobu vývoje léčiv je thalidomid, lék nechvalně známý svými teratogenními účinky, který se dnes hojně využívá v léčbě lepry a v kombinaci s jinými léky i proti mnohočetnému myelomu [2-3]. Některé výsledky naznačují, že by dalším možným kandidátem mohl být již desítky let používaný lék proti alkoholismu disulfiram, prodáváný pod označením Antabus [4].

Historie vzniku tohoto léku spadá do 30. let minulého století, kdy se disulfiram, chemicky tetraetylthiuram disulfid, používal v gumárenském průmyslu. Dělníci z těchto továren pak nebyli schopni pít jakýkoliv alkohol, neboť po jeho požití u nich docházelo k silné nevolnosti [5]. Jak se později ukázalo, nevolnost byla způsobena vysokou hladinou acetaldehydu, metabolitu alkoholu, neboť disulfiram, respektive jeho metabolity, je inhibitor aldehyd dehydrogenázy, enzymu transformujícímu acetaldehyd na kyselinu octovou [6-7].

První zmínky o protirakovinné aktivitě disulfiramu byly publikovány v 70. a 80. letech, kdy bylo ukázáno, že potlačuje vznik chemicky indukované rakoviny žaludku, tlustého střeva a močového měchýře u zvířat [8-9]. V té době byla také zveřejněna případová studie pacientky s metastazující rakovinou prsu, u které po užívání disulfiramu došlo k úplné klinické remisi nádorů [10]. V 90. letech ještě proběhl klinický test druhé fáze s pacientkami s vysoce rizikovou rakovinou prsu, kterým byl ke standardní chemoterapii přidáván ditiocarb, metabolit disulfiramu, nebo placebo. Ve skupině s ditiocarbem došlo k výraznému zvýšení celkového přežití pacientek [11].

Zájem o protirakovinnou aktivitu disulfiramu se pak vrátil až v nedávné době, kdy bylo publikováno mnoho studií, ve kterých se autoři snažili vysvětlit mechanismus jeho účinku na buněčných liniích. V několika studiích [12-13] bylo ukázáno, že disulfiram nebo

ditiocarb jsou inhibitory NF- κ B (jaderný faktor- κ B), transkripčního faktoru, který je úzce spojen s progresí nádoru, či jeho rezistencí na chemoterapii. Zároveň bylo prokázáno, že disulfiram dokáže překonat rezistenci buněk na cisplatinu, 5-fluorouracil nebo gemcitabin [13-14]. Dalším důvodem ke kombinaci disulfiramu s jinou chemoterapií je jeho schopnost inhibovat P-glykoprotein (P-gp), transportér, který je mnohdy zodpovědný za mnohočetnou lékovou rezistenci nádoru, neboť pumpuje léčivo ven z buňky. Disulfiram je schopen inhibovat jak maturaci P-gp, tak jeho ATP-vázající doménu [15]. Vedle toho bylo také ukázáno, že disulfiram interferuje i s jinými pro růst rakoviny zásadními ději – angiogenezí a tvorbou metastáz. Pro tvorbu metastáz je důležité, aby byl nádor schopen rozkládat extracelulární matrix, což se děje činností matrixových metaloproteináz (MMP). Disulfiram snižuje expresi těchto enzymů a zároveň inhibuje aktivitu MMP-2 a MMP-9 u různých rakovinných linií [16]. V souvislosti s potlačením angiogeneze se uvažuje jak o již výše zmíněné inhibici NF- κ B, který reguluje expresi vaskulárního endoteliálního růstového faktoru, tak o inhibici superoxid dismutázy, která je důležitá pro tvorbu nových cév [17-18].

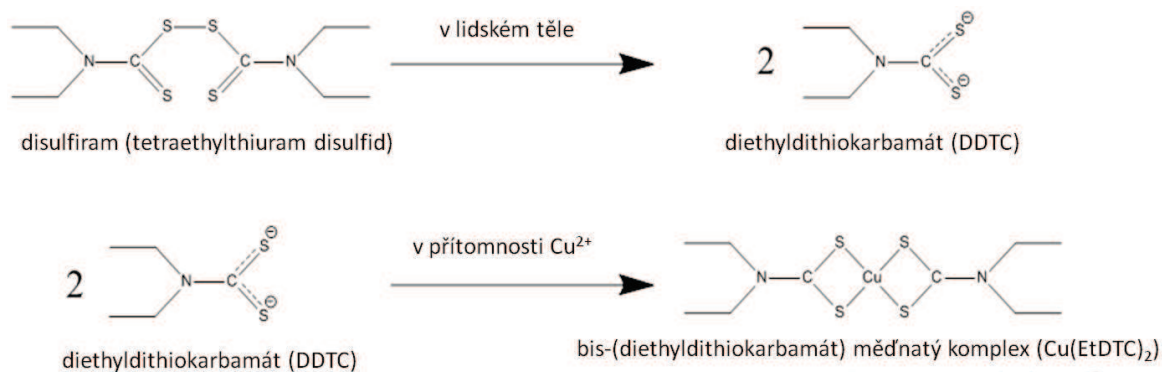
Příčina používání disulfiramu v protialkoholické léčbě, tedy inhibice aldehyd dehydrogenázy, může překvapivě stát za jeho dalším publikovaným účinkem – toxicitou vůči rakovinným kmenovým buňkám, které jsou uváděny jako jedna z příčin relapsu po léčbě. Nádorové kmenové buňky některých typů rakovin exprimují ve zvýšené míře právě aldehyd dehydrogenázu, která je pravděpodobně nepostradatelná pro jejich metabolismus. Jejich inhibice disulfiramem tedy může být vhodný způsob, jak cílit i na tuto populaci buněk, které jsou vůči většině chemoterapeutik odolné, což bylo úspěšně ukázáno u rakoviny prsu nebo glioblastomu [19-20].

Z výše uvedeného vyplývá, že je zde mnoho teorií, které vysvětlují protirakovinný účinek disulfiramu. Doposud není příliš jasné, zda je některá z nich dominantní, nebo zda za protinádorovým účinkem disulfiramu stojí kombinace všech. Také není příliš zřejmé, jestli tato data z buněčných linií odpovídají situaci *in vivo* a už vůbec není známá jejich klinická relevance. Například bylo experimentálně prokázáno, že disulfiram způsobuje demetylaci DNA u prostatických buněčných linií [21], což ovšem nebylo následně potvrzeno u pacientů s rakovinou prostaty [22]. Dalším faktem, který poněkud oslabuje *in vitro* výsledky, je metabolismus disulfiramu, neboť ten je brzy po požití rozložen na ditiokarb a další metabolity. Samotný disulfiram se tedy v těle pacienta prakticky nevyskytuje [23]. Jakožto reaktivní sloučenina obsahující disulfidovou vazbu může reagovat s –SH skupinami proteinů, což pravděpodobně vysvětluje množství jeho

popsaných cílů. Zároveň je schopen vyvazovat dvojmocné kovy (zinek a měď) z aktivních míst enzymů, jako je MMP nebo dopamin- β -hydroxyláza, čehož se využívá při léčbě závislosti na kokainu disulfiramem [17, 24].

Nehledě na nejasnou situaci okolo jeho mechanismu účinku, je zde hned několik klinických odůvodnění, která naznačují, že je disulfiram opravdu perspektivní. Jedná se kromě výše zmíněného také o případovou studii, kdy pacientce po podávání disulfiramu a zinku úplně zmizela jaterní metastáze okulárního melanomu [25]. Tyto výsledky mohou být také podpořeny epidemiologickou studií, která ukázala, že disulfiram může mít protektivní efekt vůči rakovině prsu a prostaty [26].

Významný pokrok v chápání protirakovinného účinku disulfiramu přineslo zjištění, že jeho cytotoxický účinek výrazně stoupá v přítomnosti mědi [27-28]. Dochází k tvorbě bis-(diethyldithiokarbamát) měďnatého komplexu CuEt, který je zároveň popsáným metabolitem disulfiramu v lidském těle (Obr. 1) [29]. Zdá se, že právě komplex CuEt je zodpovědný za toxický účinek vůči nádorům. Bylo ukázáno, že disulfiram v přítomnosti mědi je inhibitor proteazomu, mnohopodjednotkové proteázy, která je zásadní pro degradaci velké většiny buněčných proteinů. Směs disulfiramu a mědi je účinným inhibitorem centrální 20S části proteazomu, kde dochází k samotné proteolýze, což bylo prokázáno jak u purifikovaného 20S proteazomu, tak na buněčných liniích odvozených od rakoviny prsu [28]. Vzhledem k tomu, že inhibice proteazomu je zavedeným přístupem v léčbě rakoviny, je velmi pravděpodobné, že právě toto je zásadním faktorem stojícím za cytotoxickým účinkem disulfiramu. Nicméně mechanismus inhibice proteazomu disulfiramem s mědí je zřejmě poněkud složitější. Ve studiích popisujících ho jako inhibitor 20S totiž nebyl použit syntetický komplex CuEt, ale pouze směs disulfiramu a chloridu měďnatého, což znesnadňuje interpretaci výsledků, jelikož samotné měďnaté ionty 20S proteazom inhibují [28, 30]. V případě použití syntetického komplexu CuEt naopak nedošlo k žádné inhibici purifikovaného 20S, což znamená, že CuEt inhibuje proteazom nějakým jiným mechanismem než ostatní doposud používané inhibitory proteazomu [31].



Obr. 1. Schéma vzniku komplexu disulfiramu s mědí v lidském těle.

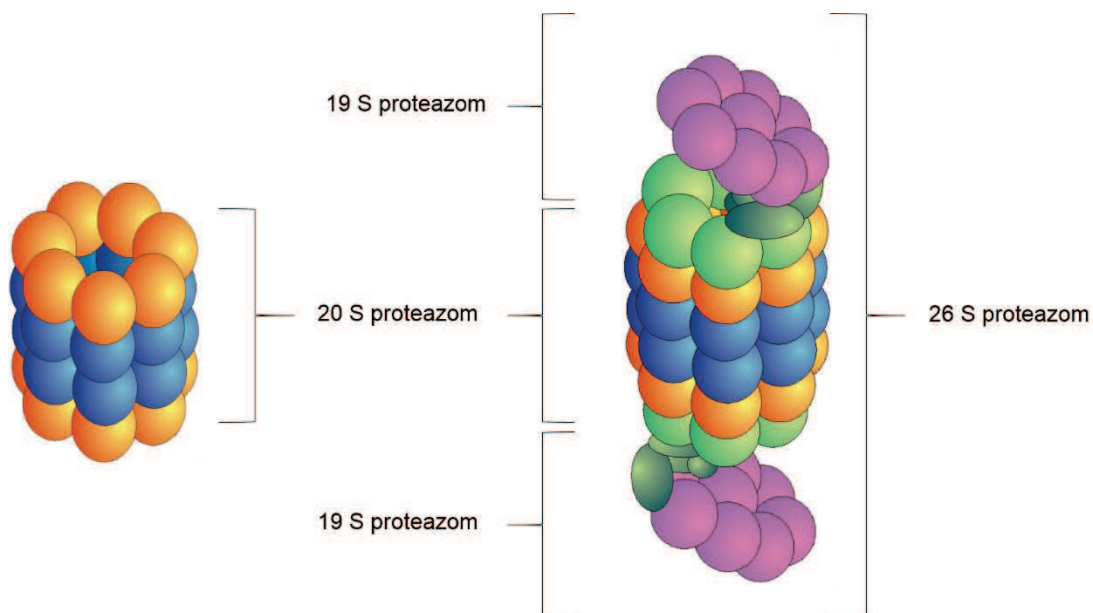
2.2 Inhibice proteazomu při léčbě rakoviny

Degradace buněčných proteinů je velmi komplexní a regulovatelný systém, což svědčí o jeho zásadní roli pro udržení buněčné homeostáze, proliferace, diferenciaci a mnoha dalších dějů [32]. Za degradaci proteinů zodpovídá proteazom, 2,5 MDa velká proteáza, skládající se z mnoha podjednotek, která se nachází jak volně v jádře, tak cytoplazmě asociována s ER a cytoskeletem [33]. Vzhledem k tomu, že k samotné proteolýze dochází uvnitř proteazomu, musí být daný protein nejdříve transportován do nitra centrální části, k čemuž je nutné, aby byl nejdříve proteazomem rozeznán a odlišen od ostatních proteinů. K tomu dochází díky specifické posttranslační modifikaci malým 8,5 kDa proteinem ubikvitinem. Pro degradaci je protein obvykle označen mnoha ubikvitiny, čímž vzniká polyubikvitinový řetězec [34]. Ubikvitin-proteazomový systém (UPS) zodpovídá nejen za degradaci až 80% všech buněčných proteinů, ale hraje důležitou roli také při regulaci transkripce, odpovědi na poškození DNA (DDR – DNA damage response) nebo endocytózu a obecně při buněčné signalizaci [35-37].

2.2.1 Struktura proteazomu

Nejčastější forma proteazomu, označovaná jako 26S, se skládá z centrální 20S části a jedné nebo dvou regulačních 19S částí (Obr. 2). Centrální 20S je složen z 28 příbuzných polypeptidů kódovaných 14 různými geny, které dohromady vytvářejí čtyři heptamerické kruhy. Uvnitř kruhů, které mimo jiné obsahují enzymaticky aktivní podjednotky β1

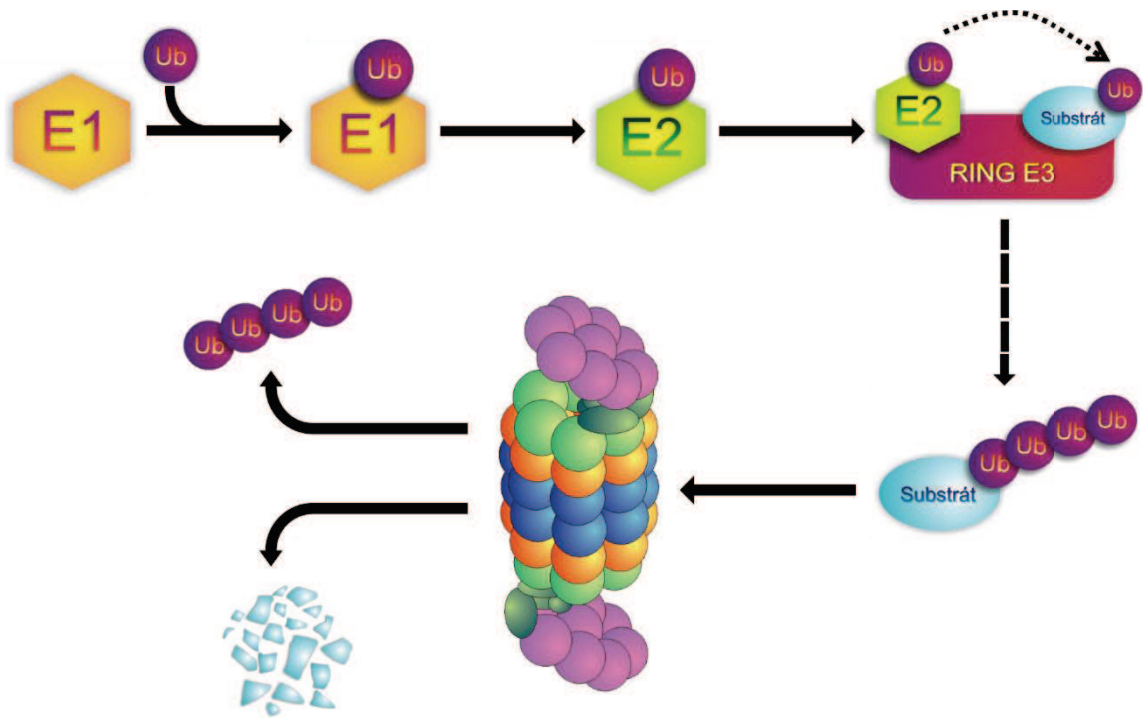
s kaspázám podobnou aktivitou (C-like), $\beta 2$ s trypsinu podobnou aktivitou (T-like) a $\beta 5$ s chymotrypsinu podobnou aktivitou (CT-like), dochází ke štěpení proteinu na malé peptidy [38]. Na 20S proteazom je navázána 19S regulační část, která zodpovídá za rozeznání substrátu, odstranění ubikvitinového řetězce, rozpletení proteinu a jeho translokaci do 20S k proteolýze. Také 19S proteazom se skládá z mnoha podjednotek – tvoří jej hexamerický kruh ATPáz, které společně se třemi dalšími proteiny tvoří bázi 19S. Na tu je připojeno víko 19S složené z dalších devíti podjednotek. Ubikvitinovaný protein je nejdříve rozeznán proteiny báze Rpn10 nebo Rpn13, následně je část proteinu translokována do proteazomu za spotřeby ATP a poté je polyubikvitinový řetězec odštěpen činností podjednotky víka Rpn11, což umožní další rozpletení proteinu a jeho postupný transport do nitra proteazomu k degradaci [39].



Obr. 2. Schéma struktury 26S proteazomu.

2.2.2 Ubikvitinace

Označení proteinu ubikvitinem je základní úrovní regulace degradace proteinů. Nicméně ne všechny ubikvitinované proteiny jsou odsouzeny k proteolýze. V buňce se totiž vyskytuje mnoho typů polyubikvitinových řetězců na základě toho, skrze který lyzin ubikvitinu jsou vzájemně spojeny.



Obr. 3. Schéma ubikvitin-proteazomového systému.

Ubikvitin obsahuje 7 lyzinových reziduí, z nichž všechny mohou sloužit ke tvorbě izopeptidové vazby, kterou jsou jednotlivé ubikvitiny spojeny v řetězec. Podle jejich polohy tedy rozlišujeme K-6, K-11, K-27, K-29, K-33, K-48 a K-63 řetězce, přičemž v buňce se vyskytují zejména K-48 a K-63. Komplexita ubikvitinace je ještě navýšena existencí smíšených nebo rozvětvených řetězců a mnohočetnou monoubikvitinací.

Zatímco K-63 řetězce mají zejména regulační roli, K-11 a hlavně K-48 se uplatňují při degradaci proteinů [40]. Proces ubikvitinace je mnohostupňový a je zprostředkován sérií enzymů – ubikvitin-aktivačního E1, ubikvitin-konjugačního E2 a ubikvitin ligázou E3, která přímo interaguje se substrátem a označuje ho ubikvitinem (Obr. 3) [41]. Zatímco jsou známy pouze dva E1 enzymy a několik E2 (a pouze jeden, Ubc13, pro K-63 řetězce [42]), vyskytuje se v buňce několik set E3 ligáz, které tudíž zprostředkovávají specifitu

ubikvitinace [43]. Ubikvitinace je ovšem proces reverzibilní, neboť ubikvitin může být z proteinu odstraněn činností deubikvitináz (DUB), kterých je popsáno hned několik desítek. Deubikvitinázy mohou být specifické podle typu řetězce nebo substrátu a jejich činností může být protein zachráněn před degradací, nebo je jeho degradace naopak umožněna DUB přítomnými na proteazomu. Zároveň DUB mohou regulovat činnost daného proteinu, jeho lokalizaci a podílet se na editaci polyubikvitinového řetězce [44].

2.2.3 Inhibice proteazomu

Vzhledem k zásadní roli proteazomu v buněčné homeostáze je pochopitelné, že se první snahy o vývoj inhibitorů proteazomu jako léků setkávaly s výraznou skepsí [45]. O to překvapivější bylo zjištění, že inhibice proteazomu má silný toxický účinek především na buňky rakovinné a z doposud ne zcela objasněných důvodů jsou normální buňky vůči tomuto zásahu relativně odolné. Možným vysvětlením by mohla být ne-onkogenní adikce rakovinných buněk na zvýšenou potřebu degradace proteinů pro udržení proteostáze [46]. Intenzivní výzkum inhibitorů proteazomu vyústil po více než 10 letech ke schválení bortezomibu v USA Úřadem pro potraviny a léky (FDA – Food and Drug Administration) k léčbě mnohočetného myelomu, nejdříve jako léku třetí volby (2003), poté i jako léku první volby v rámci kombinované terapie (2008). Bortezomib prodáváný v USA a EU pod značkou Velcade inhibuje CT-like aktivitu $\beta 5$ podjednotky 20S, která je nejméně redundantní a tudíž má její inhibice nejsilnější důsledky [47].

Úspěch bortezomibu je ovšem limitován poměrně silnými nežádoucími účinky a hlavně velmi častým relapsem a vznikem rezistence, což podnítilo vývoj nových inhibitorů [48]. První z nich, carfilzomib, už byl schválen FDA jako lék třetí volby pro pacienty s mnohočetným myelomem, kteří relapsují po bortezomibu nebo jsou na něj resistantní [49]. V této době je také klinicky testován další velmi perspektivní 20S inhibitor ixazomib, který může být podáván orálně a vykazuje oproti předchozím inhibitorům lepší farmakokinetické vlastnosti umožňující trvalejší a silnější inhibici 20S proteazomu [50]. Ukazuje se totiž, že právě krátkodobá a slabá inhibice proteazomu bortezomibem, spolu se špatnou prostupností do rakovinné tkáně, je hlavním důvodem, proč bortezomib selhal v klinických testech u všech pevných nádorů [51]. První klinické testy naznačují, že ani carfilzomib nebude o mnoho úspěšnější [52], na rozdíl od ixazomibu, u kterého předběžné výsledky dávají naději, že inhibice 20S proteazomu může být vhodným terapeutickým přístupem i u pevných nádorů [53].

Přestože je největší zájem vkládán do vývoje inhibitorů centrálního 20S proteazomu, ukazuje se, že i inhibice regulační 19S části může být cesta k léčbě rakoviny [54]. Molekula b-AP15 inhibující dvě DUB, USP14 a UCHL5, volně asociující s 19S, potlačuje růst xenograftů odvozených od čtyř různých pevných nádorů [55] a zároveň je schopna překonat rezistenci na bortezomib u buněk mnohočetného myelomu z pacientů nebo inhibovat jejich růst *in vivo* [56]. Obdobně byl nedávno popsán kovalentní inhibitor RA190 ubikvitinového receptoru Rpn13, který je součástí báze 19S. RA190 je toxický vůči liniím mnohočetného myelomu, včetně rezistentních na bortezomib, a inhibuje růst xenograftu mnohočetného myelomu a rakoviny vaječníku [57]. Tyto výsledky naznačují velký potenciál alternativních inhibitorů v léčbě maligních onemocnění [58].

Ačkoliv jsou inhibitory proteazomu používány už více než 20 let, jejich přesný mechanismus účinku není doposud plně objasněn. Vzhledem k širokému spektru substrátů proteazomu není překvapivé, že jeho inhibice ovlivní téměř všechny buněčné děje. Přesto se dlouho myslelo, že zásadní roli hraje bortezomibem zprostředkovaná inhibice transkripčního faktoru NF- κ B [59], což bylo ovšem nakonec přesvědčivě vyvráceno [60]. Unikátní toxicita bortezomibu vůči mnohočetnému myelomu dává tušit, že zásadním faktorem determinujícím účinek inhibitoru proteazomu je narušení proteostáze [61]. Mnohočetný myelom jakožto malignita plazmatických buněk je charakteristický extrémně vysokou produkcí proteinů – imunoglobulinů [62]. Rychlá proteosyntéza je spojená se vznikem velkého množství špatně nasyntetizovaných nebo špatně poskládaných proteinů, které musí být odstraněny. Děje se tak mechanismem zvaným ERAD (ER-Assisted Degradation), jehož centrální složkou je proteazom [63]. V bortezomibem ovlivněných buňkách tak dochází k akumulaci těchto defektních proteinů způsobujících ER-stres a aktivaci UPR (Unfolded Protein Response), která při trvalé stimulaci vede k apoptóze [64]. Podporou pro tuto hypotézu je také pozorování, že bortezomib je toxický i vůči normálním plazmatickým buňkám, čehož se využívá při autoimunitních onemocněních nebo při transplantacích [65]. Nejnovější výsledky naznačují, že poměr syntézy proteinů vůči jejich degradaci proteazomem nejen určuje míru citlivosti na bortezomib [66], ale také hraje zásadní roli v procesu vzniku rezistence na inhibici proteazomu. Bylo totiž zjištěno, že v průběhu léčby bortezomibem dochází k vyselektování subpopulace myelomových buněk, které mají silně potlačenou produkci protilátek [67].

Zásadní otázka – tedy, jestli jsou inhibitory vhodné i pro léčbu pevných nádorů – zůstává doposud nezodpovězena. V principu je známo, že by rakovinné buňky měly být více závislé na proteazomu než buňky netransformované, což bylo potvrzeno nedávno i

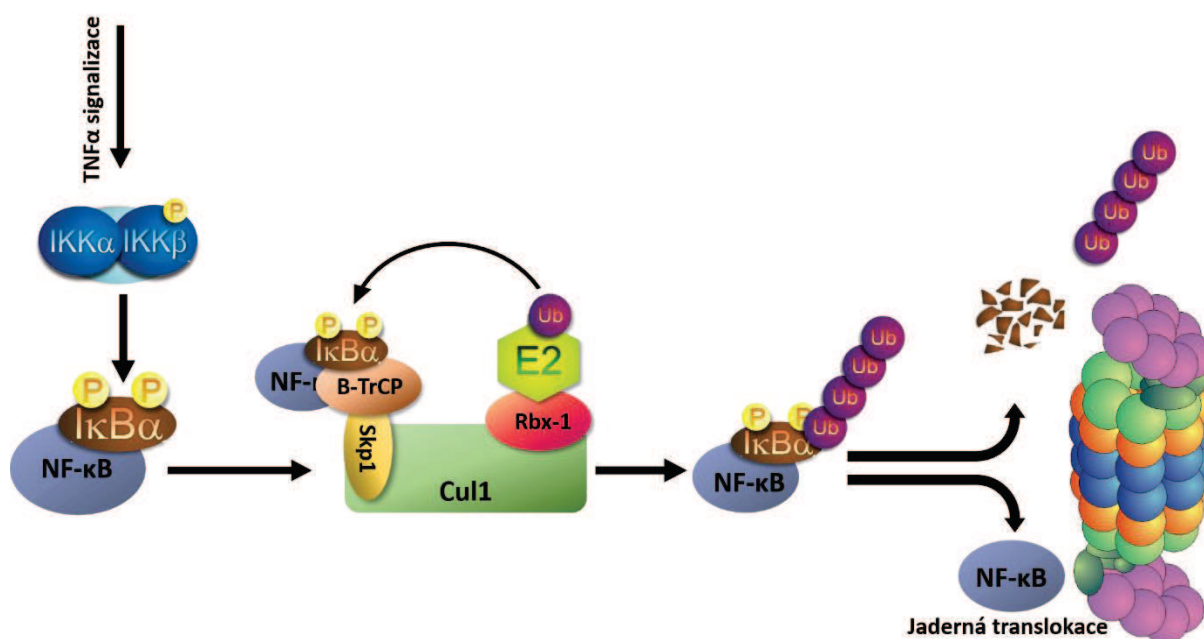
pro rakovinu prsu [68]. Zjevné selhání bortezomibu u všech pevných nádorů je pak možno vysvětlit jeho špatnou prostupností do tumoru a dávkovacím režimem, který neumožňuje udržet trvalejší inhibici proteazomu [69]. Krátkodobá a občasná inhibice proteazomu bortezomibem je pravděpodobně toxická pouze pro extrémně citlivé myelomové buňky. Pro úspěšné léčení i pevných nádorů bude nejspíše potřeba vyvinout takové inhibitory, které budou schopny udržet svůj účinek po delší dobu i u hůře přístupných tumorů bez vážných vedlejších účinků.

2.3 Ubikvitin-dependentní degradace (UDD)

Jak již bylo zmíněno, protinádorový účinek bortezomibu byl od počátku spojován s inhibicí NF- κ B, transkripčního faktoru aktivujícího angiogenezi, protiapoptotické geny nebo rezistenci vůči chemoterapii [70], který je často konstitutivně aktivní u mnohočetného myelomu [71]. Přestože novější výsledky tuto hypotézu vyvracejí, může být inhibice NF- κ B vhodným příkladem role UPS v regulaci zásadních buněčných procesů.

NF- κ B je udržován v neaktivním stavu pomocí inhibičního proteinu κ B α (I- κ B α), který je na něj vázán. Zatímco NF- κ B obsahuje jadernou lokalizační sekvenci, I- κ B α nese naopak cytoplazmatickou lokalizační sekvenci, což má za následek neustálé translokace celého komplexu mezi jádrem a cytoplazmou a naopak, čímž je transkripční faktor udržován v inaktivním stavu [72]. I- κ B α má za klidového stavu relativně pomalý turn-over (asi 130 minut), naopak v případě nutnosti aktivace NF- κ B se rapidně snižuje na méně než 2 minuty, což vzbuzovalo otázky, jakým způsobem je degradace I- κ B α regulována [73]. Při zánětlivé reakci dochází pomocí tumor necrosis factor- α (TNF α) nebo interleukin-1 β (IL-1 β) k aktivaci signální dráhy, která vede k fosforylaci I- κ B α a uvolnění NF- κ B. Jak se později ukázalo, právě fosforylace I- κ B α je zásadní pro jeho extrémně rychlou degradaci, čímž byla poprvé prokázána role proteazomu při regulaci buněčné signalizace [74]. Teprve po fosforylaci I- κ B α v místě serinu 32 a 36 I- κ B α kinázou (IKK) dochází k rozeznání I- κ B α specifickým E3 enzymem z rodiny SCF (Skp1/Culin1/F-box) ligáz, který jej označí polyubikvitinovým řetězcem, čímž umožní jeho rychlou degradaci 26S proteazomem [75]. SCF E3 ligázy se skládají z několika proteinů, které umožňují souhru několika různých vlastností zásadních pro jejich roli v buněčné signalizaci – možnost regulace, specificitu a vysokou rychlost ubikvitinace. Základní jednotkou je protein Culin 1, který interaguje s proteinem Skp1 a Rbx1, adaptorem pro E2 konjugující enzym, který přímo ubikvitinuje daný substrát. Na Culin1 je vázán také variabilní F-box protein, který umožňuje specificitu

i regulovatelnost. V případě SCF E3 pro I- κ B α se jedná o F-box protein zvaný β -TrCP (Beta-transducin Repeats-containing Proteins), který ubikvitinuje preferenčně fosforylované proteiny nebo proteiny v komplexech (Obr. 4) [76]. Mezi další substráty β -TrCP patří proteiny hrající roli ve vývoji (β -katenin), buněčném cyklu (Wee1) nebo v odpovědi na poškození DNA (Cdc25A) [77]. Zatímco k fosforylaci I- κ B α IKK kinázou dochází v cytoplasmě, ubikvitinace probíhá pravděpodobně v buněčném jádře, neboť β -TrCP má převážně jadernou lokalizaci. Kde přesně ovšem dochází k degradaci, je doposud neznámé [78].



Obr. 4. Schéma degradace proteinu I- κ B α .

Přestože je velmi dobře známo, že velká většina proteinů je označena k degradaci pomocí K-48 ubikvitinového řetězce, stále více publikací naznačuje, že existuje větší variabilita degradačních signálů. Intenzivně je zkoumána role K-63 řetězců při degradaci [79]. Proteiny označené K-63 řetězcem asociují s proteazomem a jsou degradovány stejně efektivně jako u K-48 řetězců *in vitro* [80]. Nicméně po inhibici proteazomu jsou to právě jen K-63 polyubikvitiny, které se nehromadí, což naznačuje, že jejich fyziologická role je opravdu omezena jen na buněčnou signalizaci či lysozomální degradaci [81]. Možné vysvětlení rozdílu mezi *in vivo* a *in vitro* výsledky přináší nedávná publikace [82], kde

autoři ukázali, že K-63 ubikvitinované proteiny v buňce s proteazomem vůbec neinteragují. Děje se tak činností ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) komplexu, který selektivně vychytává K-63 označené proteiny, čímž neumožňuje jejich degradaci proteazomem. Naopak je ESCRT komplex usměřuje do endozomální a lysozomální dráhy. Vzhledem k tomu, že ESCRT komplex je lokalizován pouze v cytoplazmě, nijak neinterferuje se zásadní rolí 19S proteazomu a jeho podjednotky POH1 v deubikvitinaci K-63 ubikvitinů při odpovědi na poškození DNA [83].

Původně se také myslelo, že v buňce existují pouze homogenní polyubikvitinové řetězce vzájemně spojené jedním ze sedmi lyzinů. Nicméně se ukazuje, že existují i heterogenní řetězce, které jsou spojeny skrze různá lyzinová rezidua (např. K-6 a K-11) [84]. Dokonce existují i rozvětvené řetězce, kdy je na několik lyzinů jednoho ubikvitinu připojeno více molekul ubikvitinu. Zatímco se zdá, že proteiny označené heterogenními řetězci mohou být substráty proteazomu, u rozvětvených řetězců k degradaci pravděpodobně nedochází [85]. Další možností je také tvorba lineárního řetězce, u kterého je na N-terminální konec ubikvitinu připojen C-terminus ubikvitinu druhého. Tento způsob označení se uplatňuje u degradace PCNA proteinu [86]. Dokonce byla objevena kombinace ubikvitinu s proteinem SUMO, jenž také pravděpodobně reguluje degradaci různých substrátů [87].

Dalším možným signálem pro degradaci je překvapivě monoubikvitinace nebo mnohočetná monoubikvitinace [88], přestože bylo dlouho uznávaným faktem, že protein musí být označen nejméně tetraubikvitinovým řetězcem, aby mohl být rozeznán proteazomem [89]. Monoubikvitinace se uplatňuje při degradaci např. proteinu PAX3 nebo fosfolipázy D [88].

Komplexita systému ještě vzrůstá tím, že ubikvitin nemusí být navázán jen skrze lyzinové reziduum substrátu. Jako akceptory ubikvitinu mohou sloužit i cystein, serin, treonin nebo dokonce N-terminus substrátu, což bylo pozorováno při degradaci důležitých regulátorů buněčného cyklu, jako je p21, p19, p16 nebo cyklinu G1 [88].

2.4 Ubikvitin-independentní degradace proteazomem (UID)

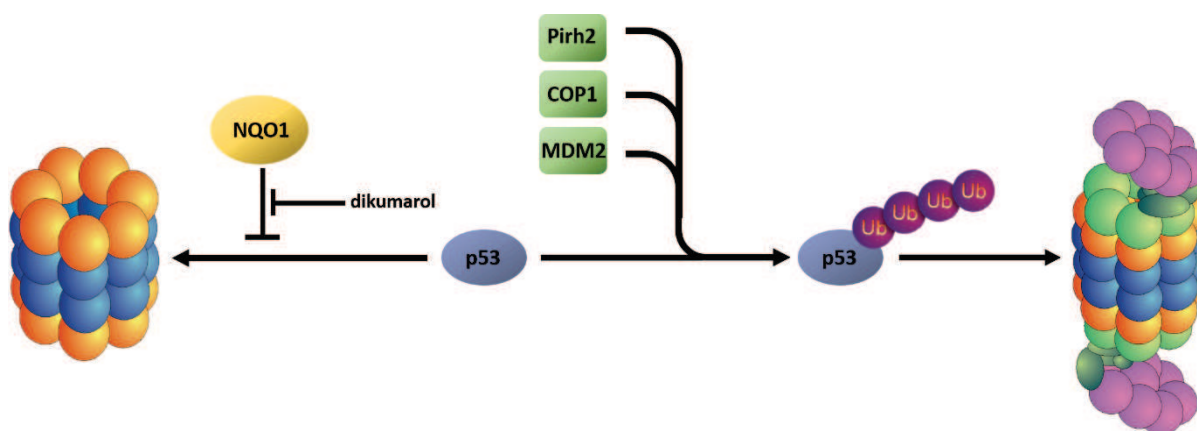
I když se ubikvitinace uplatňuje v degradaci většiny proteinů, jsou známy i případy degradace proteinů proteazomem nezávisle na ubikvitinu (Ubiquitin Independent Degradation, UID). Dokonce se zdá, že role UID je silně podceňována ne tolik z důvodu své výjimečnosti, ale spíše pro obtížnost ji experimentálně prokázat [90]. Podle některých

studií je možné, že UID se uplatňuje v degradaci více než 20% všech buněčných proteinů [91]. Také důvod existence dvou paralelních systémů – ubikvitin-dependentní degradace (UDD) a UID je neznámý. Jedna teorie předpokládá, že UID je pouze evoluční pozůstatek z doby „před ubikvitinem“, který se zachoval u těch proteinů a v těch případech, kdy to bylo výhodné. Druhá teorie uvádí, že existence dvou systémů umožňuje buňce lépe reagovat na různé podmínky, neboť v buňce může dojít k proteazomovému stresu a ubikvitinovému stresu nezávisle na sobě [92]. UID mechanismus se uplatňuje pravděpodobně také při degradaci oxidovaných či jinak poškozených proteinů. Zatímco 26S proteazom je velmi citlivý na oxidační stres a dochází k poklesu jeho aktivity nebo jeho disociaci, 20S je nadále aktivní. Dokonce je možné, že disociace 26S na volný 20S je řízený proces, který umožňuje buňce degradovat zoxidované proteiny efektivněji a lépe se vyrovnat s oxidačním stresem [93].

UID mechanismus je doposud velmi málo prozkoumanou oblastí a pouze u několika proteinů panuje obecný konsenzus, že jsou degradovány právě nezávisle na ubikvitinu. Nejznámějším příkladem takového proteinu je ornitin dekarboxyláza (ODC) [94]. ODC je první a limitující enzym syntézy polyaminů u eukaryot, který je regulován zejména prostřednictvím degradace. Zvýšená hladina ODC vede k syntéze většího množství polyaminů, hlavně sperminu a spermidinu, které následně aktivují expresi antizimu-1 (AZ1) [95]. Bylo prokázáno, že právě AZ1 indukuje degradaci ODC proteazomem nezávisle na ubikvitinu, čímž dochází ke zpětnovazebné regulaci hladiny polyaminů. AZ1 se váže na ODC za tvorby heterodimeru, který je rozeznán 26S, přičemž dochází k degradaci jen ODC za uvolnění AZ1. AZ1 nahrazuje funkci ubikvitinu tím, že umožňuje rozeznání heterodimeru proteazomem [96], a navíc bylo zjištěno, že s ubikvitinem kompetuje o stejné rozeznávací místo na 26S proteazomu, Rpn10 [97].

Je známo také několik proteinů, které jsou degradovány zároveň dvěma mechanismy – UDD a UID. Nejznámějšími příklady jsou p53 [98] a p21 [99]. Bazální hladina p53 je za normálních podmínek udržována na velmi nízké úrovni, zejména činností E3 ligáz, které ubikvitinací odsuzují p53 k degradaci 26S proteazomem. Je známo hned několik E3 ligáz, jejichž substrátem je p53, ale mezi nejhlavnější patří vedle Pirh2 (p53-induced protein with a RING H2 domain) a Cop1 (Constitutively Photomorphogenic 1) také RING (Really Interesting New Gene) ligázy MDM2 (Mouse Double Minute 2 homolog) a blízký příbuzný MDMX (Mouse Double Minute 4) [100]. Novější výsledky naznačují, že právě heterodimer MDM2/MDMX je zodpovědný za většinu degradace p53. MDM2/MDMX komplex také ovlivňuje transkripční aktivitu p53 a jeho lokalizaci.

V případě buněčného stresu, např. poškození DNA, dochází k přerušení vazby mezi p53 a MDM2/MDMX vedoucí k akumulaci aktivního p53 a spuštění buněčné odpovědi na daný stres [101]. Pokud buňka nedokáže daný problém vyřešit, může aktivace p53 vést k senescenci nebo apoptóze [102]. Mezi geny aktivované p53 patří i MDM2, který tak po ukončení stresové situace opět sníží hladinu p53 do normální úrovně. Tím je zajištěna zpětnovazebná regulace celého systému [103]. Ukazuje se ale, že se vedle na ubikvitinu závislé degradaci podílí na stabilitě p53 i UID. P53 jakožto protein obsahující rozvolněné a nestrukturované domény může být degradován bez předchozí ubikvitinace samotným 20S proteazomem (Obr. 5) [104]. Tento proces je zcela pasivní, a proto byl velmi dlouho přehlížen. Je regulován zejména NADH chinon oxidoreduktázou 1 (NQO1) [105]. Jedná se o enzym katalyzující redukcí různých chinonů při použití NADH nebo NADPH jako kofaktoru. NQO1 asociuje jednak s 20S proteazomem jednak s různými nestrukturovanými proteiny jako je p53 nebo p73 [106]. Míra interakce NQO1 s p53 je ovlivněna hladinou NADH a při jeho nízké koncentraci, nebo při inhibici NQO1, ztrácí svoji protekční vlastnost a p53 může být degradován samotným 20S proteazomem [107].



Obr. 5. Schéma ubikvitin-dependentní a ubikvitin-independentní degradace proteinu p53.

Fyziologická signifikance UID p53 byla poměrně kontroverzní, nicméně novější výsledky naznačují, že se může jednat o zásadní proces. V případě, že je buňka vystavena γ -záření, dochází k modifikaci p53 umožňující se vyhnout MDM2 regulované degradaci. Zároveň ale bylo pozorováno, že dochází i k posílení interakce mezi p53 a NQO1, čímž se

p53 vyhne také degradaci samotným 20S. V případě inhibice NQO1 nebo snížení jeho exprese nebyly tyto buňky schopny vyvolat efektivně odpověď na poškození DNA závislou na p53 [106]. Protektivní aktivita NQO1 je také důležitá při vzniku chemicky indukované rakoviny nebo odpovědi na oxidativní stres [108]. Vzhledem k tomu, že je protein p53 mutován asi 50% všech malignit, může být degradace 20S proteazomen a role NQO1 zásadní i u rakovinných onemocnění [109]. NQO1 byl identifikován jako nádorový supresor, který je u mnoha nádorů slabě exprimován nebo mutován, kromě toho určitá alela kódující nestabilní NQO1 je spojena s vyšším rizikem vzniku různých typů malignit [110]. Tato forma NQO1 má také sníženou schopnost vázat p53 vedoucí ke snížení jeho hladiny, což bylo prokázáno u rakoviny prsu. Mutovaná forma NQO1 je konečně negativní prognostický faktor, který může ovlivňovat i úspěšnost chemoterapie [111].

Biologický důvod pro UID proteinu p53 není doposud plně objasněn, nicméně jedna hypotéza tvrdí, že tento mechanismus může být zásadní pro regulaci buněčné odpovědi na oxidativní stres. ROS aktivují transkripční faktor NRF2, který indukuje expresi NQO1, čímž dojde k aktivaci p53 a odpovědi na stres [112].

UDD i UID mechanismus degradace se uplatňuje i u proteinu p21, nicméně zde není situace doposud dobře známá. Je známo, že p21 je degradován v závislosti na buněčném cyklu a za touto degradací pravděpodobně stojí E3 ligázy SCF a APC (Anaphase Promoting Complex) komplex [113]. Nicméně je popsána i UID degradace a relativní příspěvek obou mechanismů není zřejmý [114-115].

Na ubikvitinu nezávislá degradace se uplatňuje i u jiných proteinů, ať už u proapoptického proteinu NOXA [116], nebo naopak proti-apoptického Mcl-1 [117], nebo onkogenů c-Fos a Fra-1 [118].

2.5 Rostoucí komplexita UPS

Důležitost UPS při léčbě rakoviny nebo neurodegenerativních onemocnění podnítila intenzivní výzkum [119], který vede dodnes k překvapujícím výsledkům. Zjednodušené schéma předpokládající dva kroky – ubikvitinaci a následnou degradaci proteazomem – bude pravděpodobně brzy překonané. Nejen samotná ubikvitinace, která je přinejmenším u některých proteinů diskutabilní, ale i proteazomální degradace je pravděpodobně mnohem komplikovanější proces, než se mohlo dříve zdát.

26S proteazom není osamoceným komplexem, ale interaguje s mnoha dalšími partnery, kteří jsou nepostradatelní pro jeho správnou funkci. Na proteazom se vážou

některé E3 ligázy [120] a deubikvitinázy, které zřejmě představují další úroveň regulace celého systému. E3 ligázy umožňují opakovanou ubikvitinaci substrátů, aby nedošlo k jejich disociaci a byly skutečně zdegradovány. Naopak s proteazomem asociující deubikvitinázy USP14 a UCHL5 umožňují odštěpování ubikvitinových řetězců z distálního konce, čímž pravděpodobně usnadňují uvolnění proteinů z proteazomu [121]. Intuitivně se tedy předpokládalo, že inhibice těchto DUB povede k větší efektivitě proteazomu, čehož by se mohlo využít např. při léčbě neurodegenerativních onemocnění, která jsou mimo jiné charakteristická sníženou degradací poškozených proteinů [122]. O to větší bylo překvapení, že inhibitory těchto DUB vedou naopak k celkové inhibici proteazomu, čehož by se mohlo využít při léčbě rakoviny. Pravděpodobné vysvětlení tohoto paradoxu je, že tyto DUB svojí činností udržují proteazom v chodu, neboť bez nich by došlo ke kolapsu celého proteazomu, který by byl zahlcen nespecifickými ubikvitinovanými proteiny, jež nejsou určeny k degradaci [123].

Jak již bylo zmíněno, za rozeznání a navázání ubikvitinovaných proteinů proteazomem jsou zodpovědné zejména podjednotky, receptory Rpn10 a Rpn13, kterou jsou pevnou součástí 19S proteazomu. Rpn13 je schopen vázat ubikvitinované substráty pouze tehdy, když je součástí 19S, podobně jako Rpn11 vykazuje deubikvitinační aktivitu jen jako součást proteazomu [124]. Naopak druhý receptor Rpn10 dokáže vázat ubikvitinované proteiny i jako samostatná jednotka [125]. Je známo, že 20S proteazom může vázat 19S z obou stran, čímž dochází k tvorbě komplexu o velikosti asi 30S. Nedávná studie ovšem naznačuje, že takto vzniklý proteazom je asymetrický, neboť pouze jedna 19S část obsahuje Rpn13, na rozdíl od Rpn10 a Rpn11, které jsou přítomny u obou 19S [126]. Zdá se tedy, že touto asymetrií je zajištěno, že nedojde k degradaci proteinů z obou dvou stran najednou, což by mohlo vést k problémům.

Interakci proteazomu s ubikvitinovanými substráty umocňují i další pomocné proteiny, které obsahují UBL-UBA (Ubiquitin-like domain; Ubiquitin-associated domain) domény. Tyto pomocné faktory, zejména Rad23, Dsk2, Ddi1, slouží jako další receptory, které volně interagují zejména s Rpn1 podjednotkou proteazomu pomocí UBL domény a UBA doménou navazují substrát určený k degradaci [127]. V blízkosti Rpn1 se také váže DUB USP14, která tak může deubikvitinovat tyto substráty. Také se nabízí možnost, že tyto substráty musí být označeny delším polyubikvitinovým řetězcem vzhledem k větší vzdálenosti k Rpn11 [128]. Bylo například zjištěno, že specifická HIF1 α (Hypoxia-inducible factor 1 α) k různým receptorům umožňujícím degradaci je závislá právě na délce ubikvitinového řetězce [129].

Dalším důležitým proteinovým komplexem, který je nepostradatelný pro degradaci mnoha proteinů a jehož role byla donedávna poměrně opomíjena, je p97 (VCP-Valosin Containing Protein). P97 patří do rodiny AAA ATPáz vytvářející hexamer podobně jako báze proteazomu. Na tento hexamer se může vázat mnoho dalších adaptorů, z nichž mnoho obsahuje ubikvitin vázající domény UBA, UBX (Ubiquitin Regulatory X domain) nebo UIM (Ubiquitin-interactin motif) [130]. S p97 interaguje i několik DUB, E3 ligáz, E4 enzym, ale nejčastějšími partnery jsou Ufd1 (Ubiquitin fusion degradation 1) a Npl4 (Nuclear Protein Localization 4), které zprostředkovávají interakci s ubikvitinovanými proteiny [131]. Jakožto ATPáza je p97 schopen přetvářet energii z ATP na mechanickou sílu, pomocí níž může vyvazovat ubikvitinované substráty od interakčních partnerů v komplexech, z membrán, k čemuž dochází zejména při ERAD nebo degradaci mitochondriálních proteinů, nebo z chromatinu při regulaci buněčného dělení a odpovědi na poškození DNA [132]. Překvapivé bylo zjištění, že p97 je zapojen v degradaci i volných cytosolických proteinů [133]. O širší aktivity p97 při degradaci proteinů vypovídá i fakt, že při jeho inhibici dochází k akumulaci ubikvitinovaných proteinů srovnatelné s inhibicí proteazomu [134-135].

Zásadní informace přinesla i nedávná studie ukazující, že u *archeí* p97 (u nižších eukaryot a prokaryot známý jako CDC48) interaguje s 20S proteazomem a aktivuje ho [136]. *Archea* nemají ekvivalent eukaryontního 19S, a proto se nabízí otázka, zda jeho funkci nenahrazuje právě CDC48. Ke stejným výsledkům došla i studie, která potvrdila aktivaci 20S pomocí p97 u myši a v savčích buňkách [137]. Vzhledem k tomu, že komplex 20S a p97 může interagovat i s komplexem COP-9 signalozomu, který má nápadnou homologii s víkem 19S proteazomu, nabízí se myšlenka, zda se v buňkách nenachází i takováto forma alternativního proteazomu, ve kterém by báze 19S byla nahrazena p97 a víko 19S COP-9 signalozomem [138]. Je velmi pravděpodobné, že následující výzkum odhalí nové skutečnosti, které mohou do značné míry otřást našimi dnešními představami o UPS.

3 CÍL PRÁCE

Diplomová práce se snaží pojmout základní teoretické znalosti o ubikvitin-proteazomovém systému, jakožto možném cíli komplexu disulfiramu s mědí. Shrnuje komplexitu i různorodost proteazomální degradace na příkladu některých dobře popsanych proteinů, což zároveň tvoří i teoretický podklad pro experimentální práci. Dále se zabývá doposud publikovanými studiemi o protirakovinné aktivitě disulfiramu.

V praktické části je sledován vliv syntetického komplexu disulfiramu s mědí na degradaci různých proteinů proteazomem. Získané výsledky jsou srovnávány s dřívějšími poznatky a jsou hodnoceny z hlediska možné relevance v protirakovinné terapii.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Kultivace buněčných linií

V práci byly použity buněčné linie MDAMB231, MCF7, MCF10A (odvozené od rakoviny prsu) a Hela (odvozené od rakoviny děložního čípku). Buněčné linie byly kultivovány v médiu DMEM obsahujícím 10% FBS a 1% penicilin/streptomycin při teplotě 37°C a 5% koncentraci CO₂. Linie MCF10A byla kultivována v médiu DMEM/F12 s 5% koním sérem, 1% penicilín/streptomycin, EGF (20 ng/ml), hydrokortison (0,5 µg/ml), cholera toxin (100 ng/ml), inzulín (10 µg/ml).

4.2 Určení cytotoxicity

Pro zjištění vlivu zkoumané látky CuEt na viabilitu buněk bylo použito metody MTT. Tato metoda je založena na redukci MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid) na formazan. Redukce MTT na formazan je katalyzována mitochondriální dehydrogenázou, množství barevného produktu je tudíž úměrné viabilitě buněk a jejich počtu [139]. Buňky byly vysazeny v počtu 5000 na jamku na 96-jamkovou desku. Po 24 hodinách byla mikroskopicky zkontrolována rovnoměrnost počtu buněk a poté byla aplikována testovaná látka v novém médiu vždy v osmi opakováních (jamkách) pro danou koncentraci. Buňky byly inkubovány s testovanou látkou 24 hodin, pak bylo staré médium nahrazeno novým obsahujícím MTT (3 mg/ml). Po 3 hodinách bylo opět odsáto a vzniklý formazan byl rozpuštěn v DMSO a spektrofotometricky stanoven při vlnové délce 570 nm. Viabilita buněk byla vztažena ke kontrolní skupině, která byla ovlivněna pouze rozpouštědlem (DMSO).

4.3 Příprava buněčných lysátů pro Western blotting (WB) a měření aktivity proteazomu

Buňky byly vysety na 6 cm misky nebo 6-jamkové desky podle typu experimentu a ponechány do dalšího dne. Po proběhnutí experimentu byly misky dány na led, médium bylo odsáto a buňky byly propláchnuty vychlazeným PBS. Poté byl přidán RIPA pufr a po 5 minutách inkubace byla směs přepipetována do mikrozkušavky. Za občasného promíchání byla dalších 5 minut inkubována na ledě a poté centrifugována při 12000 rpm 10 minut ve 4°C. Supernatant byl zamražen v -80°C nebo použit pro změření koncentrace proteinů a další experimenty.

4.4 Měření koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla měřena metodou Bradfordové založené na barevné přeměně Coomassie Brilliant Blue G-250 při reakci s proteiny, což je možno stanovit spektrofotometricky při vlnové délce 595 nm. Při měření koncentrace bylo nejprve nutné lyzát 10x zředit a 2 μ l zředěného lyzátu byly přidány ke 200 μ l Coomassie roztoku vždy v duplikátu. Pro vytvoření kalibrační křivky byly použity různé koncentrace roztoku BSA (10 – 1000 μ g/ml v 0,15 M NaCl).

4.5 Měření aktivity 20S proteazomu

Proteolytické aktivity 20S proteazomu byly měřeny pomocí fluorogenních substrátů, u kterých dochází činností proteáz k uvolnění fluorescenčního 7-amino-4-metylkumarinu (AMC), jenž může být měřen fluorimetrem. Celobuněčné lyzáty (10 μ g proteinů) z buněk inkubovaných s testovanými látkami (CuEt, bortezomib) byly inkubovány vždy v duplikátu 1 hodinu ve 100 μ l pufru (40 mM Tris-HCl, pH 7,4) s 20 μ M fluorogenním substrátem Suc-LLVY-AMC (pro CT-like aktivitu), Z-LLE-AMC (pro C-like aktivitu) nebo Z-ARR-AMC (T-like aktivitu) při 37°C. Fluorescence vzniklého AMC byla měřena fluorimetrem při excitační vlnové délce 360 nm a emisní 460 nm. Aktivita proteazomu byly vztažena ke kontrolní skupině ovlivněné pouze DMSO.

4.6 Western blotting

Proteiny byly detekovány pomocí metody Western blottingu. Proteiny byly nejdříve separovány na základě molekulové hmotnosti polyakrylamidovou gelovou elektroforézou za denaturujících podmínek v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE). Obvykle byly použity ručně připravované gely o hustotě 10% nebo 12% akrylamidu podle předpisu výrobce (Bio-Rad) nebo komerčně dostupné gradientové (4-20%) gely. Buněčný lyzát s obsahem 30-50 μ g proteinů byl nejdříve smíchán s 4xLSB pufrem a denaturován 5 minut při 95°C, a před vnesením na gel ještě stočen. Dokud se vzorky nacházely v zaostřovacím gelu, elektroforéza probíhala při konstantním proudu 10 mA/gel. Když vzorky dosáhly rozdělovacího gelu, byl proud zvýšen na 20 mA/gel. Po proběhnutí elektroforézy, byly proteiny z gelu přeneseny na PVDF membránu semi-dry blottingem (1 hodina při 400 mA). Membrána byla několikrát opláchnuta v destilované vodě a obarvena Ponceau S roztokem pro kontrolu správnosti přenosu a množství proteinů. Membrána byla poté

odbarvena roztokem TBS-Tween a blokována 1 hodinu v 5 % sušeném mléku v TBS-Tween. Pak byla opět opláchnuta v TBS-Tween a následně inkubována s primární protilátkou přes noc ve 4°C. Další den byla primární protilátka vymyta a membrána byla další hodinu inkubována se sekundární protilátkou, která byla následně také vymyta. Navázaná sekundární protilátka s křenovou peroxidázou (HRP) byla detekována pomocí fotoluminiscenčního substrátu a filmu nebo CCD kamery.

4.7 Měření degradace Ub(G76V)-GFP

Pro tento experiment byly použity HeLa buňky konstitutivně exprimující Ub(G76V)-GFP reportér. Buňky byly nedřívě vysety v počtu 10^4 buněk/jamka na 96 jamkovou destičku. Druhého dne k nim byl přidán MG132 v koncentraci 4 μ M v DMEM médiu bez fenolové červeni a FBS. Po třech hodinách bylo médium s MG132 odsáto, buňky byly dvakrát propláchnuty PBS a poté k nim byl přidáno nové médium s 2,5% FBS obsahujícím 30 mg/ml cykloheximidu a různé koncentrace testované látky (CuEt) a kontroly DMSO (vždy v triplicátu). V průběhu dalších 3 hodin byl zaznamenáván signál GFP. Normalizovaná intenzita GFP byla spočítána podle následujícího vzorce: (intenzita GFP testované látky – intenzita pozadí) / (bazální intenzita GFP – intenzita pozadí). Bazální intenzita GFP odpovídá buňkám, které nebyly vystaveny MG132 k naakumulování GFP reportéru. Pro výpočet konstanty degradačního spádu byl Ln normalizované intenzity vztažen k času. Výsledky jsou pak vyjádřeny v procentech konstanty degradačního spádu (testovaná látka/DMSO kontrola)*100.

4.8 Biologický materiál

Buněčné linie odvozené od rakoviny prsu (MDA MB 231, MCF7 a MCF10A) byly získány z ACCT (American Collection of Cells and Tissues). HeLa buněčná linie exprimující Ub(G76V)-GFP byla získána od prof. Raymonda Deshaiese, California Institute of Technology.

4.9 Chemikálie

Penicilin/Streptomycin, P11-010 PAA, The Cell Culture Company

FBS (Fetal Bovine Serum), Heat Inactivated, sterile-filtered, cell culture tested, F9665-500ML, Sigma-Aldrich

DMEM, high glukose, PAA The Cell Culture Company
DMEM/F12, Invitrogen
Trypsin, Sigma-Aldrich
PBS 1x (NaCl 135 mM, KCl 1,3 mM, Na₂HPO₄·12 H₂O 3,2 mM, KH₂PO₄ 0,5 mM, pH 7,4);
TBS-Tween 1x (137 mM NaCl, 20 mM Tris, 0,1% Tween 20, pH 7,6);
Tris-glycin SDS pufr 1x (25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1% SDS, pH 8,3);
Tris-glycin transferový pufr 1x (25 mM Tris, 192 mM glycin, 20% metanol);
Pufr pro zaostřovací gel (0,5 mM Tris-HCl, pH 6,8);
Pufr pro rozdělovací gel (1,5 mM Tris-HCl, pH 8,8);
RIPA pufr (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,1% deoxycholát sodný, 0,1% SDS, 140 mM NaCl, před použitím přidán 1 mM PMSF, protease a phosphatase inhibitor cocktail – Roshe);
LSB pufr 1x (31,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% glycerol, 1% SDS, 0,005% bromfenolová modř);
Pufr pro měření aktivity proteazomu (40 mM Tris-HCl, pH 7,4);
Ponceau S (0,1% (w/v) v 5% octové kyselině);
Bortezomib, Sigma-Aldrich
MG132, Sigma-Aldrich
CuEt, bis-(diethyldithiokarbamát)-měďnatý komplex, Mgr. Boris Cvek, PhD
Cykloheximid, Sigma-Aldrich
Dicoumarol, Sigma-Aldrich
DMSO, Sigma-Aldrich
MTT, Sigma-Aldrich
Použité primární protilátky: anti-ubiquitin (rabbit polyclonal, 1:1000 (5% méko), Cell Signaling, 3933); anti-aktin (goat polyclonal, 1:2000 (5% mléko), Santa Cruz Biotechnology, I-19, sc-1616); anti-IκBα (rabbit polyclonal, 1:500 (5% milk), Santa Cruz Biotechnology, C-21, sc-371); anti-phospho-IκBα(Ser32/36) (mouse monoclonal, 1:1000 (5% mléko), Cell Signaling, 5A5, 9246); anti-p53 (mouse monoclonal, 1:500 (5% mléko), Santa Cruz Biotechnology, DO-1, sc-126)
Použité sekundární protilátky: anti-rabbit IgG-HRP (goat, 1:2000 (5% milk), Santa Cruz Biotechnology, sc-2030); anti-mouse IgG-HRP (goat, 1:2000 (5% milk), Santa Cruz Biotechnology, sc-2031); anti-goat IgG-HRP (donkey, 1:2000 (5% milk), Santa Cruz Biotechnology, sc-2020)

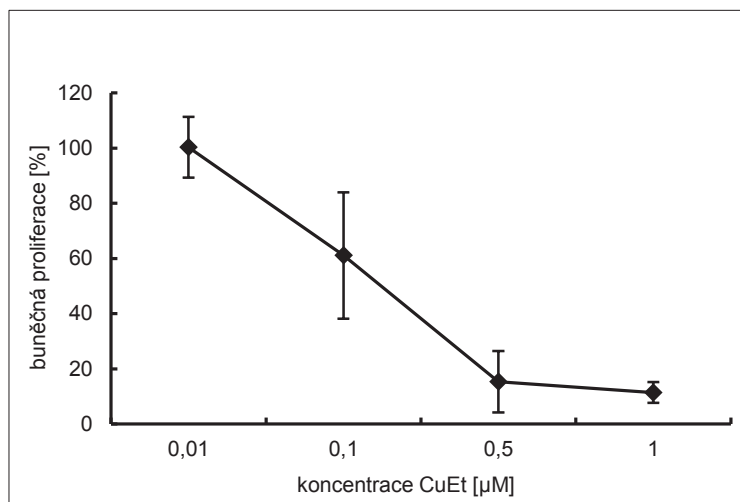
4.10 Přístrojové vybavení

ImageXpress automated microscope, USA; Inkubátor Conthern, Nový Zéland; Laminární box SafeFASTTop faster, Itálie; Mikroskop T2 103411 Olympus, ČR; Spektrofotometr Tecan (program I-Control), Švýcarsko; Centrifuga Mini Labnet International, USA; Mini-PROTEAN Tetra-Cell, PoerPac HC Power Supply, Bio-Rad, USA; Hoefer TE70X semi-dry transfer unit, Fisher Scientific, Irsko;

5 VÝSLEDKY

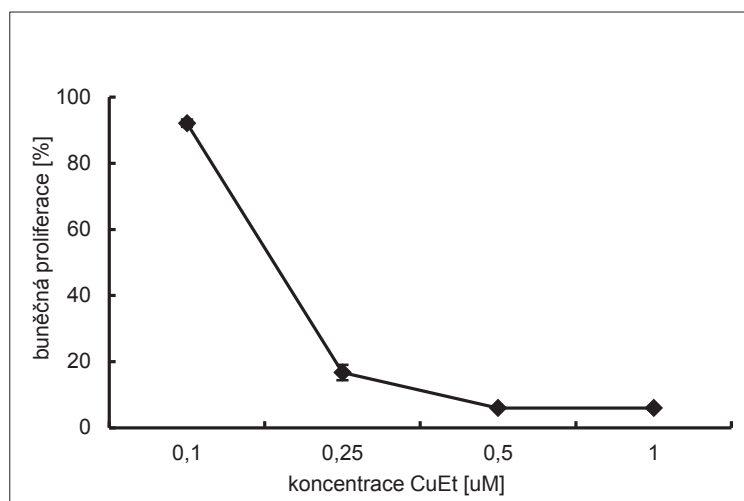
5.1 Vliv komplexu CuEt na proliferaci linií odvozených od rakoviny prsu

Pro zjištění cytotoxicity komplexu CuEt vůči různým liniím odvozeným od rakoviny prsu bylo použito MTT testu. Buňky byly vystaveny různým koncentracím CuEt po 24 hodin, po kterých byl proveden test přežívajících buněk. Každá koncentrace byla testována v osmi opakováních na experiment, přičemž ten byl proveden celkem třikrát. Výsledky jsou vyjádřeny v procentech vzhledem ke kontrole (buňky ovlivněné DMSO).



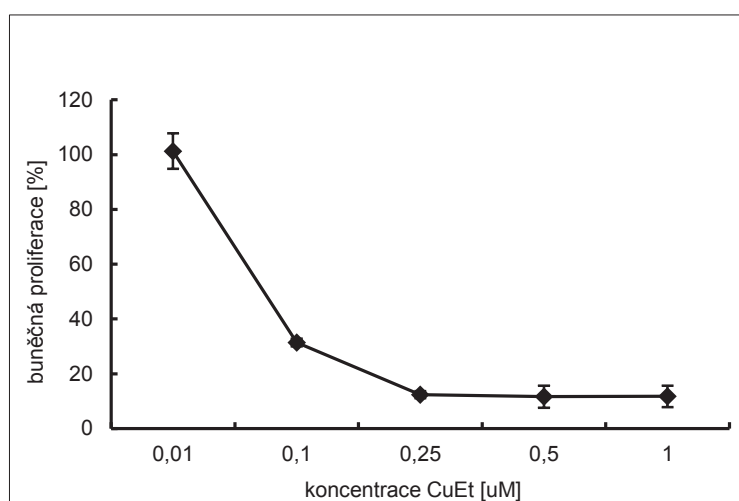
Obr. 6. Vliv komplexu CuEt na proliferaci buněčné linie MCF7.

Z obrázku 6 je patrné, že komplex CuEt je pro buněčnou linii MCF7 silně toxický. Hodnota IC_{50} je kolem $0,1 \mu\text{M}$ a při koncentraci $1 \mu\text{M}$ je viabilita buněk už jen asi 10%. V případě linie MDA MB 231 (Obr. 7) je patrné, že při $0,1 \mu\text{M}$ koncentraci nemá CuEt ještě téměř žádný toxický vliv, na rozdíl od linie MCF7. Nicméně při trochu vyšší koncentraci ($0,25 \mu\text{M}$) už CuEt viabilitu buněk dramaticky snížil, dokonce pod úroveň pozorovanou u předešlé linie.



Obr. 7. Vliv komplexu CuEt na proliferaci buněčné linie MDA MB 231.

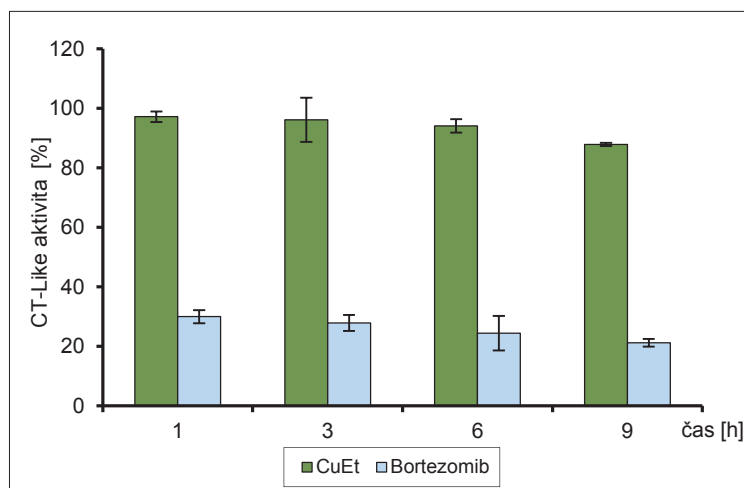
Komplex CuEt tedy vykazuje silnou toxicitu vůči buňkám odvozeným od metastazující rakoviny prsu. K ověření, zdali je tento účinek specifický jen na transformované buňky, byl otestován i vliv CuEt na prsní epiteliální buňky MCF10A, odvozené od pacientky trpící fibrocystickou chorobou prsu, které jsou ale standardně používány jako model normálních buněk. MTT test ukázal, že MCF10A linie je velmi senzitivní na CuEt (Obr. 8), dokonce citlivější než předchozí dvě nádorové linie ($IC_{50} < 0,1 \mu M$).



Obr. 8. Vliv komplexu CuEt na proliferaci buněčné linie MCF10A.

5.2 Vliv komplexu CuEt na aktivitu 20S proteazomu

Protirakovinná aktivita disulfiramu je spojována mimo jiné s inhibicí proteazomu. Předchozí studie ukazují, že inhibice proteazomu disulfiramem je závislá na přítomnosti mědi, což naznačuje, že aktivní látkou je ve skutečnosti CuEt. Bylo prokázáno, že směs disulfiramu s mědí je silným inhibítozem chymotripsinu-podobné (CT-like) proteolytické aktivity 20S proteazomu. Nicméně v případě purifikovaného 20S syntetický komplex CuEt nevykazoval téměř žádnou aktivitu vůči CT-like, čímž se výrazně odlišoval od směsi disulfiramu s mědí, která CT-like purifikovaného 20S inhibovala. Je tedy velmi pravděpodobné, že za pozorovanou aktivitou směsi stály ve skutečnosti samotné měďnaté ionty, které, jak bylo vícekrát publikováno, 20S inhibují.

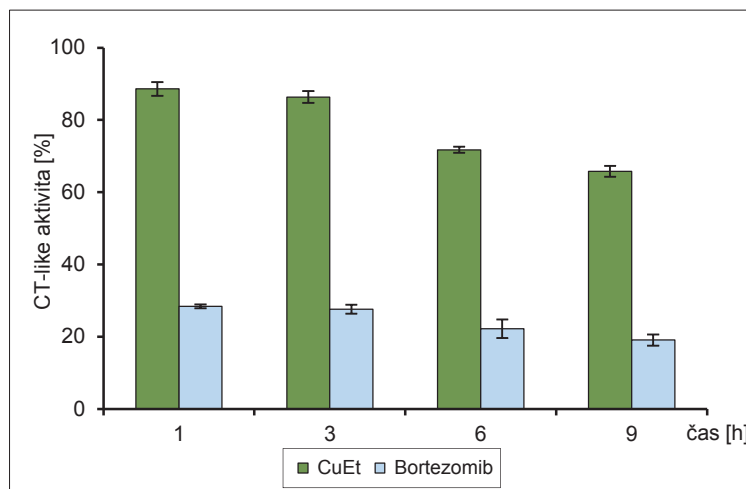


Obr. 9. Časová závislost inhibice CT-like aktivity 20S proteazomu u linie MCF7.

Pro objasnění efektu syntetického komplexu CuEt na proteazom v buňkách, byla otestována aktivita CuEt vůči CT-like 20S v liniích MCF7 a MDA MB 231. Aktivita 20S proteazomu byla měřena pomocí fluorescenčního substrátu, který je specificky štěpen $\beta 5$ podjednotkou s CT-like proteázovou aktivitou. Ke měření byly použity buněčné lyzáty.

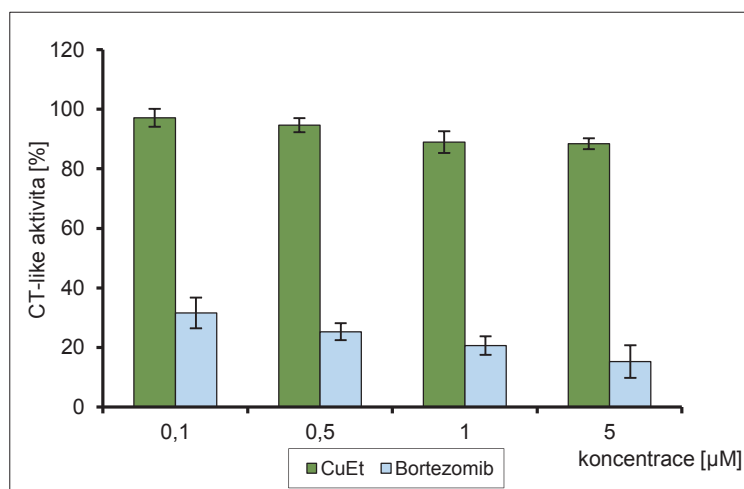
Jak je patrné z obrázku 9, 1 μM CuEt nemá téměř žádný účinek na CT-like aktivitu v buňkách MCF7 po různou dobu kultivace. Naopak stejná koncentrace bortezomibu, který byl použit jako kontrola, způsobuje téměř 80% inhibici. S podobným výsledkem dopadlo i měření u linie MDA MB 231 (Obr. 10), kde sice CuEt způsoboval jistou inhibici, ta ovšem

byla mnohem slabší než u obvyklého 20S inhibitoru bortezomibu, a lze ji s největší pravděpodobností připsat rychlé buněčné smrti, která byla pozorována.



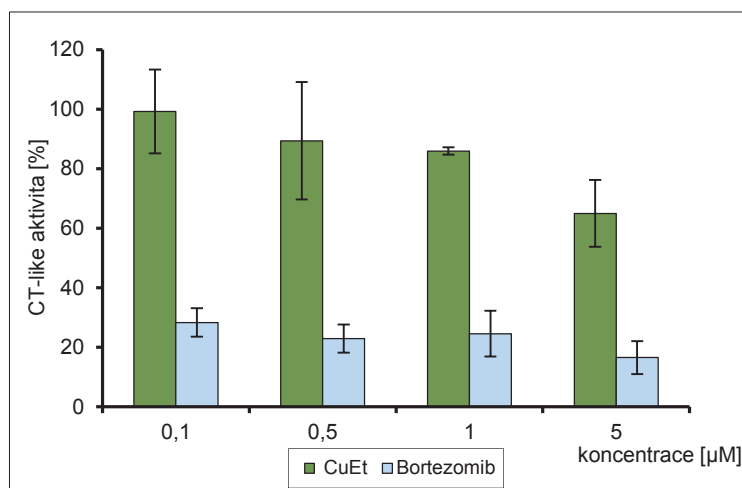
Obr. 10. Časová závislost inhibice CT-like aktivity 20S proteazomu u linie MDA MB 231.

Pro přesnější zjištění efektu CuEt na 20S proteazom byla také otestována koncentrační závislost inhibice. Buňky byly kultivovány 3 hodiny s různou koncentrací CuEt nebo bortezomibu a poté byla v lyzátech měřena aktivita proteazomu. Jak je ovšem patné z obrázku 11, CuEt nevykazoval v linii MCF7 žádnou koncentračně-závislou inhibici CT-like, na rozdíl od bortezomibu, u kterého se vzrůstající koncentrací docházelo i k výraznější inhibici.



Obr. 11. Koncentrační závislost inhibice CT-like aktivity 20S proteazomu u linie MCF7.

U linie MDA MB 231 sice bylo možno pozorovat jistý náznak koncentrační závislosti inhibice CT-like, ale i při nejvyšší použité koncentraci CuEt (5 μM) poklesla CT-like aktivita jen o 30%, což bylo výrazně méně než u bortezomibu (Obr. 12).

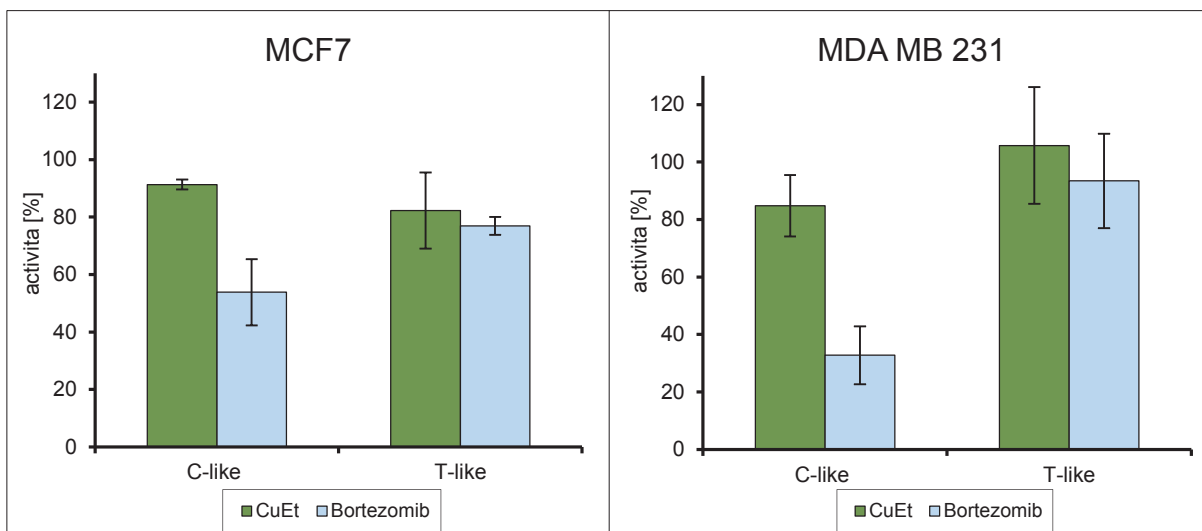


Obr. 12. Koncentrační závislost inhibice CT-like aktivity 20S proteazomu u linie MDA MB 231.

Přestože je CT-like aktivita nejdůležitější a také limitující pro správnou funkci proteazomu, zbylé dvě proteolytické aktivity 20S nemohou být ignorovány. V klinické praxi se používají doposud jen léky dominantně inhibující CT-like (bortezomib a carfilzomib), ale vykazující také účinek vůči kaspáze-podobné aktivitě (C-like). V nedávné době ale byly připraveny i inhibitory specificky cílící na $\beta 1$ podjednotku s C-like nebo $\beta 2$ s T-like aktivitami. Dokonce bylo prokázáno, že k dostatečnému cytotoxickému efektu inhibitorů proteazomu by samotná inhibice CT-like nestačila, a proto je nutné, aby tyto léky zároveň alespoň částečně inhibovaly některou z ostatních proteolytických podjednotek.

Pro zjištění efektu CuEt na zbylé aktivity 20S proteazomu byly linie MCF7 a MDA MB 231 kultivovány v přítomnosti 1 μM CuEt nebo bortezomibu po dobu tří hodin. V lyzátech pak byla změřena C-like a T-like aktivit obdobně jako v případě CT-like, tedy použitím fluorescenčních peptidů specificky štěpených těmito proteolytickými podjednotkami. CuEt na rozdíl od bortezomibu neměl žádný efekt na C-like ani na T-like

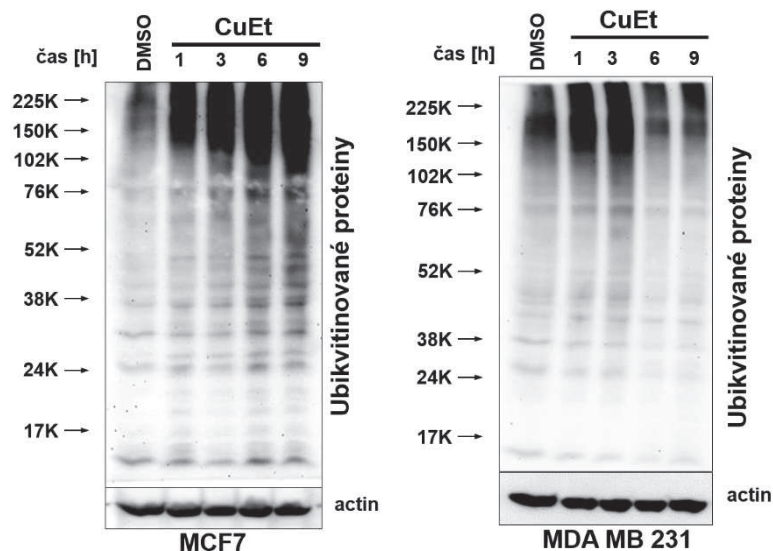
aktivitu u obou linií. Bortezomib vykazoval částečný účinek na C-like, a podobně jako CuEt téměř žádný na T-like aktivitu, jak už bylo dříve publikováno (Obr. 13).



Obr. 13. Vliv inhibitorů (CuEt, bortezomib) na C-like a T-like aktivity 20S proteazomu u linií MCF7 a MDA MB 231.

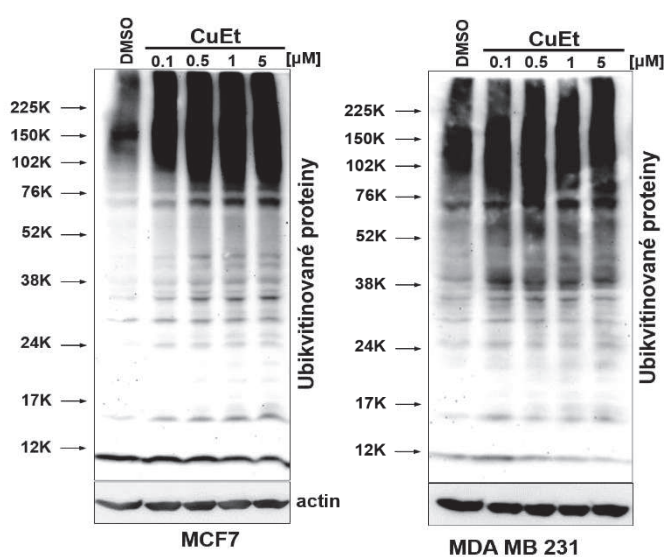
5.3 Vliv komplexu CuEt na akumulaci ubikvitinovaných proteinů

Negativní výsledky z měření proteolytických aktivit 20S proteazomu ale nevyvrací možnost, že CuEt inhibuje některou jinou aktivitu celého 26S proteazomu. Jako nejvíce pravděpodobná možnost se jeví inhibice nějaké podjednotky 19S, přičemž již dříve byla navržena POH1 deubikvitináza, která je součástí víka proteazomu a je nezbytná pro jeho aktivitu, jako možný cíl CuEt. Jedním z nejvýraznějších projevů inhibice proteazomu je akumulace ubikvitinovaných proteinů v buňce, které nemohou být degradovány. Vliv CuEt na hladinu ubikvitinovaných proteinů, která nepřímě svědčí o inhibici degradace proteinů, byl tedy testován pomocí WB analýzy.



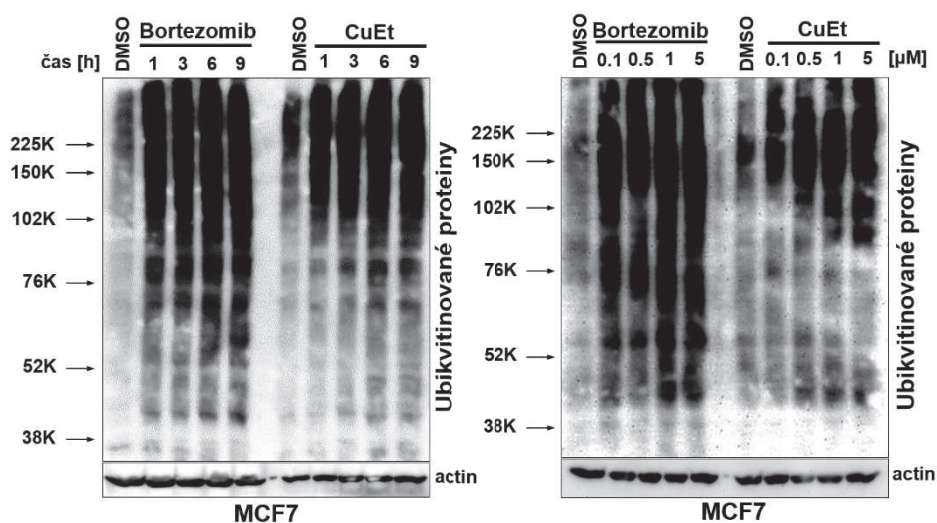
Obr. 14. Časová závislost akumulace ubikvitinovaných proteinů u linií MCF7 a MDA MB 231 po aplikaci CuEt.

Nejdříve byla zjištěna závislost akumulace ubikvitinovaných proteinů na délce inkubace buněk s 1 μM koncentrací CuEt. Výsledky znázorněné na obrázku 14 ukazují, že u obou použitých linií (MCF7 a MDA MB 231) docházelo k nárůstu akumulace s přibývajícím časem a že už po jedné hodině byla akumulace jasně viditelná.



Obr. 15. Koncentrační závislost akumulace ubikvitinovaných proteinů u linií MCF7 a MDA MB 231 po aplikaci CuEt.

Zároveň bylo ukázáno, že k akumulaci ubikvitinovaných proteinů dochází v závislosti na vzrůstající koncentraci CuEt (Obr. 15). Obě buněčné linie byly vystaveny působení různých koncentrací po dobu tří hodin a poté byly lyzáty použity pro WB analýzu ubikvitinovaných proteinů. Jak je patrné, k akumulaci začalo docházet už při koncentraci 100 nM CuEt u obou linií.



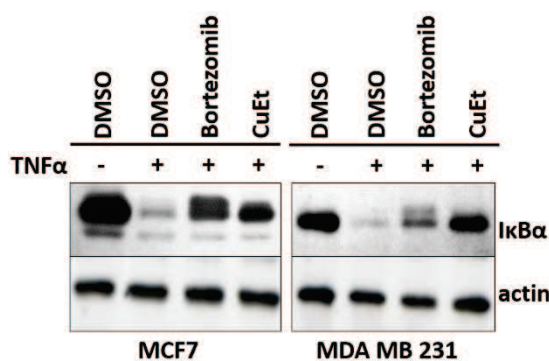
Obr. 16. CuEt akumuluje ubikvitinované proteiny s podobnou kinetikou jako bortezomib a v podobných koncentracích v linii MCF7.

Efekt CuEt byl zároveň porovnán s účinkem 20S inhibitoru bortezomibu u linie MCF7 (Obr. 16). CuEt komplex akumuluje ubikvitinované proteiny s podobnou kinetikou a ve srovnatelných koncentracích jako bortezomib, což naznačuje, že příčina akumulace je u CuEt podobná jako u bortezomibu a že je tedy spojena s inhibicí degradace proteinů.

5.4 Vliv komplexu CuEt na TNF α indukovanou degradaci proteinu I κ B α

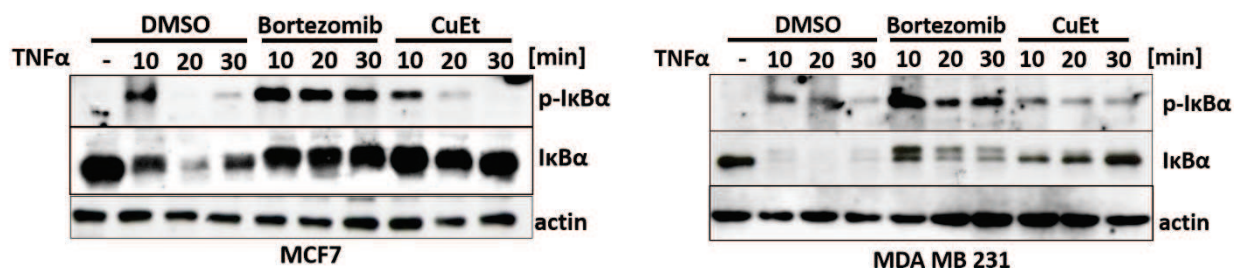
Předchozí výsledky naznačují, že přestože je aktivita 20S proteazomu nezměněna, CuEt inhibuje degradaci buněčných proteinů. Akumulace ubikvitinovaných proteinů ovšem není specifickým ukazatelem inhibice proteazomu, nebo degradace proteinů obecně. K této akumulaci může dojít i inhibicí deubikvitináz, kterých se v buňce nachází přinejmenším několik desítek. Také je možné, aby nějaká látka aktivovala celou

ubikvitinační mašinerii. Zároveň nelze vyloučit možnost, že k akumulaci ubikvitinu dochází jako odpověď na nescifický buněčný stres. Data ukazující akumulaci ubikvitinovaných proteinů po aplikaci CuEt tedy jsou pouze ve shodě s tím, že CuEt inhibuje degradaci proteinů nebo přímo proteazom, nemohou však tuto teorii potvrdit. Aby bylo možno potvrdit, že CuEt skutečně inhibuje degradaci proteinů, byl sledován efekt CuEt na degradaci proteinu I κ B α . Degradace tohoto proteinu patří mezi nejlépe popsané vůbec, a proto se jedná o velmi vhodný model. Zároveň ji lze indukovat pomocí TNF α , což je velmi rychlý proces (v desítkách minut), a tak se lze vyhnout dlouhým inkubačním časům, které mohou vést k nescifickým účinkům. TNF α indukovaná degradace I κ B α je proces zcela závislý na ubikvitin-dependentní degradaci 26S proteazomem, a je proto dostatečně specifickým ukazatelem aktivity 26S proteazomu přímo v živých buňkách.



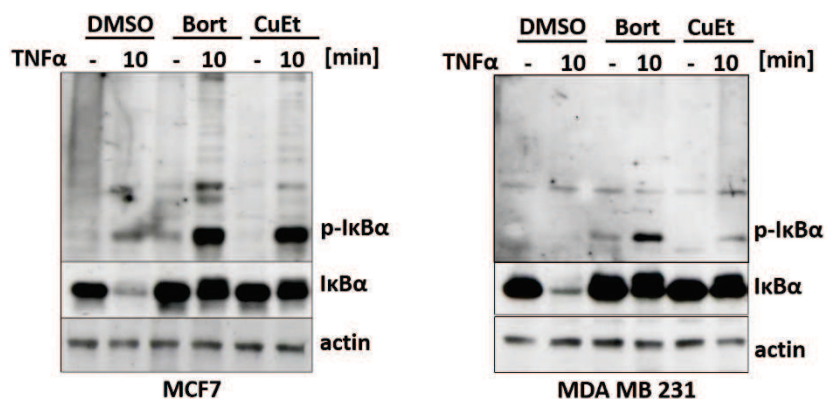
Obr. 17. CuEt inhibuje TNF α indukovanou degradaci proteinu I κ B α obdobně jako bortezomib v liniích MCF7 a MDA MB 231.

Pro zjištění efektu CuEt na degradaci I κ B α byly buňky nejdříve na jednu hodinu inkubovány s bortezomibem nebo CuEt (vždy 1 μ M koncentrace) a poté k nim byl přidán TNF α (10 ng/ml) na dalších 20 minut. Pak byly buňky zlyzovány. Jak je patrné z obrázku 17, CuEt i bortezomib zabránily degradaci I κ B α u obou linií (MCF7 a MDA MB 231), na rozdíl od DMSO kontroly. Buňky vystavené pouze DMSO bez TNF α představují počáteční stav. Efekt bortezomibu i CuEt byl víceméně srovnatelný, ovšem lze si povšimnout, že v případě bortezomibu docházelo k hromadění dvou bandů, naopak u CuEt pouze jednoho. Hornější band představuje fosforylovanou formu I κ B α . Je známo, že fosforylace I κ B α je nezbytným krokem pro jeho ubikvitinaci a následnou degradaci.



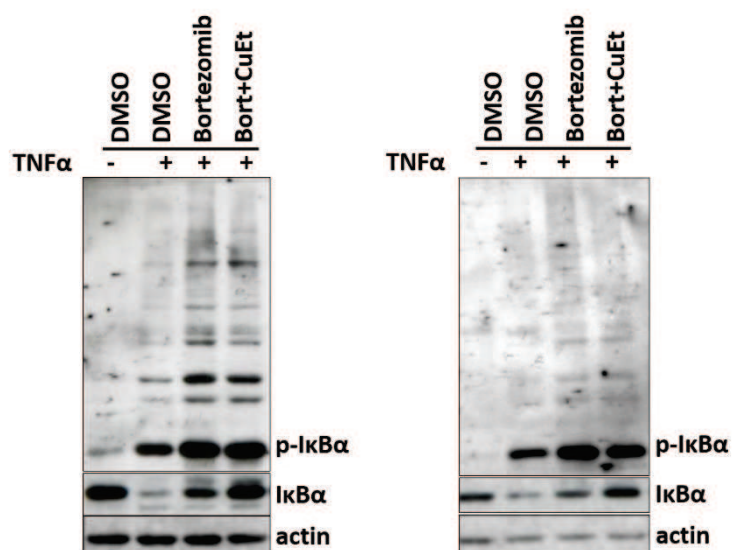
Obr. 18. Vliv komplexu CuEt na fosforylaci IκBα v buňkách MCF7 a MDA MB 231 indukovanou TNFα po různou dobu.

Tyto výsledky tedy naznačují možnost, že by CuEt mohl působit někde výše v rámci TNFα signalizace a že důvodem akumulace IκBα není ve skutečnosti zabránění jeho degradace, ale spíše inhibice nějaké části TNFα dráhy vedoucí k fosforylaci IκBα. Pro objasnění této možnosti byl navržen experiment, ve kterém byl pozorován účinek TNFα na fosforylaci IκBα v různých časových intervalech (10 až 30 minut). Jako v předchozím případě byly buňky nejdříve inkubovány s 1 μM bortezomibem nebo CuEt po dobu jedné hodiny a poté byl teprve přidán TNFα. Jak lze vidět na obrázku 18, k fosforylaci IκBα u buněk s CuEt docházelo u obou linií, průběhem podobným DMSO kontrole, ale rozdílným od bortezomibu. U CuEt nebo DMSO došlo po 10 minutách k nárůstu p-IκBα, ale poté (20 a 30 minut) ke jeho poklesu nebo úplnému vymizení, v případě DMSO doprovázeném s vymizením samotného IκBα degradací, v případě CuEt zůstala hladina IκBα konstantní, neboť jeho degradace byla inhibována. U bortezomibu byla degradace IκBα také po celou dobu inhibována, ale také hladina p-IκBα zůstala konstantní.



Obr. 19. Komplex CuEt neinhibuje TNFα indukovanou fosforylaci IκBα v liniích MCF7 a MDA MB 231.

Pro další kontrolu byla také znovu porovnána hladina p-I κ B α po 10 minutách u obou linií a srovnána s hladinou p-I κ B α u buněk neovlivněných TNF α . Experimentální podmínky a použité koncentrace byly stejné jako v předchozích pokusech. Z výsledků (Obr. 19) je patrné, že v případě buněk ovlivněných CuEt dochází po aplikaci TNF α k výraznému nárůstu p-I κ B α srovnatelnému s borteomibem. U borteomibu i CuEt jsou patrné i vysokomolekulární bandy reprezentující s nejvyšší pravděpodobností polyubikvitinované formy I κ B α . U borteomibu lze ovšem postřehnout i slabou akumulaci p-I κ B α také u buněk neovlivněných TNF α . Pravděpodobně je za toto odpovědná borteomibem způsobená aktivace IKK kináz, které fosforylují I κ B α , jak už bylo dříve ukázáno. Tímto lze také vysvětlit, proč je u borteomibu hladina p-I κ B α stále konstantní, na rozdíl od CuEt (Obr. 18).

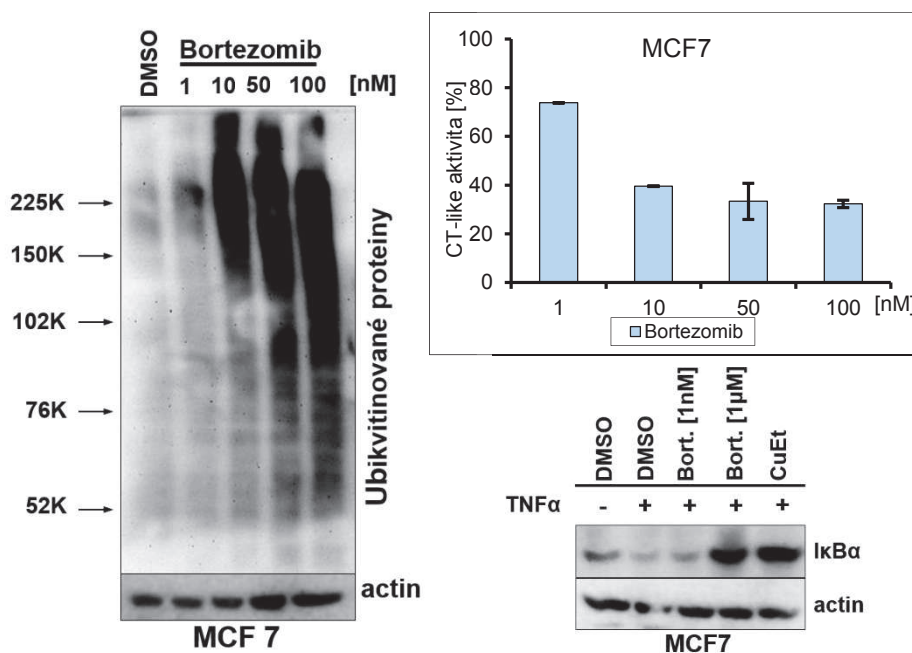


Obr. 20. Komplex CuEt neinhibuje fosforylaci ani ubikvitinaci I κ B α v kombinaci s borteomibem v liniích MCF7 a MDA MB 231.

Jako další kontrola, že CuEt neovlivňuje ani fosforylaci ani ubikvitinaci I κ B α , byl použit experiment, který porovnával samotný borteomib a kombinaci borteomibu a CuEt. Na obrázku 20 lze vidět, že přidání CuEt nemělo žádný vliv na hladinu p-I κ B α a

také nijak neovlivnilo ubikvitinaci I κ B α . Přidání CuEt naopak vedlo spíše k zesílení efektu bortezomibu na inhibici degradace samotného I κ B α .

Tyto výsledky tedy jasně ukazují, že CuEt je schopen zabránit degradaci proteinu I κ B α závislé na ubikvitinaci a proteazomu. Přestože CuEt neinhiboval žádnou z proteolytických aktivit 20S proteazomu, jakýsi částečný vliv na CT-like byl patrný, kdy za určitých koncentrací a v určité době byla pozorována až 20% inhibice (Obr. 9 až Obr. 12). Aby bylo možno jasně vyvrátit možnost, že za pozorovanými efekty CuEt (akumulace ubikvitinovaných roteinů nebo inhibice degradace I κ B α) je ve skutečnosti zodpovědná tato slabá a částečná inhibice CT-like, byl proveden experiment s nízkými koncentracemi bortezomibu (Obr. 21). Nejdříve byl změřen vliv nízkých koncentrací bortezomibu na CT-like aktivitu po 3 hodinách inkubace. Jak je patrné z grafu na obrázku 21, 1 nM bortezomib vedl asi k 20-30% inhibici CT-like. Při stejném experimentu ovšem tato koncentrace bortezomibu nedokázala vést k akumulaci ubikvitinovaných proteinů, ani zabránit TNF α indukované degradaci proteinu I κ B α . K tomuto efektu bylo zapotřebí nejméně 10 nM koncentrace bortezomibu, která ovšem už vedla k asi 60% inhibici CT-like. Tyto výsledky tedy jasně ukazují, že za efekty způsobenými CuEt není zodpovědná částečná inhibice CT-like, ale naopak jiný, doposud neznámý cíl v rámci UPS.

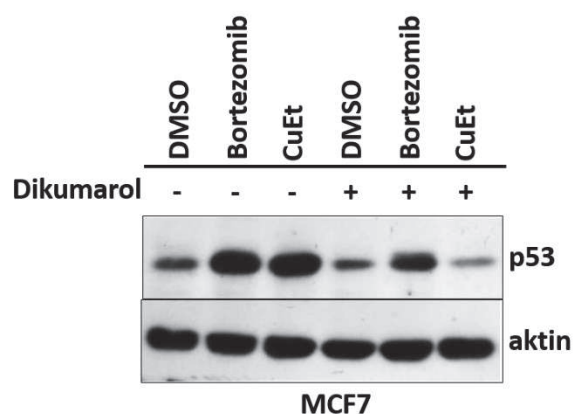


Obr. 21. Vliv nízkých koncentrací bortezomibu na aktivitu proteazomu, akumulaci ubikvitinovaných proteinů a degradaci IκBα v linii MCF7.

5.5 Vliv komplexu CuEt na akumulaci proteinu p53

Jak bylo výše uvedeno, je známo, že některé proteiny mohou být degradovány nezávisle na ubikvitinaci. Předchozí výsledky ukazují, že CuEt inhibuje degradaci závislou na ubikvitinu, ale jeho jestli je jeho vliv takto specifický, nebo se vztahuje obecně na degradaci proteinů, je otázka. Mezi proteiny, které mohou být degradovány jak závisle, tak nezávisle na ubikvitinaci, patří tumorový supresor p53. V případě normálních podmínek je degradován pomocí ubikvitinace zprostředkované nejčastěji E3 ligázou MDM2. Může být ovšem degradován i nezávisle na ubikvitinaci samotným 20S proteazomem, ale tento proces je inhibován NADH chinon oxidoreduktázou 1 (NQO1). Pokud dojde k inhibici NQO1, např. pomocí dikumarolu, je p53 degradován právě 20S proteazomem.

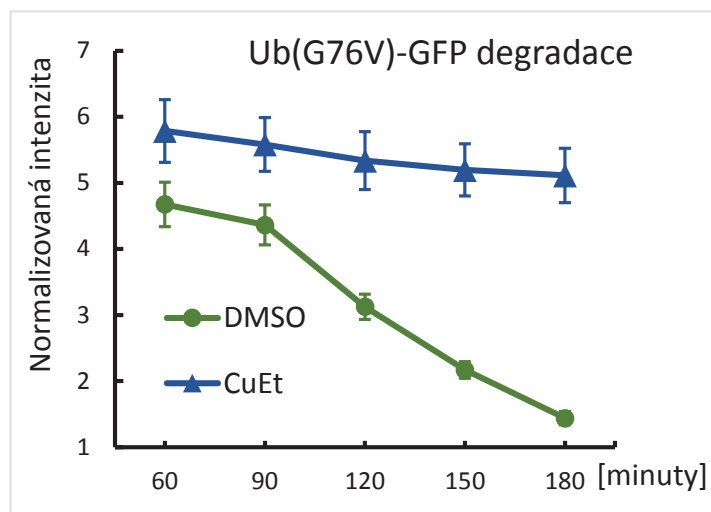
Na obrázku 22 lze vidět, že za normálních podmínek CuEt stejně jako bortezomib akumuluje p53 (po 6 hodinové aplikaci při 1 μM koncentraci). Pokud je ale přidán zároveň dikumarol, inhibitor NQO1 spouštějící ubikvitin nezávislou degradaci, CuEt na rozdíl od bortezomibu ztrácí svoji schopnost akumulovat p53, což naznačuje, že za těchto podmínek neinterferuje s jeho degradací. Tyto výsledky tedy ukazují, že CuEt má vliv pouze na degradaci proteinů, která je zároveň závislá na ubikvitinaci.



Obr. 22. Komplex CuEt ztrácí schopnost akumulovat protein p53 v přítomnosti dikumarolu.

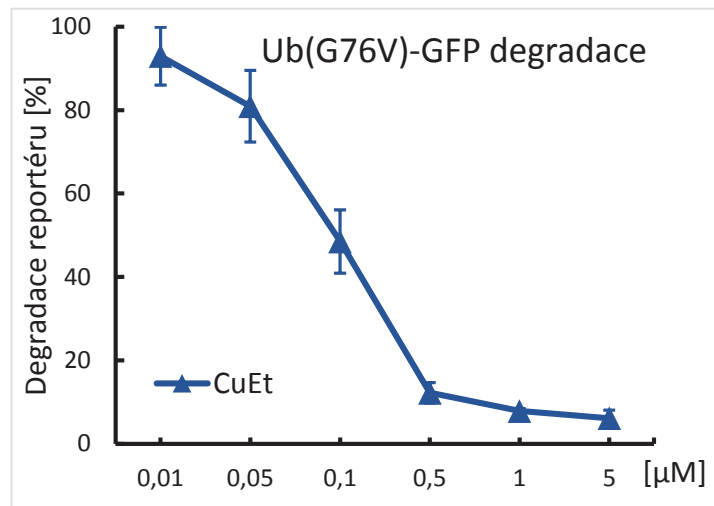
5.6 Vliv komplexu CuEt na degradaci Ub(G76V)-GFP reportéru

Na proteinu I κ B α bylo přímo ukázáno, že CuEt brání degradaci proteinů závislé na ubikvitinaci a proteazomu. Přestože bylo ukázáno, že nikterak neinterferuje se signalizační kaskádou, nelze zcela vyloučit pochybnosti týkající se možného nepřímého účinku CuEt na I κ B α , který je zásadní regulátor tak klíčového transkripčního faktoru, jakým je NF- κ B. Jako vhodný doplněk k I κ B α , který je prototypem zcela fyziologické degradace proteinu, byl vybrán i systém zcela umělý, který naopak není vůbec napojen na buněčný systém regulace. Jedním z nejčastěji používaných umělých reportérů referujících o aktivitě UPS je konstrukt GFP (Green Fluorescent Protein) napojený na ubikvitin. Molekula ubikvitinu nese na svém C-konci mutaci glycínu v pozici 76, který je nahrazen valinem. Tím je tento ubikvitin neodštěpitelný deubikvitinázami a je trvale připojen k GFP. Samotný ubikvitin ale slouží jako degradační signál, a proto je rychle rozeznán E3 ligázami, GFP je polyubikvitinován a degradován 26S proteazomem. Díky fluorescenčním vlastnostem GFP tak lze velmi jednoduše měřit aktivitu proteazomu v živých buňkách.



Obr. 23. CuEt stabilizuje Ub(G76V)-GFP reportér v buněčné linii HeLa.

Tento systém je vhodný pro měření akumulace, ale i degradace proteinů, a protože degradace reportéru více vypovídá o skutečné aktivitě proteazomu, byla měřena právě kinetika degradace reportéru. V tomto experimentu byla použita HeLa linie trvale exprimující konstrukt Ub(G76V)-GFP. Nejprve byl konstrukt naakumulován pomocí 20S inhibitoru MG132 (4 μ M po dobu 3 hodin), pak bylo médium s MG132 odsáto, buňky byly několikrát propláchnuty pufovacím roztokem, a poté inkubovány v médiu obsahujícím cykloheximid (30 μ g/ml) a DMSO nebo CuEt (1 μ M). Zatímco v případě DMSO docházelo k postupnému snižování hladiny GFP díky jeho degradaci, u buněk s CuEt byla jeho hladina téměř konstantní (Obr. 23). To velmi jasně ukazuje, že CuEt inhiboval jeho na proteazomu závislou degradaci.



Obr. 24. Koncentrační závislost inhibice degradaci Ub(G76V)-GFP po aplikaci CuEt.

Tento inhibiční efekt CuEt byl zároveň závislý na rostoucí koncentraci (Obr. 24), naznačující, že se jedná o specifický účinek. Hodnota IC_{50} byla asi 100 nM a při koncentraci 500 nM už byla pozorována asi 90% inhibice. Tento výsledek ukazuje, že CuEt poměrně velmi potentním inhibítozem degradace proteinů závislé na ubikvitinaci a proteazomu.

6 DISKUZE

Záměrem této práce bylo blíže charakterizovat účinek syntetického komplexu disulfiramů s mědí na buněčné linie odvozené od rakoviny prsu. Již publikovaná data naznačují, že by disulfiram skutečně mohl být nadějným lékem proti karcinomu prsu. Lze se opírat zejména o klinickou studii druhé fáze, kde byl pozorován pozitivní vliv ditiokarbu, metabolitu disulfiramů, v kombinaci se standardní chemoterapií [11], nebo na případovou studii odkazující na takřka úplné uzdravení alkoholičky s rozsáhle napadeným skeletem metastázemi rakoviny prsu pobírající antabus [10]. Z hlediska možného mechanismu účinku je klíčová práce [28] publikovaná před osmi lety, kde autoři ukazují, že protirakovinná aktivita disulfiramů je výrazně potencována mědí, což naznačuje, že aktivní látkou je ve skutečnosti komplex s mědí, jeden z metabolitů disulfiramů. Autoři zmíněného článku rovněž ukazují, že příčinou toxicity je pravděpodobně inhibice ubikvitin-proteazomového systému. Výraznou slabinou této práce je ovšem fakt, že autoři zde nepracovali se syntetickým komplexem, nýbrž se směsí, což se může zásadně odrazit na výsledcích, neboť obě složky (disulfiram i měďnaté ionty) jsou velmi reaktivní molekuly s rozsáhlým efektem na buněčnou homeostázu [140], a nelze předpokládat, že by obě složky v médiu zreagovaly ze sta procent. V této diplomové práci byl naopak použit syntetický komplex, což jak se ukázalo, vedlo v mnohých aspektech k naprosto odlišným výsledkům.

Jako výchozí bod bylo zvoleno testování toxicity syntetického komplexu CuEt vůči různým buněčným liniím rakoviny prsu. Pomocí MTT testu bylo zjištěno, že je CuEt toxický v hladinách relevantních pro klinickou aplikaci. U linie MCF7 odvozené od luminálního typu rakoviny prsu byla efektivní koncentrace již 0,1 μM . U MDA MB 231 linie reprezentující trojitě negativní typ onemocnění, který má obvykle horší prognózu, byla účinná koncentrace poněkud vyšší (asi 0,2 μM), ale u obou linií byl při koncentraci 1 μM téměř 100% účinek. Komplex CuEt byl ovšem velmi toxický i vůči linii MCF10A, která reprezentuje netransformovanou prsní epiteliální linii, a aktivní koncentrace byla dokonce ještě nižší (< 0,1 μM) než u předchozích dvou nádorových linií. Tento výsledek je v silném kontrastu k dříve publikovanému pozorování, že směs disulfiramů s mědí je vůči této linii netoxická [28]. Na druhou stranu ovšem nelze na základě vysoké citlivosti MCF10A na CuEt zavrhnout možnost jeho selektivity vůči rakovinným buňkám. Jednak je známo, že linie MCF10A rozhodně neodpovídá normálním buňkám v lidském organismu. Díky své velmi rychlé proliferaci je tato linie vysoce citlivá i na klasická

chemoterapeutika, mnohdy dokonce více než nádorové buňky, což bylo ukázáno např. pro 5-FU [141], který se používá u karcinomu prsu i v klinické praxi. Pokud CuEt opravdu inhibuje tak zásadní část UPS jako je proteazom, je krajně nepravděpodobné, že by i normální netransformované buňky mohly takovou inhibicí déle snášet. U CuEt ovšem připadá v úvahu další mechanismus, pomocí kterého by mohl působit selektivně na nádorové buňky. Je dobře známo, že nádory obsahují větší množství mědi [142], která je důležitou součástí mnohých enzymů potřebných pro jejich růst [143-144]. Ke tvorbě komplexu mědi s disulfiramem by tedy mělo docházet přednostně v nádoru, kde by tedy mohla být vyšší koncentrace CuEt než v normální tkáni. Také se nabízí úvaha, že jakožto vysoce lipofilní látka se bude CuEt ukládat hlavně do nádoru a jeho koncentrace v krvi bude relativně nízká [29].

Mechanismus účinku komplexu CuEt ovšem není doposud znám. Předchozí publikace [28] ukazuje, disulfiram s mědí je inhibítozem 20S proteazomu, což se ale v této diplomové práci nepotvrdilo. CuEt neinhiboval zásadní proteolytickou CT-like aktivitu 20S ani u jedné ze dvou testovaných linií odvozených od rakoviny prsu, a to jak v závislosti na délce inkubace, tak na použité koncentraci. V tomto se CuEt výrazně odlišuje od klasických proteazomových inhibitorů, reprezentovaných např. bortezomibem. Navíc bylo ukázáno, že CuEt neinhibuje ani zbylé dvě proteolytické aktivity 20S (C-like a T-like) u obou testovaných linií. Tyto výsledky jsou v přímém rozporu se dříve publikovanou studií [28], kde byl disulfiram s mědí charakterizován jako inhibitor CT-like aktivity 20S proteazomu. Pravděpodobným vysvětlením pro tyto rozdílné výsledky je fakt, že v předchozí studii autoři používali směs disulfiramu a chloridu mědnatého. V takovém případě tedy nebyl popisován účinek komplexu, ale spíše jeho směsi s reaktanty. Tento design experimentu ovšem může velmi ovlivnit naměřené výsledky, zvláště v případě použití chloridových iontů, o kterých je známo, že samy o sobě CT-like 20S proteazomu inhibují [28, 30].

Výsledky naměřené v této diplomové práci jsou naopak ve shodě s původní prací [145], která jako první vztahovala účinek disulfiramu k proteazomu. Autoři zde tvrdí, že přestože disulfiram není inhibítozem centrálního 20S proteazomu, může inhibovat jednu z aktivit regulační 19S části. V té době se jednalo o relativně revoluční myšlenku, neboť žádná látka s takovou schopností nebyla známa. Teprve nyní se ukazuje, že inhibitory 19S proteazomu mohou vykazovat odlišné vlastnosti od obvyklých inhibitorů 20S proteazomu a že mohou nalézt své uplatnění v medicíně, ať už v léčbě neurologických [121], nebo rakovinných onemocnění [55]. Nejznámějšími příklady jsou b-A15 a RA180, které inhibují

deubikvitinázu USP14, respektive ubikvitinový receptor Rpn13, tedy podjednotky, které jsou nezbytné pro funkci proteazomu [57]. V obou případech bylo ukázáno, že jsou aktivní in vivo v myších xenograftech a že vykazují slibnou účinnost i vůči buňkám rezistentním na bortezomib [56]. Pokud by tedy CuEt fungoval podobným mechanismem, tedy přes inhibici některé z podjednotek 19S, jak bylo již navrženo, spadal by do skupiny látek velmi nadějných pro terapii maligních onemocnění.

Pro hypotézu, že CuEt inhibuje proteazom nezávisle na 20S, svědčí akumulace ubikvitinovaných proteinů po aplikaci CuEt, k čemuž dochází u obou testovaných linií a při relativně nízkých koncentracích. K akumulaci ubikvitininu dochází také už po jedné hodině, což vypovídá proti možnosti, že se jedná o nespecifickou reakci buněk na stres. Vícekrát už totiž bylo pozorováno [146-148], že různé látky, které sice nemají přímou návaznost na UPS, přesto způsobují výraznou akumulaci ubikvitinovaných proteinů, pravděpodobně jako důsledek závažného poškození základních buněčných procesů. Důležitý je také oboustranný vztah mezi proteazomem a apoptózou. Zatímco je dobře známo, že inhibice proteazomu spouští apoptickou dráhu, už méně je ale probádán vliv apoptózy na aktivitu proteazomu. V první práci [149] zabývající se důsledkem započínající apoptózy na proteazom autoři ukazují, že proteolytická inaktivace různých podjednotek proteazomu kaspázami je cíleným procesem umožňujícím správný průběh apoptózy. Proteazom je zodpovědný za degradaci mnoha proapoptických proteinů, a proto se nabízí vysvětlení, že jeho inaktivací dochází k akumulaci těchto proteinů a k akceleraci apoptózy. Štěpení proteazomových jednotek je také pravděpodobnou příčinou akumulace ubikvitinovaných proteinů, které jsou často v průběhu apoptózy pozorovány. Tento děj je podivuhodně rychlý, protože k němu dochází už několik hodin po vystavení apoptickému stimulu (ligandu nebo léčivu). Ke štěpení jednotek báze a víka 19S proteazomu docházelo už po 4 hodinách, akumulace ubikvitinu byla pozorována po 2 až 4 hodinách a stabilizace modelového substrátu proteazomu ornitin dekarboxylázy byla pozorována po 6 hodinách [149]. Pomocí SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acid in cell culture) proteomické metody bylo odhaleno, že se štěpení proteazomových podjednotek se netýká jen 19S, ale také 20S a některých podjednotek 11S proteazomu [150]. Začínající buněčná smrt je tedy pravděpodobným vysvětlením pozorovaného snížení CT-like aktivity 20S proteazomu u linie MDA MB 231 po delší aplikaci CuEt.

Při porovnání efektu CuEt a bortezomibu na akumulaci ubikvitinovaných proteinů je zřejmé, že k tomuto efektu dochází s podobnou kinetikou a ve srovnatelných koncentracích, což také svědčí spíše pro přímý účinek CuEt na UPS. Lze si ovšem také

povšimnout, že CuEt akumuluje hlavně ubikvitinované proteiny s vyšší molekulovou hmotností, na rozdíl od bortezomibu, u kterého jsou ovlivněny i proteiny s nižší hmotností. V tomto efektu se CuEt podivuhodně shoduje s jiným inhibitorem 19S proteazomu b-AP15, jenž vykazuje stejný fenotyp [55]. Tento fenomén nebyl doposud plně objasněn, ale spekuluje se o možnosti, že při inhibici 20S proteazomu bortezomibem dochází alespoň u části proteinů k odštěpení polyubikvitinového řetězce činností POH1 nebo k jeho částečné deubikvitinaci a remodelaci podjednotkami USP14 a UCHL5, k čemuž ovšem při inhibici 19S nedochází. Proto se při inhibici 19S akumuluje proteiny s delším polyubikvitinovým řetězcem a tedy vyšší molekulovou hmotností [123].

Komplex CuEt také inhibuje degradaci přirozeného proteazomového substrátu proteinu I κ B α , což podporuje možnost, že cílem CuEt je skutečně proteazom, nebo nějaké složka UPS, která je nezbytná pro degradaci proteinů. Příčinou stabilizace I κ B α je velmi pravděpodobně zablokování jeho degradace a ne ubikvitinace, jak bylo pozorováno u látky PYR41, inhibitoru E1 aktivačního enzymu [151]. Při použití PYR41 totiž dochází nejen k zablokování ubikvitinace I κ B α , ale také k inhibici jeho fosforylace, která je nezbytným předpokladem pro degradaci. Je totiž známo, že pro správnou aktivitu IKK kináz, jejichž substrátem je právě I κ B α , je nutná formace signálních K-63 polyubikvitinových řetězců [152], což v případě nefunkčního E1 enzymu není možné. Naopak u buněk ovlivněných CuEt lze pozorovat fosforylaci I κ B α a dokonce i jeho ubikvitinovanou formu. Nicméně na úrovni fosforylovaného I κ B α je patrný rozdíl mezi CuEt a bortezomibem. Zatímco v případě bortezomibu p-I κ B α perzistuje po delší dobu, u CuEt dochází po jisté době k poklesu jeho hladiny, doprovázené nárůstem hladiny nefosforylovaného I κ B α . Možným vysvětlením by mohla být právě rozdílnost jejich buněčného cíle. V případě inhibitorů 20S proteazomu je známo, že jejich vedlejší účinek je mimo jiné aktivace IKK kináz [60], což je pravděpodobně zodpovědné nejen za udržení hladiny p-I κ B α , ale také za pozorovaný nárůstem p-I κ B α i bez indukce faktorem TNF α . U CuEt k podobnému efektu nedochází, což je jednak v souladu s tím, že neinhibuje 20S, ale také naznačuje, že by inhibice 19S proteazomu, nebo jiného proteinu zodpovědného za degradaci I κ B α nemusela vést k nežádoucímu efektu aktivace IKK kináz. Tento poznatek může mít i přímý terapeutický dopad, protože aktivace NF- κ B dráhy u mnohočetného myelomu bortezomibem snižuje jeho účinnost [60].

Za akumulací ubikvitinovaných proteinů a stabilizací I κ B α u CuEt není zodpovědný ani částečný pokles CT-like aktivity, který byl pozorován při vyšších koncentracích nebo po delším působení. To bylo potvrzeno v experimentu s nízkou

koncentrací bortezomibu, která způsobila stejný pokles CT-like jako CuEt, nebyla už ovšem schopna vyvolat stejný buněčný fenotyp (akumulaci ubikvitinovaných proteinů a stabilizaci I κ B α). Je tedy zřejmé, že pokud CuEt inhibuje proteazom, činí tak jiným mechanismem než klasické inhibitory 20S proteazomu, i jinak než bylo dříve publikováno. Na základě experimentu s proteinem p53 je možné také usuzovat, že CuEt interferuje pouze s degradací, která je závislá na ubikvitinu. Po aplikaci CuEt docházelo k akumulaci p53 pouze za normálních podmínek, kdy je p53 degradován závisle na ubikvitinu 26S proteazomem. V přítomnosti dikumarolu, který indukuje degradaci p53 nezávisle na ubikvitinu samotném přes 20S proteazom, už k akumulaci p53 po aplikaci CuEt nedocházelo. Pro úplnou jistotu by bylo potřeba otestovat i jiné proteiny, které jsou degradovány nezávisle na ubikvitinaci, třeba ODC, ale tento výsledek s p53 to minimálně naznačuje.

Pro další potvrzení, že CuEt inhibuje degradaci proteinů závislou na ubikvitinu, byla použita buněčná linie Hela exprimující reportér Ub(G76V)-GFP sloužící jako modelový substrát 26S proteazomu. CuEt i v tomto experimentu vykazoval silnou aktivitu s IC₅₀ asi 100 nM, která je ve shodě s koncentracemi způsobujícími akumulaci ubikvitinovaných proteinů i buněčnou smrt, což naznačuje, že všechny tyto děje jsou navzájem propojeny tímž buněčným cílem CuEt. Inhibice proteazomu je skutečně děj, který indukuje apoptózu u mnoha linií odvozených od různých typů malignit a který je používán i v klinické praxi u mnohočetného myelomu nebo lymfomu plášťových buněk [153]. Přestože nelze jistě tvrdit, že toxický efekt CuEt je přímo závislý na jeho schopnosti inhibovat UPS, jedná se o nejpravděpodobnější hypotézu, která je ovšem velmi těžko prakticky testovatelná. Nicméně nelze jistě vyloučit možnost, že inhibice UPS pouze přispívá k toxickému účinku CuEt, nebo dokonce, že je jen doprovodným jevem.

Získané výsledky naznačují, že CuEt inhibuje proteazom alternativním mechanismem, ale bez in vitro dat to nelze jistě tvrdit. Dokonce nelze ani vyloučit možnost, že cílem CuEt je jiný protein nebo proteinový komplex než proteazom. Vzhledem k šíři efektu CuEt, dokumentovaném asi nejlépe na výrazné a rychlé akumulaci ubikvitinovaných proteinů, se pravděpodobně musí jednat o protein, který má významnou roli v rámci UPS. V úvahu mohou připadat některé adaptory proteazomu jako je Rad23 nebo Dsk2, které zprostředkovávají rozeznání a dopravení ubikvitinovaných substrátů k degradaci [154]. Nicméně není téměř nic známo o tom, o jak významný děj se jedná, a zdali je vůbec nepostradatelný. Nynější stav poznání spíše nasvědčuje, že se jedná o proces, který degradaci některých proteinů spíše usnadňuje, než že by byl jeho nezbytnou

součástí [15]. Také se zdá, že se tyto jednotlivé adaptory mohou ve své činnosti vzájemně doplňovat a nahrazovat. Není tedy příliš pravděpodobné, že by cílem CuEt byl některý z těchto proteinů.

Naopak jako nejpravděpodobnější cíl CuEt by vedle proteazomu mohl být protein p97 (VCP, Valosin-containing protein). P97 se uplatňuje při degradaci zřejmě velkého množství proteinů, což nejlépe dokumentuje míra akumulace ubikvitinovaných proteinů po jeho inhibici, která je srovnatelná s inhibicí proteazomu [134]. Přesná role p97 při proteazomem zprostředkované degradaci proteinů není známa, ale je pravděpodobné, že se bude měnit podle daného konkrétního substrátu. Na příklad je známo, že při degradaci Ub(G76V)-GFP je nutné, aby p97 tento reportér částečně rozvolnila a umožnila tak jeho degradaci v proteazomu [156]. Naopak při TNF α indukované degradaci I κ B α je činnost p97 nutná k tomu, aby ubikvitinovaný I κ B α byl vyvážen od transkripčního heterodimeru NF- κ B [157-159]. P97 se také účastní při degradaci různých proteinů asociovaných s chromatinem, kde působí také nejspíše jako segregáza [160]. Stejně tak je známo, že se segregázová aktivita p97 uplatňuje při ERAD [161] a degradaci chybných nascentních produktů při proteosyntéze (RAD, Ribosome Associated Degradation) [162]. Také je popsána činnost p97 při degradaci cytosolických proteinů, např. při degradaci HIF1 α , ovšem v tomto případě není role p97 téměř vůbec objasněna. Jisté je pouze to, že p97 se účastní degradace jen relativně malé frakce HIF1 α a většina degradace tohoto proteinu je na p97 nezávislá. Jako možné vysvětlení se nabízí, že p97 je zodpovědná jen za degradaci transkripčně aktivní formy HIF1 α [133].

Aby bylo možno rozlišit, zdali CuEt inhibuje proteazom nebo p97, je nutné se podívat na efekt CuEt na procesy, které jsou nezávislé na p97, např. degradace reportéru ODD-luc, o kterém je známo, že probíhá i v přítomnosti inhibitorů p97 [163]. Z výsledků obsažených v této práci to ale nelze rozhodnout, neboť degradace obou substrátů, které zde byly měřeny (I κ B α a Ub(G76V)-GFP) a CuEt je stabilizoval, je závislá na obou potencionálních cílech CuEt, jak proteazomu tak p97.

Je známo, že inhibice proteazomu je nadějný přístup pro léčbu maligních onemocnění, přestože většina klinických testů dopadla neúspěšně, včetně testů u rakoviny prsu [164]. Nedávno byla ale publikována studie [68], která dokumentuje, že inhibice proteazomem by měla být efektivní zejména u trojitě negativní rakoviny prsu (TNBC). Jelikož tento typ onemocnění zahrnuje jen asi 10% všech případů, je velmi pravděpodobné, že větší studie s pacienty s rozdílnými typy onemocnění nedokáže postihnout případný účinek aplikace bortezomibu na TNBC. Ale právě TNBC je jeden z nejobtížnější

léčitelných typů rakoviny prsu s nejhorsí prognózou pro pacienty, a tak výjimečná citlivost TNBC na inhibici proteazomu dává naději, že by se mohlo jednat o důležitý zlom v terapii tohoto typu nádoru.

V případech inhibice p97 jako přístupu k léčbě rakovinných onemocnění není z klinické praxe známo téměř nic. V poslední době se ovšem rozšiřuje naše poznání z preklinického výzkumu [135, 165], které jasně potvrzuje, že tento přístup je velmi perspektivní. P97 jako možný cíl protinádorové terapie byla navržena před více než 20 lety, přestože v té době bylo o tomto proteinu známo velmi málo. Postupem času se ovšem zjistilo, že p97 je výrazněji exprimovaná v nádorové tkáni oproti zdravé tkáni, a že míra exprese p97 negativně koreluje s prognózou pacientů, agresivitou nádoru a výskytem metastáz u mnoha typů malignit [166-169], včetně rakoviny tlustého střeva [170], rakoviny plic [171], jater [172], prostaty [173] nebo osteosarkomu [174]. Zvýšená hladina p97 v séru pacientů byla také nalezena mimo jiné u těch, kdo měli rakovinou prsu [175]. Vzhledem k zásadní roli p97 v procesech jako je ERAD, udržování proteostáze nebo oprava poškozené DNA, je zřejmé, že by inhibice tohoto jednoho proteinu mohla způsobit citelný zásah do mnoha buněčných procesů nezbytných zejména pro nádorové buňky, které by měly být dle teorie ne-onkogenní adikce [46] na tyto zásahy více citlivé než buňky netransformované.

Z hlediska mechanismu účinku není doposud jasné, zdali je to právě inhibice UPS, která je zodpovědná za protinádorový účinek disulfiram. Z teorií publikovaných v jiných pracích připadá v úvahu asi nejvíce inhibice aldehyd dehydrogenázy (ALDH), která je příčinou používání disulfiram v protialkoholické léčbě [6]. ALDH je ale mimo jiné silně exprimována v nádorových kmenových buňkách (CSC, Cancer Stem Cell), které jsou často dávány do spojitosti s rezistencí nádoru na chemoterapii, tvorbou metastáz nebo relapsu po léčbě [176-177]. Vysoká exprese ALDH je příznačná pro CSC rakoviny prsu nebo glioblastomu [178-179], tedy malignit, u kterých disulfiram v preklinickém výzkumu vykazuje nejnadějnější aktivitu [28, 180-181]. Bylo vícekrát publikováno, že disulfiram je toxický i vůči CSC z těchto malignit, což zvyšuje jeho atraktivitu jako potencionálního léku, a tato jeho aktivita je dávana do spojitosti právě s inhibicí ALDH [182-184]. Pravděpodobně největší slabinou této teorie je ovšem fakt, že toxicita disulfiram vůči CSC je výrazně potencionována, nebo je dokonce zcela závislá, na přítomnosti mědi, což svědčí pro fakt, že za tímto účinkem ve skutečnosti stojí komplex CuEt. Vzhledem k tomu, že inhibice ALDH disulfiramem, respektive jeho metabolity ditiocarbem a metylesterem ditiocarbu probíhá skrze jejich thiolové zbytky [7], je těžko představitelné, jak by mohla

probíhat u CuEt, který má přes thiolové skupiny navázanou právě měď. Nelze tedy vyloučit možnost, že za toxickým efektem disulfiramu stojí právě CuEt inhibující pravděpodobně proteazom nebo p97 jakožto centrální složky UPS. Je zajímavé, že CSC glioblastomu nebo rakoviny prsu mají sníženou expresi a aktivitu proteazomu [185-186], což by mohlo znamenat, že i slabší inhibice UPS by u této populace buněk mohla vést k vyšší toxicitě. Toxicita CuEt vůči CSC a role inhibice UPS v tomto účinku by mohly být námětem dalšího výzkumu.

7 ZÁVĚR

Diplomová práce si kladla za cíl prohloubit znalosti o mechanismu účinku komplexu CuEt, který je pravděpodobně zodpovědný za protirakovinný účinek disulfiramu. V dřívějších pracích bylo ukázáno, že by disulfiram mohl být účinný zejména proti rakovině prsu skrze inhibici degradace proteinů komplexem disulfiramu s mědí.

V praktické části se podařilo ukázat, že je komplex CuEt silně toxický vůči dvěma buněčným liniím odvozeným od rakoviny prsu (MDA MB 231 a MCF7), ale že vykazuje i silný účinek na linii MCF10A, která je obvykle používána jako model netransformovaných buněk. CuEt komplex byl toxický při relativně nízkých koncentracích ($IC_{50} \sim 0,1$ až $0,2 \mu\text{M}$), které jsou potenciálně klinicky dosažitelné. Na rozdíl od předchozí publikace ale nebylo potvrzeno, že by CuEt inhiboval CT-like aktivitu centrálního 20S proteazomu. Výraznějšího poklesu aktivity nebylo dosaženo ani v jedné z testovaných linií, ani při vyšších použitých koncentracích nebo delším čase inkubace. Obdobně byla vyvrácena i možnost, že by CuEt mohl inhibovat zbylé dvě proteolytické aktivity 20S proteazomu, C-like nebo T-like.

I přes negativní efekt CuEt na 20S proteazom bylo pomocí akumulace ubikvitinovaných proteinů prokázáno, že CuEt inhibuje degradaci buněčných proteinů. K tomuto efektu docházelo v obou použitých liniích, v závislosti na koncentraci nebo délce aplikace. Kinetika akumulace ubikvitinovaných proteinů u CuEt byla srovnatelná s bortezomibem, klasickým proteazomovým inhibitorem. Koncentrace CuEt způsobující akumulaci byla podobná jako efektivní toxická koncentrace, což naznačuje, že inhibice degradace proteinů je příčinou protinádorového účinku CuEt. Zajímavým úkazem je rozdílná molekulová hmotnost ubikvitinovaných proteinů u CuEt a bortezomibu, což může být důsledek inhibice rozdílné části UPS.

Pomocí několika vybraných modelových proteinů byl dále sledován vliv CuEt na UPS. Na $\text{TNF}\alpha$ indukované degradaci proteinu $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ bylo prokázáno, že CuEt stabilizuje na ubikvitinu závislou degradaci proteazomem, aniž by interferoval s fosforylací nebo ubikvitinací $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$. U modelového proteinu p53 bylo potvrzeno, že CuEt má vliv pouze na degradaci závislou na ubikvitinu, aniž by inhiboval dikumarolem spuštěnou degradaci p53 samotným 20S proteazomem bez nutnosti předchozí ubikvitinace. CuEt vykazoval tento účinek při $1 \mu\text{M}$ koncentraci, při které nebylo pozorováno ještě téměř žádné snížení aktivity 20S proteazomu.

Na umělém reportéru Ub(G76V)-GFP, který se hojně používá k měření aktivity proteazomu, byl potvrzen vliv CuEt na ubikvitin-dependentní degradaci. Komplex CuEt

stabilizoval reportér již při nízkých koncentracích (hodnota $IC_{50} \sim 0,1 \mu\text{M}$), které jsou ve shodě s koncentrací CuEt, která vedla k akumulaci ubikvitinovaných proteinů nebo byla toxická. Při $1 \mu\text{M}$ koncentraci byla pozorována téměř úplná stabilizace Ub(G76V)-GFP reportéru, což svědčí o vysoké účinnosti CuEt.

Data získaná v této práci tedy potvrzují silný efekt komplexu disulfiramu s mědí na ubikvitin-dependentní degradaci proteinů proteazomem, ale spolehlivě vyvracejí možnost, že by cílem komplexu mohl být samotný 20S proteazom, jak bylo dříve navrženo. Na základě výsledků je možno spíše usuzovat, že by cílem CuEt mohla být některá podjednotka 26S proteazomu důležitá pro degradaci ubikvitinovaných substrátů, nebo některý z proteinů, který je zodpovědný za transport a prezentaci ubikvitinovaných proteinů proteazomu k degradaci.

8 ZDROJE

- [1] Orloff J, Douglas F, Pinheiro J, Levinson S, Branson M, Chaturvedi P, Ette E, Gallo P, Hirsch G, Mehta C, Patel N, Sabir S, Springs S, Stanski D, Evers MR, Fleming E, Singh N, Tramontin T, Golub H. The future of drug development: advancing clinical trial design. *Nat Rev Drug Discov.* 2009 Dec;8(12):949-57.
- [2] Boguski MS, Mandl KD, Sukhatme VP. Drug discovery. Repurposing with a difference. *Science.* 2009 Jun 12;324(5933):1394-5.
- [3] Chong CR, Sullivan DJ Jr. New uses for old drugs. *Nature.* 2007 Aug 9;448(7154):645-6.
- [4] Cvek B. Nonprofit drugs as the salvation of the world's healthcare systems: the case of Antabuse (disulfiram). *Drug Discov Today.* 2012 May;17(9-10):409-12.
- [5] Williams, E. E. Effects of alcohol on workers with carbon disulfide. *JAMA* 1937, 109:1472.
- [6] Vallari RC, Pietruszko R. Human aldehyde dehydrogenase: mechanism of inhibition of disulfiram. *Science.* 1982 May 7;216(4546):637-9.
- [7] Lipsky JJ, Shen ML, Naylor S. In vivo inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram. *Chem Biol Interact.* 2001 Jan 30;130-132(1-3):93-102.
- [8] Wattenberg LW. Inhibition of chemical carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 1978 Jan;60(1):11-8.
- [9] Irving CC, Tice AJ, Murphy WM. Inhibition of N-n-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder cancer in rats by administration of disulfiram in the diet. *Cancer Res.* 1979 Aug;39(8):3040-3.
- [10] Lewison EF. Spontaneous regression of breast cancer. *Prog Clin Biol Res.* 1977;12:47-53.
- [11] Dufour P, Lang JM, Giron C, Duclos B, Haehnel P, Jaeck D, Jung JM, Oberling F. Sodium dithiocarb as adjuvant immunotherapy for high risk breast cancer: a randomized study. *Biotherapy.* 1993;6(1):9-12.

- [12] Kim CH, Kim JH, Moon SJ, Hsu CY, Seo JT, Ahn YS. Biphasic effects of dithiocarbamates on the activity of nuclear factor-kappaB. *Eur J Pharmacol.* 2000 Mar 31;392(3):133-6.
- [13] Guo X, Xu B, Pandey S, Goessl E, Brown J, Armesilla AL, Darling JL, Wang W. Disulfiram/copper complex inhibiting NFkappaB activity and potentiating cytotoxic effect of gemcitabine on colon and breast cancer cell lines. *Cancer Lett.* 2010 Apr 1;290(1):104-13.
- [14] Wang W, McLeod HL, Cassidy J. Disulfiram-mediated inhibition of NF-kappaB activity enhances cytotoxicity of 5-fluorouracil in human colorectal cancer cell lines. *Int J Cancer.* 2003 Apr 20;104(4):504-11.
- [15] Sauna ZE, Peng XH, Nandigama K, Tekle S, Ambudkar SV. The molecular basis of the action of disulfiram as a modulator of the multidrug resistance-linked ATP binding cassette transporters MDR1 (ABCB1) and MRP1 (ABCC1). *Mol Pharmacol.* 2004 Mar;65(3):675-84.
- [16] Cho HJ, Lee TS, Park JB, Park KK, Choe JY, Sin DI, Park YY, Moon YS, Lee KG, Yeo JH, Han SM, Cho YS, Choi MR, Park NG, Lee YS, Chang YC. Disulfiram suppresses invasive ability of osteosarcoma cells via the inhibition of MMP-2 and MMP-9 expression. *J Biochem Mol Biol.* 2007 Nov 30;40(6):1069-76.
- [17] Shian SG, Kao YR, Wu FY, Wu CW. Inhibition of invasion and angiogenesis by zinc-chelating agent disulfiram. *Mol Pharmacol.* 2003 Nov;64(5):1076-84.
- [18] Marikovsky M, Nevo N, Vadai E, Harris-Cerruti C. Cu/Zn superoxide dismutase plays a role in angiogenesis. *Int J Cancer.* 2002 Jan 1;97(1):34-41.
- [19] Liu P, Brown S, Goktug T, Channathodiyil P, Kannappan V, Hugnot JP, Guichet PO, Bian X, Armesilla AL, Darling JL, Wang W. Cytotoxic effect of disulfiram/copper on human glioblastoma cell lines and ALDH-positive cancer-stem-like cells. *Br J Cancer.* 2012 Oct 23;107(9):1488-97.
- [20] Liu P, Kumar IS, Brown S, Kannappan V, Tawari PE, Tang JZ, Jiang W, Armesilla AL, Darling JL, Wang W. Disulfiram targets cancer stem-like cells and reverses resistance and cross-resistance in acquired paclitaxel-resistant triple-negative breast cancer cells. *Br J Cancer.* 2013 Oct 1;109(7):1876-85.

- [21] Lin J, Haffner MC, Zhang Y, Lee BH, Brennen WN, Britton J, Kachhap SK, Shim JS, Liu JO, Nelson WG, Yegnasubramanian S, Carducci MA. Disulfiram is a DNA demethylating agent and inhibits prostate cancer cell growth. *Prostate*. 2011 Mar 1;71(4):333-43.
- [22] Schweizer MT, Lin J, Blackford A, Bardia A, King S, Armstrong AJ, Rudek MA, Yegnasubramanian S, Carducci MA. Pharmacodynamic study of disulfiram in men with non-metastatic recurrent prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2013 Dec;16(4):357-61.
- [23] Johansson B. A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of disulfiram and its metabolites. *Acta Psychiatr Scand Suppl*. 1992;369:15-26.
- [24] Schroeder JP, Cooper DA, Schank JR, Lyle MA, Gaval-Cruz M, Ogbonmwan YE, Pozdeyev N, Freeman KG, Iuvone PM, Edwards GL, Holmes PV, Weinshenker D. Disulfiram attenuates drug-primed reinstatement of cocaine seeking via inhibition of dopamine β -hydroxylase. *Neuropsychopharmacology*. 2010 Nov;35(12):2440-9.
- [25] Brar SS, Grigg C, Wilson KS, Holder WD Jr, Dreau D, Austin C, Foster M, Ghio AJ, Whorton AR, Stowell GW, Whittall LB, Whittle RR, White DP, Kennedy TP. Disulfiram inhibits activating transcription factor/cyclic AMP-responsive element binding protein and human melanoma growth in a metal-dependent manner in vitro, in mice and in a patient with metastatic disease. *Mol Cancer Ther*. 2004 Sep;3(9):1049-60.
- [26] Askgard G, Friis S, Hallas J, Thygesen LC, Pottegård A. Use of disulfiram and risk of cancer: a population-based case-control study. *Eur J Cancer Prev*. 2014 May;23(3):225-32.
- [27] Cen D, Brayton D, Shahandeh B, Meyskens FL Jr, Farmer PJ. Disulfiram facilitates intracellular Cu uptake and induces apoptosis in human melanoma cells. *J Med Chem*. 2004 Dec 30;47(27):6914-20.
- [28] Chen D, Cui QC, Yang H, Dou QP. Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug and copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures and xenografts via inhibition of the proteasome activity. *Cancer Res*. 2006 Nov 1;66(21):10425-33.
- [29] Johansson B, Stankiewicz Z. Bis-(diethyldithiocarbamate) copper complex: a new metabolite of disulfiram? *Biochem Pharmacol*. 1985 Aug 15;34(16):2989-91.

- [30] Xiao Y, Chen D, Zhang X, Cui Q, Fan Y, Bi C, Dou QP. Molecular study on copper-mediated tumor proteasome inhibition and cell death. *Int J Oncol.* 2010 Jul;37(1):81-7.
- [31] Cvek B, Milacic V, Taraba J, Dou QP. Ni(II), Cu(II), and Zn(II) diethyldithiocarbamate complexes show various activities against the proteasome in breast cancer cells. *J Med Chem.* 2008 Oct 23;51(20):6256-8.
- [32] Goldberg AL. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature.* 2003 Dec 18;426(6968):895-9.
- [33] Wójcik C, DeMartino GN. Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003 May;35(5):579-89.
- [34] Finley D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:477-513.
- [35] Geng F, Wenzel S, Tansey WP. Ubiquitin and proteasomes in transcription. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:177-201.
- [36] MacGurn JA, Hsu PC, Emr SD. Ubiquitin and membrane protein turnover: from cradle to grave. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:231-59.
- [37] Jacquemont C, Taniguchi T. Proteasome function is required for DNA damage response and fanconi anemia pathway activation. *Cancer Res.* 2007 Aug 1;67(15):7395-405.
- [38] Tomko RJ Jr, Hochstrasser M. Molecular architecture and assembly of the eukaryotic proteasome. *Annu Rev Biochem.* 2013;82:415-45.
- [39] Lander GC, Estrin E, Matyskiela ME, Bashore C, Nogales E, Martin A. Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature.* 2012 Jan 11;482(7384):186-91.
- [40] Komander D, Rape M. The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:203-29.
- [41] Varshavsky A. The ubiquitin system, an immense realm. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:167-76.

- [42] Hofmann RM, Pickart CM. Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell*. 1999 Mar 5;96(5):645-53.
- [43] Heride C, Urbé S, Clague MJ. Ubiquitin code assembly and disassembly. *Curr Biol*. 2014 Mar 17;24(6):R215-20.
- [44] Reyes-Turcu FE, Ventii KH, Wilkinson KD. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:363-97.
- [45] Goldberg AL. Development of proteasome inhibitors as research tools and cancer drugs. *J Cell Biol*. 2012 Nov 12;199(4):583-8.
- [46] Solimini NL, Luo J, Elledge SJ. Non-oncogene addiction and the stress phenotype of cancer cells. *Cell*. 2007 Sep 21;130(6):986-8.
- [47] Cvek B, Dvorak Z. The ubiquitin-proteasome system (UPS) and the mechanism of action of bortezomib. *Curr Pharm Des*. 2011;17(15):1483-99.
- [48] Kortuem KM, Stewart AK. Carfilzomib. *Blood*. 2013 Feb 7;121(6):893-7.
- [49] Herndon TM, Deisseroth A, Kaminskas E, Kane RC, Koti KM, Rothmann MD, Habtemariam B, Bullock J, Bray JD, Hawes J, Palmby TR, Jee J, Adams W, Mahayni H, Brown J, Dorantes A, Sridhara R, Farrell AT, Pazdur R. U.s. Food and Drug Administration approval: carfilzomib for the treatment of multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2013 Sep 1;19(17):4559-63.
- [50] Lonial S, Baz RC, Wang M, et al. Phase I study of twice-weekly dosing of the investigational oral proteasome inhibitor MLN9708 in patients (pts) with relapsed and/or refractory multiple myeloma (MM). *J Clin Oncol*. 2012;30(suppl):abstr 8017.
- [51] Williamson MJ, Silva MD, Terkelsen J, Robertson R, Yu L, Xia C, Hatsis P, Bannerman B, Babcock T, Cao Y, Kupperman E. The relationship among tumor architecture, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and efficacy of bortezomib in mouse xenograft models. *Mol Cancer Ther*. 2009 Dec;8(12):3234-43.
- [52] Papadopoulos KP, Burris HA 3rd, Gordon M, Lee P, Sausville EA, Rosen PJ, Patnaik A, Cutler RE Jr, Wang Z, Lee S, Jones SF, Infante JR. A phase I/II study of carfilzomib 2-10-min infusion in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013 Oct;72(4):861-8.

- [53] Smith DC, Sullivan D, Infante JR. MLN9708, an investigational proteasome inhibitor, in patients (pts) with solid tumors: Updated phase I results. *J Clin Oncol*. 2012;30:suppl; abstr e13603.
- [54] Kisselev AF. A novel bullet hits the proteasome. *Cancer Cell*. 2013 Dec 9;24(6):691-3.
- [55] D'Arcy P, Brnjic S, Olofsson MH, Fryknäs M, Lindsten K, De Cesare M, Perego P, Sadeghi B, Hassan M, Larsson R, Linder S. Inhibition of proteasome deubiquitinating activity as a new cancer therapy. *Nat Med*. 2011 Nov 6;17(12):1636-40.
- [56] Tian Z, D'Arcy P, Wang X, Ray A, Tai YT, Hu Y, Carrasco RD, Richardson P, Linder S, Chauhan D, Anderson KC. A novel small molecule inhibitor of deubiquitylating enzyme USP14 and UCHL5 induces apoptosis in multiple myeloma and overcomes bortezomib resistance. *Blood*. 2014 Jan 30;123(5):706-16.
- [57] Anchoori RK, Karanam B, Peng S, Wang JW, Jiang R, Tanno T, Orlowski RZ, Matsui W, Zhao M, Rudek MA, Hung CF, Chen X, Walters KJ, Roden RB. A bis-benzylidene piperidone targeting proteasome ubiquitin receptor RPN13/ADRM1 as a therapy for cancer. *Cancer Cell*. 2013 Dec 9;24(6):791-805.
- [58] Flemming A. Cancer: Opening the door to a new class of proteasome inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 2012 Jan 3;11(1):23.
- [59] Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, Mitsiades C, Mitsiades N, Hayashi T, Munshi N, Dang L, Castro A, Palombella V, Adams J, Anderson KC. NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J Biol Chem*. 2002 May 10;277(19):16639-47.
- [60] Hideshima T, Ikeda H, Chauhan D, Okawa Y, Raje N, Podar K, Mitsiades C, Munshi NC, Richardson PG, Carrasco RD, Anderson KC. Bortezomib induces canonical nuclear factor-kappaB activation in multiple myeloma cells. *Blood*. 2009 Jul 30;114(5):1046-52.
- [61] Meister S, Schubert U, Neubert K, Herrmann K, Burger R, Gramatzki M, Hahn S, Schreiber S, Wilhelm S, Herrmann M, Jäck HM, Voll RE. Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer Res*. 2007 Feb 15;67(4):1783-92.

- [62] Chesi M, Bergsagel PL. Molecular pathogenesis of multiple myeloma: basic and clinical updates. *Int J Hematol*. 2013 Mar;97(3):313-23.
- [63] Amm I, Sommer T, Wolf DH. Protein quality control and elimination of protein waste: the role of the ubiquitin-proteasome system. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jan;1843(1):182-96.
- [64] Hetz C, Chevet E, Harding HP. Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2013 Sep;12(9):703-19.
- [65] Gomez AM, Willcox N, Molenaar PC, Buurman W, Martinez-Martinez P, De Baets MH, Losen M. Targeting plasma cells with proteasome inhibitors: possible roles in treating myasthenia gravis? *Ann N Y Acad Sci*. 2012 Dec;1274:48-59.
- [66] Bianchi G, Oliva L, Cascio P, Pengo N, Fontana F, Cerruti F, Orsi A, Pasqualetto E, Mezghrani A, Calbi V, Palladini G, Giuliani N, Anderson KC, Sitia R, Cenci S. The proteasome load versus capacity balance determines apoptotic sensitivity of multiple myeloma cells to proteasome inhibition. *Blood*. 2009 Mar 26;113(13):3040-9.
- [67] Leung-Hagesteijn C, Erdmann N, Cheung G, Keats JJ, Stewart AK, Reece DE, Chung KC, Tiedemann RE. Xbp1s-negative tumor B cells and pre-plasmablasts mediate therapeutic proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma. *Cancer Cell*. 2013 Sep 9;24(3):289-304.
- [68] Petrocca F, Altschuler G, Tan SM, Mendillo ML, Yan H, Jerry DJ, Kung AL, Hide W, Ince TA, Lieberman J. A genome-wide siRNA screen identifies proteasome addiction as a vulnerability of basal-like triple-negative breast cancer cells. *Cancer Cell*. 2013 Aug 12;24(2):182-96.
- [69] Arastu-Kapur S, Anderl JL, Kraus M, Parlati F, Shenk KD, Lee SJ, Muchamuel T, Bennett MK, Driessen C, Ball AJ, Kirk CJ. Nonproteasomal targets of the proteasome inhibitors bortezomib and carfilzomib: a link to clinical adverse events. *Clin Cancer Res*. 2011 May 1;17(9):2734-43.
- [70] Baud V, Karin M. Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov*. 2009 Jan;8(1):33-40.

- [71] Li ZW, Chen H, Campbell RA, Bonavida B, Berenson JR. NF-kappaB in the pathogenesis and treatment of multiple myeloma. *Curr Opin Hematol*. 2008 Jul;15(4):391-9.
- [72] Iwai K. Diverse roles of the ubiquitin system in NF- κ B activation. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jan;1843(1):129-36.
- [73] Henkel T, Machleidt T, Alkalay I, Krönke M, Ben-Neriah Y, Baeuerle PA. Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B. *Nature*. 1993 Sep 9;365(6442):182-5.
- [74] Shih VF, Tsui R, Caldwell A, Hoffmann A. A single NF κ B system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Res*. 2011 Jan;21(1):86-102.
- [75] Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:621-63.
- [76] Metzger MB, Pruneda JN, Klevit RE, Weissman AM. RING-type E3 ligases: master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jan;1843(1):47-60.
- [77] Cardozo T, Pagano M. The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 Sep;5(9):739-51.
- [78] Kanarek N, London N, Schueler-Furman O, Ben-Neriah Y. Ubiquitination and degradation of the inhibitors of NF-kappaB. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 Feb;2(2):a000166.
- [79] Peth A, Uchiki T, Goldberg AL. ATP-dependent steps in the binding of ubiquitin conjugates to the 26S proteasome that commit to degradation. *Mol Cell*. 2010 Nov 24;40(4):671-81.
- [80] Hofmann RM, Pickart CM. In vitro assembly and recognition of Lys-63 polyubiquitin chains. *J Biol Chem*. 2001 Jul 27;276(30):27936-43.
- [81] Xu P, Duong DM, Seyfried NT, Cheng D, Xie Y, Robert J, Rush J, Hochstrasser M, Finley D, Peng J. Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell*. 2009 Apr 3;137(1):133-45.

- [82] Nathan JA, Kim HT, Ting L, Gygi SP, Goldberg AL. Why do cellular proteins linked to K63-polyubiquitin chains not associate with proteasomes? *EMBO J.* 2013 Feb 20;32(4):552-65.
- [83] Butler LR, Densham RM, Jia J, Garvin AJ, Stone HR, Shah V, Weekes D, Festy F, Beesley J, Morris JR. The proteasomal de-ubiquitinating enzyme POH1 promotes the double-strand DNA break response. *EMBO J.* 2012 Oct 3;31(19):3918-34.
- [84] Kirkpatrick DS, Hathaway NA, Hanna J, Elsasser S, Rush J, Finley D, King RW, Gygi SP. Quantitative analysis of in vitro ubiquitinated cyclin B1 reveals complex chain topology. *Nat Cell Biol.* 2006 Jul;8(7):700-10.
- [85] Kim HT, Kim KP, Uchiki T, Gygi SP, Goldberg AL. S5a promotes protein degradation by blocking synthesis of nondegradable forked ubiquitin chains. *EMBO J.* 2009 Jul 8;28(13):1867-77.
- [86] Zhao S, Ulrich HD. Distinct consequences of posttranslational modification by linear versus K63-linked polyubiquitin chains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Apr 27;107(17):7704-9.
- [87] Geoffroy MC, Hay RT. An additional role for SUMO in ubiquitin-mediated proteolysis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Aug;10(8):564-8.
- [88] Ciechanover A, Stanhill A. The complexity of recognition of ubiquitinated substrates by the 26S proteasome. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Jan;1843(1):86-96.
- [89] Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 2000 Jan 4;19(1):94-102.
- [90] Jariel-Encontre I, Bossis G, Piechaczyk M. Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Dec;1786(2):153-77.
- [91] Baugh JM, Viktorova EG, Pilipenko EV. Proteasomes can degrade a significant proportion of cellular proteins independent of ubiquitination. *J Mol Biol.* 2009 Feb 27;386(3):814-27.
- [92] Erales J, Coffino P. Ubiquitin-independent proteasomal degradation. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Jan;1843(1):216-21.

- [93] Aiken CT, Kaake RM, Wang X, Huang L. Oxidative stress-mediated regulation of proteasome complexes. *Mol Cell Proteomics*. 2011 May;10(5):R110.006924.
- [94] Murakami Y, Matsufuji S, Kameji T, Hayashi S, Igarashi K, Tamura T, Tanaka K, Ichihara A. Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature*. 1992 Dec 10;360(6404):597-9.
- [95] Coffino P. Regulation of cellular polyamines by antizyme. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Mar;2(3):188-94.
- [96] Coffino P. Antizyme, a mediator of ubiquitin-independent proteasomal degradation. *Biochimie*. 2001 Mar-Apr;83(3-4):319-23.
- [97] Coffino P. Antizyme, a mediator of ubiquitin-independent proteasomal degradation. *Biochimie*. 2001 Mar-Apr;83(3-4):319-23.
- [98] Tsvetkov P, Reuven N, Shaul Y. Ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation. *Cell Death Differ*. 2010 Jan;17(1):103-8.
- [99] Kravtsova-Ivantsiv Y, Ciechanover A. Non-canonical ubiquitin-based signals for proteasomal degradation. *J Cell Sci*. 2012 Feb 1;125(Pt 3):539-48.
- [100] Hock AK, Vousden KH. The role of ubiquitin modification in the regulation of p53. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jan;1843(1):137-49.
- [101] Wang X, Jiang X. Mdm2 and MdmX partner to regulate p53. *FEBS Lett*. 2012 May 21;586(10):1390-6.
- [102] Hock AK, Vousden KH. Tumor suppression by p53: fall of the triumvirate? *Cell*. 2012 Jun 8;149(6):1183-5.
- [103] Hamard PJ, Manfredi JJ. Mdm2's dilemma: to degrade or to translate p53? *Cancer Cell*. 2012 Jan 17;21(1):3-5.
- [104] Asher G, Shaul Y. p53 proteasomal degradation: poly-ubiquitination is not the whole story. *Cell Cycle*. 2005 Aug;4(8):1015-8.
- [105] Asher G, Lotem J, Sachs L, Kahana C, Shaul Y. Mdm-2 and ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation regulated by NQO1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Oct 1;99(20):13125-30.

- [106] Asher G, Tsvetkov P, Kahana C, Shaul Y. A mechanism of ubiquitin-independent proteasomal degradation of the tumor suppressors p53 and p73. *Genes Dev.* 2005 Feb 1;19(3):316-21.
- [107] Moscovitz O, Tsvetkov P, Hazan N, Michaelovski I, Keisar H, Ben-Nissan G, Shaul Y, Sharon M. A mutually inhibitory feedback loop between the 20S proteasome and its regulator, NQO1. *Mol Cell.* 2012 Jul 13;47(1):76-86.
- [108] Iskander K, Gaikwad A, Paquet M, Long DJ 2nd, Brayton C, Barrios R, Jaiswal AK. Lower induction of p53 and decreased apoptosis in NQO1-null mice lead to increased sensitivity to chemical-induced skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 2005 Mar 15;65(6):2054-8.
- [109] Asher G, Lotem J, Tsvetkov P, Reiss V, Sachs L, Shaul Y. P53 hot-spot mutants are resistant to ubiquitin-independent degradation by increased binding to NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Dec 9;100(25):15065-70.
- [110] Tsvetkov P, Reuven N, Shaul Y. Ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation. *Cell Death Differ.* 2010 Jan;17(1):103-8.
- [111] Fagerholm R, Hofstetter B, Tommiska J, Aaltonen K, Vrtel R, Syrjäkoski K, Kallioniemi A, Kilpivaara O, Mannermaa A, Kosma VM, Uusitupa M, Eskelinen M, Kataja V, Aittomäki K, von Smitten K, Heikkilä P, Lukas J, Holli K, Bartkova J, Blomqvist C, Bartek J, Nevanlinna H. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 NQO1*2 genotype (P187S) is a strong prognostic and predictive factor in breast cancer. *Nat Genet.* 2008 Jul;40(7):844-53.
- [112] Dinkova-Kostova AT, Talalay P. NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Arch Biochem Biophys.* 2010 Sep 1;501(1):116-23.
- [113] Lu Z, Hunter T. Ubiquitylation and proteasomal degradation of the p21(Cip1), p27(Kip1) and p57(Kip2) CDK inhibitors. *Cell Cycle.* 2010 Jun 15;9(12):2342-52.
- [114] Li X, Amazit L, Long W, Lonard DM, Monaco JJ, O'Malley BW. Ubiquitin- and ATP-independent proteolytic turnover of p21 by the REGgamma-proteasome pathway. *Mol Cell.* 2007 Jun 22;26(6):831-42.

- [115] Chen X, Barton LF, Chi Y, Clurman BE, Roberts JM. Ubiquitin-independent degradation of cell-cycle inhibitors by the REGgamma proteasome. *Mol Cell*. 2007 Jun 22;26(6):843-52.
- [116] Craxton A, Butterworth M, Harper N, Fairall L, Schwabe J, Ciechanover A, Cohen GM. NOXA, a sensor of proteasome integrity, is degraded by 26S proteasomes by an ubiquitin-independent pathway that is blocked by MCL-1. *Cell Death Differ*. 2012 Sep;19(9):1424-34.
- [117] Stewart DP, Koss B, Bathina M, Perciavalle RM, Bisanz K, Opferman JT. Ubiquitin-independent degradation of antiapoptotic MCL-1. *Mol Cell Biol*. 2010 Jun;30(12):3099-110.
- [118] Basbous J, Jariel-Encontre I, Gomard T, Bossis G, Piechaczyk M. Ubiquitin-independent- versus ubiquitin-dependent proteasomal degradation of the c-Fos and Fra-1 transcription factors: is there a unique answer? *Biochimie*. 2008 Feb;90(2):296-305.
- [119] Bedford L, Lowe J, Dick LR, Mayer RJ, Brownell JE. Ubiquitin-like protein conjugation and the ubiquitin-proteasome system as drug targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2011 Jan;10(1):29-46.
- [120] Crosas B, Hanna J, Kirkpatrick DS, Zhang DP, Tone Y, Hathaway NA, Buecker C, Leggett DS, Schmidt M, King RW, Gygi SP, Finley D. Ubiquitin chains are remodeled at the proteasome by opposing ubiquitin ligase and deubiquitinating activities. *Cell*. 2006 Dec 29;127(7):1401-13.
- [121] Lee BH, Lee MJ, Park S, Oh DC, Elsasser S, Chen PC, Gartner C, Dimova N, Hanna J, Gygi SP, Wilson SM, King RW, Finley D. Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature*. 2010 Sep 9;467(7312):179-84.
- [122] Lee MJ, Lee BH, Hanna J, King RW, Finley D. Trimming of ubiquitin chains by proteasome-associated deubiquitinating enzymes. *Mol Cell Proteomics*. 2011 May;10(5):R110.003871.
- [123] D'Arcy P, Linder S. Proteasome deubiquitinases as novel targets for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012 Nov;44(11):1729-38.

- [124] Pathare GR, Nagy I, Śledź P, Anderson DJ, Zhou HJ, Pardon E, Steyaert J, Förster F, Bracher A, Baumeister W. Crystal structure of the proteasomal deubiquitylation module Rpn8-Rpn11. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Feb 25;111(8):2984-9.
- [125] Matiuhin Y, Kirkpatrick DS, Ziv I, Kim W, Dakshinamurthy A, Kleifeld O, Gygi SP, Reis N, Glickman MH. Extraproteasomal Rpn10 restricts access of the polyubiquitin-binding protein Dsk2 to proteasome. *Mol Cell*. 2008 Nov 7;32(3):415-25.
- [126] Berko D, Herkon O, Braunstein I, Isakov E, David Y, Ziv T, Navon A, Stanhill A. Inherent asymmetry in the 26S proteasome is defined by the ubiquitin receptor RPN13. *J Biol Chem*. 2014 Feb 28;289(9):5609-18.
- [127] Su V, Lau AF. Ubiquitin-like and ubiquitin-associated domain proteins: significance in proteasomal degradation. *Cell Mol Life Sci*. 2009 Sep;66(17):2819-33.
- [128] Bhattacharyya S, Yu H, Mim C, Matouschek A. Regulated protein turnover: snapshots of the proteasome in action. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Feb;15(2):122-33.
- [129] Bandau S, Knebel A, Gage ZO, Wood NT, Alexandru G. UBXN7 docks on neddylated cullin complexes using its UIM motif and causes HIF1 α accumulation. *BMC Biol*. 2012 Apr 26;10:36.
- [130] Franz A, Ackermann L, Hoppe T. Create and preserve: proteostasis in development and aging is governed by Cdc48/p97/VCP. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jan;1843(1):205-15.
- [131] Yamanaka K, Sasagawa Y, Ogura T. Recent advances in p97/VCP/Cdc48 cellular functions. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan;1823(1):130-7.
- [132] Meyer H, Bug M, Bremer S. Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nat Cell Biol*. 2012 Feb 2;14(2):117-23.
- [133] Alexandru G, Graumann J, Smith GT, Kolawa NJ, Fang R, Deshaies RJ. UBXD7 binds multiple ubiquitin ligases and implicates p97 in HIF1 α turnover. *Cell*. 2008 Sep 5;134(5):804-16.
- [134] Wang Q, Li L, Ye Y. Inhibition of p97-dependent protein degradation by Eeyarestatin I. *J Biol Chem*. 2008 Mar 21;283(12):7445-54.

- [135] Magnaghi P, D'Alessio R, Valsasina B, Avanzi N, Rizzi S, Asa D, Gasparri F, Cozzi L, Cucchi U, Orrenius C, Polucci P, Ballinari D, Perrera C, Leone A, Cervi G, Casale E, Xiao Y, Wong C, Anderson DJ, Galvani A, Donati D, O'Brien T, Jackson PK, Isacchi A. Covalent and allosteric inhibitors of the ATPase VCP/p97 induce cancer cell death. *Nat Chem Biol*. 2013 Sep;9(9):548-56.
- [136] Barthelme D, Sauer RT. Identification of the Cdc48•20S proteasome as an ancient AAA+ proteolytic machine. *Science*. 2012 Aug 17;337(6096):843-6.
- [137] Barthelme D, Sauer RT. Bipartite determinants mediate an evolutionarily conserved interaction between Cdc48 and the 20S peptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Feb 26;110(9):3327-32.
- [138] Pick E, Berman TS. Formation of alternative proteasomes: same lady, different cap? *FEBS Lett*. 2013 Mar 1;587(5):389-93.
- [139] Hatok J, Babusikova E, Matakova T, Mistuna D, Dobrota D, Racay P. In vitro assays for the evaluation of drug resistance in tumor cells. *Clin Exp Med*. 2009 Mar;9(1):1-7.
- [140] Skrott Z, Cvek B. Diethyldithiocarbamate complex with copper: the mechanism of action in cancer cells. *Mini Rev Med Chem*. 2012 Oct;12(12):1184-92.
- [141] Cyr L, Langler R, Lavigne C. Cell cycle arrest and apoptosis responses of human breast epithelial cells to the synthetic organosulfur compound p-methoxyphenyl p-toluenesulfonate. *Anticancer Res*. 2008 Sep-Oct;28(5A):2753-63.
- [142] Daniel KG, Harbach RH, Guida WC, Dou QP. Copper storage diseases: Menkes, Wilsons, and cancer. *Front Biosci*. 2004 Sep 1;9:2652-62.
- [143] Brady DC, Crowe MS, Turski ML, Hobbs GA, Yao X, Chaikuad A, Knapp S, Xiao K, Campbell SL, Thiele DJ, Counter CM. Copper is required for oncogenic BRAF signalling and tumorigenesis. *Nature*. 2014 Apr 9, *in press*.
- [144] Finney L, Vogt S, Fukai T, Glesne D. Copper and angiogenesis: unravelling a relationship key to cancer progression. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009 Jan;36(1):88-94.
- [145] Lövborg H, Oberg F, Rickardson L, Gullbo J, Nygren P, Larsson R. Inhibition of proteasome activity, nuclear factor-KappaB translocation and cell survival by the antialcoholism drug disulfiram. *Int J Cancer*. 2006 Mar 15;118(6):1577-80.

- [146] Yu X, Sidhu JS, Hong S, Robinson JF, Ponce RA, Faustman EM. Cadmium induced p53-dependent activation of stress signaling, accumulation of ubiquitinated proteins, and apoptosis in mouse embryonic fibroblast cells. *Toxicol Sci.* 2011 Apr;120(2):403-12.
- [147] Soldatenkov VA, Prasad S, Voloshin Y, Dritschilo A. Sodium butyrate induces apoptosis and accumulation of ubiquitinated proteins in human breast carcinoma cells. *Cell Death Differ.* 1998 Apr;5(4):307-12.
- [148] Dimitrakis P, Romay-Ogando MI, Timolati F, Suter TM, Zuppinger C. Effects of doxorubicin cancer therapy on autophagy and the ubiquitin-proteasome system in long-term cultured adult rat cardiomyocytes. *Cell Tissue Res.* 2012 Nov;350(2):361-72.
- [149] Sun XM, Butterworth M, MacFarlane M, Dubiel W, Ciechanover A, Cohen GM. Caspase activation inhibits proteasome function during apoptosis. *Mol Cell.* 2004 Apr 9;14(1):81-93.
- [150] Stoehr G, Schaab C, Graumann J, Mann M. A SILAC-based approach identifies substrates of caspase-dependent cleavage upon TRAIL-induced apoptosis. *Mol Cell Proteomics.* 2013 May;12(5):1436-50.
- [151] Yang Y, Kitagaki J, Dai RM, Tsai YC, Lorick KL, Ludwig RL, Pierre SA, Jensen JP, Davydov IV, Oberoi P, Li CC, Kenten JH, Beutler JA, Vousden KH, Weissman AM. Inhibitors of ubiquitin-activating enzyme (E1), a new class of potential cancer therapeutics. *Cancer Res.* 2007 Oct 1;67(19):9472-81.
- [152] Chen ZJ. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol.* 2005 Aug;7(8):758-65.
- [153] Moreau P, Richardson PG, Cavo M, Orłowski RZ, San Miguel JF, Palumbo A, Harsousseau JL. Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later. *Blood.* 2012 Aug 2;120(5):947-59.
- [154] Ghaboosi N, Deshaies RJ. A conditional yeast E1 mutant blocks the ubiquitin-proteasome pathway and reveals a role for ubiquitin conjugates in targeting Rad23 to the proteasome. *Mol Biol Cell.* 2007 May;18(5):1953-63.

- [155] Isasa M, Katz EJ, Kim W, Yugo V, González S, Kirkpatrick DS, Thomson TM, Finley D, Gygi SP, Crosas B. Monoubiquitination of RPN10 regulates substrate recruitment to the proteasome. *Mol Cell*. 2010 Jun 11;38(5):733-45.
- [156] Beskow A, Grimberg KB, Bott LC, Salomons FA, Dantuma NP, Young P. A conserved unfoldase activity for the p97 AAA-ATPase in proteasomal degradation. *J Mol Biol*. 2009 Dec 11;394(4):732-46.
- [157] Li JM, Wu H, Zhang W, Blackburn MR, Jin J. The p97-UFD1L-NPL4 protein complex mediates cytokine-induced I κ B α proteolysis. *Mol Cell Biol*. 2014 Feb;34(3):335-47.
- [158] Hotta K, Nashimoto A, Yasumura E, Suzuki M, Azuma M, Iizumi Y, Shima D, Nabeshima R, Hiramoto M, Okada A, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Ito T, Ando H, Sakamoto S, Kabe Y, Aizawa S, Imai T, Yamaguchi Y, Watanabe H, Handa H. Vesnarinone suppresses TNF α mRNA expression by inhibiting valosin-containing protein. *Mol Pharmacol*. 2013 May;83(5):930-8.
- [159] Dai RM, Chen E, Longo DL, Gorbea CM, Li CC. Involvement of valosin-containing protein, an ATPase Co-purified with I κ B α and 26 S proteasome, in ubiquitin-proteasome-mediated degradation of I κ B α . *J Biol Chem*. 1998 Feb 6;273(6):3562-73.
- [160] Verma R, Oania R, Fang R, Smith GT, Deshaies RJ. Cdc48/p97 mediates UV-dependent turnover of RNA Pol II. *Mol Cell*. 2011 Jan 7;41(1):82-92.
- [161] Wójcik C, Rowicka M, Kudlicki A, Nowis D, McConnell E, Kujawa M, DeMartino GN. Valosin-containing protein (p97) is a regulator of endoplasmic reticulum stress and of the degradation of N-end rule and ubiquitin-fusion degradation pathway substrates in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. 2006 Nov;17(11):4606-18.
- [162] Verma R, Oania RS, Kolawa NJ, Deshaies RJ. Cdc48/p97 promotes degradation of aberrant nascent polypeptides bound to the ribosome. *Elife*. 2013 Jan 22;2:e00308.
- [163] Chou TF, Deshaies RJ. Quantitative cell-based protein degradation assays to identify and classify drugs that target the ubiquitin-proteasome system. *J Biol Chem*. 2011 May 13;286(19):16546-54.

- [164] Engel RH, Brown JA, Von Roenn JH, O'Regan RM, Bergan R, Badve S, Rademaker A, Gradishar WJ. A phase II study of single agent bortezomib in patients with metastatic breast cancer: a single institution experience. *Cancer Invest.* 2007 Dec;25(8):733-7.
- [165] Chou TF, Brown SJ, Minond D, Nordin BE, Li K, Jones AC, Chase P, Porubsky PR, Stoltz BM, Schoenen FJ, Patricelli MP, Hodder P, Rosen H, Deshaies RJ. Reversible inhibitor of p97, DBeQ, impairs both ubiquitin-dependent and autophagic protein clearance pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Mar 22;108(12):4834-9.
- [166] Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Ishikawa O, Ohigashi H, Nakamori S, Monden M, Aozasa K. Increased expression of valosin-containing protein (p97) is associated with lymph node metastasis and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2004 Feb;11(2):165-72.
- [167] Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Takiguchi S, Fujiwara Y, Yasuda T, Yano M, Nakamori S, Sakon M, Monden M, Aozasa K. Expression level of valosin-containing protein is strongly associated with progression and prognosis of gastric carcinoma. *J Clin Oncol.* 2003 Jul 1;21(13):2537-44.
- [168] Yamamoto S, Tomita Y, Uruno T, Hoshida Y, Qiu Y, Iizuka N, Nakamichi I, Miyauchi A, Aozasa K. Increased expression of valosin-containing protein (p97) is correlated with disease recurrence in follicular thyroid cancer. *Ann Surg Oncol.* 2005 Nov;12(11):925-34.
- [169] Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Iizuka N, Kidogami S, Miyata H, Takiguchi S, Fujiwara Y, Yasuda T, Yano M, Nakamori S, Sakon M, Monden M, Aozasa K. Expression level of valosin-containing protein (p97) is associated with prognosis of esophageal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004 Aug 15;10(16):5558-65.
- [170] Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Sakon M, Kameyama M, Imaoka S, Sekimoto M, Nakamori S, Monden M, Aozasa K. Expression of valosin-containing protein in colorectal carcinomas as a predictor for disease recurrence and prognosis. *Clin Cancer Res.* 2004 Jan 15;10(2):651-7.
- [171] Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Iizuka N, Monden M, Yamamoto S, Iuchi K, Aozasa K. Expression level of valosin-containing protein (p97) is correlated with

progression and prognosis of non-small-cell lung carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2004 Jul;11(7):697-704.

[172] Yamamoto S, Tomita Y, Nakamori S, Hoshida Y, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Monden M, Aozasa K. Elevated expression of valosin-containing protein (p97) in hepatocellular carcinoma is correlated with increased incidence of tumor recurrence. *J Clin Oncol*. 2003 Feb 1;21(3):447-52.

[173] Tsujimoto Y, Tomita Y, Hoshida Y, Kono T, Oka T, Yamamoto S, Nonomura N, Okuyama A, Aozasa K. Elevated expression of valosin-containing protein (p97) is associated with poor prognosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2004 May 1;10(9):3007-12.

[174] Long XH, Zhang ZH, Liu ZL, Huang SH, Luo QF. Inhibiting valosin-containing protein suppresses osteosarcoma cell metastasis via AKT/nuclear factor of kappa B signaling pathway in vitro. *Indian J Pathol Microbiol*. 2013 Jul-Sep;56(3):190-5.

[175] Laguë MN, Romieu-Mourez R, Bonneil É, Boyer A, Pouletty N, Mes-Masson AM, Thibault P, Nadeau MÈ, Boerboom D. Proteomic profiling of a mouse model for ovarian granulosa cell tumor identifies VCP as a highly sensitive serum tumor marker in several human cancers. *PLoS One*. 2012;7(8):e42470.

[176] Eaves CJ. Cancer stem cells: Here, there, everywhere? *Nature*. 2008 Dec 4;456(7222):581-2.

[177] Beck B, Blanpain C. Unravelling cancer stem cell potential. *Nat Rev Cancer*. 2013 Oct;13(10):727-38.

[178] Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 2007 Nov;1(5):555-67.

[179] Venugopal C, Wang XS, Manoranjan B, McFarlane N, Nolte S, Li M, Murty N, Siu KW, Singh SK. GBM secretome induces transient transformation of human neural precursor cells. *J Neurooncol*. 2012 Sep;109(3):457-66.

- [180] Hothi P, Martins TJ, Chen L, Deleyrolle L, Yoon JG, Reynolds B, Foltz G. High-throughput chemical screens identify disulfiram as an inhibitor of human glioblastoma stem cells. *Oncotarget*. 2012 Oct;3(10):1124-36.
- [181] Triscott J, Lee C, Hu K, Fotovati A, Berns R, Pambid M, Luk M, Kast RE, Kong E, Toyota E, Yip S, Toyota B, Dunn SE. Disulfiram, a drug widely used to control alcoholism, suppresses the self-renewal of glioblastoma and over-rides resistance to temozolomide. *Oncotarget*. 2012 Oct;3(10):1112-23.
- [182] Liu P, Brown S, Goktug T, Channathodiyl P, Kannappan V, Hugnot JP, Guichet PO, Bian X, Armesilla AL, Darling JL, Wang W. Cytotoxic effect of disulfiram/copper on human glioblastoma cell lines and ALDH-positive cancer-stem-like cells. *Br J Cancer*. 2012 Oct 23;107(9):1488-97.
- [183] Liu P, Kumar IS, Brown S, Kannappan V, Tawari PE, Tang JZ, Jiang W, Armesilla AL, Darling JL, Wang W. Disulfiram targets cancer stem-like cells and reverses resistance and cross-resistance in acquired paclitaxel-resistant triple-negative breast cancer cells. *Br J Cancer*. 2013 Oct 1;109(7):1876-85.
- [184] Yip NC, Fombon IS, Liu P, Brown S, Kannappan V, Armesilla AL, Xu B, Cassidy J, Darling JL, Wang W. Disulfiram modulated ROS-MAPK and NF κ B pathways and targeted breast cancer cells with cancer stem cell-like properties. *Br J Cancer*. 2011 May 10;104(10):1564-74.
- [185] Vlashi E, Lagadec C, Chan M, Frohnen P, McDonald AJ, Pajonk F. Targeted elimination of breast cancer cells with low proteasome activity is sufficient for tumor regression. *Breast Cancer Res Treat*. 2013 Sep;141(2):197-203.
- [186] Vlashi E, Kim K, Lagadec C, Donna LD, McDonald JT, Eghbali M, Sayre JW, Stefani E, McBride W, Pajonk F. In vivo imaging, tracking, and targeting of cancer stem cells. *J Natl Cancer Inst*. 2009 Mar 4;101(5):350-9.

9 SEZNAM ZKRATEK

19S RP	Regulační část proteazomu
20S CP	Centrální část (Core Particle) proteazomu
5-FU	Fluoruracil
ALDH	aldehyd dehydrogenáza
APC	Anaphase-promoting complex
ATP	Adenosintrifosfát
AZ1	Antizym 1
β -TrCP	Beta-transducin Repeats-containing Proteins
C-like	kaspáze podobná aktivita 20S proteazomu
Cop1	Constitutively Photomorphogenic 1
CRL	Cullin-RING ubikvitin E3 ligázy
CSC	nádorové kmenové buňky
CT-like	chymotrypsinu podobná aktivita 20S proteazomu
CuEt	Bis-(diethylthiokarbamat) měďnatý komplex
Da	dalton
DDR	DNA damage response
DMEM	Dulbecco's modified essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DSB	Dvouřetězcové zlomy DNA
DUB	Deubikvitináza
E1	ubikvitin aktivační enzym
E2	ubikvitin konjugační enzym
E3	ubikvitin ligáza
EGF	epidermální růstový faktor
ERAD	ER-assisted degradation
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
FBS	Fetální bovinní sérum
FDA	Food and Drug Administration
GFP	zelený fluoreskující protein
HECT	Homologous to E6-Associated Protein C-Terminus
HIF1 α	Hypoxií indukibilní faktor 1 α
HRP	křenová peroxidáza

Hsp	Protein teplotního šoku
IC ₅₀	Half Maximal Inhibitory Concentration
IκB	Inhibitor κB
IKK	IκB kináza
IL-1/8	Interleukin 1/8
JAMM	Jab1/MPN/Mov34 metaloenzym doména
K	lyzin
LSB	Loading sample buffer
MDM2	Mouse Double Minute 2 homolog
MDMX	Mouse Double Minute 4
MMP	Matrix metaloproteináza
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
Npl4	Nuclear Protein Localization 4
NQO1	NADH/NADPH chinon oxidoreduktáza 1
NF-κB	Jaderný faktor κB
ODC	ornitin dekarboxyláza
PBS	Phosphate buffered saline
Pirh2	p53-induced protein with a RING H2 domain
PVDF	polyvinyliden fluorid
RAD	Ribosome assisted degradation
RING	Really Interesting New Gene
Rpn	Podjednotka regulační části proteazomu (Regulatory Particle non-ATPase)
Rpt	Podjednotka regulační části proteazomu (Regulatory Particle Triple-A ATPase)
SCF	Skp1/Cullin/F-box E3 ligáza
SDS-PAGE	Polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecyl sulfátu sodného
SILAC	Stable isotope labeling by amino acid in cell culture
SUMO	Small ubiquitin-like modifier
T-like	trypsinu podobná aktivita 20S proteazomu
TNBC	trojitě negativní rakovina prsu
TNF-α	Tumor necrosis faktor α
UBA	Ubiquitin-associated domain

UBL	Ubiquitin-like domain
UBX	Ubiquitin regulatory X domain
UDD	Ubikvitin-dependentní degradace
UFD	Unfolded protein response
Ufd1	Ubiquitin fusion degradation 1
UID	Ubikvitin-independentní degradace
UIM	Ubiquitin-interacting motiv
UPS	Ubikvitin-proteazomový systém
VCP	Valosin containing protein
WB	Western blot

10 PŘÍLOHY

Značné množství experimentů diplomové práce bylo uděláno v průběhu stáží u zahraničních odborníků na disulfiram a ubikvitin-proteazomový systém. Jednalo se o laboratoř prof. Q Ping Doua na Karmanos Cancer Institute, Wayne State University, Detroit, USA a také o laboratoř prof. Raymonda Deshaiese na California Institute of Technology, Pasadena, USA. Zvací dopisy obou profesorů jsou uvedeny v příloze.

B A R B A R A A N N
KARMANOS
CANCER INSTITUTE

Wayne State University

December 2, 2011

Mr. Zdenek Skrott
Ruzdka 352
756 25
Czech Republic

Dear Mr. Skrott,

I am writing to invite you to join my laboratory from June 20, 2012 to September 20, 2012 (tentatively). You will participate in a joint research collaborative project that has been established between Dr. Boris Cvek at Department of Cell Biology and Genetics, Palacký University and myself in the Department of Oncology and Karmanos Cancer Institute, School of Medicine at Wayne State University (WSU). In my understanding, this joint research project is also a part of your M.S. thesis at the Palacký University. This collaboration has been established and Dr. Cvek and I have been working together for four years.

I have interacted with you for several times. I was impressed by your English and believe that you should have no problems communicating with co-workers in my laboratory and our department. I also believe that you have obtained good training in basic lab skills and knowledge required for your research project.

During the time you stay in Wayne State University, you will not pay any tuition to WSU since you are not a Wayne State University graduate student. I also understand that Dr. Cvek's research grant (2011-2014 OP VK CZ.1.07/2.3.00/20.0062) will cover your round trip tickets and living expenses while you stay at Detroit.

I look forward to welcoming you in my laboratory in the near future!

Sincerely yours,

Qing Ping Dou, Ph.D.
Professor and Co-Leader
Developmental Therapeutics Program
Barbara Ann Karmanos Cancer Institute
Departments of Oncology, Pharmacology and Pathology
School of Medicine
Wayne State University
540.1 Hudson Webber Cancer Research Building
Mail code HW05AO
4100 John R Road
Detroit, MI 48201-2013
Tel: 313-576-8301 (Office); 313-576-8299 (Adm. Assistant); 313-576-8264, -8248, -8249 (Lab)
Fax: 313-576-8307 (Office); 313-576-8928 (Adm. Assistant)
E-mail: doup@karmanos.org

4100 John R
Detroit, Michigan 48201
1-800-KARMANOS (1-800-527-6266)
info@karmanos.org | www.karmanos.org





CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY

OFFICE OF THE DEAN OF GRADUATE STUDIES 230-87, PASADENA, CALIFORNIA 91125-3100
TELEPHONE (626) 395-6346 FAX (626) 577-9246 E-MAIL Gradofc@caltech.edu

Mr. Zdenek Skrott
zdenek.skrott@centrum.cz

February 4, 2013

Dear Mr. Skrott,

It gives me great pleasure to inform you that you have been invited to participate in the Visiting Student Researcher program under the Biology option at the California Institute of Technology. While visiting the Institute, you will be under the supervision of Professor Raymond Deshaies. This invitation is effective June 24, 2013 to July 19, 2013.

In your own interests, you should have sufficient funds for living expenses totaling \$1,667 per month, as well as proof of health and accident insurance for the duration of your stay at Caltech. There will not be any Institute funds available for your financial support. It is also required that visiting student researchers check in with the Registrar's office upon arrival for issuance of an identification card.

If you have any questions, please feel free to contact your research supervisor, Professor Deshaies or me.

Sincerely yours,

Joseph E. Shepherd
Dean of Graduate Studies

JES:hld

cc: R. Deshaies
D. Shimoda
Registrar's Office
ISP