

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2017**

**Bc. Jiří Hodoň**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Cytotoxicky aktivní triterpeny a studium jejich  
mechanizmu účinku**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Bc. Jiří Hodoň**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2017**

**Vedoucí práce: doc. RNDr. Milan Urban, Ph.D.**

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením doc. RNDr. Milana Urbana, Ph.D. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci, 28. 4. 2017

.....

Podpis

## **Poděkování**

Na tomto místě bych rád poděkoval svému vedoucímu práce doc. RNDr. Milanu Urbanovi, Ph.D. za odborné vedení, předané zkušenosti, cenné rady a připomínky, věnovaný čas a přátelský přístup v průběhu psaní této diplomové práce. Mé velké díky také patří Mgr. Janě Václavkové za věnovaný čas, cenné rady a pomoc při zpracování a interpretaci proteomických dat. Dále bych chtěl poděkovat Renatě Burianové za ochotu a trpělivost při zpracování dat z průtokového cytometru. V neposlední řadě děkuji zaměstnancům Laboratoře experimentální medicíny (Ústav molekulární a translační medicíny LF a FN Olomouc) za pomoc při práci v laboratoři, dále kolegům z týmu triterpenů za vytvoření příjemného pracovního prostředí a mnohé rady. Děkuji také své rodině a přítelkyni za podporu během celého studia.

## Souhrn

Tato práce se zabývá zjišťováním mechanismu účinku cytotoxicky aktivních triterpenů. Byly připraveny konjugáty triterpenů s deriváty glukózy pomocí Huisgenovy cykloadice. Byly změřeny cytotoxické aktivity všech připravených sloučenin. Byly vybrány nejaktivnější látky a studován jejich mechanismus účinku: 1. Byl analyzován jejich vliv na buněčný cyklus, apoptózu a na syntézu nukleových kyselin s použitím metod průtokové cytometrie; 2. aktivní pyrazin s nejlepším terapeutickým indexem byl dále biotinylován a použit v pull down esejích vyhodnocovaných pomocí kvantitativní proteomiky v kombinaci se SILAC. Byla nalezena skupina proteinů, se kterými tento pyrazin selektivně interaguje, tyto proteiny tak mohou být cíli zodpovědnými za jeho aktivitu. V budoucnu však bude nutné tyto potenciální cíle validovat alternativními metodami.

## **Summary**

The aim of this thesis is investigation of mechanism of action of cytotoxic active triterpenes. The conjugates of triterpenes with glucose derivatives were prepared using Huisgen cycloaddition. Cytotoxic activities of all prepared compounds were measured. The most active derivatives were further examined for their mechanism of action: 1. First, influence of the active compounds on cell cycle was studied, then influence on apoptosis and nucleic acid synthesis using flow cytometry methods. Active pyrazine with the most promising therapeutic index was selected and used in pull down assays evaluated by quantitative proteomics and SILAC to find a set of proteins that bind selectively to the molecule and which may be responsible for the activity. A group of specifically interacting proteins were found, however, in the future, these potential targets will have to be validated by alternative methods.

# Obsah

<b>1. Cíle práce .....</b>	<b>8</b>
<b>2. Teoretický úvod.....</b>	<b>9</b>
2.1 Vývoj protirakovinných léčiv.....	9
2.2. Buněčný cyklus .....	12
2.2.1. Kontrolní mechanismy buněčného cyklu .....	14
2.3. Apoptóza .....	17
2.4. Triterpeny.....	17
2.5. SILAC.....	19
2.6. Afinitní purifikace proteinů pomocí magnetických kuliček.....	20
<b>3. Experimentální část.....</b>	<b>23</b>
3.1. Chemická část.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
3.1.1. Obecné poznámky k experimentální části .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
3.1.2. Příprava sloučenin .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
3.2. Biologická část .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
3.2.1. Materiál .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
3.2.2. Metody .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
<b>4. Výsledky.....</b>	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.1. Syntéza nových cytotoxických triterpenů .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.2. Cytotoxická aktivita připravených sloučenin .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.3. Výpočet terapeutického indexu.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.4. Analýza buněčného cyklu a apoptózy.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.5. Analýza syntézy DNA .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.6. Analýza syntézy RNA.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.7. Detekce fosforylace histonu H3 <sup>Ser10</sup> .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.8. Afinitní purifikace pomocí magnetických kuliček.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
<b>5. Diskuze.....</b>	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
<b>6. Závěr .....</b>	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
<b>7. Seznam použité literatury a internetových zdrojů .....</b>	<b>68</b>
7.1. Seznam použité literatury.....	68
7.2. Seznam použitých internetových zdrojů.....	74
<b>8. Seznam použitých zkratk a symbolů .....</b>	<b>74</b>
<b>9. Přílohy.....</b>	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>

## 1. Cíle práce

Hlavní náplní této diplomové práce je optimalizace vlastností cytotoxicky aktivních triterpenů a zkoumání jejich mechanismu účinku. Za tímto účelem byly vytčeny tyto cíle:

1. Provést literární rešerši.
2. Připravit známé i nové cytotoxicky aktivní terpeny a jejich konjugáty s glukózou nebo tetraacetylglukózou.
3. Změřit cytotoxickou aktivitu připravených sloučenin na osmi nádorových a dvou nenádorových liniích.
4. U vybraných derivátů analyzovat jejich vliv na buněčný cyklus, indukci apoptózy, syntézu nukleových kyselin a fosforylaci histonu H3<sup>Ser10</sup> na nádorové buněčné linii CCRF-CEM.
5. Vybrat nejlepšího kandidáta pro další vývoj, připravit jeho konjugát s biotinem a pak pomocí afinitní purifikace a metody SILAC vyhledat s tímto kandidátem specificky interagující proteiny.
6. Vyhodnotit výsledky a pokusit se o vytipování možných molekulárních cílů.



## 2. Teoretický úvod

### 2.1 Vývoj protirakovinných léčiv

Všude na světě je vynakládáno obrovské množství finančních prostředků na prevenci, diagnostiku a léčbu rakoviny, protože nádorová onemocnění jsou po kardiovaskulárních chorobách druhým nejčastějším důvodem úmrtí v Evropě a severní Americe. Výzkum a vývoj protinádorových léčiv je proto hlavním posláním mnoha farmaceutických společností, stejně jako neziskových vládních i nevládních organizací.

Rakovina byla průvodně označována jako onemocnění nekontrolovaného buněčného dělení. Z toho důvodu byly všechny snahy zaměřeny na látky, které měly antiproliferativní účinek a regrese velikosti nádoru byla přijímána jako primární a objektivní znak účinnosti v preklinickém a klinickém testování. V návaznosti na to byly vyvinuty myší modely s rapidně rostoucími nádory, na kterých byly nové sloučeniny testovány. Testováním na těchto modelech bylo objeveno velké množství protirakovinných sloučenin, které působily především na rychle se rozvíjející rakovinná onemocnění, jako jsou lymfomy nebo dětská leukemie. Relativně menší úspěch byl pozorován u pomaleji rostoucích nádorů dospělých, jako jsou nádory plic, prsu, tlustého střeva a konečníku (Suggit *et* Bibby, 2005). Tyto výsledky vedly k úpravě testovacích metod, které v současnosti zahrnují daleko širší škálu buněčných linií a nádorů. Již v roce 1960 národní institut pro výzkum rakoviny (NCI) nahradil zvířecí modely v prvních fázích testování na 60 rakovinných buněčných liniích. První fáze testování na buněčných liniích spočívá v inkubaci buněk v mikrotitračních destičkách spolu s různými koncentracemi zkoumané látky. Na konci inkubace je měřen růst buněk pomocí kolorimetrického testu, nejčastěji MTT, a molekula vhodná pro pokročilejší testování je vybrána na základě její cytostatické nebo cytotoxické aktivity. Tyto informace mohou být použity jako tzv. fingerprint neboli „otisk“ dané sloučeniny. Porovnávání těchto fingerprintů s databází sloučenin, u kterých známe mechanismus účinku, může napovědět o hypotetickém mechanismu účinku testované látky. Ačkoliv používání buněčných kultur je velice výhodné ve smyslu cena-efekt, protože poskytuje velké množství výsledků a nevyžaduje používání testovacích zvířat; neposkytuje zdaleka tolik informací, jako náročnější *in vivo* testování. Příkladem nezbytnosti použití *in vivo* testů je například snaha o vývoj prodrugs, kdy je

molekula přeměněna na neaktivní formu z důvodu lepší adsorpce a distribuce v organismu, ale následně je vyžadována její metabolická aktivace, vedoucí k uvolnění aktivní species, která způsobí terapeutickou odezvu. Dále se vývoj protinádorových léčiv poslední dobou ubírá především k molekulárně cíleným terapeutikům, které využívají zvířecích modelů pro ověření jejich mechanismu účinku.

Identifikace cytotoxických sloučenin vedla k vývoji terapeutik po několik desetiletí. Nicméně pokroky v léčbě rakoviny byly omezeny identifikací unikátních biochemických aspektů, které mohly být využity pro selektivní zneškodnění nádorových buněk. Již před třemi dekádami bylo zjištěno, že z více než 600 000 sloučenin, v té době otestovaných proti rakovině, je méně než 40 molekul rutinně používaných v klinické praxi (Schwartzmann *et al*, 1988). Nedávný vývoj v molekulárních vědách a pokrok v oblasti genomiky a proteomiky přinesl několik nových molekulárních cílů u potenciálních léčiv, které vedly ke změnám v paradigmatech o protirakovinných léčivech směrem k molekulárně cíleným léčivům. Tato změna v celkovém přístupu k protinádorové chemoterapii vedla nejen k většímu zapojení vědců v hledání molekulárních cílů, ale také vyžadovala změny v testování a klinickém vyhodnocení léčiv.

Konvenční postup výzkumu a vývoje protirakovinných léčiv se zaměřuje na cytotoxické látky. Protirakovinné látky, které byly vybrány k dalšímu výzkumu, musely mít významnou cytostatickou nebo cytotoxickou aktivitu na nádorových buněčných liniích a způsobovat regresi nádorů v myších nádorových štěpech. Tyto protirakovinné látky byly objeveny převážně náhodou nebo inhibicí metabolické dráhy zodpovědné za buněčné dělení. Jejich mechanismus účinku byl však často předmětem retrospektivního šetření. Například pro léčbu lymfoblastické leukemie (ALL) se používaly folátové analogy od roku 1948, ale mechanismus účinku těchto látek, inhibice dihydrofolát reduktázy, byl objeven až v roce 1958 (Farber *et al.*, 1948; Osborn *et al.*, 1958). Podobné to bylo u dusíkatého yperitu, mustinu, který byl používán jako chemoterapeutický prostředek dlouho předtím, než byl jeho mechanismus účinku zřejmý (Goodman *et al.*, 1946).

Ačkoliv tato metoda dosáhla poměrně velkého úspěchu, poslední vývoj v molekulární biologii a pochopení rakoviny na molekulární úrovni vedl k cílenému vývoji léčiv, racionálnímu designu. Jedná se o látky, které jsou na základě zkušeností navrženy k inhibici nebo k pozměnění vybraných molekulárních markerů, považovaných za důležité v diagnostice růstu

nebo metastázování rakoviny. Takto cíleně navržených sloučenin se v posledních letech objevila celá řada. Zatímco většina z těchto sloučenin jsou v preklinickém testování, některé postoupily do fáze klinických studií a několik z nich už je dokonce schváleno ve Spojených státech. Například: Bortezomib, Imatinib, Gefitinib a další (URL:<<http://www.cancer.gov>> [cit. 2017-04-12]). Důležitou součástí preklinických a klinických testů molekulárně cílených látek je výzkum jejich účinků přímo na specifický molekulární cíl. Ačkoliv popis vlivu protinádorové látky na její molekulární cíl nemusí přímo znamenat klinický přínos, je to nezbytný krok k ověření metody, která vedla k navržení účinné struktury a k potvrzení předpokládaného mechanismu účinku.

Dále stojí za zmínku mnohočetná léková rezistence (MDR). Jedná se o situaci, kdy si rakovinné buňky vytvoří rezistenci proti různým léčivům. MDR může vznikat jako porucha apoptózy rakovinných buněk nebo zvýšenou aktivací membránového P-glykoproteinu (P-gp), jakožto odpověď na chemoterapii. P-gp působí jako efluxní pumpa pro celou řadu léků, což vede k jejich snížené intracelulární koncentraci a tím i sníženému účinku. Léčiva, která inhibují P-gp efluxní pumpu, mohou zlepšit účinnost léčby cytotoxickými látkami. Například derivát amlodipinu, CJX1, inhibuje P-gp a zvyšuje intracelulární koncentraci doxorubicinu, a tím se snižuje odolnost lidské myeloidní leukemie proti doxorubicinu (Ji *et al.*, 2005).

Systematický proces výzkumu a vývoje nových léčiv je důležitý k identifikaci potenciálních kandidátů a vyhodnocení jejich léčivých vlastností. Ačkoliv výzkum a vývoj protirakovinných léčiv podléhá téměř stejnému procesu jako u ostatních nových molekulárních entit, obsahuje tento proces několik jedinečných aspektů. Proces vývoje nového protinádorového léčiva obvykle obsahuje následující fáze:

1. Získávání nových, potenciálně aktivních chemických sloučenin: Toto může být docíleno chemickou syntézou nebo extrakcí z přírodních zdrojů. Z přírodních zdrojů mohou být izolovány aktivní látky a z nich syntetizovány jejich deriváty kvůli zvýšení účinnosti a snížení toxicity. Analoga již existujících sloučenin jsou také syntetizována kvůli potlačení jejich vedlejších účinků a zlepšení farmakokinetických profilů (Mans *et al.*, 1994). Další fáze zapojuje analytické metody pro určení struktury a čistoty sloučenin, stejně jako jejich stabilitu při skladování. Jsou identifikovány fyzikálně-chemické vlastnosti sloučenin, jako je například polymorfismus, bod tání a rozpustnost u krystalických látek. Jak je sloučenina dále zkoumána, je syntetizována ve větším

měřítku. Dále jsou identifikovány formulace vhodné pro podávání člověku a průběžně je posuzována i ekonomická stránka jejich potencionální výroby a používání.

2. Testování látek a preklinická farmakologie: Toto představuje tzv. „chemii na papíru“, která porovnává strukturu dané látky se strukturami, které již existují v databázi. Toto je nezbytné pro určení její potenciální aktivity, toxicity, metabolických a degradačních drah. V dalších fázích je provedeno předběžné testování na buněčných kulturách (IC<sub>50</sub>, buněčný cyklus, apoptóza, atd.), které určí specifičnost jejich protirakovinné aktivity a poté následuje testování účinnosti a toxicity na zvířecích modelech.
3. Klinický vývoj: Klinický vývoj léčiv, jakožto vhodných kandidátů, zahrnuje testy na lidských dobrovolnících, aby se zjistila toxicita a maximální tolerovaná dávka (MTD) v I. fázi klinických testů. Následovně je látka v II. fázi klinických testů podána pacientům s vybraným typem rakoviny k určení účinnosti a ověření dávek. Fáze III. je zaměřena na porovnávání sledovaného terapeutika s již používanými látkami proti danému typu rakoviny.

V dnešní době je výzkum a vývoj léků velmi dlouhý, rizikový a nákladný. Hlavně díky vysokým nárokům na bezpečnost je průměrná doba, než se léčivo objeví na trhu, 10–15 let. Také cena za vývoj nového léku několikanásobně stoupla a dnes stojí přes 1 miliardu dolarů, což je asi 1/4 ročních výdajů na léky v České republice (URL:<<http://www.czso.cz>> [cit.-2017-04-13]). Aby byl objeven nový lék, je třeba prozkoumat desetitisíce chemických sloučenin, a i z těch úspěšných jen každá třetí uhradí své náklady.

## 2.2. Buněčný cyklus

Buněčný cyklus je proces, během kterého z buňky mateřské vzniknou dvě buňky dceřiné. Během buněčného cyklu dojde k zdvojení DNA obsažené v chromozomech a k následnému rozdělení chromozómů na dvě identické sady a jejich odseparování do dvou geneticky identických dceřiných buněk. Tento proces je definován dvěma hlavními fázemi buněčného cyklu, S a M fází. Zdvojení DNA probíhá během S fáze, která trvá přibližně 10-12 hodin a u normální savčí buňky zabírá přibližně polovinu buněčného cyklu. Následovně rozdělení chromozómů a buněčné dělení probíhá v M fázi, která u savčí buňky trvá méně než hodinu. M fáze zahrnuje řadu dramatických událostí, která začíná kondenzací chromozómů: to jsou duplikované řetězce DNA, které jsou sbalené do protáhlých útvarů a dále

kondenzovány do mnohem kompaktnějších chromozomů, potřebných pro jejich separaci. Poté dochází k rozpadu jaderného obalu a replikované chromozomy, které se skládají ze sesterských chromatid, jsou napojeny na mikrotubuly mitotického vřeténka. Jak mitóza pokračuje, buňka se na krátkou dobu pozastaví ve stádiu zvaném metafáze, kde jsou chromozomy srovnány v ekvatoriální rovině mitotického vřeténka, a jsou připraveny k segregaci. Následující rozdělení sesterských chromatid naznačuje začátek anafáze, během které se chromozomy pohybují k opačným pólům buňky, kde jsou dekonenzovány a proběhne rekonstrukce jaderné membrány. V poslední fázi neboli cytokinezi, dochází k rozdělení cytoplazmy, vzniku dvou buněk a dělení je kompletní (Alberts *et al.*, 2008).

Většina buněk vyžaduje mnohem více času na růst, zdvojnásobení množství proteinů a organel, až poté k dochází replikaci DNA a rozdělení. Aby buňka získala více času pro zmiňovaný růst, jsou u většiny buněk vloženy další fáze – G1 fáze před S fází a G2 fáze před M fází. To znamená, že eukaryotický buněčný cyklus je běžně rozdělen do čtyř po sobě jdoucích fází: G1, S, G2, M. G1, S a G2, ty se společně nazývají jako interfáze. U běžné lidské buňky, zabírá interfáze přibližně 23 hodin z 24 hodinového cyklu, z toho 1 hodina M fáze (Obaya *et Sedivy*, 2002).

Obě tyto přidané fáze slouží jako časové zpoždění pro umožnění růstu buněk. Poskytují ovšem také buňce čas pro sledování vnitřního a vnějšího prostředí, aby bylo jisté, že je vše v pořádku a připraveno, než se buňka dostane do hlavních fází dělení, tedy S fáze a mitózy. V tomto ohledu je obzvláště důležitá fáze G1. Její délka se může značně lišit v závislosti na vnějších podmínkách a extracelulárních signálech od jiných buněk. Pokud jsou nepříznivé extracelulární podmínky, například je velké zpoždění v G1 fázi, může buňka vstoupit do specializovaného klidového stavu, známého jako G0 fáze, ve které může buňka setrávat dny, týdny a někdy i roky. Je i mnoho typů buněk, které zůstávají permanentně v G0 fázi, dokud ony nebo organismus nezemře – tento stav nazýváme senescencí. Pokud jsou přítomné signály pro růst a dělení, a extracelulární podmínky jsou příznivé, dochází na konci G1 fáze k překlenutí kontrolního bodu. Po překročení tohoto bodu buňka začíná replikovat DNA v S fázi, a to i v případě, že jsou odstraněny extracelulární signály, stimulující růst a dělení (Alberts *et al.*, 2008).

### 2.2.1. Kontrolní mechanismy buněčného cyklu

Kontrola buněčného cyklu je velice důležitá hned z několika důvodů. Za prvé, v případě, že by buněčný cyklus nebyl regulován, buňky by neustále podstupovaly buněčné dělení. I když tato situace může být pro některé buňky výhodná, neustálá replikace bez důvodu je biologicky nevhodná a často je projevem patologickým, například u nádorových onemocnění. Za druhé, vnitřní regulace buněčného cyklu je potřebná, aby signál pro přechod z jedné fáze do druhé, nastal ve správnou chvíli. Tyto regulace nejsou striktně řízeny časem, ale daleko více zpětnou vazbou buňky samotné. K regulaci buněčného cyklu dochází prostřednictvím cyklin-dependentních kináz (CDK) společně s jejich proteinovými substráty, tedy cykliny, tumor supresorovými geny a protoonkogeny.

Kontrola buněčného cyklu je využívána i v aplikované léčbě pod souhrnným názvem – cytostatika. Tyto látky jsou schopny zpomalit nebo úplně zastavit buněčný cyklus, nejčastěji rakovinného bujení. Triterpeny jsou v tomto ohledu velice slibnou skupinou sloučenin, jelikož byla potvrzena jejich cytostatická aktivita v G2/M kontrolním uzlu (Borkova *et al*, 2016).

#### Cykliny a cyklin-dependentní kinázy

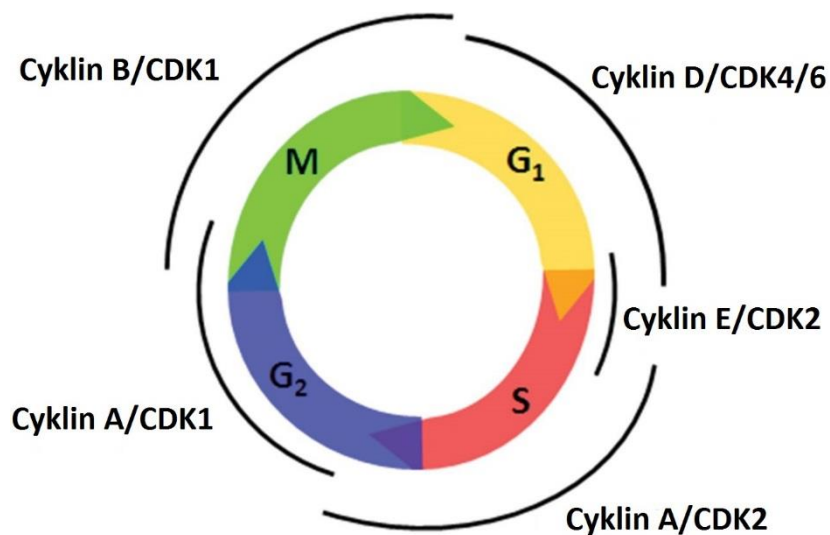
Cyklin-dependentní kinázy (CDKs) jsou rodina kináz, které byly objeveny právě díky jejich roli regulovat buněčný cyklus. Jsou také zapojeny v regulaci transkripce, zpracování mRNA a diferenciaci nervových buněk (Morgan, 2007). Zajímavé je, že např. kvasinkové buňky mohou normálně proliferovat, i když byl jejich gen pro CDK nahrazen homologním lidským genem (Morgan, 2007; Lee *et Nurse*, 1987); svědčí to o jejich univerzálnosti. CDKs jsou relativně malé proteiny o velikosti v rozmezí od 34 do 40 kDa, které váží regulační proteiny nazývané cykliny. Bez cyklinů má CDK malou nebo žádnou kinázovou aktivitu; aktivní je pouze komplex cyklin-CDK. Vzhledem k tomu, že CDK fosforylují své substráty na serinech a threoninech, řadíme je mezi serin-threonin kinázy (Morgan, 2007). Množství cyklinů se v průběhu buněčného cyklu průběžně mění, tedy dochází k jejich syntéze a degradaci. Při nízké koncentraci cyklinu dochází k deaktivaci CDK a naopak, při zvyšující se koncentraci cyklinů se CDK aktivují a buňka může vstoupit do dalších fází buněčného cyklu (Karp, 2013).

Živočišné buňky obsahují alespoň devět CDKs, z toho pouze čtyři jsou přímo zapojeny do regulace buněčného cyklu – CDK1, 2, 3 a 4. Dále rozlišujeme čtyři třídy cyklinů, dle jejich

funkce a fáze buněčného cyklu, ve kterém se váží na CDK. Přehled CDK, cyklinů a jejich funkce je uvedena v Tabulce 1.

**Tabulka 1:** CDK a cykliny – nomenklatura a jejich funkce v buněčném cyklu savců (upraveno a převzato od Lodish, 2013)

CDK	Cyklin	Funkce	Název
CDK1	Cyklin A, Cyklin B	M fáze G2 fáze	Mitotické CDK
CDK2	Cyklin A, Cyklin E	Vstup do buněčného cyklu S fáze	CDK G1/S fáze CDK S fáze
CDK4	Cyklin D	G1 fáze Vstup do buněčného cyklu	CDK G1 fáze
CDK6	Cyklin D	G1 fáze	CDK G1 fáze



**Obrázek 1:** Jednotlivé body buněčného cyklu a cykliny v nich zapojené (upraveno a převzato od Suryadinata *et al*, 2010)

### Tumor supresorové geny

Tumor supresorové geny nebo také anti-onkogeny jsou geny, které chrání buňku před přeměnou na buňku nádorového bujení. Pokud je tento gen porušen nebo je jeho funkce snížena, obvykle je tento stav doprovázen dalšími genetickými změnami, může dojít ke vzniku

rakoviny. Ztráta těchto genů může být dokonce významnější pro vznik různých druhů lidských rakovinných buněk než samotná aktivace protoonkogenu (Weinberg, 2014).

Tumor supresorové geny, nebo spíše proteiny, které tyto geny kódují, mají buď tlumící nebo represivní účinek na regulaci buněčného cyklu, podporují apoptózu nebo obojí. Funkce tumor-supresorových proteinů spadají do několika kategorií:

1. Represe genů, které jsou nezbytné pro pokračování buněčného cyklu. Pokud nejsou tyto geny exprimovány, buněčný cyklus nepokračuje a buněčné dělení je zastaveno.
2. Kontrola poškození DNA během buněčného cyklu. Pokud je v DNA buňce během dělení poškozena, dělení je zastaveno, dokud není DNA opravena. V případě, že poškození DNA není možné opravit, buňka zahájí apoptózu (programovanou buněčnou smrt), která chrání organismus před vznikem mutovaných buněk (Sherr, 2004).
3. Proteiny, které jsou zapojeny v buněčné adhezi, mohou zabránit rozšíření nádorových buněk, a dokonce inhibici metastáz. Tyto proteiny jsou známé jako metastázové supresory (Hirohashi *et Kanai*, 2003; Yoshida *et al.*, 2000).
4. Proteiny zapojené do oprav DNA, jsou také obvykle klasifikovány jako nádorové supresory. Bez těchto proteinů by buněčný cyklus vůbec neproběhl nebo by vznikaly chyby, s možným vznikem rakovinného bujení (Markowitz, 2000).

Prvním tumor supresorovým proteinem, který byl objeven je Retinoblastoma protein (pRb). Dalším z důležitých tumor supresorů je protein p53 kódovaný genem TP53. Ztráta aktivity proteinu p53 byla například pozorována u poloviny případů s rakovinou prsu. Mutovaný protein p53 je také zapojen do patofyziologie leukémie, lymfomů, sarkomů a další (Rivlin *et al.*, 2011). Abnormality genu pro p53 je dědičná forma Li-Fraumeniho syndromu (LFS), který zvyšuje riziko vzniku různých typů rakoviny (Malkin, 2011).

## **Protoonkogeny**

Protoonkogeny jsou skupina genů, které dělají z normálních buněk rakovinné, pokud jsou mutovány (Adamson, 1987; Weinstein *et Joe*, 2006). Mutované proto-onkogeny jsou v přírodě běžné a mutovanou verzí proto-onkogenu nazýváme onkogen. Je známo, že proto-onkogeny kódují celou řadu proteinů, jejichž funkce je stimulace buněčného cyklu, inhibice buněčné diferenciace a zastavení buněčné smrti. Všechny tyto procesy jsou důležité pro normální lidský vývoj a pro udržování tkání a orgánů. Onkogeny se však obvykle vyznačují



zvýšenou produkcí těchto proteinů, což vede ke zvýšenému buněčnému dělení, snížení buněčné diferenciaci a inhibici buněčné smrti. Tyto děje definují rakovinné buňky. Z tohoto důvodu jsou onkogeny hlavním molekulárním cílem pro molekulárně navržená protirakovinná léčiva.

### 2.3. Apoptóza

Je proces jinak označovaný jako programovaná buněčná smrt, která je zcela běžná v mnohobuněčném organismu (Green, 2011). Biochemické události vedou k charakteristickým buněčným změnám a její smrti. Tyto změny zahrnují zmenšování buněk, kondenzace chromatinu, fragmentace DNA a rozpadu mRNA. Během apoptózy dochází ke kontrolovanému rozpadu na apoptotická tělíska bez vzniku zánětu. Je to geneticky regulovaný, fyziologický proces aktivace specifických nukleáz a proteáz. Může být aktivován přirozeně nebo některými infekcemi a jedy, na rozdíl od nekrózy, což je forma traumatické buněčné smrti, která je následkem akutního buněčného poškození (Krysko *et al.*, 2009). Apoptóza řízený proces, který organismu dává výhodu v průběhu životního cyklu organismu. Apoptóza se řadí mezi velice regulované procesy, jakmile jednou začne, už ji nelze zastavit. Apoptóza může být iniciována jednou ze dvou drah, vnitřní a vnější. Ve vnitřní dráze buňky zabijí sami sebe v důsledku buněčného stresu. Na rozdíl od toho, u vnější dráhy buňka zemře na základě signálu od ostatních buněk. Obě dráhy buněčné smrti jsou aktivovány kaspázami, což jsou proteázy neboli enzymy degradující proteiny.

### 2.4. Triterpeny

Triterpeny jsou přírodní látky, sekundární metabolity, které je možné najít především v rostlinách, ale v menších koncentracích se vyskytují téměř ve všech žijících organismech. Doposud bylo izolováno tisíce triterpenů z přírodních zdrojů a velké množství z nich je biologicky aktivních (Hill *et Connolly*, 2015). Vyznačují se celou řadou aktivit jako je cytotoxická, antimikrobiální, protivředová, protivirová, analgetická a další (Sarek *et al.*, 2010; Zuo *et al.*, 2011; Yano *et al.*, 1989; Dang *et al.*, 2013; Gaertner *et al.*, 1999). Pokud bychom tvořili seznam sloučenin se zajímavými biologickými aktivitami, triterpeny se budou rozhodně nacházet mezi nimi (Dzubak *et al.*, 2006). Ačkoliv izolované sloučeniny jsou často aktivní, jejich

terapeutické využití je komplikováno dvěma hlavními problémy. Jedním z nich je  $IC_{50}$ , která je většinou nedostačující v porovnání s již dostupnými terapeutiky. Dalším z problémů jsou nevhodné farmakologické vlastnosti: asi nejdůležitější z nich je nízká rozpustnost ve vodných médiích, kvůli čemuž nastávají problémy s biologickou dostupností. Na druhou stranu mají triterpeny velkou variabilitu mechanismů účinku, z nichž řada je dosud nejspíš neodhalená. O takovéto triterpeny je potom velký zájem, jelikož mohou být alternativou pro léčbu rezistentních typů rakovin a bakteriálních či virových onemocnění, kde mohou být použity v kombinaci s již používanými terapeutiky. To je hlavní důvod, proč jsou triterpeny v zájmu mnoha výzkumných skupin po celém světě, které se snaží vylepšit  $IC_{50}$  a farmakologický profil základní struktury pomocí chemických modifikací nebo syntézy tzv. prodrugs (Kvasnica *et al.*, 2015; Urban *et al.*, 2015).

Existuje velké množství triterpenů, u kterých již byla biologická aktivita objasněna a jejichž mechanismus účinku je znám, v některých případech byl dokonce nalezen i specifický molekulární cíl. Tyto mechanismy účinku zahrnují inhibici proteazomu, topoisomeras, transkripčních faktorů, dále indukci apoptózy nebo down-regulaci proteinů nezbytných pro růst nádoru (Chintharlapalli *et al.*, 2007; Fulda *et al.*, 2007; Ganguly *et al.*, 2007; Qian *et al.*, 2011; 2000; Safe *et al.*, 2012). Každopádně mnoho dalších mechanismů účinku zůstává neobjasněných.

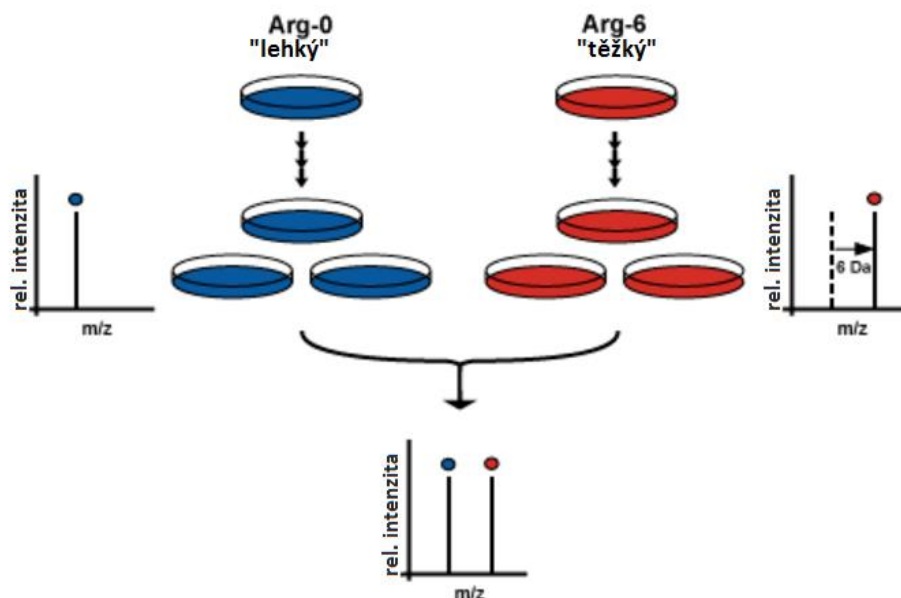
Tato diplomová práce je zaměřena především na zkoumání mechanismu účinku již v literatuře (Sarek, 2003; Urban, 2012) popsaných cytotoxicky vysoce aktivních triterpenů **1-3** a dále na syntézu jejich analogů, které by měly mít lepší cytotoxicitu nebo farmakologické vlastnosti než sloučeniny **1-3** a na studium mechanismu účinku i u těchto analogů. Zlepšení  $IC_{50}$  bylo očekáváno zejména spojením dvou farmakoforů v molekule **4**, naopak zavedení cukerné části mělo vést ke zlepšení biodostupnosti molekul **15-18**. Za účelem zkoumání mechanismu účinku byly dříve připraveny ze sloučenin **1-3** biotinylované konjugáty (Hodoň, 2015; Sural *et al.*, 2015). Po vyhodnocení všech biologických experimentů a předběžných experimentů zabývajících se hledáním molekulárních cílů provedených v práci (Hodoň, 2015) byl pro pokročilé testy vybrán konjugát **19** odvozený od pyrazinu **3**.

Pro nalezení mechanismu účinku aktivní látky existuje velké množství metod. Mezi základními metodami je zkoumání efektu látek na buněčný cyklus, indukci apoptózy, syntézu DNA a RNA pomocí průtokového cytometru, kde získaná data mohou být využita v dalších

fázích výzkumu. Další a velice důležitý způsob podhalení mechanismu účinku je nalezení molekulárního cíle, který interaguje s látkou, a následné potvrzení, že tato interakce je zodpovědná za biologickou odpověď. Jednou z metod na identifikaci molekulárních cílů je afinitní purifikace, metodika založená na interakci biotin – streptavidin skombinovaná s kvantitativní proteomikou, využitím izotopově značených aminokyselin (SILAC) a hmotnostní spektrometrie. Tato metoda využívá izotopicky značeného proteomu buněk (SILAC), která nám dokáže učit, který protein(y) interaguje se sloučeninou a je dokonce schopna odlišit falešnou pozitivitu, tedy nespecificky vázané proteiny (Sakamoto *et al.*, 2012; Ong *et al.*, 2012). Specificky interagující proteiny mohou být dále zkoumány a pomocí již známých informací, dohledána jejich biochemická úloha.

## 2.5. SILAC

Neboli „Stable Isotope Labeling by/with Amino acids in Cell culture“ je metoda, která detekuje rozdíly v proteinovém zastoupení mezi vzorky s použitím neradioaktivního izotopového značí (Oda *et al.*, 1999; Ong *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2002). V praxi jsou kultivovány dvě populace buněčných kultur. Jedna populace je pěstována v médiu obsahující normální „lehké“ aminokyseliny. Na rozdíl od toho je druhá populace pěstována v médiu s aminokyselinami, které jsou značeny stabilními (neradioaktivními) „těžkými“ izotopy. Médium může například obsahovat arginin značený šesti uhlíky s 13 atomy ( $^{13}\text{C}$ ) místo normálního uhlíku s 12 atomy ( $^{12}\text{C}$ ). Během růstu buněk v tomto médiu inkorporují „těžký“ arginin do všech nově syntetizovaných proteinů. Po několika pasážích jsou všechny peptidy obsahující jeden arginin o 6 Da těžší než jejich normální protějšky. Trik je v tom, že proteiny z obou populací mohou být poté spojeny a analyzovány společně hmotnostní spektrometrií. Páry chemicky identických peptidů s odlišným isotopickým obsahem mohou být rozlišeny pomocí hmotnostního spektrometru na základě jejich rozdílných hmotností. Poměr intenzit píku v hmotnostním spektru takových peptidových párů odráží poměr množství pro dva proteiny. Pokud s jednou kulturou provedeme experiment a druhou použijeme jako kontrolu, uvidíme vliv experimentu na obsah konkrétního proteinu v buňce.



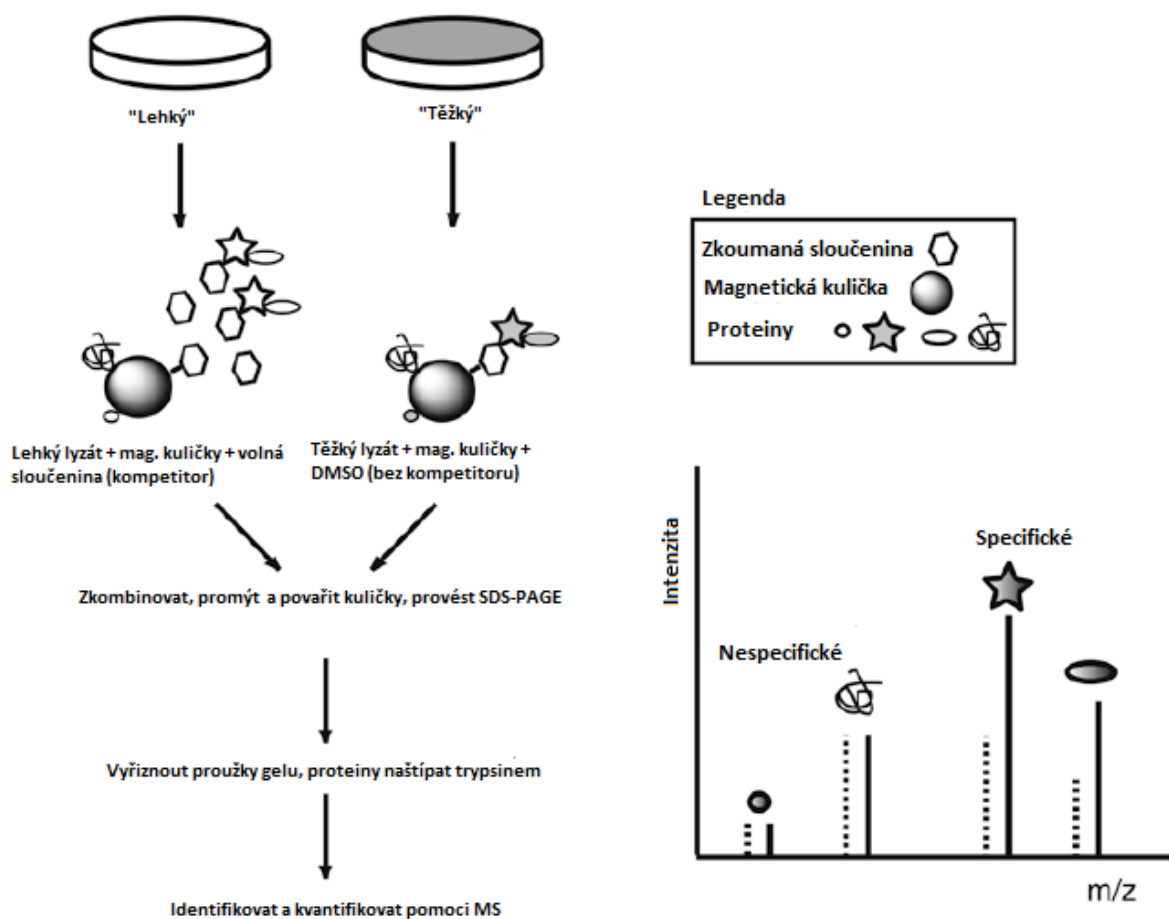
**Obrázek 2:** Buňky, které jsou značené jejich pěstováním v lehkém médiu např. s normálním argininem (Arg-0, modrá barva) nebo v médiu s těžkým argininem (Arg-6, červená barva) (URL: <<http://www.mdc-berlin.de>> [cit. 2017-04-12]).

## 2.6. Afinitní purifikace proteinů pomocí magnetických kuliček

Metod pro afinitní purifikaci existuje obrovské množství, ale jen několik z nich dokáže přesně a efektivně odhalit proteiny, které selektivně interagují se studovanou molekulou.

Jednou z těchto účinných metod je afinitní purifikace založená na interakci biotinu a streptavidinu. V praxi je studovaná molekula chemicky upravena tak, aby obsahovala molekulu biotinu a během experimentu je inkubována s magnetickými kuličkami, které jsou pokryty streptavidinem (Hodoň, 2015). K proteinovému lyzátu ze standardní linie (lehký lyzát) je přidána vysoká koncentrace volné zkoumané sloučeniny (bez biotinu, funguje jako kompetitor) a dojde tak k vyvázání většiny molekulárních cílů (proteinů, které se ke zkoumané sloučenině váží). K těžkému lyzátu není přidána volná zkoumaná látka (kompetitor). Následně jsou lyzáty přidány ke komplexu magnetická kulička + biotinylovaná zkoumaná sloučenina. Vzhledem k tomu, že u lehkého lyzátu došlo k vyvázání většiny specifických molekulárních cílů kompetitorem, tak na specifickou interakci s komplexem magnetická kulička + biotinylovaná

zkoumaná látka zbývá jen malé množství volných specifických cílů. Na rozdíl od toho, u těžkého lyzátu nic nebránilo navázání specifických i nespecifických molekulárních cílů, je na nich tedy relativní nadbytek specifických cílů oproti lehkému lyzátu. Magnetické kuličky se promyjí a magnetické kuličky, které byly inkubovány s lehkým lyzátem se spojí s kuličkami inkubovanými s těžkým lyzátem. Následně jsou proteiny z kuliček uvolněny denaturačním puftrem a teplotou 95 °C s následující analýzou na hmotnostním spektrometru. Tento pokus se provede i v opačném uspořádání a po odečtení nespecifických molekulárních cílů dostaneme vhodné kandidáty na molekulární cíl (Ong *et al*, 2012).



**Obrázek 3:** Identifikace specifických proteinových interakcí pomocí kvantitativní proteomiky a metody SILAC. Buněčná populace je plně značena lehkými (bílá) a těžkými aminokyselinami (šedá). Lyzáty jsou inkubovány s magnetickými kuličkami a volnou sloučeninou (kompetitorem) nebo s DMSO (bez kompetitoru). Proteiny interagující specificky se zkoumanou látkou, v tomto uspořádání, jsou získány u těžkého lyzátu na rozdíl od lehkého a jsou

identifikovány rozdílným poměrem intenzit píků. Poměr intenzit píků u nespecificky vázaných proteinů je stejný (Převzato a upraveno z článku Ong *et al.*, 2012).

### **3. Experimentální část**





































































































## 7. Seznam použité literatury a internetových zdrojů

### 7.1. Seznam použité literatury

Adamson, E. D. (1987): Oncogenes in development. *Development* 99, 449–471.

Alberts, B., Wilson, J., Hunt, T. (2008): *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 1 392 p. ISBN 978-081-5341-055.

Borkova, L., Gurska, S., Dzubak, P., Burianova, R., Hajduch, M., Sarek, J., Popa, I., Urban, M. (2016): Lupane and 18a-oleanane derivatives substituted in the position 2, their cytotoxicity and influence on cancer cells *Eur. J. Med. Chem.* 121: 120-131.

Cox, J., Mann, M. (2008): MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 26: 1367-72.

Dang, Z., Ho, P., Zhu, L., Qian, K., Lee, K.-H., Huang, L., and Chin, C.-H. (2013): New Betulinic Acid Derivatives for Bevirimat Resistant Human Immunodeficiency Virus Type-1. *J. Med. Chem.* 56: 2029–2037.

Darzynkiewicz Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T., Traganos, F. (1997): Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis)." *Cytometry* 27.1: 1-20.

Dzubak, P., Hajduch, M., Vydra, D., Hustova, A., Kvasnica, M., Biedermann, D., Markova, L., Urban, M., Sarek, J. (2006): Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Nat. Prod. Rep.* 23: 394–411.

Esteves, A. P., Rodrigues, L. M., Silva, M. E., Gupta, S., Oliveira-Campos, A. M. F., Machalicky, O., Mendonça, A. J. (2005): Synthesis and characterization of novel fluorescent N-glycoconjugates. *Tetrahedron*: 61, 8625.

Farber, S., Diamond, L., Mercer, R. D., Sylvester, R. F. J., Wolff, J. A. (1948): Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroylglutamic acid (aminopterin). *Engl. J Med* 238: 787–793.

Fulda, S., and Debatin, K.-M. (2000): Betulinic Acid Induces Apoptosis Through a Direct Effect on Mitochondria in Neuroectodermal Tumors. *Med. Pediatr. Oncol.* 35: 616–618.

Gaertner, M., Muller, L., Ross, J. F., Santos, A. R. S., Nieto, R., Calixto, J. B., Yunes, R. A., Delle Monache, F., and Cechinel-Filho, V. (1999): Analgesic Triterpenes from *Sebastiania schottiana* roots. *Phytomedicine* 6: 41–44.

Ganguly, A., Das, B., Roy, A., Sen, N., Dasgupta, S. B., Mukhopadhyay, S., Majumder, H. K. (2007): Betulinic acid, a catalytic inhibitor of topoisomerase I, inhibits reactive oxygen species-mediated apoptotic topoisomerase I-DNA cleavable complex formation in prostate cancer cells but does not affect the process of cell death. *Cancer Res.*;67(24):11848-58.

Goodman, L.S., Wintrobe, M. M., Dameshek, W., Goodman, M. J., Gilman, A., McLennan, M. T. (1946): Nitrogen mustard therapy. Use of methyl-bis(beta-chloroethyl)amine hydrochloride and tris(beta-chloroethyl)amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. *JAMA*; 251: 2255–2261.

Green, D., R. (2011): Means to an end: apoptosis and other cell death mechanisms. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Hill, R. A., Connolly, J. D. (2015) Triterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* 32, 273–327.

Hirohashi, S., Kanai, Y. (2003): Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci.* 94 (7): 575–81.

Chintharlapalli, S., Papineni, S., Ramaiah, S. K., and Safe, S. (2007): Betulinic Acid Inhibits Prostate Cancer Growth through Inhibition of Specificity Protein Transcription Factors. *Cancer Res.* 67: 2816–2823.

Hodoň (2016): Bakalářská práce

Chowdhury, R., Mandal, S., Mitra, B., Sharma, S., Mukhopadhyay, S., Majumder, H. K. (2002): Betulinic acid, a potent inhibitor of eukaryotic topoisomerase I: identification of the inhibitory step, the major functional group responsible and development of more potent derivatives. *Med Sci Monit.*; 8(7): 254-260.

Ji, B.S., He, L., Liu, G. Q. (2005): Reversal of p-glycoprotein-mediated multidrug resistance by CJX1, an amlodipine derivative, in doxorubicin-resistant human myelogenous leukemia (K562/DOX) cells. *Life Sci*; 77: 2221–2232.

Karp, G. (2013): *Cell and Molecular Biology - Concepts and Experiments*, 7th Edition. Wiley.

Krysko, D., V, Vanden Berghe, T., D'Herde, K., Vandenabeele, P. (2008). "Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis.". *Methods.* 44 (3): 205–21.

Kvasnica, M., Urban, M., Dickinson, N. J., Sarek, J. (2015): Pentacyclic triterpenoids with nitrogen and sulfur containing heterocycles: Synthesis and medicinal significance. *Nat. Prod. Rep.* 32: 1303–1330.

Lee, M. G., Nurse, P. (1987): Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature.* 327 (6117): 31–5.

Lodish, H. F., Berk, A., Kaiser, Ch. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., Scott, M. P. (2013): *Molecular Cell Biology*. W.H. Freeman and Co.

Malkin, D. (2011): Li-Fraumeni Syndrome. *Genes & Cancer.* 2(4):475-484.

Mans, D. R. A, Jung, F. A., Schwartzmann, G. (1994): Anticancer drug discovery and development. *J Brazilian Assoc Advancement Sci*; 46: 70–81.

*Markowitz, S. (2000): DNA repair defects inactivate tumor suppressor genes and induce hereditary and sporadic colon cancers. J. Clin. Oncol. 18 (21 Suppl): 75S–80S.*

Mizushima, Y., Akira, I., Kenji, E., Masahiko, O., Nobuyuki, K., Kohei, K., Toshiko S. (2003): Inhibition of DNA Polymerases and DNA Topoisomerase II by Triterpenes Produced by Plant Callus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305 (2): 365–73.

Morgan, D. O. (2007): *The Cell Cycle: Principles of Control*. London: New Science Press, 1st ed.

National Cancer Institute (2008): *Targeted Cancer Therapy*.

Obaya, A. J., Sedivy, J. M. (2002): Regulation of Cyclin-Cdk Activity in Mammalian Cells. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 59 (1): 126–42.

Oda, Y., Huang, K., Cross, F. R., Cowburn, D., Chait, B. T. (1999): Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96 (12): 6591–6.

Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A., Mann, M. (2002): Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*. 1 (5): 376–86.

Ong, S.-E., Li, X., Schenone, M., Schreiber, S. L., and Carr, S. A. (2012): Identifying Cellular Targets of Small-Molecule Probes and Drugs with Biochemical Enrichment and SILAC. *Methods Mol. Biol.* 803: 129–140.

Osborn, M.J, Freeman, M., Huennekens, F.M. (1958): Inhibition of dihydrofolic reductase by aminopterin and amethopterin. *Proc Soc Exp Biol Med*; 97: 429–431.

Osborn, M.J., Huennekens, F.M. (1958): Enzymatic reduction of dihydrofolic acid. *J Biol Chem*; 233: 969–974.

Patton, G. C. (2004): *Development and Applications of Click Chemistry*

Qian, K., Kim, S.-Y., Hung, H.-Y., Huang, L., Chen, C.-H., and Lee, K.-H. (2011): New Betulinic Acid Derivatives as potent proteasome inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21: 5944–5947.

Rivlin, N., Brosh, R., Oren, M., Rotter, V. (2011): Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. Levine AJ, ed. *Genes & Cancer.* 2(4):466-474.

Safe, S. H., Prather, P.L., Brents, L. K., Chadalapaka, G., Jutooru, I. (2012): Unifying Mechanisms of Action of the Anticancer Activities of Triterpenoids and Synthetic Analogs. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry.* 12(10):1211-1220.

Sakamoto, S., Hatakeyama, M., Ito, T., and Handa, H. (2012): Tools and Methodologies Capable of Isolating and Identifying a Target Molecule for a Bioactive Compound. *Bioorg. Med. Chem.* 20: 1990–2001.

Sarek, J., Klinot, J., Dzubak, P., Klinotova, E., Noskova, L., Krecek, V., Korinkova, G., Thomson, J.P., Janost'akova, A., Wang, S.D., Parsons, S., Fischer, P.M., Zhelev, N.Z., Hajduch, M. (2003): New lupane derived compounds with pro-apoptotic activity in cancer cells: synthesis and structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* 46: 5402-5415.

Sarek, J., Kvasnica, M., Vlk, M., Biedermann, D. (2010) Semisynthetic lupane triterpenes with cytotoxic activity. In *Pentacyclic Triterpenes as Promising Agents in Cancer* (Salvador, J. A. R., Ed.), Nova Science Publishers, New York. pp 159–189, Chapter 6.

Sherr, C. J. (2004): Principles of tumor suppression. *Cell.* 116 (2): 235–46.



Schwartzmann, G., Winograd, B., Pinedo, H.M. (1988): The main steps in the development of anticancer agents. *Radiother Oncol.*; 12: 301–313.

Soural, M., Hodon, J., Dickinson, N. J., Sidova, V., Gurska, S., Dzubak, P., Hajduch, M., Sarek, J., Urban, M. (2015): Preparation of conjugates of cytotoxic lupane triterpenes with biotin. *Bioconjugate chem.* 26: 2563 – 2570.

Suggitt, M., Bibby, M. C. (2005): 50 years of preclinical anticancer drug screening: Empirical to target-driven approaches. *Clin Cancer Res*; 11: 971–981.

Suryadinata, R., Sadowski, M., Sarcevic, B. (2010): Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. *Biosci Rep.* 17;30(4):243-55.

Urban, M., Kvasnica, M., Dickinson, N. J., Sarek, J. (2015): Biologically Active Terpenoids Usable as Prodrugs. In *Terpenoids and Squalene: Biosynthesis, Function and Health Implications* (Bates, A. R., Ed.) pp 25–50, Chapter 2, Nova Science Publishers, New York.

Urban, M., Sarek, J., Kvasnica, M., Tislerova, I., Hajduch, M. (2007): Triterpenoid pyrazines and benzopyrazines with cytotoxic activity. *J. Nat. Prod.* 70 (4): 526-532.

Vlk, M., Micolova, P., Urban, M., Kvasnica, M., Saman, D., Sarek, J. (2016): <sup>15</sup>N-labelled pyrazines of triterpenic acid. *J Radioanal Nucl Chem* 308: 733.

Weinberg, R. A. (2014): *The Biology of Cancer*. Garland Science, page 231.

Weinstein, I. B., Joe, A. K. (2006): Mechanisms of disease: Oncogene addiction—a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nature Clinical Practice Oncology* 3: 448–457.

Wick, W., Grimm, C., Wagenknecht, B., Dichgans, J., Weller, M. (1999): Betulinic Acid-Induced Apoptosis in Glioma Cells: A Sequential Requirement for New Protein Synthesis,

Formation of Reactive Oxygen Species, and Caspase Processing. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 289 (3): 1306–12.

Yano, S., Harada, M., Watanabe, K., Nakamaru, K., Hatakeyama, Y., Shibata, S., Takahashi, K., Mori, T., Hirabayashi, K., Takeda, M. (1989): Antiulcer Activity of Glycyrrhetic Acid Derivatives in Experimental Gastric Lesion Models. *Chem. Pharm. Bull.* 37: 2500–2504.

*Yoshida, B. A., Sokoloff, M. M., Welch, D. R, Rinker-Schaeffer C. W. (2000): Metastasis-suppressor genes: a review and perspective on an emerging field. J. Natl. Cancer Inst. 92 (21): 1717–30.*

Zhu, H., Pan, S., Gu, S., Bradbury, E. M., Chen, X. (2002): Amino acid residue specific stable isotope labeling for quantitative proteomics. *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* 16 (22): 2115–23.

Zuo, W.-J., Dai, H.-F., Chen, J., Chen, H.-Q., Zhao, Y.-X., Mei, W.-L., and Wang, J.-H. (2011): Triterpenes and Triterpenoid Saponins from the Leaves of *Ilex kudincha*. *Planta Med.* 77: 1835–1840.

## **7.2. Seznam použitých internetových zdrojů**

cancer.gov

czso.cz

uniprot.org

mdc-berlin.de

## **8. Seznam použitých zkratk a symbolů**

AA – kyselina octová

ACN – acetonitril

Acr-Bis – acrylamid/bis-acrylamid

APS – persíran amonný

BrdU- 5-bromo-2'-deoxyuridin

BrU- 5-bromouridin  
BSA – bovine serum albumin/Hovězí sérový albumin  
CDCl<sub>3</sub> – Deuterovaný chloroform  
CDK – cyklin-dependentní kináza  
DMF – dimethylformamid  
DMSO – dimethylsulfoxid  
DNA- 2'-deoxyribonukleová kyselina  
ELFO – elektroforéza  
FA – kyselina mravenčí  
FBS – fetální bovinní sérum  
FITC – fluorescein izothiokyanát  
FTIR – Fourierova transformovaná infračervená spektroskopie  
HPLC – high-performance liquid chromatography/vysokoučinná kapalinová chromatografie  
HRMS – High Resolution Mass Spectrometry/vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie  
IAA – kyselina indolactová  
IC<sub>50</sub> – střední inhibiční koncentrace; nejnižší koncentrace látky, která zabije 50 % nádorových buněk  
IgG – imunoglobulin G  
IR – infrared spectroscopy/infračervená spektroskopie  
LC-ESI – liquid chromatography–mass spectrometry/ kapalinová chromatografie-hmotnostní spektrometrie  
MeOH – methanol  
MS – hmotnostní spektrometrie  
MS H<sub>2</sub>O – voda s čistotou pro hmotnostní spektrometrii  
NMR – nuclear magnetic resonance spectroscopy/ spektroskopie nukleární magnetické resonance  
NP-40 - nonidet P-40  
p53 – protein/produkt 53 (transkripční faktor, produkt genu TP53)  
PAGE – polyakrylamidová gelová elektroforéza  
PBS – izotonický fosfátový pufr  
PBS-T – izotonický fosfátový pufr s přísadkou Tween-100  
PDA – photodiode-array/detektor diodového pole

PI-propidium jodid

ppm – parts per milion/počet dílů na jeden milion

r. t. - laboratorní teplota

RNA – ribonukleová kyselina

rpm – otáčky za minutu

RVO – rotační vakuová odparka

SDS – dodecylsírán sodný

SD-směrodatná odchylka

t. t – teplota tání

TCEP- tris(2-karboxyethyl)fosfin

TEMED - N,N,N',N'-tetramethylethylendiaminu

TFA – kyselina trifluoroctová

TFE – trifluoroethanol

TGS – tris/glycin/SDS pufr

TI – terapeutický index

TK H<sub>2</sub>O – autoklávovaná sterilní voda

TLC – thin layer chromatography/chromatografie na tenké vrstvě

Tris – tris(hydroxymethyl)aminometan





















