

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2013**

**Petr Daněk**

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



**Neziskové léky: Aktivita komplexu  
disulfiramů (antabusů) s mědí proti buněčné  
linii odvozené od osteosarkomu**

**Bakalářská práce**

**Petr Daněk**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2013**

**Vedoucí práce: Mgr. Boris Cvek, Ph.D.**

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod odborným vedením  
Mgr. Borise Cveka, Ph.D. s použitím citované literatury.

V Olomouci 19. dubna 2013

.....

podpis

## Souhrn

Osteosarkom je závažné rakovinné onemocnění postihující především děti a mladistvé. Každý rok zaznamenají lékaři více než 2 miliony nových případů osteosarkomu. Léčba této choroby je ve srovnání s minulostí poměrně efektivní, nicméně u metastatického osteosarkomu, kterým trpí každý pátý pacient, je šance na přežití pouze 60 %. K léčbě se používají vysoké dávky agresivních chemoterapeutik v kombinaci s chirurgickými zákroky, které mohou zahrnovat i amputaci postižených končetin. Vědci se proto snaží nalézt nová, efektivní a zároveň šetrná léčiva. Vhodným cílem takových léčiv se zdá být proteazom, neboť jeho inhibice je pro rakovinné buňky letální. V současnosti se v klinické praxi inhibitory proteazomu (bortezomib a carfilzomib) využívají pouze k léčbě krevních nádorů, protože proti solidním tumorům nebyly efektivní. Jako inhibitor proteazomu byl identifikován také diethyldithiokarbamátový komplex s mědí, který vzniká reakcí měďnatého iontu s metabolity starého léčiva antabusu, u něž byla už dříve zaznamenána biologická aktivita proti solidním tumorům *in vivo*. Experimentálně bylo prokázáno, že diethyldithiokarbamátový komplex s mědí je vůči buněčné linii odvozené od osteosarkomu vysoce toxický s hodnotou  $IC_{50} = 1,3 \mu\text{mol/l}$ . Silná *in vitro* toxicita vůči buňkám osteosarkomu, pravděpodobná schopnost potlačovat pevné tumory *in vivo* a zanedbatelné vedlejší účinky naznačují, že by antabus v kombinaci s mědí mohl být vhodným přípravkem pro léčbu osteosarkomu. Antabus má navíc potenciál stát se tzv. neziskovým lékem, protože se jedná o levný přípravek, na nějž se již nevztahují patentová práva, a sejmout tak ze zdravotnických systémů nesmírnou finanční zátěž, kterou léčba rakoviny představuje. Právě díky velmi nízkým nákladům antabusu, a tedy jeho neziskovosti, nebude žádná z farmaceutických firem do takovéto ztrátové investice vkládat peníze. Z tohoto důvodu je třeba zaplatit jeho klinické testy z veřejných zdrojů, o což se snaží např. Bostonská společnost GlobalCures, se kterou naše laboratoř spolupracuje.

## Summary

Osteosarcoma is a serious cancer prevalent among children and young people. There are more than 2 millions of newly diagnosed osteosarcomas per year globally. Compared to the past, the treatment of osteosarcoma is rather successful, yet every fifth patient suffers with the metastatic form of osteosarcoma with a chance to survive about 60 %. High doses of aggressive chemotherapeutic agents and surgery, which might involve even dismemberment of the affected limb, are used. Hence, researchers are trying to develop new, more effective and safer drugs. The suitable target for new anticancer drugs is proteasome, which is essential for the cancer cell viability. Proteasome inhibitors (bortezomib, carfilzomib) are used for the treatment clinically used for treatment of multiple myeloma, but are ineffective in solid tumors. The diethyldithiocarbamate complex with copper has been identified as a proteasome inhibitor. The complex is a product of the reaction of the copper (II) ion and diethyldithiocarbamate, the metabolite of the old drug antabuse (disulfiram), which shows intriguing biological activity against solid tumors *in vivo*. It has been determined that diethyldithiocarbamate-copper complex is highly toxic for the U-2 OS cell line derived from an osteosarcoma patient with the  $IC_{50} = 1,3 \mu\text{mol/l}$ . Strong *in vitro* toxicity against osteosarcoma cells, the potential ability to suppress solid tumours *in vivo*, and low level of adjacent effects suggest antabuse with copper could become the potent agent in the osteosarcoma therapy. Because its patent laws have been expired, antabuse is generic, i.e. very inexpensive drug. Thus, antabuse has been proposed to become pilot case of so-called non-profit drugs which could take off the enormous financial burden of the cancer treatment from the healthcare systems. Problem is that pharmaceutical industry won't invest into clinical trials of drugs which can't produce any profit. Thus, clinical trials of antabuse should be paid from the public resources, what is the intention of Boston-based GlobalCures, nonprofit organization we are collaborating with.

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.

### **Poděkování:**

Rád bych poděkoval panu Mgr. Borisi Cvekovi, Ph.D. za cenné rady, připomínky, konzultace a odborné vedení při zpracování bakalářské práce. Poděkování patří také panu Mgr. Jindřichu Sedláčkovi, který mne provedl experimentální částí práce a poskytl mi mnoho praktických rad.

## Obsah:

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>OSTEOSARKOM</b>	<b>2</b>
2.1.1	Nález, diagnóza a vývoj osteosarkomu	2
2.1.2	Etiologie	3
2.1.3	Komplikace	4
2.1.4	Léčba	4
<b>2.2</b>	<b>UBIKVITIN-PROTEAZOMOVÝ SYSTÉM (UPS)</b>	<b>9</b>
2.2.1	Struktura proteazomu	9
2.2.2	Ubikvitinace proteinů	15
2.2.3	Deubikvitinace	18
2.2.4	Degradace proteinů nezávislá na ubikvitinaci	20
2.2.5	Kompletní a částečná degradace vícepodjednotkových substrátů	21
<b>2.3</b>	<b>SIGNÁLNÍ DRÁHA NF-<math>\kappa</math>B</b>	<b>22</b>
2.3.1	Struktura NF- $\kappa$ B	22
2.3.2	NF- $\kappa$ B signální dráha a rakovina	24
2.3.3	NF- $\kappa$ B jako cíl protinádorové léčby	25
<b>2.4</b>	<b>INHIBICE PROTEAZOMU</b>	<b>26</b>
2.4.1	Antiangiogeneze	26
2.4.2	Zablokování buněčného cyklu	27
2.4.3	Upregulace proteinu p53	27
2.4.4	Rozvrácení vnitřní homeostázy buňky	27
<b>2.5</b>	<b>BORTEZOMIB – VELCADE</b>	<b>29</b>
2.5.1	Klinické testy	29
2.5.2	Mechanismus účinku bortezomibu	30
2.5.3	Negativní vlastnosti bortezomibu	32
2.5.4	Nová generace inhibitorů proteazomu	32
<b>2.6</b>	<b>DISULFIRAM (ANTABUS)</b>	<b>34</b>
2.6.1	Historie – disulfiram v praxi	34
2.6.2	Mechanismus účinku disulfiramu	35
<b>2.7</b>	<b>NOVÁ VYUŽITÍ PRO STARÁ LÉČIVA</b>	<b>40</b>



<b>3</b>	<b>CÍL PRÁCE</b> .....	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>44</b>
<b>4.1</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>44</b>
4.1.1	Biologický materiál.....	44
4.1.2	Chemikálie .....	44
4.1.3	Roztoky.....	44
4.1.4	Laboratorní vybavení .....	45
4.1.5	Přístroje.....	46
4.1.6	Použitý software.....	46
4.1.7	Hodnocení cytotoxicity pomocí MTT testu .....	46
4.1.8	Zpracování výsledků.....	50
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>51</b>
5.1.1	Vliv bortezomibu na viabilitu buněk buněčné linie U-2 OS .....	51
5.1.2	Vliv DDTC na viabilitu buněk buněčné linie U-2 OS .....	52
5.1.3	Vliv $\text{CuCl}_2$ na viabilitu buněk buněčné linie U-2 OS .....	53
5.1.4	Vliv komplexu $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ na viabilitu buněk buněčné linie U-2 OS.....	54
5.1.5	Určení hodnot $\text{IC}_{50}$ zkoumaných látek .....	56
<b>6</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>59</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	<b>65</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>67</b>
<b>10</b>	<b>PŘÍLOHY</b> .....	<b>85</b>

# 1 ÚVOD

Osteosarkom představuje velmi agresivní nádor vznikající transformací osteoblastů, který se objevuje především u dětí a mladistvých. Tomuto typu rakoviny podlehl i přes maximální úsilí lékařů např. slavný běžec Terry Fox, šampion v boxu Daniel Jacobs, či režisér a spisovatel Cameron Duncan. Nebezpečí osteosarkomu není dáno pouze rychlou proliferací transformovaných buněk, ale také častou tvorbou metastáz a odolností tumoru vůči léčbě. Standardní léčba zahrnuje neoadjuvantní chemoterapii, adjuvantní chemoterapii a chirurgický zákrok. Současná medicína udělala v léčbě osteosarkomu obrovský pokrok, razantně zvýšila šance pacientů na přežití a omezila nutnost amputací postižených končetin, na kterých se tumor nejčastěji vyskytuje. Problémem však zůstávají metastáze, které chemoterapie nemusí vždy zničit a jejich chirurgické odstranění není možné. K zahubení nádorových buněk je nutné podávat pacientům vysoké dávky agresivních toxických chemoterapeutik, které závažně poškozují zdraví převážně mladých lidí a komplikují jim život. Vědci se proto stále intenzivněji zaměřují na hledání nových léků proti osteosarkomu. Náklady na výzkum protirakovinných léčiv nesmírným tempem vzrůstají, nicméně počet nových léků stagnuje na velmi nízkém a zcela nedostatečném množství. Bylo vyvinuto několik strategií, jak získávat léčiva efektivněji, mezi něž se řadí tzv. drug repurposing – hledání nových využití pro stará léčiva. Staré léky, které by mohly mít protirakovinný efekt, zahrnují například přípravek používaný k averzní léčbě alkoholismu – antabus (disulfiram). Komplexy disulfiramu s mědí pravděpodobně inhibují činnost proteazomu, což vede k apoptotické smrti rakovinných buněk, vyznačujících se mnohem vyšší citlivostí k inhibici proteazomu než buňky zdravé. Inhibitory proteazomu se již v léčbě onkologických onemocnění používají, přičemž příkladem může být látka bortezomib (velcade). Pokud by se prokázala schopnost disulfiramu s mědí účinně usmrcovat transformované osteoblasty *in vivo*, mohl by se stát v léčbě osteosarkomu velmi účinnou látkou s téměř utopickými vlastnostmi – tedy preparátem vysoce toxickým vůči rakovinným buňkám, majícím minimálními vedlejšími účinky a zároveň velmi nízkou cenu. Cílem této bakalářské práce je pomocí MTT testu stanovit toxicitu disulfiramu s mědí vůči buněčné linii U-2 OS, rozebrat jeho mechanismus účinku a terapeutický potenciál v léčbě osteosarkomu. Má bakalářská práce zároveň představuje podklad pro práci diplomovou, jejíž experimentální část proběhne na Barbara Ann Karmanos Cancer Institute v Detroitu, a to díky pozvání tamějšího prof. Doua.

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 OSTEOSARKOM

Mohlo by se zdát, že osteosarkom není příliš běžným či podstatným onkologickým onemocněním, protože tvoří pouze 0,001 % všech rakovin, což v USA činí asi 16 000 diagnostikovaných případů osteosarkomu ročně; globálně pak toto procento tvoří každým rokem 2,1 milionu nově diagnostikovaných osteosarkomů. Nicméně je nutné se tomuto onemocněním náležitě věnovat, neboť se jedná o velmi agresivní formu rakoviny, jejíž léčba je obtížná a často způsobuje následné zdravotní komplikace, nebo dokonce trvalé poškození pacientova zdraví. [1] Osteosarkom představuje nejčastější primární maligní nádor kostí, vyskytující se především u dětí (15 % všech dětských rakovin) a mezi šedesátým a sedmdesátým rokem života. [2] Zároveň se jedná o nádor s druhou nejhorší prognózou a druhou nejvyšší úmrtností ze všech rakovin vůbec. Nebezpečnost tohoto nádorového onemocnění je dána zejména jeho odolností, rychlostí proliferace a častou tvorbou metastáz. [3]

#### 2.1.1 Nález, diagnóza a vývoj osteosarkomu

Osteosarkom patří mezi maligní solidní nádory kostí a je produkován osteoblasty. [1] Maligní mezenchymální neoplazmy jsou složeny z neoplastických buněk. Z těchto maligních neoplazem postupně vzniká osteoid, který pak způsobuje vytvoření samotného osteosarkomu. [2] Nejčastěji se vyskytuje na dlouhých kostech, a sice v distální části stehenní kosti, proximální části kosti holenní a proximální části kosti pažní. Nádor svůj růst začíná intramedulárně, postupně prorůstá k povrchu kosti, až nakonec penetruje kortex. Jakmile tumor prostoupí ven z kosti, dojde ke stlačení okolního svalstva a vytvoření pseudokapsulární vrstvy, tzv. reaktivní zóny, [3] která na radiových snímcích připomíná krajkovou strukturu. [2]

Prvním symptomem, který signalizuje přítomnost osteosarkomu, je bolest v inkriminovaném místě. Nejprve se jedná o slabší, popřípadě noční bolesti, které postupně přejdou v bolesti velmi úporné a intenzivní. V současné době známe velké množství diagnostických metod, zahrnujících různá radiologická vyšetření (CT – computed tomography), angiografii a mnoho dalších. Nejvýznamnější a nejspolehlivější diagnostickou metodou je biopsie [1]. Biopsie se musí provádět velmi opatrně a odborně,

neboť její nepřesné provedení nebo zanedbání může pro pacienta znamenat mnoho komplikací, například návrat tumoru, tvorbu metastází či horší prognózu. [2]

### 2.1.2 Etiologie

Ne všechny příčiny a spouštěcí mechanismy osteosarkomu jsou přesně prozkoumány a potvrzeny, nicméně ohledně jeho vzniku existuje několik hypotéz. Jednou z nich je jisté spojení mezi zvýšeným růstem pacienta a výskytem osteosarkomu. Osteosarkom se totiž u adolescentů a dětí vyskytuje v místech, kde kosti rostou nejvíce (distální část stehenní kosti, proximální část holenní kosti a proximální část kosti pažní). [4] Rychle se dělící buňky rostoucí kosti pravděpodobně vykazují vyšší náchylnost k nekontrolovanému bujení; [5] navíc byla zjištěna pozitivní korelace mezi výškou pacientů, kteří jsou většinou vyšší než jejich vrstevníci, a výskytem osteosarkomu femuru, [4] která nemá obdoby ani u jiných nádorů kostí, ani u starších pacientů. [3] Hypotézu potvrzuje také publikace A. Longhio a kol., uveřejněná v roce 2005, podle které se u dívek nádory nejčastěji objevují v průměru kolem dvanáctého roku života a u chlapců až po dosažení čtrnácti let, a to z toho důvodu, že dívky vyspívají dříve než chlapci. [6]

Dlouhodobá (10 až 20 let) expozice ionizujícímu záření, způsobující osteosarkom u starších lidí, je zatím jedinou naprosto potvrzenou a zdokumentovanou příčinou vzniku tohoto onemocnění. Takto vzniklé osteosarkomy však nejsou příliš obvyklé, neboť jejich zastoupení činí pouhé 2 %. [3] Mohou se však objevit jako následek léčby jiného typu rakoviny ozařováním, a to jak u dětí, tak u dospělých. Riziko vzniku osteosarkomu po podstoupení radioterapie se zde oproti normální, zdravé populaci navyšuje až devětkrát. [7-8]

Osteosarkom je spojen s přítomností genetických aberací, které se mohou fenotypově projevat jako Li-Fraumeniho nebo Rothmund-Thomsonův syndrom. U některých pacientů s diagnostikovaným osteosarkomem byly detekovány chromozomové mutace, např. zmnožení 1. chromozomu, ztráta 9., 10., 13. a 17. chromozomu a abnormality v 11., 19. a 20. chromozomu. Objevují se také mutace *RB* (retinoblastomového) genu [3] a *RECQL4* (RecQ Protein-Like 4) genu. [9] Za potenciální příčiny vzniku osteosarkomu se rovněž považuje přítomnost c-Jun protoonkogenu [10] a P-glykoproteinu. [11] U 18-30 % osteosarkomů se vyskytuje mutace p53 tumor supresorového genu. [1-2] Tento gen/protein hraje důležitou roli v inhibici růstu tumoru, v tvorbě metastází, angiogenezi a regulaci buněčného cyklu. [3]

### 2.1.3 Komplikace

Nejčastější komplikací osteosarkomu je tvorba metastáz, které se vyskytují přibližně u 20 % pacientů, přičemž v drtivé většině případů metastatického osteosarkomu dochází k přenosu uvolněných buněk prostřednictvím lymfatického systému. Primárně se metastáze objevují nejčastěji v plicích, sekundárně se pak mohou nalézat např. v kostech jako tzv. skip metastáze; ty se však vyskytují u méně než 10 % případů. [1 a 12] Vznik metastáz značně zhoršuje prognózu a snižuje šanci pacienta na přežití, která se v případě plicních metastáz v současnosti pohybuje okolo 60 %, nicméně před zavedením kombinované léčby chemoterapeutiky a speciálních chirurgických zákroků byla šance na přežití metastatického osteosarkomu téměř nulová. Skip metastáze se vytvářejí na stejné kosti jako tumor, ale až po vyvinutí plicních metastáz. Jejich přítomnost svědčí o velmi pokročilém stavu nemoci, kdy bývá prognóza onemocnění nejhorší a šance na uzdravení pacienta mizivá i v případě použití moderní léčby. Protože se tumor šíří především lymfatickým systémem, mohou se metastáze vzácně objevit také v lymfatických uzlinách. [1 a 3]

Mezi významné komplikace osteosarkomu patří také lokální návrat tumoru, jehož četnost závisí na zvoleném typu léčby a pohybuje se od 2,8 % do 6,2 % během prvních pěti let od diagnózy, přičemž platí, že čím je léčba intenzivnější, tím je pravděpodobnost lokálního návratu osteosarkomu nižší. [3] Pravděpodobnost návratu onemocnění se samozřejmě u agresivnějších forem osteosarkomu zvyšuje, zejména u metastatických forem. [1] Obecně nejvyšší riziko relapsu hrozí v období 5 až 10 let od diagnózy, kdy se může vyšplhat až na 28 %. [13]

### 2.1.4 Léčba

Jedinou úspěšnou léčbu v minulosti představovala včasná amputace postižené končetiny, kdy se šance na přežití v případech bez komplikací pohybovala kolem 15 %. Úspěšnější a efektivnější léčba osteosarkomu se začala rozvíjet až od 80. let 20. století, a to především díky kombinované terapii. Ta spočívá v podávání různých kombinací chemoterapeutik, která přicházejí ve dvou vlnách (neoadjuvantní a adjuvantní chemoterapie), a v chirurgickém zákroku, tedy resekci tumoru, popřípadě amputaci či radioterapii.

Můžeme pokládat za úspěch, že šance na přežití osteosarkomem se v dnešní době pohybuje od 50 % až k 90 %, v závislosti na stavu pacienta, fázi onemocnění, agresivitě nádoru a dalších komplikacích, které mohou při léčbě nastat. [1] Při podrobnějším prozkoumání však zjistíme, že tato statistika není až tak pozitivní. Léčiva i zákroky jsou značně invazivní a poškozují zdravotní stav pacienta, a to jak akutně, tak i s trvalými následky, mezi které často patří vývoj dalšího typu rakoviny či selhání srdce. [14] Zanedbatelné nejsou ani s léčbou spojené sociální a psychické problémy.

#### **2.1.4.1 Amputace**

Amputace postižené končetiny byla před rokem 1970 standardní a jedinou léčbou, která mohla pacientům s osteosarkomem pomoci. [3] Mezi její hlavní negativa patří poměrně markantní a trvalý zásah do pacientova života, což s sebou nese sociální, finanční i psychické problémy. [1] Z těchto důvodů byla amputace nahrazena šetrnější chirurgickou metodou, tzv. limb-salvage surgery (končetinu zachovávajícím výkonem). Ačkoli limb-salvage surgery představuje pro pacienta šetrnější řešení, je díky potenciální nedostatečné resekcii všech nádorových ložisek spojena s vyšší četností návratu onemocnění. [2] Proto amputace z operačních sálů ani v dnešní době ještě úplně nevymizela a v 10 až 15 % případů se stále používá, a to zejména u pacientů trpících velmi agresivním druhem osteosarkomu. [1]

#### **2.1.4.2 Radioterapie**

Pokud je chirurgický zásah shledán příliš nebezpečným a složitým, například pro svou lokalizaci v oblasti obličeje či blízkém okolí páteře, odstraňuje se tumor ozařováním. [2] Nejedná se tedy o standardní druh léčby. Navíc je radioterapie spojována s dalšími zdravotními riziky, z nichž mezi nejzávažnější patří výskyt sekundárních malignancí, nedostatečné odstranění tumoru a jeho následný lokální návrat. [1]

#### **2.1.4.3 Limb-salvage surgery**

Limb-salvage surgery (končetinu zachovávající výkon) byl zaveden již v 70. letech 20. století jakožto alternativa do té doby používané amputace a v současné době je tímto zákrokem řešeno asi 95 % osteosarkomů. Jedná se o výkon, který musí být velmi dobře načasován a kterému musí předcházet řada složitých vyšetření, zahrnujících CT, biopsii,

angiografii, magnetickou rezonanci, pozitronovou tomografii a další. [1 a 12] Limb-salvage surgery se sestává ze tří částí. První z nich představuje resekce tumoru a okolní tkáň, následně dochází k rekonstrukci kosti pomocí různých implantátů, endoprotéz či štěpů a nakonec se postižené místo překryje svalovinou tak, aby zůstala zachována motorika končetiny. [1-2] Pacienti, kteří podstoupili tuto operaci, se poměrně rychle vracejí k normálnímu životu bez výraznějších problémů se zařazením do společnosti, dosažením vzdělání, v sexuálním a partnerském životě či v zaměstnání. [14] Nicméně bez vhodné chemoterapie by končetinu zachovávající výkon nebyl dostatečně efektivní léčbou. [1]

#### **2.1.4.4 Chemoterapie**

Před zavedením chemoterapie byla šance na přežití osteosarkomu velmi malá. Lidé umírali nejčastěji po resekcii tumoru na jeho návrat nebo na plicní metastáze. [1] Z tohoto důvodu došlo k zavedení chemoterapeutik, schopných zmenšovat velikost tumoru usmrcováním rakovinných buněk, a to včetně makroskopicky nepozorovatelných nádorových ložisek. Současná systémová chemoterapie efektivně potlačuje jak tumor samotný, tak jeho metastáze včetně skip metastází, nicméně jejím problémem zůstává nedostatek specifity proti rakovinným buňkám. Chemoterapie tak s sebou nese mnoho akutních i chronických zdravotních problémů, toxicitu vůči organismu a poškození tkání, jako je myokard či sliznice trávicí trubice; dále také způsobuje narušení vlasových kořínků, úbytek myelinových pochev a podobně. [2] Chemoterapie se nasazuje ve dvou vlnách, a to neoadjuvantně (před operací) a adjuvantně (po operaci). V léčbě osteosarkomu jsou nejvíce používány tyto látky: cisplatina (CDDP), methotrexát (MTX), adriamycin (ADM), ifosfamid (IFOS), doxorubicin (DOX) a etoposid. Různá kombinace těchto chemoterapeutik pak maximalizuje terapeutický efekt. [15]

Cisplatina (CDDP) je poměrně účinné léčivo, nicméně pacientům způsobuje řadu závažných problémů, například ztrátu sluchu. Riziko nevratného poškození tohoto smyslu je v nepřímé úměře s věkem, ve kterém byl pacient cisplatině exponován. K úplné ztrátě sluchu dochází postupně asi u 15 až 20 % dětských pacientů, přičemž celkem 40 % pacientů zažívá během léčby jeho zhoršení. [16] Mezi další závažný vedlejší účinek cisplatiny řadíme nefrotoxicitu, způsobenou snížením činnosti glomerulu a následným poškozením tubulárních buněk. Výsledkem tohoto procesu je ztráta a následný nedostatek iontů. Problémy s ledvinami se vyskytují u 90 % léčených. [15] Cisplatina rovněž

způsobuje dočasnou infertilitu mužů, přičemž středně silné dávky cisplatiny vyvolávají neplodnost u 19 % mužů a vysoké dávky až u 47 %. Obnova spermatogeneze nastává v průběhu pěti let od dokončení léčby u 80 % mužů. [17]

Doxorubicin patří mezi anthracykliny a používá se k léčbě 60 % dětských rakovin. [18] Anthracykliny zvyšují produkci volných radikálů, které poškozují DNA, což může vést ke vzniku dalších nádorů. [2] Doxorubicin a ostatní anthracykliny jsou navíc kardiotoxické a vyvolávají tedy poškozování a usmrcování buněk srdeční svaloviny. [15] Následkem bývá selhání srdce, jehož četnost u pacientů léčených doxorubicinem stoupá osmkrát oproti běžné populaci. [18]

Při léčbě osteosarkomu je často používán methotrexát, který může být při dlouhodobější expozici nebo při administraci velkých dávek příčinou dermatitidy, mukoitidy, hepatitidy a myelosuprese. Neurologické problémy spojené s myelosupresí zahrnují změny osobnosti, proměnlivost nálad (bezdůvodný smích až letargie), slepotu či epilepsii. Většina z těchto negativních účinků není chronická a objevuje se zpravidla po druhé nebo třetí dávce. K metabolizaci methotrexátu dochází v ledvinách, kde působí nefrotoxicky. Poškozené ledviny jej nedokáží dostatečně odbourávat a methotrexát se tak hromadí v těle pacienta, kde zároveň zvyšuje míru ostatních toxicit. [15]

K léčbě rakoviny včetně osteosarkomu se již od 70. let 20. století používá ifosfamid. Jeho zavedení markantně zvýšilo šanci pacientů na přežití, avšak s jeho metabolity je spojena velká řada toxicit. Metabolizací ifosfamidu v těle vzniká choracetaldehyd, který se následně usazuje v ledvinách a závažným způsobem je poškozuje. V důsledku poškození pak dochází ke ztrátě elektrolytů, solí, glukózy a dalších důležitých látek. [19] U 20 % dětí léčených ifosfamidem se navíc objevují změny mentality, poruchy mozkových funkcí, záchvaty a dysfunkce mužských i ženských gonád. [15]

Léčivo etoposid se používá především v kombinačních terapiích s jinými léčivy, jejichž účinnost dosahuje vysokých hodnot. Nicméně i etoposid je, stejně jako ostatní chemoterapeutika, spojen s řadou zdravotních problémů a toxicit, mezi které patří snížení počtu bílých krvinek a následné problémy s imunitou, akutní nevolnost, zvracení, kožní problémy (alopecie) a neurotoxicita. [20]



Potlačení vedlejších účinků chemoterapeutik, popřípadě vývoj nových, šetrnějších a zároveň účinnějších léčiv, představuje nejvýznamnější oblast současného onkologického výzkumu. Farmaceutické firmy i státy věnují na tyto účely horentní finanční sumy. Mezi takové nově syntetizované látky patří například dexrazoxan, který je schopen inhibovat akutní kardiotoxicitu anthracyklinů, aniž by snížil jejich účinnost. Je schopen koordinačně vázat těžké kovy, které poškozují buňky, a vychytávat volné radikály. [15] Velmi slibnou strategií v této snaze se zdá být tzv. cílená léčba, která na rozdíl od klasických chemoterapeutik selektivně zasahuje transformované rakovinné buňky a nepoškozuje zdravou tkáň. Mnoho takových léčiv se již dostalo do první fáze klinických testů. Jedná se například o inhibitory receptoru vaskulárního endoteliálního růstového faktoru VEGF (inhibicí blokuje angiogenezi tumoru), inhibitory NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B) dráhy, která je nezbytná pro diferenciaci a přežití osteoklastů, a převážně další inhibitory buněčných signálních drah či monoklonální protilátky. [21] Vědci zároveň zkoumají léčbu osteosarkomu pomocí genové terapie. Ta spočívá ve vnesení požadované genetické informace do nemocných buněk bakteriálním plazmidem nebo pomocí viru. [2] K cílené léčbě by mohly přispět také nanotechnologie, kde nanočástice slouží jako nosič léčiva, které se z něj uvolní až v místě nádoru. [22] Cílenými léčivy můžeme však také nazývat různé skupiny látek, např. inhibitory cyklin-dependentních kináz nebo inhibitory proteazomu.

## 2.2 UBIKVITIN-PROTEAZOMOVÝ SYSTÉM (UPS)

Proteazom je buněčný multiproteinový komplex velký přibližně 2,5 MDa. Vyskytuje se v eukaryotických buňkách, kde zodpovídá za degradaci proteinů, ať už se jedná o poškozené a nepotřebné polypeptidy, regulační proteiny, části signálních drah či transkripční faktory. V buňce se nachází v cytoplazmě, jádře, [23] endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu. [24] Napomáhá udržovat proteinovou homeostázu buňky, neboť je nedílnou součástí mnoha důležitých buněčných procesů, jako např. aktivace a inaktivace signálních drah, regulace buněčného cyklu, stárnutí buňky, imunitní odpovědi a expozice antigenů, buněčná diferenciaci i růst. [25] Poruchy a mutace proteazomu nebo různých částí ubikvitin-proteazomového systému vedou ke vzniku závažných poruch, mezi které patří Parkinsonova choroba, atheroskleróza, Huntingtonova choroba a další neurodegenerativní onemocnění či metabolické poruchy. [26-28] V buňkách se nachází velké množství důležitých proteinů, které proteazom v dané chvíli degradovat nesmí. Aby mohla buňka degradaci regulovat, musí přesně rozlišovat funkční a potřebné proteiny od proteinů redundantních. K této selekci slouží v buňce relativně malé proteiny – ubikvitiny, kterými jsou proteiny určené k degradaci označeny. Mechanismus značení proteinů ubikvitinem představuje nesmírně složitý a komplikovaný proces, který bude popsán až po kapitole zabývající se strukturou proteazomu. Nesčetné množství regulačních proteinů, proteinů rozpoznávajících substráty a rozsáhlá plejáda biologických funkcí a signálních drah, ve kterých je proteazom zapojen, činí z UPS skutečně složitý a komplexní buněčný aparát.

Velmi zjednodušeně řečeno, degradace proteinu probíhá tak, že je protein pomocí specifického souboru enzymů označen několika molekulami ubikvitinu, tzv. polyubikvitinovým řetězcem. Takto označený protein rozpoznávají specifické proteazomální receptory, které iniciují proces vedoucí k rozštěpení vazby mezi polyubikvitinovým řetězcem a proteazomálním substrátem. Následně dojde za spotřeby ATP k rozvolnění struktury proteinu a jeho následnému vtažení do proteazomu, kde nastává degradace daného proteinu, tedy rozštěpení této makromolekuly na krátké peptidy.

### 2.2.1 Struktura proteazomu

Proteazom se skládá ze dvou základních částí. Jednak z proteolyticky aktivní části, která je nazývána 20S proteazom nebo také CP (core particle), a části regulační – RP (regulation

particle). V klasickém pojetí proteazomu tvoří regulační část proteazomu 19S, ale celý proteazom vykazuje poměrně výraznou strukturní heterogenitu, díky které známe různé RP s různými funkcemi (PA28, PA200 atd.). Kompletní 26S proteazom má vlastně podobu jakéhosi válce (CP), který je zakončen z každé strany jednou RP, i když CP a RP se v buňkách vyskytují také samostatně. [29]

### 2.2.1.1 Struktura a složení 20S proteazomu (CP)

20S tvoří katalytickou jednotku 26S proteazomu sestavenou z 28 podjednotek, uspořádaných do čtyř k sobě přilehlých heteroheptamerních prstenců. Ty vytváří katalytickou komoru, v níž jsou proteiny degradovány. Tři katalytická centra neboli aktivní místa proteazomu se nacházejí na dvou vnitřních kruzích, nazývaných  $\beta$ -kruhy. Každý  $\beta$ -kruh je sestaven ze sedmi  $\beta$  podjednotek, přičemž aktivní místa se nacházejí na  $\beta 1$  podjednotce (hydrolýza vazeb především na C konci aminokyselin),  $\beta 2$  podjednotce (štěpí vazbu po lyzinu a argininu) a  $\beta 5$  podjednotce (štěpí následující vazbu v řetězci po hydrofobních aminokyselinách). [30] Proteazom tedy degradované proteiny nerozkládá na jednotlivé aminokyseliny, ale na kratší peptidové řetězce (často oligopeptidy), které jsou v buňce znovu využity, nebo dále štěpeny peptidázami. [31]

Na dvojici  $\beta$ -kruhů nasedá z každé strany jeden  $\alpha$ -kruh, tvořený sedmi  $\alpha$  podjednotkami. Tyto  $\alpha$ -kruhy mají několik funkcí. Jednak se jejich pomocí RP přichycuje k 20S, a jednak tvoří svými N konci uzavíratelný kanál, který umožňuje vstup pouze těm proteinům, které mají být degradovány. [31] V každé  $\alpha$  podjednotce se nacházejí kapsy, do kterých jsou zavedeny volné C koncové řetězce nasedajících podjednotek RP. Tyto řetězce udržují RP asociovanou s 20S a ovlivňují otevírání translokačního kanálu. N konce  $\alpha$  podjednotek blokují vstup do katalytické komory (dovolují výstup pouze peptidům o délce sedmi a méně aminokyselin). C koncové řetězce, které jsou zavedeny do kapes v  $\alpha$  podjednotkách, vycházejí z ATPázového kruhu 19S proteazomu (viz níže). Hydrolýza ATP v ATPázách 19S iniciuje jejich konformační změny, a ty se volnými C konci převádějí do  $\alpha$  podjednotek. Následná změna konformace představuje rotaci  $\alpha$  podjednotky kolem glycinu 128 (Gly128), jejímž výsledkem je odstranění volných N konců z prostoru katalytické komory a umožnění vstupu proteinu. [32] ATPázové C konce v kapsách  $\alpha$  podjednotek také výrazně přispívají ke stabilitě 26S proteazomu. [33]

## 2.2.1.2 Struktura RP

### 2.2.1.2.1 19S proteazom (PA700)

19S proteazom představuje multiproteinový komplex, tvořený dvěma segmenty. Prvním z nich je báze, která nasedá na  $\alpha$  kruh CP; druhý segment se pak nazývá víko.

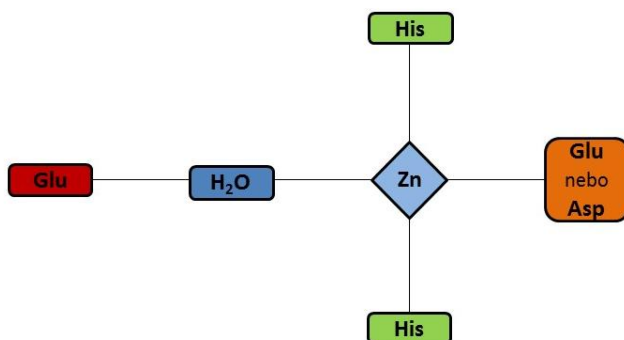
Bázi tvoří 6 AAA ATPáz (Rpt1, Rpt2, Rpt3, Rpt4, Rpt5 a Rpt6) a 4 další proteiny (Rpn1, Rpn2, Rpn10 a Rpn13), jejichž funkce není závislá na hydrolýze ATP. [34-35] ATPázy umožňují převedení proteinu na jeho primární strukturu, otevření brány do katalytické komory (rotace  $\alpha$  podjednotek) a translokaci proteinu přes kanál do katalytické komory CP. [36] Tyto děje jsou energeticky velmi náročné a na degradaci jednoho proteinu spotřebují ATPázy 300 až 400 molekul ATP. [37] Jednotlivé ATPázy v bázi 19S proteazomu mají pravděpodobně rozdílnou funkci, například Rpt2, Rpt3 a Rpt5 zřejmě zodpovídají za otevírání translokačního kanálu. ATPázy jsou situovány v takových polohách, že jejich rozmístění zaujímá tvar jakéhosi točitého schodiště. Toto uspořádání má pravděpodobně klíčový význam v posunu proteinu do katalytické komory. ATPázy procházejí vlivem hydrolýzy ATP jedna po druhé postupnými konformačními změnami a posouvají substrát do 20S proteazomu (CP). [38]

Mezi největší podjednotky proteazomu řadíme ATP independentní proteiny Rpn1 a Rpn2, [39] které jsou uspořádány do formy  $\alpha$ -helikálních toroidů umístěných sériově za sebou uvnitř ATPázového prstence. Pravděpodobně spojují místo vazby substrátu na proteazom s  $\alpha$  podjednotkami CP, čímž se podílí na translokaci substrátu. [40] Rpn1 a Rpn2 dále slouží jako jakési lešení pro další proteiny – tedy místo, na které se mohou vázat. Na Rpn2 se tak například navazuje ubikvitinový receptor Rpn13, zatímco na Rpn1 deubikvitináza (DUB) Ubp6. [39] Ubp6 představuje důležitý enzym, který se podílí na recyklaci ubikvitinu a který má dokonce schopnost inhibovat proteazomální degradaci proteinů. [41] Rpn13 tvoří na C konci 3 smyčky z  $\beta$  skládaných listů, které nesou tzv. Pru domény (pleckstrin-like receptor for ubikvitin) vážící ubikvitinový Leu8, Ile44 a Val70. Na svém N konci Rpn13 naopak nese vazebné místo deubikvitinového enzymu (DUB) Uch37, jehož prostřednictvím získává schopnost modifikovat (zkracovat) ubikvitinové řetězce a regulovat tak proces proteinové degradace. [42] Uch37 má však další významné regulační role, kdy kromě modifikace ubikvitinových řetězců například potlačuje degradaci substrátů s malými ubikvitinovými řetězci. [43-44] Rpn13 není jediným vazebným místem

pro ubikvitin, kterým proteazom disponuje. Na vazbě ubikvitinů se podílí také podjednotka Rpn10, asociovaná s proteazomem prostřednictvím proteinu Rpn2. Tento receptor rozpoznává ubikvitin pomocí svých dvou  $\alpha$  helikálních ubikvitin-interagujících míst. [39]

Druhou, menší část 19S proteazomu, tvořenou pouze devíti podjednotkami, představuje tzv. víko. Nejdůležitější funkcí víka je pravděpodobně deubikvitinace substrátu, jenž se pro správný průběh proteazomální degradace proteinů zdá být naprosto esenciální. Proteazom sice rozpoznává svůj substrát detekcí polyubikvitinového řetězce, ale tento řetězec musí být od proteinu před samotnou degradací ze sterických důvodů oddělen. Délka polyubikvitinového řetězce 4 ubikvitinů totiž dosahuje přibližně 28 Å, zatímco průměr katalytické komory 20S proteazomu je asi pouze 13 Å. [45] Velmi důležitým proteinem víka, který tuto funkci zajišťuje, je DUB Poh1 (u kvasinek Rpn11) obsahující metalloenzymovou doménu JAMM. [46] S tímto poznatkem jsou konzistentní i nejnovější výzkumy, které ukazují, že se Poh1 nachází přímo nad translokačním kanálem ústícím do 20S proteazomu, což zajišťuje jeho kontakt s ubikvitinovými receptory Rpn10 a Rpn13. [38] Velmi podstatnou součástí JAMM domény představuje atom zinku. Ten na sebe váže dva histidiny (His70 a His72), nacházející se na hlavním  $\beta$  listu Poh1, dále glutamovou nebo asparagovou kyselinu na druhém  $\alpha$  helix Poh1 a současně molekulu vody, s níž je spojena další glutamová kyselina (Glu25) (viz Obr. 1), která tvoří součást smyčky mezi prvním  $\alpha$  helix a druhým  $\beta$  listem Poh1. Zinek je pro fungování aktivního místa Poh1 zcela zásadní. [46-48]

**Obr. 1** – Struktura JAMM domény



Poh1 obsahuje celkem dva zinečnaté ionty. Mechanismus odštěpení probíhá reakcí zinku s molekulou vody za vzniku hydroxidového aniontu OH<sup>-</sup>, který nukleofilně napadá izopeptidovou vazbu mezi ubikvitinem a proteinem určeným k degradaci. Glutamová kyselina se nachází v blízkosti zinečnatého iontu a funguje zde zároveň jako donor

i akceptor elektronů. [48-49] Tímto mechanismem odštěpuje Poh1 ze substrátu celý ubikvitinový řetězec najednou. Isopeptidázová aktivita potřebná pro deubikvitinaci Poh1 tedy závisí na zinečnatém iontu ( $Zn^{2+}$ ).

Cysteinové DUBy, tedy ty, které nemají v aktivním místě kovový iont, ale cystein, jsou inhibovány vazbou ubikvitin-aldehydu, který blokuje cystein v aktivním místě a DUBy pak ztrácejí svou funkci – nemohou deubikvitinovat proteiny. JAMM doména Poh1 enzymu však k těmto inhibitorům vykazuje rezistenci, protože v aktivním místě neobsahuje cystein, se kterým by ubikvitin-aldehyd mohl interagovat. [50] Na druhou stranu je ale JAMM doména, respektive Poh1, inhibovatelná např. chelátory zinku TPEN (N,N, N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)-ethylendiamin). Inhibice JAMM domény, důležité pro deubikvitinaci proteinů, by zákonitě měla zablokovat celý proces ubikvitin dependentní degradace. [51]

Deubikvitinace není jedinou funkcí, kterou Poh1 v buňce zastává. Zřejmě rovněž zodpovídá za stabilitu 26S proteazomu, vznik mnohočetných rezistencí vůči léčivům nebo zvyšování exprese některých tyrozin kináz, které mohou podporovat proliferaci buněk a zhoršovat prognózu rakovinných onemocnění. Po umlčení genu pro Poh1 (RNA interference) vykazovaly buňky stejný fenotyp, jako buňky s inhibovaným proteazomem, což je pro rakovinnou buňku letální stav. Poh1 tedy představuje zajímavý cíl onkologických výzkumů. [52-53]

#### **2.2.1.2.2 PA28 (11S)**

PA28, neboli 11S, je jednou z několika regulačních částic proteazomu. Tvoří ji ATP independentní homoheptamerní nebo heteroheptamerní kruh, složený z kombinace tří homologů: PA28 $\alpha$ , PA28 $\beta$  a PA28 $\gamma$ . Funkce této regulační podjednotky souvisí zejména s funkcí imunitního systému, kde hraje proteazom s PA28 (někdy nazýván také jako imunoproteazom) nezastupitelnou roli, neboť se uplatňuje v prezentaci antigenů na povrchu buňky přes MHC I molekuly. [39 a 54] K vytvoření této regulační části a k jejímu nasednutí na 20S proteazom dochází na podnět imunitního systému, a to konkrétně působením INF- $\gamma$  (interferon  $\gamma$ ). INF-  $\gamma$  moduluje enzymatickou aktivitu 20S proteazomu výměnou katalyticky aktivních  $\beta$  podjednotek za jejich homology s pozměněnou hydrolytickou aktivitou, která je pro správnou funkci imunitního systému vyžadována. [55] Na tvorbě imunoproteazomu se podílí pouze homology PA28 $\alpha$  a PA28 $\beta$ .

Výskyt PA28 $\gamma$  byl zaznamenán především v jádrech nervových buněk, kde předešlé dva homology naopak chybí, přičemž jeho role v imunitním systému nebyla pozorována. Experimenty potvrdily, že PA28 $\gamma$  ovlivňuje regulaci buněčného cyklu a apoptózu, kterou pravděpodobně inhibuje – nervové buňky pak mají hladinu tohoto proteinu zvýšenou, protože jejich odumírání bez závažných důvodů není žádoucí. [54 a 56] Zvýšená koncentrace PA28 $\gamma$  byla navíc naměřena v některých nádorových buňkách. [57] Funkce PA28 $\gamma$  spočívá pravděpodobně v ubikvitin independentní degradaci proteinů, včetně regulátorů buněčného cyklu. [58]

### **2.2.1.2.3 PA200**

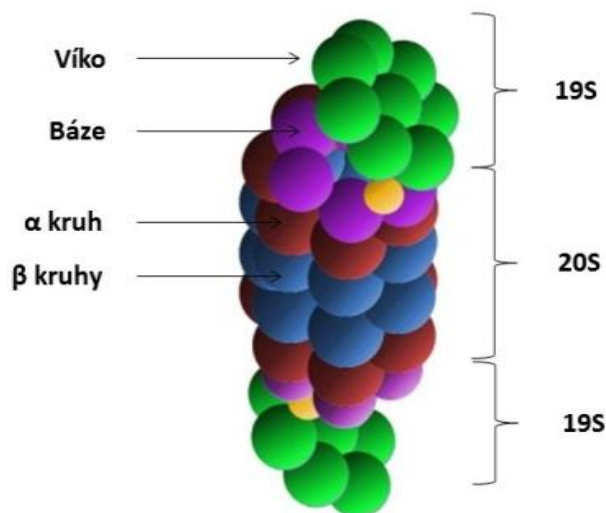
Tato RP se uplatňuje především při buněčné reakci vůči stresu a má úlohu v procesech opravy poškozené DNA. Jedná se o poměrně velký multiproteinový komplex (200 kDa), který selektivně a ATP independentně zprostředkovává hydrolyzu některých polypeptidů. [59]

### **2.2.1.3 Člunkové faktory proteazomu**

Člunkové faktory představují volné cytoplazmatické proteiny, které fungují jako receptory ubikvitinu. Přestože nepatří mezi stálé součásti proteazomu, jsou pro jeho správnou funkci potřebné. Jedná se o proteiny Rad23, Dsk2 a Ddi1. Člunkové faktory na svém C konci obsahují UBA doménu (ubiquitin associated domain), tvořenou třemi  $\alpha$  helixy, díky které váží molekuly ubikvitinu. Na N konci člunkových faktorů se naopak nachází UBL doména (Ubiquitin-Like Domain), prostřednictvím které tyto faktory, někdy také nazývané UBA/UBL proteiny, interagují s proteazomem (přes Rpn1, Rpn10 a Rpn13). Další domény, které se u člunkových faktorů vyskytují, zajišťují jejich vyšší selektivitu a specifitu a rovněž slouží jako regulační signály. [39] Součástí proteinu Rad23 je LRR doména (leucin-rich-repeat domain), která interaguje s Rpn proteiny. Člunkové faktory, jakožto substechiometrické části proteazomu (nemusí být přítomny v každém proteazomu), zastávají funkci dopravy ubikvitinem označených proteinů k degradaci. [60] Podle jistých teorií se váží na konkrétní ubikvitin ještě před jeho připojením na substrát, a to přes vazbu s jeho specifickou ligázou. UBA/UBL proteiny tak mají důležitou regulační funkci. V cytoplazmě se mohou spojovat s dalšími proteiny (např. s volným Rpn10), a tyto

komplexy, stejně jako třeba nadměrná exprese Rad23, stabilizují polyubikvitinový řetězec, čímž inhibují proteazomální degradaci proteinů. [61]

**Obr. 2** – Struktura a uskupení 26S proteazomu



### 2.2.2 Ubikvitinace proteinů

Od objevu proteazomu stále zůstává nejasné, jakým způsobem dokáže tato struktura rozpoznat proteiny určené k degradaci od těch, které být degradovány nemají. Přestože došlo k četným objevům a k částečnému objasnění mechanismu této specifity, podstata a původní příčiny specifické degradace proteinů zůstávají stále z velké části neznámé. Jistě však víme, že proteazom rozpoznává ubikvitinové řetězce, kterými jsou proteiny určené k degradaci označeny, svými receptory Rpn10 a Rpn13. [62]

Protein ubikvitin byl objeven v roce 1975 skupinou vědců pod vedením doktora Goldsteina. Jedná se o poměrně malou molekulu, obsahující pouze 76 aminokyselin, která je lokalizována prakticky ve všech buněčných organelách napříč všemi organismy. Ubikvitin má velmi konzervativní strukturu [63] a jeho úloha v buňce se podobá funkci fosfátu. Jakožto součást mnoha signálních drah zastupuje ubikvitin navíc prostřednictvím kovalentní vazby s proteiny roli značky a buněčného signálu. Ubikvitinace proteinů ovlivňuje například buněčný cyklus, proces opravy DNA, translokaci molekul přes membrány a mnohé další. [31 a 64] V procesu proteazomální degradace zastupují důležitou roli především polyubikvitinované řetězce o minimální délce 4 ubikvitinů.



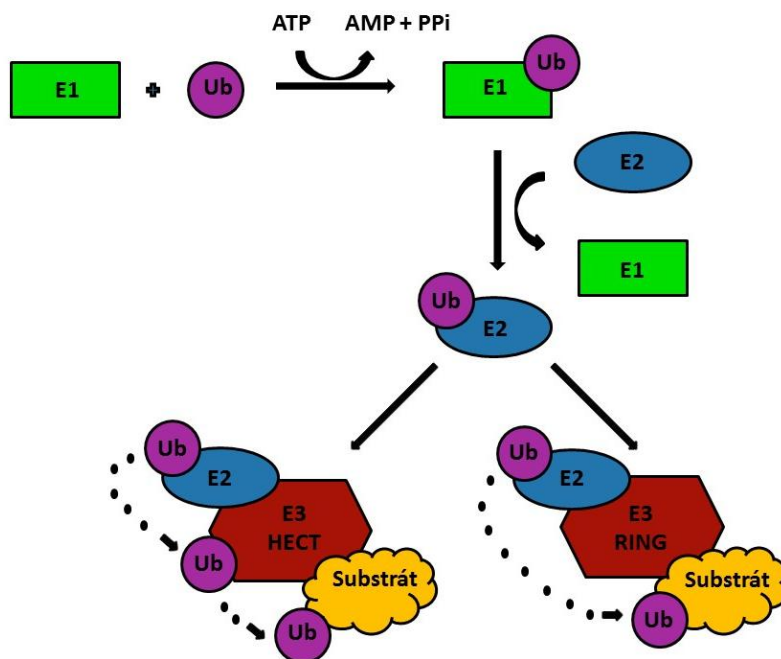
Ubikvitiny se na sebe nejčastěji navazují přes Lys48 předchozího ubikvitinu. Byla však potvrzena existence i dalších typů řetězců (např. připojení ubikvitinů přes Lys63) s různými funkcemi, délkou a prostorovým uspořádáním. Každý typ řetězce může představovat jiný signál, třeba již zmíněnou degradaci, ale také jadernou translokaci a další buněčné funkce. Ubikvitinový systém je navíc nesmírně dynamický, takže se tyto signály mohou neustále měnit, upravovat a přetvářet, často v závislosti na kontextu buněčné situace a vnitřních i vnějších podmínkách. [65] Mezi důležité předpoklady funkčnosti ubikvitinace patří specifická vazba ubikvitinu na proteiny, jeho vazba do správného místa a v dostatečném množství pro daný signál či funkci. To zajišťují specializované enzymy, které nazýváme E1, E2, E3 a E4 ligázy. [31, 44, 62, 63]

Prvním krokem ubikvitinace je aktivace C konce ubikvitinu ubikvitin aktivacím enzymem E1. V aktivním místě E1 enzymu se nachází cystein, mezi jehož postranním řetězcem a C koncem ubikvitinu vzniká za hydrolýzy ATP thioesterová vazba, čímž je ubikvitin aktivován. Následně dochází k přenosu aktivovaného ubikvitinu pomocí transthiolace na cystein ubikvitin konjugačního enzymu E2, který se u člověka vyskytuje asi v 50 různých variantách. E2 enzymy přenášejí aktivovaný ubikvitin na substrát pomocí specifické E3 ligázy, která je na tento substrát navázána. Existují dvě skupiny E3 ligáz. První skupina obsahuje HECT (homologous to E6-associated protein C terminus) doménu. Tyto E3 ligázy přebírají ubikvitin z E2 enzymu na svůj vlastní cystein a v zápětí jej předávají na substrát. Druhou skupinu představují E3 ligázy obsahující RING (really interesting new gene) doménu. RING-doménové E3 ligázy váží E2 enzymy prostřednictvím RING domény takovým způsobem, že dojde k přiblížení ubikvitinu vázaného na cysteinu E2 enzymu k patřičnému místu substrátu, kde má být ubikvitin navázán. Nakonec následuje samotný přenos ubikvitinu. [62, 65, 66]

V současné době je známo asi 600 E3 ligáz. Jedná se o enzymy s vysokou substrátovou specificitou, zásadní pro správnou, selektivní a adekvátně regulovanou činnost proteazomu. [62, 65, 66] Jak již bylo zmíněno, proteiny určené k degradaci jsou označeny polyubikvitinovým řetězcem, přičemž ubikvitiny se v tomto řetězci spojují prostřednictvím izopeptidové vazby mezi lyzinem předchozího ubikvitinu (nejčastěji Lys48) a aktivovaným C koncem (glycin) ubikvitinu přicházejícího. RING doménové E3 na tento lyzin (distální lyzin již navázaného ubikvitinu) přidávají ubikvitin stejným způsobem jako na substrát samotný, tedy přímo z E2. Podle jedné teorie zůstává E2 spojen s E3 a ostatní

E2 pak navazují na komplex E3-E2-substrát-ubikvitin další ubikvitiny. [67] U HECT doménových E3 je polyubikvitinový řetězec seskládán na cysteinu E3 ligázy, načež je celý přenesen na substrát [68]. Průběh ubikvitinace schematicky znázorňuje následující obrázek (Obr. 3).

**Obr. 3** – Schéma průběhu ubikvitinace proteinu



V elongaci ubikvitinového řetězce mohou být zapojeny ještě E4 konjugační enzymy. E4 se uplatňují jak v degračních, tak i v regulačních procesech. Vyznačují se totiž schopností prodlužovat řetězce na monoubikvitinovaných substrátech, čímž označují daný protein k degradaci, nebo inhibovat jejich signální funkci. Charakteristickým znakem E4 enzymů je přítomnost U-box motivu na jejich C konci. Jedná se o útvar složený ze 70 aminokyselin, které jsou uspořádány do struktury podobné RING doméně. Podle jedné teorie nedokáží HECT E3 ligázy ze sterických důvodů vytvořit polyubikvitin, a proto využívají elongační aktivity E4 ligáz. Navíc je známo, že pro funkci většiny E4 konjugačních enzymů je nezbytná přítomnost E1, E2 i E3 enzymů. [69]

Přesto, že mechanismus ubikvitinace byl z části odhalen a naše poznání se v tomto odvětví stále dynamicky rozvíjí, zůstává nadále nepoznané, jakým způsobem specifické E3 ligázy rozpoznávají svůj substrát. Na proteinech, které mají být degradovány, se pravděpodobně vyskytuje určitý signál, který je k ubikvitinaci (resp. k degradaci) předurčuje. Takový

signál se nazývá degron. Jako degron může působit např. specifická aminokyselina na N konci substrátu; mnohem výrazněji degron působí v případě volného N konce proteinu, protože takový signál je pro E3 ligázu ze sterických důvodů výhodnější. Pro životnost proteinu je rozhodující povaha jeho N konce, respektive aminokyseliny, která se na něm vyskytuje, a jeho celkové prostorové uspořádání. [71-72] Například jedna podjednotka kohezinu (Scc1) má na svém N konci arginin, jehož rozpoznání vede k degradaci, která umožňuje následný rozestup chromozomů. Proteiny, které nemají být degradovány (např. nově syntetizované proteiny), mají podle této teorie na svém N konci stabilizační jednotku - methionin. Pokud by měl být takto chráněný protein degradován, dojde pravděpodobně k odštěpení methioninu a vzniku degronu. Byly zaznamenány i další typy degronů. Například pro degradaci cyklinů a CDK inhibitorů vzniká degron fosforylací specifických serinových a treoninových jednotek. Úlohu ubikvitinace určuje poloha degronu, udávající místo ubikvitinace, a tak částečně i typ polyubikvitinového řetězce. [73] V současnosti začíná být stále více patrné, že degron může mít mnohem více podob a při jeho rozpoznání či vzniku hraje velkou úlohu celkový stav buňky.

### **2.2.3 Deubikvitinace**

Deubikvitinace představuje regulační proces spočívající v odstranění ubikvitinů a polyubikvitinových řetězců z proteinů, který zprostředkovávají enzymy nazývané deubikvitinázy (DUBy). V lidském organismu jich bylo doposud objeveno přibližně 100. [44] Deubikvitinace není jen důležitá pro ubikvitin-dependentní funkci proteazomu, jak již bylo zmíněno dříve, ale také pro další buněčné děje. [73] Na proteazomu se nachází hned několik deubikvitináz, které ze substrátu odštěpují polyubikvitinové řetězce a ubikvitiny. Nejvýznamnější s proteazomem asociované DUBy jsou Poh1 (Rpn11), Uch37 a Ubp6. [39] Uch37 a Ubp6 pravděpodobně fungují jako jakési „časovače“ proteazomální degradace. Po navázání ubikvitinovaného substrátu na proteazomální ubikvitinové receptory začnou tyto DUBy postupně odštěpovat z polyubikvitinového řetězce jednotlivé molekuly ubikvitinu. Pokud Poh1 nedokáže substrát dostatečně rychle deubikvitinovat, dojde vlivem Uch37 a Ubp6 ke snížení počtu ubikvitinů a k uvolnění substrátu z proteazomu. Antagonistickou funkci k Uch37 a Ubp6 má s proteazomem asociovaný E4 enzym Hul5, který je naopak schopen ubikvitinové řetězce prodlužovat a udržovat tak substrát na proteazomu déle. [74]

Deubikvitinázy neovlivňují pouze degradaci proteinů, ale prakticky všechny děje, ve kterých je zahrnuta ubikvitinace. To znamená buněčný cyklus, proces opravy DNA, stresové reakce, endo a exocytózu a navíc umožňují velmi důležitou recyklaci ubikvitinu (odštěpený ubikvitin z jednoho proteinu může díky recyklaci ubikvitinovat další protein). Deubikvitinázy mohou být dokonce kódovány v genomech patogenů, které jejich prostřednictvím blokují buněčnou ubikvitinaci a ovlivňují tak stav hostitelské buňky ve svůj prospěch. [44, 49, 75] Deubikvitinázy jsou děleny do pěti základních proteinových rodin. UCH (ubiquitin C-terminal hydrolase), USP (ubiquitin-specific protease), OTU (ovarian tumor protease), JAMM(JAB1/MPN/Mov34 metalloenzyme) a MJD (Machado-Joseph disease protein domain protease). [44]

Kromě metalloenzymů, jejichž činnost je závislá na  $Zn^{2+}$ , a o kterých jsem se zmiňoval již dříve, [48] mají všechny známé DUBy ve svém aktivním místě cystein. [44] Jejich aktivita závisí na sekvenci celkem tří aminokyselin včetně onoho cysteinu. Histidin sousedící s cysteinem snižuje jeho pKa a umožňuje mu nukleofilně reagovat s izopeptidovou vazbou mezi ubikvitinem a značeným proteinem. Třetí důležitá aminokyselina aktivního místa, často asparagin nebo kyselina asparagová, polarizuje histidin. Přestože polarizace histidinu je pro jeho funkci důležitá, nemusí být aminoskupina s polarizační aktivitou přítomná u všech DUBů. Deubikvitinace začíná odštěpením aminoskupiny lyzinu, načež se karboxylová skupina ubikvitinu kovalentně naváže k aktivnímu cysteinu, což vede ke vzniku tzv. acylového intermediátu. Negativní náboj vznikající odtržením amino skupiny vyrovnávají vodíkové donory a zbytek molekuly vody poté hydrolyzuje acylový intermediát, což vede k uvolnění ubikvitinu. [76] Proces, kterým z proteinů odstraňují ubikvitin deubikvitinací metalloenzymy, byl popsán výše.

Aktivita deubikvitináz je v buňce komplikovaně a velmi přesně regulována, neboť deregulace jejich činnosti může představovat příčinu vzniku rakoviny, tedy zvýšenou hladinu onkoproteinů nebo naopak sníženou hladinu onkosupresorových proteinů, a řady dalších vážných onemocnění. [1] Deubikvitinázy asociují s dalšími proteiny a stávají se tak součástí velkých multipodjednotkových proteinových celků. Takových proteinů známe téměř 800, přičemž jejich funkce spočívá především v regulaci deubikvitinázové aktivity. Jedním z takových celků je např. proteazom. [73] Katalytickou aktivitu s proteazomem asociovaných DUBů (Poh1, Rpn1, Uch13, Ubp6) značně ovlivňuje jejich vazba na

proteazom a množství volného ubikvitinu v cytoplazmě. Na regulaci DUBů se podílí také další faktory, jako je fosforylace či jejich buněčná lokalizace. [44 a 49]

#### **2.2.4 Degradace proteinů nezávislá na ubikvitinaci**

Přestože se proteazom účastní obrovského množství dějů, signálů a procesů zahrnutých v ubikvitinačních drahách a ubikvitiny jsou pro jeho funkci zásadní, neznamená to, že by byly všechny funkce proteazomu na ubikvitinech a ubikvitinaci zcela závislé. Bylo zjištěno, že proteazom je schopen degradovat proteiny i bez jejich ubikvitinace. Jedná se především o substráty navázané na adaptorové proteiny nebo poškozené, často toxické polypeptidy, mezi které patří zoxidované proteiny, proteiny staré a proteiny s rozvolněnou strukturou. [39 a 77]

Pokud se buňka nachází v oxidativním stresu, je ubikvitinace proteinů silně potlačena, neboť dochází ke glutathionaci aktivního místa E1 a E2 enzymů. [78] Navzdory tomu, že proteiny nemohou být ubikvitinovány, proteazomální degradace proteinů pokračuje. [79] Rpn10 na ubikvitinovém řetězci detekuje aminokyseliny hydrofobní povahy Leu8, Ile44 a Val70. [80] Oxidační poškození proteinu se projevuje převážně rozvolněním jeho struktury, přičemž dojde k odhalení některých vnitřních hydrofobních částí, které může Rpn10 detekovat stejně jako hydrofobní řetězec ubikvitinu. Následně dochází k degradaci proteinu bez spotřeby ATP. To značí, že degradaci poškozených proteinů zprostředkovává volný 20S proteazom, který ATPázovou aktivitu zcela postrádá. [77 a 79] Proteazom se také pravděpodobně podílí na procesu stárnutí. Za normálních podmínek totiž degraduje poškozené proteiny velmi efektivně; pokud však buňka stárne, poškozené proteiny se v ní hromadí, což by mohlo naznačovat sníženou aktivitu proteazomu. [79 a 81] Akumulace toxických proteinů může vést také například k různým neurodegenerativním onemocněním, jako je Alzheimerova či Parkinsonova choroba. [82]

Stárnutí proteinů doprovází mnoho projevů, většinou se však jedná o deamidace a izomerace aminokyselin. Pomocí CaM (calmodulin) proteinu bylo experimentálně potvrzeno, že degradace starých proteinů je ATP dependentní a účastní se jí pravděpodobně 26S proteazom. Aktivní místo CaM proteinu vykazuje závislost na aspartylech. Pokud dojde k jejich poškození, není protein schopen efektivně vázat  $Ca^{2+}$ , což se projevuje jeho nestabilitou a následnou degradací. CaM proteiny s funkčním aktivním místem i CaM s aktivním místem nefunkčním vykazují totožnou míru

ubikvitinace, nicméně v případě poškozených proteinů neschopných vázat  $\text{Ca}^{2+}$  dochází k podstatně vyšší intenzitě degradace. [83] K podobnému závěru došel i Benaroudi a kol. ve své publikaci z roku 2001, v níž je popsána ubikvitin-independentní a ATP dependentní 26S proteazomální degradace denaturovaného ovalbuminu, přestože byl ovalbumin ve fyziologickém stavu k degradaci imunní. [84] Proteazom tedy vykazuje schopnost degradovat staré, poškozené, denaturované a rozvolněné proteiny nezávisle na ubikvitinovém signálu, což mu umožňuje rychle reagovat na změny podmínek a stresové situace a udržovat tak proteinovou homeostázu buňky.

### **2.2.5 Kompletní a částečná degradace vícepodjednotkových substrátů**

Pro kompletní degradaci vícepodjednotkového substrátu postačuje ubikvitinace pouhé jedné jeho podjednotky. Polyubikvitinovaná podjednotka má funkci jakéhosi pomocného (adaptérového) proteinu, který ostatní podjednotky dovede k proteazomu a následně zahájí jejich degradaci. Samotná polyubikvitinace však k iniciaci degradace nestačí, je proto zapotřebí ještě dalšího kontrolního signálu, tzv. iniciačního místa, tedy místa počátku degradace. V podstatě se jedná o rozvolněnou část proteinu, která může být vtažena do útrobu proteazomu. Ke kompletní degradaci vícepodjednotkového substrátu dochází pouze v případě, mají-li všechny jeho podjednotky tato iniciační místa. [85] Tohoto mechanismu využívají např. některé papillomaviry. Jejich E7 protein se váže na RB protein (významný tumorsupresor), následně je ubikvitinován, čímž přivede k degradaci i RB protein. Výsledkem může být nádorová transformace buňky. [86]

Buňka využívá tohoto modelu proteazomální degradace proteinů i obráceně, pro tzv. částečnou degradaci. Částečná degradace není v buňce výjimečným dějem, naopak tvoří základ pro mnoho důležitých signálních drah, jako je např. funkce jaderného faktoru  $\kappa\text{B}$  – NF- $\kappa\text{B}$ , o kterém se zmíním později. Částečná degradace představuje klíč k degradaci jen jedné podjednotky určitého multiproteinového komplexu. Ostatní podjednotky musí mít nepřístupná nebo nějakým způsobem krytá iniciační místa, popřípadě využívat tzv. stop signálů. Stop signál je vlastně velmi pevně a úzce stažená doména na polypeptidovém řetězci, která brání jeho degradaci. V případě NF- $\kappa\text{B}$  dojde pouze k degradaci inhibitoru  $\kappa\text{B}$  (I $\kappa\text{B}$ ), čímž se na něj navázaný transkripční faktor uvolní do cytoplazmy a může podstoupit jadernou translokaci. [39 a 85]

## 2.3 SIGNÁLNÍ DRÁHA NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B je velmi složitá a multifunkční signální dráha. Její aktivace, deaktivace a regulace přenosu signálu interferuje s ubikvitin-proteazomovým systémem a vede tak ke kontrole exprese celé řady genů, které jsou zapojeny např. do procesu zrání buněk, jejich diferenciaci, vývoje organismu jako celku či apoptózy. Velkou měrou se rovněž podílí na zánětlivých reakcích imunitního systému i na reakci buňky vůči stresu. [87]

### 2.3.1 Struktura NF- $\kappa$ B

Základní kameny této kaskády představují proteiny RelA (zvaný také p65), RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1 (p50/p105) a NF- $\kappa$ B2 (p52/p100). Proteiny p100 a p105 fungují jako prekurzory funkčních proteinů p50 a p52. Pro proteiny patřící do Rel proteinové rodiny je charakteristický 300 aminokyselin dlouhý Rel homologní region (RHR). Tento region tvoří dvě domény, jednu v podobě smyček – NTD (N-terminal domain), zodpovědných za specifickou vazbu na DNA, a doménu CTD (C-terminal domain), prostřednictvím které se tvoří proteinové dimery a která se dále podílí na nespecifické vazbě na DNA. Mezi součásti Rel proteinů patří také transaktivační doména TAD a NLS (nuclear localization site) místo. Aby nedocházelo k samovolné interferenci mezi transkripčními faktory a DNA, jsou tyto proteiny udržovány v neaktivní formě. Neaktivní Rel proteiny se vyskytují v cytoplazmě ve formě homodimerů nebo heterodimerů s navázaným inhibítorem, při jejichž tvorbě se uplatňuje právě RHR. [88]

Na RHR se svou ARD doménou (ankyrin repetiční doména) váže protein I $\kappa$ B (inhibitor- $\kappa$ B), který stabilizuje dimery Rel proteinů a překrývá DNA vazebné místo RelA podjednotky, čímž brání nasednutí transkripčního faktoru na DNA. Jsou známy celkem 3 druhy I $\kappa$ B proteinů: I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  a I $\kappa$ B $\epsilon$ . I $\kappa$ B se připojuje na dimery obsahující alespoň jeden RelA protein, popřípadě c-Rel. Jako inhibitory transkripčních faktorů mohou sloužit i proteinové prekurzory p100 a p105. K aktivaci transkripčního faktoru je nezbytná disociace I $\kappa$ B z proteinového dimeru, popřípadě jeho degradace. První signál, který předchází degradaci, představuje fosforylace inhibitoru I $\kappa$ B proteinovým komplexem IKK (I $\kappa$ B kináza). Tento komplex je složen ze tří podjednotek, konkrétně kináz IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  a regulační podjednotky NEMO (IKK $\gamma$ ). [88-89]

Jakožto dráha s pleiotropním efektem zahrnuje NF- $\kappa$ B velké množství aktivačních signálů a složitý systém regulačních molekul. NF- $\kappa$ B čítá dvě rozdílné dráhy, lišící se jak svým spouštěcím mechanismem, tak i průběhem a buněčnou odpovědí.

### **2.3.1.1 Kanonická (klasická) NF- $\kappa$ B dráha**

Kanonická dráha NF- $\kappa$ B může být aktivována intracelulárními a extracelulárními ligandy, jako například cytokiny, TNF (tumor necrosis factor), IL-1 (interleukin 1), podrážděním TLR (Toll-like receptor) a jiných receptorů pro antigeny, bakteriálními či virálními lipopolysacharidy, ale rovněž hypoxií, poškozením DNA a různými stresovými faktory. Kanonická NF- $\kappa$ B dráha hraje zásadní roli především ve správné funkci imunitního systému. Klíčový krok pro její správný průběh představuje aktivace IKK. IKK komplex je aktivován NEMO dependentní fosforylací, na níž se podílí velké množství proteinů včetně ubikvitinu. [90-91] Aktivovaný komplex IKK se následně za účasti transaktivační domény TAD naváže na I $\kappa$ B $\alpha$ , který fosforyluje na Ser32 a Ser36. Tato fosforylace signalizuje zahájení polyubikvitinace I $\kappa$ B $\alpha$  prostřednictvím specifické E3 ligázy, načež se polyubikvitinovaný I $\kappa$ B $\alpha$  stává substrátem pro 26S proteazom. Následkem degradace inhibitoru I $\kappa$ B $\alpha$  se uvolňuje dimer Rel proteinů (p50:p65) ve své aktivní formě, ve které není RHR překryt ARD doménou, a translokuje se do jádra, kde může spustit expresi potřebných genů. K vazbě na specifické místo DNA ( $\kappa$ B místo) musí alespoň jeden člen dimeru obsahovat TAD doménu (což splňují proteiny RelA a c-Rel). [91]

### **2.3.1.2 Nonkanonická (alternativní) NF- $\kappa$ B dráha**

Nonkanonická dráha je specifitější než dráha kanonická a ovlivňuje metabolismus kostní dřeně, lymfoidní organogenezi, diferenciaci buněk v epiteliární tkáni a maturaci dendritických buněk a T-lymfocytů. Aktivace této alternativní NF- $\kappa$ B dráhy probíhá odlišným způsobem. Je NEMO independentní, zahrnuje jiné signální molekuly, a také vede k uvolnění a aktivaci jiného transkripčního faktoru, konkrétně p52:RelB. Aktivace nonkanonické dráhy probíhá pomalu, protože je spojena se syntézou signálních proteinů *de novo* a zahrnuje také jejich akumulaci. Za její aktivaci zodpovídají například receptory CD40, lymfotoxinové  $\beta$  receptory a další. [91-93]



### 2.3.2 NF- $\kappa$ B signální dráha a rakovina

Jedná se o velmi důležitou dráhu, jejíž deregulace má spojitost se vznikem závažných onemocnění, což potvrzuje fakt, že je v mnoha rakovinných buňkách NF- $\kappa$ B konstitutivně aktivní. [94] Jeden z prvních náznaků zapojení NF- $\kappa$ B dráhy do vzniku a průběhu rakovinných onemocnění představuje přítomnost Rel proteinů, vykazujících homologii k v-Rel proteinu, jenž je považován za potencionální onkoprotein ptačího retikuloendoteliálního viru, a také zapojení některých dalších onkoproteinů do regulace této signální dráhy. [95] Navíc bylo zjištěno, že rakovina může mít spojitost s chronickým zánětem, způsobeným právě deregulací signální dráhy NF- $\kappa$ B a její konstitutivní aktivitou. NF- $\kappa$ B ovlivňuje řadu důležitých buněčných pochodů, mezi něž patří i řízení apoptózy. Zda bude mít dráha proapoptotický nebo antiapoptotický efekt závisí na její přesné regulaci a buněčném kontextu. [96] Špatná signalizace a deregulace dráhy NF- $\kappa$ B může namísto ochrany buňky vést až k zvýšené proliferaci, produkce antiapoptotických proteinů, zahájení tvorby metastáz, buněčné adhezi, angiogenezi a dokonce změny aerobního metabolismu v anaerobní. [97]

Je paradoxní, že NF- $\kappa$ B vykazuje tumorsupresorovou aktivitu, a to jednak svou proapoptotickou funkcí a jednak interferencí se signálními drahami spojenými s p53 proteinem. [96] Dráhu NF- $\kappa$ B i dráhu proteinu p53 aktivuje stres či poškození DNA. Indukce tvorby p53 proteinu dokonce může vést k IKK independentní aktivaci NF- $\kappa$ B dráhy. [98] Zahájení apoptózy vyžaduje aktivaci NF- $\kappa$ B, přestože se jedná o majoritně antiapoptotickou dráhu, zatímco p53 protein má proapoptotický účinek a dokáže zastavit buněčný cyklus. Protein p53 zřejmě moduluje aktivitu proteinu p52, který je následně schopen inhibovat cyklín promotor D1. [99] Podle jedné z teorií dojde aktivací NF- $\kappa$ B dráhy p53 proteinem k vazbě komplexu aktivního transkripčního faktoru a p53 do vazebného místa na DNA a následné transkripční inaktivaci NF- $\kappa$ B dependentních genů. [98] NF- $\kappa$ B tak nefunguje proapoptoticky přímo (protože její aktivita je antiapoptotická), ale zastavuje expresi antiapoptotických produktů. [95] Rakovinné buňky navíc díky této dráze získávají resistenci vůči aplikovaným protirakovinným léčivům. [100] Z těchto informací vyplývá, že NF- $\kappa$ B je velmi složitý, propletený a komplikovaný systém spojený s obrovským množstvím dalších drah, jehož reakce značně ovlivňuje kontext a celkové fyziologické podmínky buňky v komplexním měřítku. [97]

### 2.3.3 NF-κB jako cíl protinádorové léčby

Vzhledem k funkcím NF-κB dráhy, jako je vliv na buněčný metabolismus, odolnost buňky proti apoptóze, indukce zánětů vedoucích až k rakovinnému bujení, regulace buněčného cyklu, podpora angiogeneze a množení buněk či získávání resistance k léčivům, a vzhledem k přítomnosti konstitutivně aktivní dráhy v transformovaných buňkách se inhibitory NF-κB dráhy staly slibnou zbraní v boji proti rakovině.

*In vitro* i *in vivo* experimenty potvrdily, že inhibice NF-κB vede k významnému zvýšení cytotoxicity tumorsupresiv a k zabránění vzniku resistance vůči běžným léčivům. [100] V těchto experimentech se většinou prokázal i cytotoxický efekt inhibitorů NF-κB, které byly schopny nádorové buňky usmrtit, jako např. disulfiramové komplexy s mědí. [101] Hlavní uplatnění najdou tyto látky pravděpodobně spíše v kombinovaných terapiích, i když u již zmíněných komplexů disulfiramu s mědí byla zaznamenána vysoká cytotoxická aktivita i bez přidání dalších látek. [102] Inhibitory NF-κB zasahují a blokují signální dráhu na mnoha úrovních. Může se jednat o inhibitory IKK, inhibitory proteazomu, který je zde důležitý pro uvolnění aktivního transkripčního faktoru, nebo také inhibitory vazby transkripčního faktoru NF-κB na DNA. [103] V léčbě rakoviny se ukázaly jako nejefektivnější právě inhibitory proteazomu, protože jejich komplexní efekt působí na buňku mnohem agresivněji. [100] Není možné brát tyto výsledky dogmaticky a je jisté zapotřebí dalšího zkoumání už jen proto, že inhibitor proteazomu bortezomib signální dráhu NF-κB navzdory veškeré teorii aktivuje. [104] Jeden z experimentů navíc ukazuje, že inhibice NF-κB rakovinné buňky nezabíjí. Luedde a jeho spolupracovníci v něm zkoumali, co se stane s myšmi s delecí genu pro NEMO, tedy s trvale inaktivovanou NF-κB dráhou. Podle dřívějších teorií by tyto myši měly být rezistentní ke vzniku a rozvoji rakoviny, nicméně u nich naopak došlo ke spontánnímu vzniku karcinomu jater. Buňky s inaktivovanou NF-κB dráhou jsou totiž náchylné k samovolné apoptóze a jejich smrt způsobí v játrech zánět a aktivaci reparačních mechanismů. Jaterní buňky proliferují za účelem opravy tkáně, ale zánět je udržuje pod silným oxidačním stresem, což v těchto podmínkách vede ke vzniku velkého množství mutací, které mohou způsobit transformaci buněk. [105] Zmíněný experiment ukazuje, že je třeba brát efekty léčiv a jejich mechanismus účinku skutečně v širokých souvislostech.

## 2.4 INHIBICE PROTEAZOMU

Z výše uvedených informací vyplývá, že proteazom představuje nesmírně důležitý buněčný aparát. Zodpovídá za degradaci starých a poškozených proteinů, nepotřebných proteinů a degradaci různých komponent mnoha signálních drah. Svým vlivem na tyto dráhy může ovládat buněčný cyklus, vývoj a diferenciaci buněk, produkci prozánětlivých a protizánětlivých látek, apoptózu, antigenní prezentaci a celkovou homeostázu buňky. Jeho úloha je pro život zkrátka natolik nezbytná, až se může zdát, že jeho inhibice musí neodvratně skončit toxicitou a smrtí organismu. [106-107] Poruchy funkce proteazomu se také skutečně projevují řadou zdravotních problémů, jako jsou revmatická onemocnění, srdeční dysfunkce, neurodegenerativní poruchy, kachexie a mnohými dalšími. Žádné narušení proteazomálních funkcí však nebylo objeveno u onkologických nemocí, což by mohlo naznačovat, že proteazom je pro život nádorových buněk zcela nezbytný. [108] Tato myšlenka se také experimentálně prokázala. K usmrcení nádorových buněk stačila koncentrace aldehyd-peptidového inhibitoru proteazomu 340× menší než k usmrcení buněk zdravých. [109-110] Existuje hned několik teorií vysvětlujících tak vysokou citlivost nádorových buněk k inhibici proteazomu. Nelze se ale přiklonit pouze k jediné teorii, protože proteazom je multifunkční struktura, jejíž inhibice zasáhne spoustu signálních drah a buněčných dějů. Navíc je nutné brát v potaz skutečnost, že mechanismy účinku a efekty na zasaženou buňku se u jednotlivých inhibitorů proteazomu mohou velmi lišit, neboť inhibují s různou aktivitou různé proteazomální podjednotky a interferují s dalšími rozdílnými buněčnými proteiny.

### 2.4.1 Antiangiogeneze

Normální zdravé buňky přísně regulují své angiogenetické signální dráhy a udržují je inaktivované. Angiogeneze je využívána pouze k růstu opravě tkání, kdy při poranění dojde ke spuštění angiogenetických signálních drah a ke kontrolovanému růstu cév. V transformovaných nádorových buňkách však dochází k deregulaci těchto drah, což umožňuje maligním buňkám vytvářet si vlastní cévní systém. Prokrvený nádor má lepší přístup k živinám a může se rychleji rozvíjet. Inhibice proteazomu zastavuje angiogenetické dráhy, a tím poškozuje nádor, zpomaluje jeho růst, může jej senzibilizovat k dalším léčivům a způsobit odumírání transformovaných buněk. [111]

### **2.4.2 Zablokování buněčného cyklu**

Rakovinné buňky se nekontrolovatelně dělí, přičemž se tato rychlá proliferace stává jejich silnou stránkou i slabostí. Jinak řečeno životnost rakovinných buněk závisí na rychlém procházení buněčným cyklem. Proteazom zodpovídá za degradaci cyklinů, která následuje okamžitě po přechodu z jedné fáze buněčného cyklu do druhé, a tím umožňuje vyvíjející se buňce další progres. Pokud dojde k inhibici proteazomu, nenastává tato degradace a buněčný cyklus se zastavuje, stejně jako proliferace nádorových buněk. Zastavení buněčného cyklu navíc umocňuje stabilizace inhibitorů cyklin-dependentních kináz (CDKI), které mají rovněž nezastupitelnou roli v negativní regulaci buněčného cyklu. [112-113]

### **2.4.3 Upregulace proteinu p53**

Protein p53 je schopen indukovat apoptózu, zprostředkovat buněčnou ochranu před stresem různého původu, zahájit proces opravy poškozené DNA i zastavit buněčný cyklus. p53 podléhá autoregulaci (snižování vlastní produkce) indukcí exprese p53 specifické E3 ligázy (MDM2), která jej ubikvitinuje a odsuzuje tak k proteazomální degradaci, což vede k poklesu koncentrace tohoto proteinu. V rakovinných buňkách se vyskytují mutace p53 až v 50 % případů, stejně jako nadměrná exprese ligázy MDM2, která p53 potlačuje; právě nefunkční p53 nebo eliminace jeho funkce patří mezi časté příčiny vzniku rakoviny. [114] Inhibice proteazomu zastavuje MDM2 zprostředkovanou proteazomální degradaci p53 a způsobuje jeho akumulaci. Vysoká hladina p53 má značný tumorsupresorový účinek. [115-116]

### **2.4.4 Rozvrácení vnitřní homeostázy buňky**

Pro maligní, rychle proliferující buňky je charakteristická vysoká hladina proteosyntézy, která k tvorbě nových proteinů využívá recyklovaných substrátů proteazomu. Inhibice proteazomu by tak měla rakovinným buňkám působit deficit stavebního materiálu pro syntézu nových proteinů a brzdít tak jejich proliferaci a růst. [117] Nádorové buňky mají navíc aberantní, mutantní metabolismus a pozměněné signálními dráhy vedoucí k produkci velkého množství chybných, poškozených, nefunkčních, toxických či zoxidovaných proteinů. Vzhledem k nefunkčnímu nástroji jejich degradace tak dochází v buňkách k hromadění proteinového odpadu, který narušuje homeostázu buňky a může

interferovat s mnoha různými buněčnými ději a pochody. Zvýšená potřeba rakovinných buněk degradovat proteiny je doprovázena i zvýšenou mírou ubikvitinace a produkce ubikvitinu. [107]

Je známo 5 skupin inhibitorů proteazomu. Jedná se o peptidové aldehydy, sulfonáty, epoxyketony, boronáty a  $\beta$ -laktany. Všechny tyto inhibitory blokují hydrolytickou aktivitu  $\beta$ 5 podjednotky proteazomu vazbou na threonin v jejím aktivním místě. Různé inhibitory proteazomu ovlivňují buňku rozdílně a ne všechny mohou být využity v medicíně. Na průběh inhibice proteazomu má vliv např. specificita inhibitorů proteazomu, reversibilita/ireversibilita vazby do aktivního místa, jejich stabilita, metabolismus a farmakokinetika. [118]

## 2.5 BORTEZOMIB – VELCADE

Prvním, kdo si uvědomil, jaký potenciál by inhibitory proteazomu mohly mít, byl Julian Adams a kolektiv kolem něj. Přes značné nesnáze nakonec pod Adamsovým vedením vyvinula firma ProScript, později koupena firmou Millennium Pharmaceuticals Inc., inhibitor proteazomu PS-341 (bortezomib), prodáváný pod komerčním názvem Velcade. [119-120] Bortezomib byl testován v National Cancer Institute a dosáhl při tom obrovských úspěchů. Ukázalo se, že je *in vitro* velmi účinný proti mnoha nádorovým liniím (melanom, nádory prsu, prostaty, vaječníků apod.). [118] Účinnost bortezomibu a jeho dobré vlastnosti, jako je např. reversibilní inhibice proteazomu a tehdy předpokládaná specifita, vedly k zahájení klinických testů bortezomibu proti rozličným typům rakoviny. Do první fáze klinických testů vstoupil bortezomib hned dvakrát. Jednou proti solidním tumorům a podruhé proti krevním malignancím.

### 2.5.1 Klinické testy

Bortezomib byl testován na 53 pacientech se solidními tumory, konkrétně nádory ledvin, tlustého střeva, prostaty a několika dalšími karcinomy. Jednalo se o intravenózní aplikaci spolu s mannitolem rozpuštěným ve fyziologickém roztoku. Maximální dávka z důvodu toxicity činila  $2 \text{ mg/m}^2$ , doporučená dávka pak  $1,6 \text{ mg/m}^2$ . Mezi nejčastější vedlejší účinky patřila nevolnost, průjem, zvracení, hypotenze, hypertenze, anémie a periferní neuropatie. Se zvyšující se dávkou bortezomibu rostla i míra inhibice proteazomu, avšak tato inhibice neměla protinádorový efekt. Žádný z pacientů nevykázal kompletní pozitivní reakci, pouze u dvou testovaných se objevila částečná odpověď. Bortezomib tak byl v první fázi klinických testů proti solidním tumorům vyhodnocen jako málo efektivní až neefektivní. [121] Nejedná se tedy ani o vhodný lék pro léčbu osteosarkomu, protože v klinickém testu na léčbu pozitivně reagoval pouze 1 z 21 pacientů s osteosarkomem. Dávky bortezomibu byly přitom vyšší než je obvyklé a vedlejší příznaky častější, zejména periferní neuropatie se objevila až u 47 % případů. Korelace mezi množstvím dávky a mírou vedlejších účinků nebyla pozorována. [122]

Přestože bortezomib nebyl v klinických testech proti solidním tumorům úspěšný, vykázal výraznou biologickou aktivitu u pacientů s nádory krve. Bortezomib tak byl povolen pro léčbu mnohočetného myelomu a lymfomu pláštěvých buněk. Rozličná účinnost byla detekována i u ostatních krevních malignancí, ke schválení bortezomibu jako léčiva však

nebyla dostatečná. Účinnost bortezomibu proti mnohočetnému myelomu popisuje zpráva z druhé fáze klinických testů. Provádělo se zde testování bortezomibu na 54 pacientech, u kterých proběhla standardní léčba neúspěšně nebo u nich došlo k návratu onemocnění. Pacienti byli rozděleni do dvou skupin, ve kterých byl bortezomib podáván intravenózně, a to v jedné skupině po 1 mg/m<sup>2</sup> a v druhé po 1,3 mg/m<sup>2</sup>. Bortezomib byl aplikován čtyřikrát po dobu dvou týdnů celkem v osmi cyklech. U skupiny s aplikací 1,3 mg/m<sup>2</sup> došlo k pozitivní odezvě u 38 % pacientů. Mezi vážnější vedlejší účinky patřila trombocytopenie (24 % pacientů) a periferní neuropatie (9 % pacientů). [123]

Jedna studie porovnávala bortezomib s jiným léčivem krevních malignancí - dexamethasonem. Studie proběhla na 669 pacientech s relapsem mnohočetného myelomu, kdy byl bortezomib podáván intravenózně v dávce 1,3 mg/m<sup>2</sup> a dexamethason perorálně v dávce 40 mg. Reakce na bortezomib se shodovala s dříve zmíněnou studií a pozitivní reakce byla i zde zaznamenána u 38 % pacientů, zatímco pozitivní reakce na samotný dexamethason pouze u 18 % pacientů. První rok od zahájení léčby bortezomibem navíc přežilo 80 % pacientů, ale v případě dexamethasonu pouze 66 %. Bortezomib se tak ukázal jako účinnější látka, avšak jeho efekt doprovázel častější výskyt vážnějších vedlejších účinků, a to v 75 % případů oproti 60 % při léčbě dexamethasonem. [124] Další studie prokázala nejvyšší léčebný účinek při současném podání obou látek, kdy se pozitivní reakce vyskytla u 50 % pacientů. [123]

### **2.5.2 Mechanismus účinku bortezomibu**

Bortezomib inhibuje proteazom vazbou do aktivního místa  $\beta 5$  podjednotky 20S proteazomu. Atom bóru se v aktivním místě kovalentně váže s kyslíkem na  $\gamma$  uhlíku Ser195. Zároveň dochází ke vzniku vodíkových můstků mezi Gly47, N-koncovým threoninem  $\beta$ -5 podjednotky a boronátovým karboxylem. Velká afinita bóru k nukleofilnímu kyslíku činí bortezomib poměrně selektivním k serinovým proteázám. N-koncový threonin vazbu ještě více stabilizuje, a tak zvyšuje afinitu bortezomibu selektivně k aktivnímu místu  $\beta 5$  podjednotky, respektive k serinovým proteázám s přítomností tohoto threoninu. Bortezomib pak logicky neinhibuje cysteinové proteázy, protože vazba bóru se sírou je velmi slabá a vznikající komplex není stabilní. [125] Zablokováním aktivního místa dochází k inhibici proteazomu a k následným jevům, které z inhibice plynou.

Bortezomib má na nádorové buňky, respektive buňky mnohočetného myelomu, pleiotropní efekt. Způsobuje apoptózu těchto buněk, sensibilizaci k ostatním léčivům, zahazuje tvorbu IL-6 (interleukin 6) a negativně ovlivňuje mikroprostředí nádoru. Tyto a další efekty pravděpodobně nejsou způsobeny pouze inhibicí proteazomu, ale rovněž interferencemi s jinými molekulami, což je podpořeno faktem, že různé inhibitory proteazomu mají na buňky odlišný efekt. [107] Dosud se nepodařilo protinádorovou aktivitu bortezomibu uspokojivě popsat a odhalit její molekulární podstatu. Výše zmíněné efekty inhibice proteazomu obecně platí, avšak jednotliví jedinci i jejich buňky, zejména pak transformované proliferující buňky rakovinné, se mohou velmi lišit. Tak může bortezomib účinkovat v různých buňkách prostřednictvím různých signálních drah, a tedy i s různou efektivitou. První dráha, která byla v antitumorové aktivitě bortezomibu považována za klíčovou, je NF- $\kappa$ B.

Ukázalo se však, že tato dráha je velmi složitě regulována a její aktivace či inaktivace není zcela závislá na degradaci I $\kappa$ B. [126] Během inhibice proteazomu udržuje tuto dráhu v chodu tzv. PIR (proteasome-inhibition-resistant) mechanismus. NF- $\kappa$ B může být bortezomibem dokonce i aktivována. Po aplikaci bortezomibu dochází k významnému poklesu exprese I $\kappa$ B $\alpha$ , jejímž výsledkem je nedostatečná inaktivace aktivního heterodimeru p50:p65 a tudíž aktivace NF- $\kappa$ B dráhy. [104] Svou roli určitě hraje i narušení regulace buněčného cyklu a rozvrácení vnitřní homeostázy buňky, ale protein p53 v mechanismu účinku bortezomibu pravděpodobně význam nemá, protože protinádorová aktivita bortezomibu se projevovala i u buněk s deletovaným genem pro tvorbu p53. [127] Mechanismus účinku bortezomibu je neoddělitelně spjatý i s jeho omezeným využitím *in vivo*. Jeden z možných mechanismů specifického účinku bortezomibu proti mnohočetnému myelomu by mohla být produkce proapoptotického NOXA proteinu, jehož množství se po přidání bortezomibu v maligních buňkách zvyšuje až 50 $\times$ , zatímco u buněk zdravých zůstává stejné. [128] Další z mnoha jevů představuje pravděpodobně bortezomibem způsobená down-regulace intercelulární adhezí molekuly VCAM1 (vascular cell adhesion molecule 1), nezbytné pro adhezi buněk myelomu ke stromálním buňkám kostní dřeně a k následné ochraně rakovinných buněk před apoptózou. Rozvrácení buněčné homeostázy a interference s NF- $\kappa$ B dráhou pravděpodobně způsobuje v buňkách vyšší senzitivitu k dalším léčivům. [107] Tato myšlenka je konzistentní s nejvyšší účinností bortezomibu v kombinaci s jinými léčivy. [123]



### 2.5.3 Negativní vlastnosti bortezomibu

Mezi negativní vlastnosti bortezomibu nepatří pouze jeho velmi omezené využití (léčba mnohočetného myelomu a lymfomu pláštěvých buněk), ale také velmi časté vedlejší účinky, vyskytující se až v 97 % případů. Nejzávažnějším vedlejším účinek je periferní neuropatie. Častý výskyt vedlejších účinků naznačuje, že bortezomib není příliš selektivní léčivo a v buňkách interferuje s dalšími buněčnými proteiny, zejména některými serinovými proteázami. [129] Jako u většiny léků a přípravků, začínají se také zde postupně objevovat rakovinné buňky, které vůči bortezomibu vykazují různý stupeň rezistence, což bylo potvrzeno i experimentálně. Buňky byly *in vitro* vystaveny zvyšujícím se dávkám bortezomibu, až nakonec došlo k vyvinutí buněčné linie 500× odolnější k inhibici proteazomu bortezomibem než obyčejné rakovinné buňky. Tuto rezistenci způsobila zvýšená exprese 20S proteazomální  $\beta 5$  podjednotky a mutace v jejím aktivním místě, zabraňující vazbě bortezomibu. Lidský organismus je však mnohem komplexnější a složitější než buňky *in vitro*, a tak může k rezistenci přispívat například metabolismus, farmakokinetika a další faktory. [130-131] Z těchto důvodů se výzkumy inhibitorů proteazomu pro onkologickou praxi zaměřují na úspěch bortezomibu a snaží se nalézt a připravit jeho nové analogy, strukturně podobné látky i jiné inhibitory proteazomu, které by měly být účinnější, šetrnější ke zdraví pacientů, spolehlivější a použitelné proti širšímu spektru onemocnění.

### 2.5.4 Nová generace inhibitorů proteazomu

Nová generace inhibitorů proteazomu navazuje na úspěch bortezomibu. Cílem vývoje těchto látek je především nalezení inhibitorů proteazomu se silnějším účinkem, komfortnější aplikací nebo takových inhibitorů proteazomu, na které nevzniká rezistence. Mnohé z nich již vstoupily do různých fází klinických testů. Mezi tato potenciální léčiva patří látky jako MLN9708, carfilzomib, PR-047 nebo CEP-18770.

Nejúčinnějšími látkami se zdají být MLN9708 a carfilzomib. MLN9708 účinkuje nejen proti lymfomům, ale na rozdíl od bortezomibu potlačuje také například xenografty nádorů prostaty a střeva. Navíc je možné podávat jej orálně, což oproti intravenózně podávanému bortezomibu umožňuje lepší regulaci dávkování a nabízí pacientům vyšší komfort. Specifickou vlastnost MLN9708 představuje zvýšená inhibice proteazomů v kostní dřeni a v tumorech se současně slabší inhibicí proteazomu v krvi, zapříčiněná zřejmě jeho lepší

tkáňovou distribucí. Pro svůj potenciál vstoupila tato látka do první fáze klinických testů. [132-133] Mezi možné příčiny omezeného využití bortezomibu patří zřejmě jeho špatná tkáňová distribuce, protože má MLN9708 poměrně velký terapeutický potenciál. [132]

Carfilzomib je epoxy-ketonovým ireverzibilním inhibitorem proteazomu s velmi silným účinkem, neboť k překonání inhibice proteazomu musí buňka nasyntetizovat nové proteazomy. Zároveň se vyznačuje větší specifitou, než byla pozorována u bortezomibu. Cytotoxické účinky carfilzomibu byly prokázány *in vitro* vůči buňkám myelomů, a to dokonce i u kmenů resistantních vůči dexamethasonu, lymfomů, leukémií a pevných nádorů a staly se podkladem pro zahájení klinických testů této látky. Zejména pro jeho sensibilizační účinky se předpokládalo, že carfilzomib najde uplatnění především v kombinované léčbě. [130 a 135] Nicméně carfilzomib v roce 2012 úspěšně prošel třetí fází klinických testů a FDA (Food and Drug Administration) jej schválila k léčbě mnohočetného myelomu. [135] Pro léčbu osteosarkomu byly v současnosti navrženy aldehydové vysoce specifické inhibitory proteazomální  $\beta 5$  podjednotky, které jsou sice *in vitro* méně toxické než bortezomib, ale zároveň mnohonásobně šetrnější ke zdravým buňkám. Tato publikace navíc ukazuje vhodnost inhibice proteazomu v léčbě osteosarkomu. [136]

Známe ale současně látky, které mohou inhibovat proteazom a mít tak velmi slibné protirakovinné účinky, třeba právě proti velmi agresivnímu osteosarkomu. Mechanismy jejich působení se odlišují od zablokování katalytických míst proteazomu. Jedním z takových inhibitorů proteazomu by mohly být dithiokarbamátové komplexy s mědí, popřípadě jiným dvoumocným kovem. Tyto komplexy tvoří např. metabolity starého léčiva disulfiramu, prodávaného pod komerčním názvem antabus.

## 2.6 DISULFIRAM (ANTABUS)

### 2.6.1 Historie – disulfiram v praxi

Antabus (disulfiram) je v klinické praxi dobře znám a používán již velmi dlouho. Už v roce 1951 jej FDA povolila k léčbě závislosti na alkoholu. Princip léčby je založen na tzv. averzní terapii. Disulfiram inhibuje aldehyddehydrogenázu (ALDH), tedy enzym hrající klíčovou roli v metabolismu etanolu, kde převádí acetaldehyd na acetát. Inhibicí ALDH dochází k hromadění acetaldehydu v těle, což způsobuje toxicitu, projevující se nejprve rudnutím obličeje, pocením a mírnou bolestí hlavy. Se zvyšující se hladinou acetaldehydu se postupně dostavuje silná nevolnost, zvracení, křeče, tachykardie, hypotenze, hyperventilace, srdeční arytmie a dokonce i selhání srdce, infarkt a smrt. Tento velmi nepříjemný stav odrazuje alkoholika od dalšího požívání alkoholu. [137] Terapeutický potenciál disulfiramu byl odhalen v roce 1937, kdy E. E. Williams publikoval studii o vlastnostech disulfiramu. Zaznamenal totiž, že dělníci vystavení této látce při výrobě gumy byli nuceni od alkoholu abstinovat, neboť po jeho požití trpěli silnou nevolností. [138] V současnosti se také zvažuje využití disulfiramu v léčbě závislosti na kokainu. [139]

Disulfiram má velmi silné komplexotvorné vlastnosti. Komplexy vytváří především s dvojmocnými kovy, a proto byl také už počátkem 20. století využíván jako látka k hubení střevních parazitů. V jejich dýchacím řetězci hraje zásadní roli měď, kterou je disulfiram schopen vyvázat a vytvořit s ní koordinační sloučeninu. Právě díky svým komplexotvorným vlastnostem se dithiokarbamáty podávají jako antidota při otravách těžkými kovy. [140]

V roce 1977 publikoval E. F. Lewison článek, ve kterém zaznamenal případ pacientky, která se během užívání antabusu vyléčila z rakoviny. Tato žena musela kvůli chronickému alkoholismu přerušit hormonální léčbu metastatického karcinomu prsu s metastázemi v oblasti páteře, pánve, žeber a lebky. Po dobu deseti let přerušovaně užívala v rámci averzní terapie disulfiram, který během této doby růst nádoru nejenže zastavil, ale nakonec způsobil úplnou remisi nádorových ložisek a pacientka tak byla prohlášena za vyléčenou. [141] Článek však upadl v zapomnění a využití disulfiramu jako protirakovinného léčiva nebylo po řadu let zkoumáno.

Aktivním metabolitem disulfiramu je jeho redukována forma – diethyldithiokarbamát (DDTC), který vzniká především metabolickou aktivitou erytrocytů v krevním řečišti a v kyselém prostředí žaludku. [140] V 90. letech byla provedena studie účinku DDTC v kombinaci se standardní anthracyklinovou chemoterapií na 64 pacientkách trpících karcinomem prsu. Pacientky byly rozděleny do dvou skupin, z nichž jedné byl k anthracyklinové chemoterapii podáván DDTC a druhé placebo. V tomto experimentu se kombinovaná léčba s DDTC ukázala jako účinnější než klasická chemoterapie. V horizontu 6 let od diagnózy přežilo 81 % pacientek léčených kombinací obou látek, oproti 55 % pacientkám léčených klasickou chemoterapií. Autoři studie však tehdy chybně předpokládali, že za tímto jevem stojí imunomodulační schopnosti DDTC. [142] Navíc zde byly použity několikanásobně menší dávky DDTC (600 mg týdně), než je standardní dávka disulfiramu, která činí 250 – 500 mg, dříve až 3000 mg denně. V takových dávkách by se DDTC mohl v klinickém testu ukázat ještě mnohem účinnějším. [143]

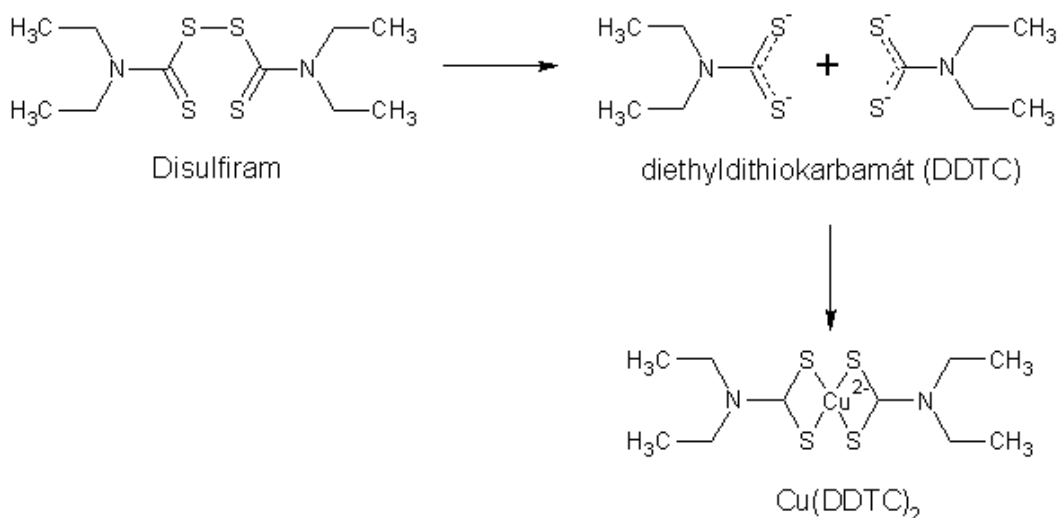
### 2.6.2 Mechanismus účinku disulfiramu

Ačkoli přesný mechanismus protinádorového účinku disulfiramu ještě není znám, víme, že disulfiram nezasahuje pouze proteazom, ale naopak je jeho efekt v buňkách značně pleiotropní. Různé metabolity disulfiramu pravděpodobně rozličně poškozují nádorové buňky, ale za apoptózu transformovaných buněk zřejmě zodpovídají diethyldithiokarbamátové komplexy s dvoumocným kovem. Jedná se o dvě molekuly DDTC, které chelačně váží kovový iont. Nejvyšší cytotoxicity proti nádorovým buňkám bylo dosaženo při použití koordinační sloučeniny DDTC a mědi –  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$  (bis-diethyldithiokarbamáto měďnatý komplex). [144] Pokud se v proteinech plazmy nachází měď, dochází nejen v krevním řečišti, ale částečně již v kyselém prostředí žaludku k samovolné tvorbě tohoto komplexu. Pro léčebné účely je možné hladinu mědi zvýšit užíváním glukonátu měďnatého. Kdyby tedy pacient užíval disulfiram v kombinaci s mědí, vznikal by v jeho těle aktivní komplex  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ . [144-145] Kombinace disulfiramu s glukonátem měďnatým dokonce vstoupila do klinického testu (ClinicalTrials.gov Identifier NCT00742911), jehož výsledky dosud nebyly publikovány. [146]

Zatím se stále nepodařilo objasnit, proč nejvyšší toxicitu vykazují právě komplexy s mědí, nicméně na základě tohoto poznatku vznikly rozličné, a pravděpodobně ne vždy správné, hypotézy. Měď představuje esenciální prvek pro život a růst tumoru a její hladina

v rakovinou zasažené oblasti, kde se akumuluje, je tak logicky mnohem vyšší než ve tkáni zdravé. [147] Na mědi závisí např. angiogeneze. Pro tvorbu cév a následnou výživu nádoru hraje zásadní roli faktor VEGF (vascular endothelial growth factor), jehož expresi absence mědi silně potlačuje. V současnosti jsou dokonce vyvíjeny léky, které by měly vychytáváním (chelací) mědi inhibovat angiogenezi. [148] Disulfiram v kombinaci s mědi zasahuje velké množství buněčných procesů a cílů. Pacient by však nebyl léčen synteticky připraveným komplexem  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ , ale disulfiramem, který se v těle redukuje na DDTC a reaguje s mědí za vzniku komplexu  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ . Použití disulfiramu je výhodné pro jeho nízkou cenu a snadnou dostupnost v lékárnách, což pro DDTC neplatí. Určité množství DDTC však měď nenavazuje a zůstává volné. Tyto metabolity disulfiramu vykazují vysokou reaktivitu a jsou možná zodpovědné za celou řadu jevů, které na rakovinných buňkách po aplikaci disulfiramu můžeme pozorovat. Jejich vliv na mechanismus účinku  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$  *in vivo* při podání disulfiramu a glukonátu měďnatého by tak nebylo dobré zanedbat.

**Obr. 4** – Struktura disulfiramu, jeho metabolitu DDTC a komplexu  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$



### 2.6.2.1 Inhibice proteazomu

V roce 2006 byl disulfiram identifikován jako inhibitor proteazomu *in vitro*. Při porovnání jeho účinku s bortezomibem se u obou látek vyskytovala shodná míra inhibice 26S proteazomu. [149] Hypotézu o inhibici proteazomu také podpořil experiment z roku 2004, který prokázal obecnou schopnost organických komplexů s mědí inhibovat funkci tohoto proteinového komplexu. [150] Dále bylo experimentálně prokázáno, že  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$  stejně jako bortezomib selektivně zabíjí pouze rakovinné buňky. U buněk zdravých, a dokonce

ani u buněk uměle immortalizovaných, nebyl cytotoxický účinek směsi disulfiramem s mědí detekován. Tento objev má velký význam, protože specifická je v léčbě onkologických onemocněním skvělým benefitem, neboť limituje vedlejší účinky terapeutika. [151]

Nabízí se však otázka, z jakého důvodu zkoumat další inhibitor proteazomu, když víme, že bortezomib, který je rovněž inhibitorem proteazomu, nemá proti solidním tumorům *in vivo* žádný terapeutický efekt. Odpovědí není pouze přítomnost dalších buněčných cílů zasahovaných disulfiramem s mědí a jeho mírné vedlejší účinky, ale také zcela odlišný mechanismus inhibice proteazomu, rozdílná farmakokinetika a farmakodynamika. Po přidání DDTC do média s příměsí mědi dojde ke vzniku vysoce lipofilního komplexu  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$  a následně k výraznému vzestupu koncentrace mědi uvnitř buněk, [152] což by mohlo naznačovat, že  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$  je biologicky dobře dostupný.

$\text{Cu}(\text{DDTC})_2$  inhibuje pouze 26S proteazom a na rozdíl od bortezomibu není schopen inhibovat samotný 20S proteazom. To naznačuje, že  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$  nezasahuje katalyticky aktivní místa ani další podjednotky 20S, ale že cíl tohoto komplexu pravděpodobně představuje regulační podjednotka – 19S proteazom, konkrétně JAMM doména deubikvitinačního metalloproteinového enzymu Poh1. [47] Jak již bylo řečeno dříve, Poh1 je velmi důležitým enzymem 19S proteazomu a jeho inhibice znemožňuje translokaci ubikvitinovaného substrátu do 20S proteazomu, což vede k zastavení ubikvitin-dependentní degradace proteinů. Metodou RNAi (RNA interference) bylo zjištěno, že se inhibice JAMM domény projevuje markantně sníženou proliferací a viabilitou nádorových buněk. [154]

### 2.6.2.2 Inhibice tvorby metastáz

Pro osteosarkom je charakteristická rychlá proliferace buněk a častá tvorba metastáz. Metastáze vzniká uvolněním maligní transformované buňky do krevního řečiště, kterým putuje, dokud se neusadí v cílové tkáni. V místě usazení se začne dělit a vytvářet tak nové ložisko nemoci. [1] Pro uvolnění takové buňky musí dojít k narušení mikroprostředí tumoru – extracelulární matrix. K tomuto účelu slouží metalloenzymy MMP (matrix metalloproteinases). Za fyziologických podmínek využívá organismus těchto enzymů např. v procesu hojení poškozených tkání. Ve zdravých buňkách je hladina a aktivita MMP enzymů přísně regulována, ale pro transformované buňky typicky nastává jejich deregulace vedoucí k růstu tumoru, angiogenezi a tvorbě metastáz. [155] MMP enzymy

hrají velmi důležitou úlohu také v buňkách osteosarkomu [156-157] a představují další buněčný cíl, který disulfiram, respektive komplexy jeho metabolitů (DDTC) s mědí, zasahují. Disulfiram pravděpodobně inhibuje enzymy MMP-2 a MMP-9 zodpovědné za degradaci kolagenu typu IV a fibronektinu. Degradaci těchto látek dochází k disociaci intercelulárních adhezních komplexů a extracelulární matrix. Inhibice MMP enzymů tedy zastavuje extracelulární degradativní procesy a zabraňuje růstu osteosarkomu a tvorbě metastází. Disulfiram tyto enzymy inhibuje pravděpodobně dvěma rozdílnými mechanismy. Jednak se jedná o již zmíněnou inhibici MMP, která je přímo úměrná koncentraci disulfiramu, a také o snížení exprese MMP řízené signální drahou NF- $\kappa$ B. Ta je inhibicí proteazomu zastavena, což vede k významnému snížení míry exprese MMP enzymů. [158]

### **2.6.2.3 Indukce oxidačního stresu**

Směs disulfiramu s mědí, ve které  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$  vzniká, způsobuje apoptózu nádorových buněk. [159] Přítomnost nadměrného množství thiolových antioxidantů (např. glutathion) tuto programovanou buněčnou smrt inhibuje. Oxidativní stres je tedy stav, který pravděpodobně podmiňuje vstup buňky do apoptózy indukované směsí disulfiramu s mědí. [160-161] Disulfiram v buňkách významně zvyšuje hladiny superoxidů a způsobuje depolarizaci vnitřní mitochondriální membrány, tedy jevu, který apoptóze předchází. [162] U buněk inkubovaných se směsí mědi a disulfiramu byla naměřena zvýšená exprese cytoplazmatické superoxiddismutázy SOD1, mitochondriální superoxiddismutázy mnSOD a katalázy. Těmito enzymy se buňka brání zvýšené produkci superoxidu. SOD enzymy katalyzují přeměnu superoxidů na peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), který následně podléhá rozkladu katalázou na kyslík ( $\text{O}_2$ ) a vodu ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Peroxid vodíku se vytváří rovněž exogenně. Ve vnějším prostředí buňky však nemůže být dostatečně eliminován, což vede k jeho interferenci s thiolredoxními systémy buňky, kde oxiduje glutation, a tím jej inaktivuje. Následně dochází k narušení redoxní rovnováhy buňky a k indukci oxidačního stresu prostřednictvím jiných oxidantů a volných radikálů. [144]

### **2.6.2.4 Senzibilizace buněk s resistencí vůči léčivům**

Jedním z problémů v léčbě onkologických onemocnění je rezistence buněk vůči použitým léčivům – MDR (multidrug resistance). Po dlouhodobé aplikaci léku se vůči němu totiž buňky stávají rezistentními, což komplikuje další léčbu. Vznik MDR nicméně znamená

odolnost buňky proti naprosté většině terapeutik, nikoli pouze proti cytostatikům. Tento problém se nevyhýbá ani inhibitorům proteazomu, jako je například bortezomib. Známe širokou škálu mechanismů, které mohou buňky k získání resistance použít. Velmi významné jsou tzv. ABC (ATP-binding cassette) transportéry, tedy transmembránové proteiny umožňující ATP dependentní transport molekul přes cytoplazmatickou membránu do vnějšího prostředí z buňky. [163] V současnosti známe 48 členů rodiny ABC transportérů, kteří se označují jako MRP (multidrug resistance protein), z nichž většina je specializovaná pro transport určitých skupin látek. Konkrétně se jedná o transport xenobiotik, četných endogenních látek či produktů metabolismu, jako jsou glutathionové konjugáty, redukovaný glutathion, bilirubin, cGMP (cyklický guanozinmonofosfát) a různé imunomodulátory. [164] Mezi ABC transportéry řadíme například P-glykoprotein. Ten se vyskytuje také ve zdravých buňkách, kde zodpovídá zejména za ochranu před buněčnými toxiny, zamezení apoptóze, správnou funkci T-lymfocytů a NK buněk (natural killers) a metabolismus cholesterolu. V rakovinných buňkách však může dojít k nadměrné expresi P-glykoproteinu a jeho zvýšená koncentrace pak dává vzniknout MDR. [165] Ve snaze zablockovat a obejít MDR vyvíjejí farmaceutické společnosti různé inhibitory P-glykoproteinu. Tyto látky sice potlačují rezistenci buněk, nicméně vyvolávají nepříznivé vedlejší účinky a zatěžují tak pacientův organismus. Jednu z dalších vlastností disulfiramu představuje potlačení MDR. Disulfiram pravděpodobně neinhibuje P-glykoprotein, ale zastavuje proces jeho maturace, čímž se od ostatních inhibitorů liší. Jeho použitím by se mohlo předcházet vzniku MDR. Navíc se již dlouho využívá v praxi a jeho vedlejší účinky a reakce organismu na dlouhodobou expozici jsou známé a poměrně mírné. [166]

Disulfiram se zdá být vhodným lékem na rakovinu hned z několika důvodů. Jedná se o organismem velmi dobře snášené léčivo, které selektivně zabíjí pouze rakovinné buňky, jimž přivozuje apoptotickou smrt. [151] Zároveň také brání tvorbě metastáz [158] a potlačuje rezistenci proti použitým lékům. [166] Mezi pozitiva disulfiramu patří také jeho snadná dostupnost a finanční nenákladnost léčby.



## 2.7 NOVÁ VYUŽITÍ PRO STARÁ LÉČIVA

Současná medicínská věda a farmaceutický průmysl stojí před závažným problémem. Náklady na výzkum a vývoj nových léků neustále rostou, a přesto jejich počet téměř stagnuje. Medicínská věda s rozsáhlou a stále se rozšiřující znalostí buněčných fyziologických i patologických dějů dokázala stanovit bezpočet cílů pro nová potenciální léčiva, nicméně pouze minoritní část látek zaměřených na tyto cíle uspěje v klinických testech. [167] S tímto problémem se farmaceutický průmysl a především zdravotnické systémy potýkají něco málo přes deset let. Situace se v současnosti dostala tak daleko, že vývoj jednoho léku trvá průměrně 13,5 let a stojí 1,8 miliardy USD. [168]

Před padesáti lety byla situace odlišná. Tehdy zvýšení finančních prostředků znamenalo také nárůst vyprodukovaných a schválených léčiv. [168] M. J. Keiser a kol. publikovali v roce 2009 v časopise Nature studii, ve které ukazují, že právě hledání přesných molekulárních cílů pro léčiva vhání medicínskou vědu do jakési „slepé uličky“. Z jejich článku vyplývá, že i známé a používané léky mají obrovské množství interakcí s různými proteiny a molekulami, které v širokém měřítku téměř nejsme schopni určit. V cytoplasmě se vyskytuje tolik strukturně podobných látek či proteinů s podobnými doménami a vzájemně interagujících signálních kaskád, že snaha zasáhnout pouze jedinou signální dráhu nebo molekulu je podle zmíněného zdroje poněkud iluzorní představa. Léky s domněle známým mechanismem účinku dokonce možná fungují ve skutečnosti zcela jinak, prostřednictvím tzv. off-target molekul, tedy prostřednictvím proteinů, se kterými léčivo interaguje, ale které podle dostupných znalostí nejsou zodpovědné za jeho terapeutický efekt, nebo které nejsou známy. Stejně interakce rovněž zodpovídají za vznik vedlejších účinků léků. [169] Přesto je snaha o nalezení těchto cílených terapií pochopitelná, protože takové léčebné prostředky by mohly být velmi účinné a bez vedlejších účinků.

Každý rok se finanční podpora vývoje léčiv téměř zdvojnásobí, ale počet schválených léků se pohybuje pouze mezi dvaceti až třiceti ročně. Pokud by tento trend pokračoval, dosáhneme dvojnásobné produkce léků asi až za 300 let. Takto nastavený systém je nejen velmi nákladný, ale hlavně neefektivní. Farmaceutický průmysl za daných podmínek nedokáže dostatečně flexibilně reagovat například na existenci a objev nových patogenů a neznámých nemocí. [170] Klinickými testy úspěšně projde pouze 30 % potenciálních terapeutik, které do nich vstoupí. Peníze investované na výzkum 70 % látek se tedy

efektivně nevracejí zpět. [171] To pro zdravotnický systém znamená obrovské finanční ztráty. Z důvodů pokrytí nákladů na neschválená léčiva jsou ceny schválených léků logicky velmi vysoké, což opět představuje významnou finanční zátěž pro zdravotní systémy a způsobuje nedostupnost léků pro chudé obyvatelstvo. Oba tyto jevy mohou v budoucnu vyústit ve zhroucení celého zdravotnického systému a je třeba je řešit. [172]

Studie ukazují, že velké farmaceutické firmy jsou schopné zvládat finančně tíživou a problematickou situaci lépe než firmy malé. [171] Díky tomuto faktu dochází konzistentně ze strany státu ke komercializaci zdravotnického systému a ke snaze konsolidovat trh, tedy sloučit firmy do větších konglomerátů. V poslední době došlo například ke konsolidaci firem Genetech a Roche, Wyeth a Pfizer nebo Schering-Plough a Merck. [168] Zatím se však efektivita tohoto postupu neprokázala, protože podle nejnovějších publikací problémy přetrvávají. [173] Curtis R. Chong a David J. Sullivan ve svém článku z roku 2007 navrhují jiné řešení. Podle nich by se měla pozornost věnovat hledání nových uplatnění pro stará léčiva. [170] Velké množství nepředpokládaných interferencí a off-target mechanismů, které popisuje Keiser [169] a které prakticky znemožňují vývoj cílené léčby, se v tomto alternativním přístupu vývoje zdají být naopak velmi užitečnými, protože poskytují každému léku velké množství dalších potenciálních cílů využitelných v celé řadě patologických stavů. [174] U starých a prověřených léčiv navíc známe farmakokinetiku, farmakodynamiku, kontraindikace i vedlejší účinky, což šetří až 40 % nákladů na klinické testování. Chong a Sullivan dále nastiňují vytvoření rozsáhlých databází a knihoven, které by o lécích sbíraly a hromadily údaje. [170]

Koncept navržený Chongem a Sullivanem se v některých státech již uplatňuje v praxi. Monitorují a zaznamenávají se jak negativní, tak i tzv. pozitivní vedlejší účinky. Seznam pozitivních vedlejších účinků by mohl umožnit využití starých léčiv k léčbě zcela jiných onemocnění bez nutnosti složitých klinických testů a tvorby patentů. [175] Výborným příkladem nalezení nových využití pro stará léčiva je lék thalidomid, který byl původně zaveden jako přípravek proti nevolnostem v průběhu těhotenství. Po zjištění, že thalidomid způsobuje těžké malformace a poškození plodu, došlo ke stažení přípravku z trhu. Za několik desítek let však našel uplatnění v léčbě lepry a následně dokonce i v léčbě mnohočetného myelomu. [176]

První společností, která se začala zabývat nejen hledáním nových použití pro stará léčiva, ale také vytvořením neziskových léků, především proti onkologickým onemocněním, je

bostonská nezisková organizace Global Cures. Ta se snaží získat finanční prostředky k zavedení nových a hlavně levných léčiv do klinické praxe. Léky, jejichž klinické testy by se zaplatily z veřejných peněz, by nebyly majetkem farmaceutické firmy, což by umožnilo jejich velmi nenákladnou produkci i distribuci do chudých zemí v Africe či Asii. [177] Mezi takováto léčiva patří právě disulfiram. K zahájení klinických testů, které žádná farmaceutická firma nezaplatí, neboť taková investice se bez patentu látky firmě nikdy nevrátí, je však třeba sehnat dostatek prostředků. Finanční účast států a neziskových organizací není tedy jen nezbytná, ale dokonce i výhodná. Zavedení levného léku proti rakovině by ušetřilo spousty výdajů spojených s její léčbou. Dvanáct cyklů ambulantní léčby jednoho pacienta s osteosarkomem vysokými dávkami methotrexátu stojí průměrně 8 712 USD. [178] Léčba disulfiramem by přitom byla přibližně patnáctkrát levnější, kdy cena terapie na celý rok činí asi 550 USD. K zahájení klinických testů jsou však nutné přesvědčivé důkazy o funkčnosti přípravku a znalost jeho mechanismu účinku, aby veřejnost neinvestovala do léku, který v klinických testech selže. Disulfiram má před sebou pravděpodobně slibnou budoucnost. Již dokonce vstoupil do několika klinických testů, přičemž v současnosti se připravuje III. fáze jeho klinického testování proti karcinomu prsu. [177] Zda je uplatnění tohoto léku reálné i v léčbě osteosarkomu, mohou potvrdit pouze klinické testy, k jejichž zahájení je však potřeba spousta předcházejících *in vitro* i *in vivo* experimentů.

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem mé bakalářské práce bylo pojmout teoretické znalosti o příčinách vzniku osteosarkomu a problémech, které jsou s jeho léčbou spojené. Dále zde měly být shrnuty současné vědomosti o činnosti ubikvitin-proteazomového systému a jeho významu nejen pro zdravé, ale především rakovinné buňky včetně buněk osteosarkomu. Spojení těchto informací mělo vést k vytvoření uceleného pohledu na vztah mezi rakovinou a ubikvitin-proteazomovým systémem. Na základě těchto znalostí se nakonec práce zabývá terapeutickým potenciálem látek interferujících s ubikvitin-proteazomovým systémem, tedy bortezomibem a  $\text{Cu(DDTC)}_2$ . Experimentální část je pak zaměřena na zjištění vhodnosti užití těchto látek pro léčbu osteosarkomu v *in vitro* podmínkách.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 MATERIÁL A METODIKA

#### 4.1.1 Biologický materiál

Experiment byl proveden na buněčné linii odvozené z osteosarkomu U-2 OS, obdržené z ATTC: The Global Bioresource Center. Jedná se o mírně diferenciované, adherentně rostoucí buňky, které byly v roce 1964 odebrány patnáctileté pacientce z osteosarkomu holenní kosti.

#### 4.1.2 Chemikálie

- Deionizovaná voda (přístrojem Aqua osmotic)
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich
- $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 307483-100G, Sigma-Aldrich
- Diethyldithiokarbamát sodný trihydrát (DDTC), Sigma-Aldrich
- Komplex diethyldithiokarnamátu měďnatého  $\text{Cu(DDTC)}_2$ , Mgr. Boris Cvek Ph.D.
- Bortezomib, Millennium Pharmaceuticals
- Triton-X 100, 37240, Serva
- Trypanová modř, T6146-256, Sigma-Aldrich
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose; With 4500 mg/l glucose, sodium pyruvate, and sodium bicarbonate, without L-glutamine, liquid, sterile-filtered, cell culture tested, D6546-6X500ML, Sigma-Aldrich
- Fetal Bovine Serum; Heat inactivated, sterile-filtered, cell culture tested, F9665-500ML, Sigma-Aldrich
- Penicilin/Streptomycin (100 ml), P11-010 PAA, The Cell Culture Company
- L-glutamin G63921-VL, Sigma-Aldrich
- 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylyl tetrazolium bromid (MTT), Sigma-Aldrich

#### 4.1.3 Roztoky

- Zásobní roztok  $\text{CuCl}_2$  v  $\text{H}_2\text{O}$ ; 1 mol/l

- Zásobní roztok DDTC v H<sub>2</sub>O; 200 mmol/l
- Zásobní roztok Cu(DDTC)<sub>2</sub> v DMSO; 15 mmol/l (před každým experimentem byl připraven nový zásobní roztok)
- Zásobní roztok bortezomibu v DMSO; 3,5 mmol/l
- PBS 1x (pH 7,4) NaCl 4 g; KCl 0,1 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O 1,605 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01 g
- MTT roztok v PBS 3 mg/ml
- 1% NH<sub>3</sub> v DMSO (MTT rozpouštěcí roztok)
- Trypsin-EDTA solution; 0.25%, 2.5 g porcine trypsin and 0.2 g EDTA. 4Na per liter of Hanks' Balanced Salt Solution with phenol red, sterile-filtered, cell culture tested, T4049-500ML, Sigma-Aldrich
- Médium (500 ml DMEM, 50 ml Fetal Bovine Serum, 5 ml penicilin/streptomycin, 5 ml L-glutamin)

#### 4.1.4 Laboratorní vybavení

- Mikrozkušavky 0,5 ml, Tubes for you
- Mikrozkušavky 1,5 ml, Tubes for you
- Mikrozkušavky 2 ml, Tubes for you
- Kultivační destičky, 96 jamek, Orange Scientific
- Kultivační destičky, 24 jamek, Orange Scientific
- Kultivační láhev, 25 cm<sup>2</sup>, filter cap, Orange Scientific
- Kultivační láhev, 75 cm<sup>2</sup>, filter cap, Orange Scientific
- Centrifugační zkumavky 50 ml, Orange Scientific
- Centrifugační zkumavky, 15 ml, Orange Scientific
- Petriho misky
- Plastové pipety 5 ml, 10 ml. Orange Scientific
- epTIPS 0,1 – 10 µl, 2 × 500 špiček, Eppendorf
- epTIPS 2 – 200 µl, 2 × 500 špiček, Eppendorf
- epTIPS 50 – 1000 µl, 2 × 500 špiček, Eppendorf
- Immobilion<sup>®</sup>-P Polyvinylidene Difluoride membranes, Milipore
- Stříkačka plastová z PP pro jednorázové použití 50 ml, Chirana
- Stojany na zkumavky, lihový kahan, zapalovač, Bürkerova komůrka, latexové rukavice

#### **4.1.5 Přístroje**

- Automatické pipety (0,1 – 2,5 µl; 0,5 – 10 µl; 2 – 20 µl; 10 – 100 µl; 50 – 200 µl; 100 – 1000 µl), Eppendorf
- Multi-kanálová automatická pipeta (30 – 300 µl), Biohit Proline plus
- Pipetovací nástavec SWIFTPET
- Laminární box SafeFAST Top, Faster, Itálie
- Inkubátor Contherm, Nový Zéland
- Mikroskop T2 103411, Olympus, ČR
- Invertovaný mikroskop Novel Optics
- Třepačka Reax Top Heidolf, Německo
- Váhy Kern ABS 80-4, Německo
- Vodní lázeň LCB 11(330 × 270 × 380) LabTech, Česká republika
- Spektrofotometr Tecan, Švýcarsko
- Membránová vývěva, KNF-lab, Francie

#### **4.1.6 Použitý software**

- MS Office Excel 2010
- MS Office Word 2010
- StatSoft STATISTICA v. 10
- GIMP v. 2.8
- Tecan I-Control
- ScopeImage DynamicPro
- ED50plus v. 1.0

#### **4.1.7 Hodnocení cytotoxicity pomocí MTT testu**

##### **4.1.7.1 Princip MTT testu**

MTT test je kolorimetrická metoda, která se používá k měření viability buněk po aplikaci testovaných látek. Testovaná látka se ve vhodných koncentracích přidává do media (není vhodné, aby látka vyhubila všechny buňky) a inkubuje se s buňkami za fyziologické teploty po různě dlouhé časové úseky. Medium s testovanou látkou je poté odstraněno

a nahrazeno mediem s obsahem MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu). Buňky se spolu s MTT inkubují 30 minut až půl hodiny. Živé buňky metabolizují MTT na nerozpustnou fialovou sloučeninu zvanou formazan. Tuto reakci zprostředkovávají mitochondriální dehydrogenázy. Protože jsou krystaly formazanu obsaženy uvnitř buněk, musí se rozpustit v DMSO (s 1% koncentrací  $\text{NH}_3$ ). Intenzita zabarvení je měřena spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm a změřená absorbance je přímo úměrná viabilitě buněk, která se vypočítá podle hodnoty absorbance negativní kontroly (100% viabilita). Výhody této metody jsou především její rychlost a finanční a technická nenáročnost. Navíc umožňuje zhodnotit velké množství vzorků najednou. Nicméně tato metoda neposkytuje informace o mechanismu účinku testované látky a výsledky jsou zatíženy poměrně značnou chybou měření.

#### **4.1.7.2 Postup práce**

##### **4.1.7.2.1 Rozmražení buněk (U-2 OS)**

Kryozkumavka s buněčnou linií U-2 OS zmraženou při  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  byla otevřena a byl do ní opakovaně přidáván 1 ml na  $37\text{ }^\circ\text{C}$  vytemperovaného media a jím rozmražené buňky byly následně přenášeny do malé kultivační láhve ( $25\text{ cm}^2$ ). Po kompletním rozmrazení buněk byly 24 hodin inkubovány při teplotě  $37\text{ }^\circ\text{C}$  v 5% atmosféře  $\text{CO}_2$ . Poté jim bylo vyměněno medium.

##### **4.1.7.2.2 Kultivace buněk**

- Adherentní buněčná linie U-2 OS byla kultivována ve střední kultivační láhvi ( $75\text{ cm}^2$ ) s 16 ml media v 5% atmosféře  $\text{CO}_2$  při  $37\text{ }^\circ\text{C}$ .

##### **4.1.7.2.3 Pasážování buněk**

- Medium bylo odsáto a kultivační láhev následně promyta 6 ml  $1\times$  ředěného PBS vytemperovaného na  $37\text{ }^\circ\text{C}$ .
- Do kultivační láhve byl přidán 1 ml trypsinu, který působil na buňky po dobu 2 minut.



- Trypsin byl neutralizován přidáním 9 ml na 37 °C vytemperovaného media a plastovou pipetou byly resuspendovány shluky buněk. Buněčná suspenze byla přenesena do plastové centrifugační zkumavky (50 ml).
- 1 ml buněčné suspenze byl vložen zpět do střední kultivační láhve (75 cm<sup>2</sup>), která byla následně doplněna 15 ml na 37 °C vytemperovaného media. Poté byla kultivační láhev vložena do inkubátoru (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C).

#### 4.1.7.2.4 Počítání buněk a výsev

- Bylo odebráno 10 µl buněčné suspenze a vloženo do mikrozkušavky (0,5 ml) a v nesterilním prostředí pak bylo do stejné mikrozkušavky přidáno 90 µl trypanové modři.
- Z této suspenze bylo dvakrát odebráno 10 µl a vloženo na počítací mřížky Bürkerovy komůrky. Pomocí mikroskopu byly spočítány buňky v deseti čtvercích.
- Z tohoto množství bylo vypočítáno množství buněk v 1 ml suspenze a následně bylo vypočteno kolik suspenze a kolik media bude potřeba smíchat pro vytvoření buněčné suspenze s takovou koncentrací buněk, aby do požadovaného množství jamek na kultivační destičce (96 jamek) bylo nanášeno 20 000 buněk v 200 µl suspenze.
- Takto vytvořená suspenze byla vložena do Petriho misky a z ní osmikanálovou pipetou bylo opakovaně nanášeno 200 µl do jamek kultivační destičky.

#### 4.1.7.2.5 Příprava roztoků

- Látky (CuCl<sub>2</sub>, DDTC, Cu(DDTC)<sub>2</sub> a bortezomib) byly testovány ve čtyřech koncentracích, přičemž pro každou koncentraci byl vysázen jeden triplet jamek.
- Zásobní roztok (1 mol/l) dihydrátu chloridu měďnatého (CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, Mr = 170,5 g/mol) byl připraven rozpuštěním 340,96 mg CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O v 2 ml deionizované vody. Tento zásobní roztok byl z důvodu kontaminace přefiltrován přes sterilní membránu. Ze zásobního roztoku byly připraveny roztoky o koncentracích 100; 500; 750 a 1000 mmol/l. Jako rozpouštědlo byla použita deionizovaná sterilní voda.
- Zásobní roztok (200 mmol/l) diethyldithiokarbamátu sodného trihydrátu (DDTC, Mr = 225,3 g/mol) byl připraven rozpuštěním 90,12 mg DDTC ve 2 ml

deionizované vody. Tento zásobní roztok byl z důvodu kontaminace přefiltrován přes sterilní membránu. Ze zásobního roztoku byly připraveny roztoky o koncentracích 10; 50; 100 a 200 mmol/l. Jako rozpouštědlo byla použita sterilní deionizovaná voda.

- Zásobní roztok bortezomibu (3,5 mmol/l) byl uchováván v mrazáku (-20 °C) a byly z něj připravovány roztoky o koncentracích 1; 0,1; 0,01 a 0,001 mmol/l. Jako rozpouštědlo byl použit dimethylsulfoxid (DMSO).
- Zásobní roztok (15 mmol/l) diethyldithiokarbamátového komplexu s mědí ( $\text{Cu(DDTC)}_2$ ,  $M_r = 360,1 \text{ g/mol}$ ) byl připraven rozpuštěním 1,1 mg v 200  $\mu\text{l}$  dimethylsulfoxidu (DMSO). Z něj byly pak připraveny roztoky o koncentracích 5; 2,5; 1 a 0,1 mmol/l. Jako rozpouštědlo byl použit dimethylsulfoxid (DMSO).

#### **4.1.7.2.6 Aplikace testovaných látek na buňky**

- Připravené roztoky testovaných látek byly následujícím způsobem smíchány s mediem. Z každého připraveného roztoku testované látky byl odebrán 1  $\mu\text{l}$  a smíchán s 999  $\mu\text{l}$  media, čímž byl každý roztok 1000x naředěn.
- Pozitivní kontrola byla vytvořena smícháním 630  $\mu\text{l}$  media s 370  $\mu\text{l}$  20% tritonu.
- Negativní kontrola pro vzorky, kde byla jako rozpouštědlo použita voda, byla vytvořena smícháním 1  $\mu\text{l}$  sterilní deionizované vody s 999  $\mu\text{l}$  media.
- Negativní kontrola pro vzorky, kde byl jako rozpouštědlo použit dimethylsulfoxid, byla vytvořena smícháním 1  $\mu\text{l}$  dimethylsulfoxidu s 999  $\mu\text{l}$  media.
- Z kultivační destičky bylo odsáto medium a do jamek bylo nanášeno vždy po 200  $\mu\text{l}$  směsi testované látky a media, pro každou ze čtyř koncentrací do tří jamek (triplet). Po jednom tripletu byly také vysázeny kontroly.
- Kultivační destička byla po dobu 24 hodin kultivována v inkubátoru při 37 °C v atmosféře 5%  $\text{CO}_2$ .

#### **4.1.7.2.7 MTT test**

- Z kultivační destičky bylo odstraněno medium a jamky byly následně propláchnuty 100  $\mu\text{l}$  PBS 1x.
- Do každé jamky bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  směsi 1 ml roztoku MTT (3 mg/ml v PBS 1x) v 9 ml media.

- Kultivační destička byla 60 minut inkubována při 37 °C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub>.
- Následně byla z jamek odstraněna kapalina a k rozpuštění krystalků formazanu bylo do každé jamky přidáno 100 µl 1% roztoku NH<sub>3</sub> v DMSO.
- Míra zbarvení byla proměřena pomocí spektrofotometru při vlnové délce 570 nm.

#### 4.1.7.2.8 Určení viability buněk

Ve všech MTT testech byly na buněčné linii U-2 OS testovány 4 koncentrace každé z testovaných látek, a to vždy po jednom tripletu jamek na jednu koncentraci. Viabilita buněk po 24 hodinové inkubaci s testovanými látkami byla vypočítána následujícím způsobem:

- Hodnoty absorbance daného tripletu byly zprůměrovány.
- Od průměrné hodnoty absorbance byla odečtena průměrná hodnota absorbance tripletu pozitivní kontroly (roztok tritonu).
- Byly zprůměrovány hodnoty absorbance negativní kontroly (medium s H<sub>2</sub>O, nebo DMSO) a od průměrné hodnoty absorbance negativní kontroly byla odečtena průměrná hodnota absorbance pozitivní kontroly.
- Viabilita byla vypočítána následujícím výpočtem:

$$\frac{A_{prum\ vzorku} - A_{prum\ poz.\ kontroly}}{A_{prum\ neg.\ kontroly} - A_{prum\ poz.\ kontroly}} \cdot 100$$

#### 4.1.8 Zpracování výsledků

Data, získaná pomocí MTT testu, jsou uvedena jako průměrné hodnoty tří nezávislých experimentů se směrodatnou odchylkou (SD). Ke statistickému zhodnocení výsledků byl použit dvourozměrný Studentův T-test. Jako statisticky signifikantní byla považována hladina  $p \leq 0,05$ , tedy že mé výsledky jsou dílem náhody s pravděpodobností menší než 5 %. Pokud byla hodnota  $p \leq 0,05$ , výsledky byly brány jako statisticky signifikantní. Hodnoty IC<sub>50</sub> byly stanoveny pomocí programu ED50plus v 1.0

## 5 VÝSLEDKY

V experimentální části byla pomocí MTT testu testována cytotoxicita DDTC (diethyldithiokarbamátu),  $\text{CuCl}_2$  (chloridu měďnatého) a komplexu těchto dvou sloučenin –  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$  vůči buněčné linii U-2 OS. Získaná data byla porovnána s cytotoxicitou bortezomibu vůči též buněčné linii. K porovnání efektivity látek byly stanoveny hodnoty poloviční inhibiční koncentrace  $\text{IC}_{50}$ .  $\text{IC}_{50}$  je hodnota, která odpovídá takové koncentraci aplikované látky, při které dojde k úmrtí 50 % buněk, viabilita buněk je tedy 50%. Tato hodnota byla odečtena z grafu lineární regrese závislosti viability buněčné linie U-2 OS na koncentraci aplikované látky pomocí programu ED50plus v 1.0.

### 5.1.1 Vliv bortezomibu na viabilitu buněk buněčné linie U-2 OS

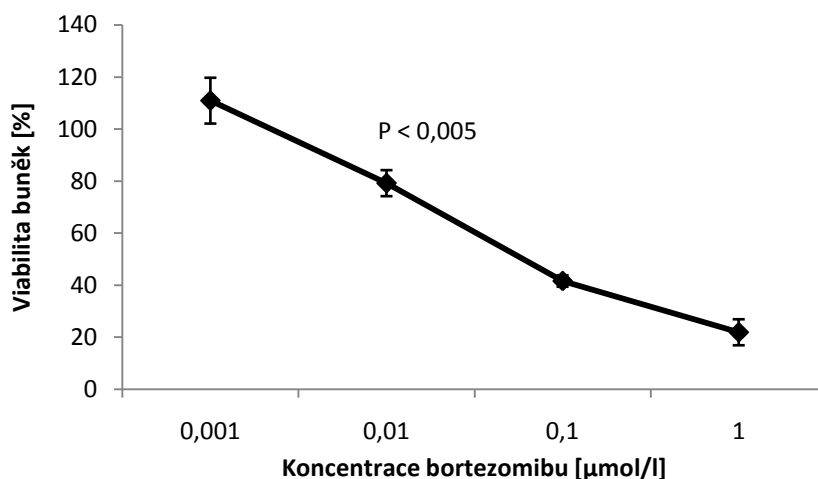
Buňky U-2 OS byly po dobu 24 hodin vystaveny působení roztoků bortezomibu v DMSO, které byly přidány do média. Výsledky (viz Tab. 1) ukazují, že bortezomib je pro buněčnou linii U-2 OS vysoce toxický s průměrnou hodnotou  $\text{IC}_{50} = 0,4 \mu\text{mol/l}$ . Statisticky průkazné byly výsledky od koncentrace bortezomibu rovné  $0,01 \mu\text{mol/l}$  ( $p < 0,005$ ;  $n = 3$ ). Závislost viability buněk na koncentraci bortezomibu je graficky znázorněna na Obr. 5. Vysoká cytotoxicita tohoto inhibitoru proteazomu naznačuje, že buňky U-2 OS jsou k inhibici proteazomu *in vitro* citlivé.

**Tab. 1** - Vliv bortezomibu na viabilitu buněk U-2 OS

Koncentrace [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Viabilita [%]				
	1. opakování	2. opakování	3. opakování	průměr	SD
0,001	98,5	117,5	116,7	<b>110,9</b>	8,8
0,01	73,8	85,9	78	<b>79,2</b>	5,0
0,1	44,8	40,3	39,8	<b>41,6</b>	2,2
1	27,6	15,5	22,7	<b>21,9</b>	5,0

(SD – směrodatná odchylka)

**Obr. 5** - Viabilita buněk U-2 OS v závislosti na koncentraci bortezomibu



### 5.1.2 Vliv DDTC na viabilitu buněk buněčné linie U-2 OS

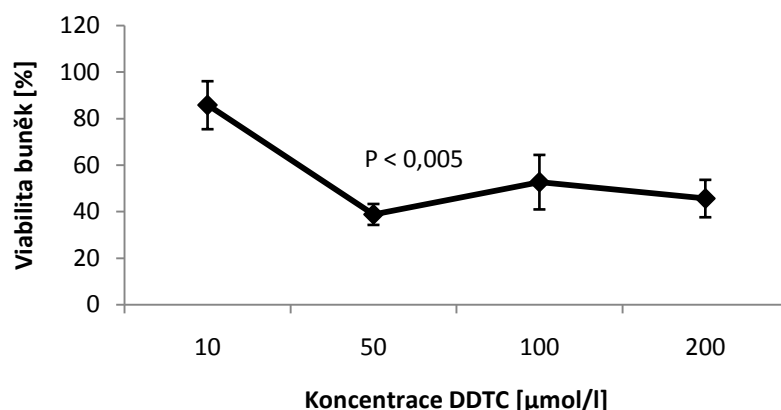
Na buňky U-2 OS bylo po dobu 24 hodin působeno roztoky DDTC (hlavním metabolitem disulfiramu) ve sterilní deionizované vodě. MTT test ukázal, že toxicita DDTC vůči buňkám je bifázického charakteru (viz Tab. 2), čili že DDTC viabilitu buněk nesnižuje kontinuálně. S rostoucí koncentrací viabilita buněk nejprve klesá, poté se opět zvýší, a nakonec se dostaví další pokles. Z důvodu nepravidelnosti křivky nebyla hodnota  $IC_{50}$  pro DDTC stanovena. DDTC dosáhl nejvyšší toxicity při koncentracích 50  $\mu\text{mol/l}$ , kdy viabilita buněk klesla na 38,8 %, a 200  $\mu\text{mol/l}$ , kdy viabilita buněk klesla na 45,7 %. Přestože hodnota  $IC_{50}$  nebyla určena, byla zjevně překročena. Statisticky průkazné byly výsledky od koncentrace DDTC rovné 50  $\mu\text{mol/l}$  ( $p < 0,005$ ;  $n = 3$ ). Závislost viability buněk na koncentraci DDTC je graficky znázorněna na Obr. 6.

**Tab. 2** - Vliv DDTC na viabilitu buněk U-2 OS

Koncentrace [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Viabilita [%]				
	1. opakování	2. opakování	3. opakování	průměr	SD
10	81,8	75,6	99,9	<b>85,8</b>	10,3
50	42,5	32,5	41,5	<b>38,8</b>	4,5
100	66,4	53,9	37,8	<b>52,7</b>	11,7
200	47,6	54,4	35	<b>45,7</b>	8,0

(SD – směrodatná odchylka)

**Obr. 6** - Viabilita buněk U-2 OS v závislosti na koncentraci DDTC



### 5.1.3 Vliv $\text{CuCl}_2$ na viabilitu buněk buněčné linie U-2 OS

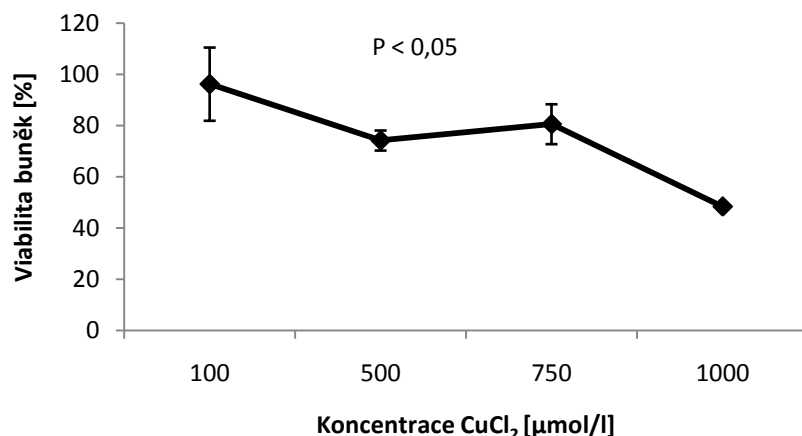
Na buňky U-2 OS bylo po dobu 24 hodin působeno roztoky  $\text{CuCl}_2$  ve sterilní deionizované vodě. Samotný  $\text{CuCl}_2$  podle výsledků snižuje viabilitu buněk U-2 OS až při relativně vysokých koncentracích (viz Tab. 3). Hodnota  $\text{IC}_{50}$  pro  $\text{CuCl}_2$  nebyla přesně stanovena, protože přesahuje nejvyšší použitou koncentraci roztoku (1000  $\mu\text{mol/l}$ ),  $\text{IC}_{50} > 1000$   $\mu\text{mol/l}$ . Statisticky průkazné byly výsledky od koncentrace  $\text{CuCl}_2$  rovné 500  $\mu\text{mol/l}$  ( $p < 0,05$ ;  $n = 3$ ). Závislost viability buněk na koncentraci  $\text{CuCl}_2$  je znázorněna na Obr. 7.

**Tab. 3** - Vliv  $\text{CuCl}_2$  na viabilitu buněk U-2 OS

Koncentrace [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Viabilita [%]				
	1. opakování	2. opakování	3. opakování	průměr	SD
100	80,4	115	93	<b>96,1</b>	14,3
500	69	74,9	78,5	<b>74,1</b>	3,9
750	69,5	85,3	86,7	<b>80,5</b>	7,8
1000	46,8	49,6	48,6	<b>48,3</b>	1,2

(SD – směrodatná odchylka)

**Obr. 7** - Viabilita buněk U-2 OS v závislosti na koncentraci  $\text{CuCl}_2$



#### 5.1.4 Vliv komplexu $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ na viabilitu buněk buněčné linie U-2 OS

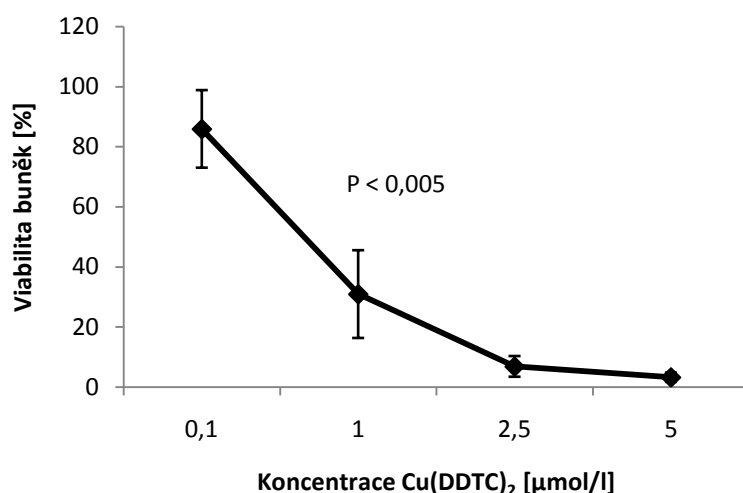
Na buňky U-2 OS bylo po dobu 24 hodin působeno roztoky  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$  v DMSO, které byly rozpuštěny v médiu. Diethyldithiokarbamátový komplex s mědí je komplexem dvou již zmíněných testovaných látek (DDTC a  $\text{CuCl}_2$ ), u nichž nebyla vůči buněčné linii U-2 OS detekována výrazná cytotoxicita. Komplex  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$  se na rozdíl od svých jednotlivých komponent ukázal být pro použítou buněčnou linii vysoce toxický (viz Tab. 4) s průměrnou hodnotou  $\text{IC}_{50} = 1,3 \mu\text{mol/l}$ . Statisticky průkazné byly výsledky od koncentrace  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$  rovné  $0,01 \mu\text{mol/l}$  ( $p < 0,005$ ;  $n = 3$ ). Závislost viability na koncentraci  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$  je graficky znázorněna na Obr. 8.

**Tab. 4** - Vliv  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$  na viabilitu buněk U-2 OS

Koncentrace [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Viabilita [%]				
	1. opakování	2. opakování	3. opakování	průměr	SD
0,1	75,5	104,1	78,0	<b>85,9</b>	12,9
1	18,3	51,4	23,1	<b>30,9</b>	14,6
2,5	9,2	2,0	9,4	<b>6,9</b>	3,4
5	5,1	1,3	3,4	<b>3,3</b>	1,5

(SD – směrodatná odchylka)

**Obr. 8** - Viabilita buněk U-2 OS v závislosti na koncentraci  $\text{Cu(DDTC)}_2$



Pro srovnání účinnosti jednotlivých složek  $\text{Cu(DDTC)}_2$  byl proveden další experiment. Buňky U-2 OS byly 24 hodin kultivovány s roztoky o nejnižších použitých koncentracích DDTC a  $\text{CuCl}_2$  a se směsí těchto dvou roztoků, vždy po jednom tripletu. Viabilita buněk po aplikaci roztoku DDTC ve vodě o koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  byla v průměru ze tří měření 78,0 %. Po aplikaci roztoku  $\text{CuCl}_2$  ve vodě o koncentraci 100  $\mu\text{mol/l}$  byla viabilita buněk v průměru ze tří měření 81,2 %. Pokud byly buňky 24 hodin inkubovány se směsí vodných roztoků DDTC (10  $\mu\text{mol/l}$ ) a  $\text{CuCl}_2$  (100  $\mu\text{mol/l}$ ), klesla jejich viabilita v průměru ze tří měření na 5,0 % ( $p < 0,0005$ ;  $n = 3$ ) viz Tab. 5 a Obr. 9.

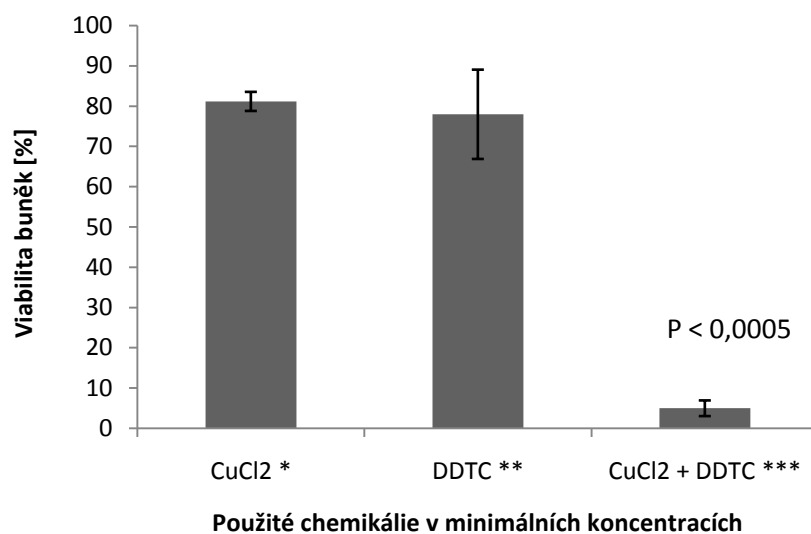
**Tab. 5** - Porovnání cytotoxicity roztoků DDTC,  $\text{CuCl}_2$  a jejich směsi v nejnižších použitých koncentracích

Látka	Koncentrace [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Viabilita [%]				
		1. opakování	2. opakování	3. opakování	Průměr	SD
DDTC	10	85,3	62,3	86,3	78,0	11,1
$\text{CuCl}_2$	100	78	83,7	81,8	81,2	2,4
DDTC + $\text{CuCl}_2$	10 + 100	7,7	4,1	3,2	5,0	1,9

(SD – směrodatná odchylka)



**Obr. 9** - Porovnání vlivu vodných roztoků DDTC, CuCl<sub>2</sub> a jejich směsi v nejnižších použitých koncentracích na viabilitu buněk U-2 OS



\* 100 μmol/l; \*\* 10 μmol/l; \*\*\* 100 μmol/l CuCl<sub>2</sub> + 10 μmol/l DDTC

### 5.1.5 Určení hodnot IC<sub>50</sub> zkoumaných látek

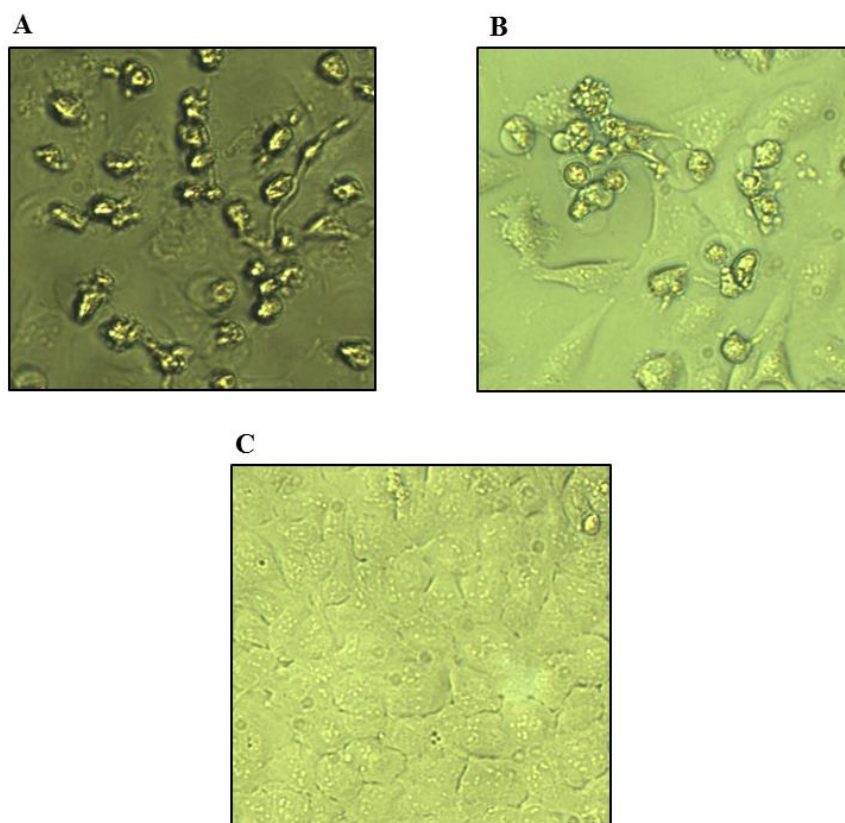
Pro porovnání cytotoxicity byla u všech testovaných látek stanovena průměrná inhibiční koncentrace IC<sub>50</sub>, jejíž hodnoty uvádím v Tab. 6. Nejméně účinnou látkou byl roztok CuCl<sub>2</sub>, jehož hodnota IC<sub>50</sub> přesahovala nejvyšší použitou koncentraci tohoto roztoku (1000 μmol/l). IC<sub>50</sub> pro DDTC nebyla stanovena, avšak ke snížení viability buněk pod 50 % došlo při koncentraci 50 μmol/l a 200 μmol/l. Nejvyšší míru toxicity proti buněčné linii U-2 OS vykazoval bortezomib, který byl velmi efektivní i v nanomolárních koncentracích s IC<sub>50</sub> stanovenou na 0,4 μmol/l. Cu(DDTC)<sub>2</sub> byl toxický v podobné míře jako bortezomib a jeho IC<sub>50</sub> byla stanovena na 1,3 μmol/l.

**Tab. 6** - Hodnoty IC<sub>50</sub> použitých látek proti buněčné linii U-2 OS

Látka	IC <sub>50</sub> [μmol/l]				
	1. opakování	2. opakování	3. opakování	Průměr	SD
CuCl <sub>2</sub>	> 1000	957,6	> 1000	-	-
DDTC	-	-	-	-	-
Cu(DDTC) <sub>2</sub>	1,2	1,5	1,3	<b>1,3</b>	0,1
Bortezomib	0,5	0,4	0,4	<b>0,4</b>	0,1

(SD – směrodatná odchylka)

**Obr. 10** – Porovnání morfologie buněk linie U-2 OS po 24 hodinové kultivaci s testovanými látkami



**A** – Na snímku jsou zachyceny buňky linie U-2 OS po 24 hodinové kultivaci s bortezomibem o koncentraci  $0,4 \mu\text{mol/l}$  ( $IC_{50}$ ) při zvětšení  $200\times$ . Jsou zde pozorovatelné buňky živé (přisedlé) a uvolněné buňky s cytoplazmatickými váčky přibližně v poměru 1:1

**B** – Na snímku jsou zachyceny buňky linie U-2 OS po 24 hodinové kultivaci s  $\text{Cu(DDTC)}_2$  o koncentraci  $1,3 \mu\text{mol/l}$  ( $IC_{50}$ ) při zvětšení  $200\times$ . Jsou zde pozorovatelné buňky živé (přisedlé) a uvolněné buňky s cytoplazmatickými váčky přibližně v poměru 1:1

**C** – Na snímku jsou zachyceny buňky linie U-2 OS při zvětšení  $100\times$  po 24 hodinové kultivaci v mediu s 0,1% DMSO (rozpuštědlo pro bortezomib a  $\text{Cu(DDTC)}_2$  obsaženo ve stejné koncentraci ve všech zobrazených snímcích). Buňky jsou přisedlé a bez vizuálních známek přicházející apoptózy či nekrózy.

Stanovená hodnota  $IC_{50}$  byla následně použita k určení morfologie nádorových buněk linie U-2 OS po aplikaci jednotlivých látek. Buňky byly kultivovány po dobu 24 hodin s testovanými látkami, jejichž koncentrace odpovídaly jejich průměrným hodnotám  $IC_{50}$ . Na Obr. 10 jsou vyfotografovány buňky linie U-2 OS po působení bortezomibu o koncentraci  $0,4 \mu\text{mol/l}$ ,  $\text{Cu(DDTC)}_2$  o koncentraci  $1,3 \mu\text{mol/l}$  (hodnoty jejich  $IC_{50}$ ) při

zvětšení 200× a buňky negativní kontroly (kultivace s 1 μl DMSO) při zvětšení 100×. Na snímcích lze pozorovat mnohem vyšší hustotu přisedlých buněk v kontrolním vzorku, než u buněk, na něž bylo působeno jednou z testovaných látek. Množství přisedlých buněk po kultivaci s bortezomibem a Cu(DDTC)<sub>2</sub> bylo přibližně srovnatelné a na obou snímcích jsou zachyceny buňky, jejichž morfologie by mohla napovídat, že podstupují apoptotickou smrt. U buněk, které byly kultivovány s bortezomibem a Cu(DDTC)<sub>2</sub>, byly pomocí světelného mikroskopu pozorovány změny ve struktuře cytoplazmatické membrány, uvolnění buněk ze dna kultivační nádoby, tvorba cytoplazmatických váčků, výčnělků, změna tvaru buňky a vakuolizace cytoplazmy. Tyto morfologické změny jsou podle studie G. Häckera projevem probíhající apoptózy, [179] i když pouhá morfologie buněk k určení apoptotické smrti buněk nestačí. Tyto morfologické změny se u buněk kontrolního vzorku nevyskytovaly.

## 6 DISKUZE

Již poměrně dávno byla zaznamenána remise rakoviny po podání disulfiramu [141] a jeho pozitivní vliv, především v kombinacích s dalšími látkami, byl několikrát experimentálně prokázán. [142 a 180] Podle publikace D. Chena a kolektivu z roku 2006 [151] vykazuje směs disulfiramu s mědí pro rakovinné buňky selektivní toxicitu (experiment byl proveden na buněčné linii karcinomu prsu MDA-MB-231). Původ této toxicity autoři přisoudili inhibici proteazomu, která byla po aplikaci směsi detekována.

Má bakalářská práce se mimo shrnutí teoretických znalostí o této problematice snaží náznamem ukázat, zda je syntetický komplex  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$  pro buněčnou linii U-2 OS cytotoxický a zda má terapeutický potenciál v léčbě osteosarkomu. Drtivá většina publikací zabývající se disulfiramelem a jeho komplexy s kovy pracuje se směsí DDTC a  $\text{CuCl}_2$ , popřípadě s jinou solí obsahující kov. Aktivita syntetického komplexu, který byl použit v experimentální části mé bakalářské práce, se od takové směsi může lišit. Ve směsi látek nedojde k reakci veškerého DDTC s  $\text{CuCl}_2$  a na buňky tak působí celkem 3 látky, což může vést ke špatné interpretaci výsledků a chybnému stanovení vlastností disulfiramových komplexů.

Z experimentální části vyplývá, že  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$  je pro buňky U-2 OS vysoce toxický s hodnotou  $\text{IC}_{50} = 1,3 \mu\text{mol/l}$  pro 24 hodinovou aplikaci (viz Tab. 6). Viabilitu buněk přitom snižuje již při koncentraci  $0,1 \mu\text{mol/l}$  a se zvyšující se koncentrací  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$  viabilita buněk klesá (viz Obr. 8), až se hodnoty viability dostávají pod 5 % při koncentraci  $5 \mu\text{mol/l}$  (viz Tab. 4). Jak již bylo zmíněno v teoretické části bakalářské práce, disulfiram je v těle metabolizován na DDTC, [141] který může následně koordinačně vázat měď za vzniku  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ . [145] K ověření, zda toxicita komplexu  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$  není způsobena některým z jeho komponent, byla obdobnými MTT testy stanovena cytotoxicita vodných roztoků DDTC a  $\text{CuCl}_2$ .

Z obrázku Obr. 6 a tabulky Tab. 2 je patrné, že DDTC za 24 hodin nejvýrazněji snižuje viabilitu buněk U-2 OS ve dvou koncentracích, a sice v koncentraci  $50 \mu\text{mol/l}$  (viabilita buněk byla stanovena na 38,8 %) a  $200 \mu\text{mol/l}$  (viabilita buněk byla stanovena na 45,7 %). Se vzrůstající koncentrací DDTC, nedocházelo k nepřímo úměrnému snížení viability, neboť při použití DDTC o koncentraci  $100 \mu\text{mol/l}$  došlo k jejímu nárůstu na 52,7 %. DDTC tedy působí na buňky tzv. bifázickým efektem. Mé výsledky jsou podpořeny

publikací D. A. Rigase, která bifázický efekt DDTC popisuje. [181] Přesto, že hodnota  $IC_{50}$  nebyla určena, koncentrace DDTC, při které došlo významnému poklesu viability buněk, byla  $50 \mu\text{mol/l}$ , což je mnohem více, než bylo naměřeno u komplexu  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ . Není tedy pravděpodobné, že by příčinou cytotoxicity komplexu  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$  byl DDTC.

Vodný roztok  $\text{CuCl}_2$  nevykázal prakticky žádnou protirakovinnou aktivitu. Hodnota  $IC_{50}$  pro tuto látku převyšuje její maximální použitou koncentraci ( $1000 \mu\text{mol/l}$ ) (viz Tab. 6). Aplikace  $\text{CuCl}_2$  o koncentraci  $1000 \mu\text{mol/l}$  vedla ke snížení viability buněk na průměrnou hodnotu 48,3 % (viz Tab. 3). Syntetický  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$  je tedy vůči buněčné linii U-2 OS téměř tisíckrát toxičtější než  $\text{CuCl}_2$  samotný. Měď může buňkám způsobovat oxidační stres a může být i vysoce toxická, zároveň je však v rakovinných buňkách velmi důležitým elementem. Vyšší hladiny tohoto kovu se v porovnání se zdravými buňkami vyskytují v buňkách rakovinných, které jsou na mědi funkčně závislé. [147] Měďnaté ionty navíc nejsou schopné procházet volně přes cytoplazmatickou membránu.  $\text{CuCl}_2$  je i v relativně vysokých koncentracích proti nádorovým buňkám neúčinný pravděpodobně právě z těchto důvodů.

K ověření, zda  $\text{CuCl}_2$  přidaný do média dokáže zvýšit toxicitu DDTC, byl proveden MTT test, ve kterém byly porovnány tři skupiny buněk. První skupina byla inkubována 24 hodin s nejnižší použitou koncentrací  $\text{CuCl}_2$  ( $100 \mu\text{mol/l}$ ) a druhá byla po stejnou dobu inkubována s nejnižší použitou koncentrací DDTC ( $10 \mu\text{mol/l}$ ). U obou skupin se viabilita buněk U-2 OS pohybovala průměrně okolo 80 % (viz Tab. 5 a Obr. 9). Ve třetí skupině, kde byly buňky linie U-2 OS inkubovány se směsí  $\text{CuCl}_2$  a DDTC o nejnižších použitých koncentracích ( $100 \mu\text{mol/l}$  pro  $\text{CuCl}_2$  a  $10 \mu\text{mol/l}$  pro DDTC) poklesla viabilita buněk za 24 hodin až na hodnotu 5 %. Tento výsledek naznačuje, že aktivní látka, která při podání disulfiramu zabíjí rakovinné buňky, je právě komplex  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ , jenž při podání disulfiramu samovolně vzniká v krevním řečišti pacienta. [145] DDTC pravděpodobně účinnou látkou není, nejen kvůli jeho nízké cytotoxicitě *in vitro*, ale také díky stechiometrii reakce vzniku  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ . Jeden iont mědi je totiž koordinačně vázán dvěma molekulami DDTC (viz Obr. 4). Po přidání  $\text{CuCl}_2$  se tedy počet volného DDTC snižuje, a pokud by DDTC byl aktivní látkou, měla by cytotoxicita směsi klesat. V MTT testu byl ale po přidání  $\text{CuCl}_2$  pozorován prudký nárůst cytotoxicity, který však podle předchozích výsledků testu nezpůsobil samotný, v použité koncentraci netoxický,  $\text{CuCl}_2$ .

Komplex  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ , který je tedy pravděpodobně zodpovědný za cytotoxický efekt disulfiramu, je potenciální inhibitor proteazomu. [151] Proto byla jeho účinnost porovnána s jiným inhibitorem proteazomu – bortezomibem. *In vitro* je bortezomib toxický k velkému množství různých buněčných linií, v praxi (*in vivo*) se však používá pouze k léčbě mnohočetného myelomu. K pevným nádorům není účinný. [118 a 121] Vysokou míru toxicity vykázal bortezomib *in vitro* také proti buněčné linii U-2 OS. Jeho hodnota  $\text{IC}_{50}$  byla stanovena na  $0,4 \mu\text{mol/l}$  (viz Tab. 6). Přesto při nejnižší použité koncentraci ( $0,001 \mu\text{mol/l}$ ) viabilita buněk mírně rostla. Hodnoty viability pro tuto koncentraci však nebyly průkazné a statisticky se nelišily od kontroly. Bortezomib tedy v této koncentraci není pro buněčnou linii U-2 OS toxický. K poklesu viability buněk došlo až při koncentraci  $0,01 \mu\text{mol/l}$ . Naopak při nejvyšší použité koncentraci ( $1 \mu\text{mol/l}$ ) došlo k poklesu viability v průměru až na 21,9 %. Hodnoty viability buněk pro jednotlivé použité koncentrace jsou shrnuty v Tab. 1. Závislost viability buněk na koncentraci bortezomibu je zobrazena na Obr. 5 a má se stoupající koncentrací bortezomibu v celém svém průběhu sestupný charakter.

Bortezomib způsobuje buňkám apoptotickou smrt, a toto tvrzení bylo podpořeno mnoha experimenty. Mezi detekované signály přicházející apoptózy patří např. štěpení PARP (poly ADP-ribose polymerase), fosforylace ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1), deregulace mitochondriálních procesů, která vede k akumulaci ROS, a uvolnění AIF (apoptosis inducing factor). [182] Buňky inkubované s bortezomibem a buňky apoptotické navíc vykazují podobnou morfologii (viz Obr. 5), kterou podrobně popsal G. Häcker ve své publikaci. [179] Podobná míra toxicity bortezomibu a  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$  a morfologie buněk U-2 OS (viz Obr. 5) po aplikaci těchto látek by mohla naznačovat, že i  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$  způsobuje buňkám apoptotickou smrt. I když by obě látky měly být inhibitory proteazomu, rozdíly v jejich toxicitě jsou pravděpodobně způsobeny jejich odlišnými mechanismy působení.

I v současnosti je zejména metastatický osteosarkom velkým problémem, a přesto že je léčba velmi drahá, není schopna dostatečně uspokojivě uzdravovat pacienty. Léčba osteosarkomu je spojena se závažnými vedlejšími účinky a v případě metastatického osteosarkomu i se špatnou prognózou. [1] Spousta vědeckých pracovišť hledá v léčbě nové přístupy, ale zatím nebylo dosaženo žádných výrazně lepších výsledků, než poskytují současná léčiva. Pokud by se některé úspěšné nové látky zavedly do klinické praxe, byla

by jejich cena velmi vysoká. [183] Podle mých výsledků je syntetický  $\text{Cu(DDTC)}_2$  proti buňkám osteosarkomu *in vitro* účinný. Od *in vitro* efektivity je ke skutečným klinickým testům ještě daleko, nicméně podle dosavadních znalostí a výsledků studií by komplex disulfiramu s mědí mohl být vhodným přípravkem k léčbě solidních tumorů [151], přestože inhibice proteazomu bortezumibem nebyla proti solidním tumorům včetně osteosarkomu *in vivo* účinná. [121-122]  $\text{Cu(DDTC)}_2$  totiž inhibuje proteazom odlišným mechanismem než bortezumib a má tak jiný terapeutický potenciál. Toto tvrzení je podpořeno studií [184]. Při léčbě osteosarkomu by bylo denně perorálně podáváno 500 mg disulfiramu v kombinaci s glukonátem měďnatým. [143] Při takovém způsobu administrace se v těle pacienta nebude vyskytovat pouze  $\text{Cu(DDTC)}_2$ , ale také další metabolity disulfiramu, které mají pravděpodobně terapeuticky podpůrnou biologickou aktivitu [158, 162, 185, 186, 187] a mohou být zodpovědné za potlačení MDR, angiogeneze či tvorby metastáz. [180] Disulfiram tak zasahuje buněčné pochody, které jsou pro vývoj tumoru a viabilitu buněk osteosarkomu velmi důležité, čímž je biologická aktivita  $\text{Cu(DDTC)}_2$  vůči tomuto onemocnění ještě potenciována. Připočteme-li k tomuto pleiotropnímu efektu také velmi nízkou pořizovací cenu disulfiramu a zanedbatelné vedlejší účinky, zjistíme, že disulfiram by se mohl stát dostupnou látkou schopnou šetrné léčby pacientů trpících i velmi agresivní metastatickou formou osteosarkomu. [188] Toto tvrzení však mohou s konečnou platností potvrdit či vyvrátit pouze klinické testy.

## 7 ZÁVĚR

Osteosarkom je velmi agresivní tumor kostí, který postihuje hlavně mladé lidi a děti. K jeho léčbě se dnes využívají vysoké dávky chemoterapeutik a chirurgické zákroky různého rozsahu včetně amputací. Samotný osteosarkom navíc často doprovází výskyt komplikací, které ústí ve velmi špatnou prognózu pacienta. Právě proto je třeba hledat nová léčiva, která by byla nejen efektivnější, ale zároveň také šetrnější. Jeden z možných přístupů léčby osteosarkomu představuje inhibice ubikvitin – proteazomového systému (UPS), důležitého pro všechny buňky, zejména však pro buňky rakovinné, protože na rozdíl od zdravých buněk není rakovinná buňka schopná inhibici proteazomu přežít. První inhibitor proteazomu, který byl schválen pro léčbu mnohočetného myelomu, se nazývá bortezomib. K léčbě osteosarkomu však použit nelze, protože bortezomib *in vivo* účinnost vůči solidním tumorům nevykazuje. Proto se vědci zabývají vývojem dalších inhibitorů proteazomu. Ty by měly mít lepší vlastnosti, například lepší tkáňovou distribuci, a měly by tak rozšířit pole působnosti proteazomálních inhibitorů. Mezi takové látky pravděpodobně patří i disulfiram, respektive komplex jeho metabolitů s dvoumocným kovem. Proti rakovinným buňkám se jeví být nejúčinnější komplex diethyldithiokarbamátu s mědí. Z praktické části práce vyplývá, že bis-diethyldithiokarbamát měďnatý je skutečně proti buněčné linii U-2 OS odvozené od lidského osteosarkomu *in vitro* vysoce účinný. Protože pravděpodobně inhibuje proteazom jiným mechanismem než bortezomib a má i jiné farmakokinetické vlastnosti, zdá se pravděpodobné, že by mohl být účinný také *in vivo*, což naznačují i některé dřívější výzkumy a publikace. Pokud by byl disulfiram v kombinaci s mědí zaveden do klinické praxe pro léčbu osteosarkomu, mohlo by to znamenat obrovský pokrok v léčbě této nemoci. Vzhledem k jeho nízké ceně by se z disulfiramu stalo zároveň léčivo dostupné pro každého, včetně chudých rozvojových zemí, a jeho použití by sňalo obrovskou finanční zátěž ze zdravotního systému, kterou současná nesmírně drahá léčba představuje. Neméně podstatnou výhodou léčby osteosarkomu disulfiramem s mědí představují jeho téměř zanedbatelné vedlejší účinky, které nepoškozují tělo pacienta tak jako klasická chemoterapie. Přesný mechanismus účinku komplexu  $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$  však ještě není zcela odhalen a další výzkum je tak k zahájení klinických testů nezbytný. Nestačí však pouze znalost mechanismu a potvrzení efektivity tohoto léčiva, musí být také sehnán dostatečný finanční obnos z veřejných zdrojů k zaplacení klinických testů, protože žádná farmaceutická firma nebude investovat peníze do neziskového léčiva.



Tato práce je podkladem pro další studium protirakovinného účinku syntetického bis-diethyldithiokarbamátu měďnatého a základním kamenem mé diplomové práce. Experimenty, které navazují na poznatky z této práce, budou pokračovat v Barbara Ann Karmanos Cancer Institute v Detroitu pod vedením prof. Q. Ping Doua, který o proteazomu a jeho inhibici publikoval mnoho vědeckých článků a již dlouho se touto problematikou zabývá. Zvací dopis od prof. Q. Ping Doua uvádím v přílohách.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CT	počítačová tomografie (computed tomography)
RB	retinoblastomový protein (retinoblastoma protein)
TGF- $\beta$	tumour growth factor $\beta$
RECQL4	RecQ protein-like 4
CDDP	cisplatina (cisplatin)
MTX	methotrexát (methotrexate)
ADM	adriamycin (adriamycin)
IFOS	ifosfamid (ifosfamide)
DOX	doxorubicin (doxorubicin)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
NF- $\kappa$ B	jaderný faktor $\kappa$ B (nuclear factor $\kappa$ B)
UPS	ubikvitin-proteazomový systém (ubiquitin-proteasome system)
CP	katalytická podjednotka (core particle)
RP	regulační podjednotka (regulation particle)
PA28	aktivátor proteazomu 28 (proteasome activator28)
PA200	aktivátor proteazomu 200 (proteasome activator200)
ATP	adenozintrifosfát (adenosine triphosphate)
PA700	aktivátor proteazomu 700 (proteasome activator 700)
DUB	deubikvitináza (deubiquitinase)
JAMM	JAB1/MPN/Mov34 metalloenzyme
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
MHCI	hlavní histokompatibilní komplex 1 (major histocompatibility complex 1)
INF- $\gamma$	interferon $\gamma$
UBA	ubiquitin associated domain
UBL	ubiquitin-like domain
LRR	leucin-rich-repeat domain
HECT	homologous to E6-associated protein C terminus domain
RING	really interesting new gene domain
CaM	kalmodulin (calmodulin)
CDK	cyklin-dependentní kináza (cycline dependent kinase)
UCH	ubiquitin C-terminal hydrolase
USP	ubiquitin-specific protease

OTU	ovarian tumor protease
MJD	Machado-Joseph disease protein domain protease
IκB	inhibitor κB
RHR	Rel homologní oblast (Rel homologous region)
NTD	N-terminal domain
CTD	C-terminal domain
TAD	transaktivační doména (trans-activation domain)
NLS	nuclear localisation site
ARD	ankyrin-repetitive domain
IKK	inhibitor κB kináza (inhibitor κB kinase)
NEMO	NF-κB essential modulator
TNF	tumor necrosis factor
IL	interleukin
TLR	Toll-like receptor
CDKI	Inhibitor cyklin-dependentních kináz (cyclin-dependent kinase inhibitor)
MDM2	mouse double minute 2 homolog
PIR	proteasome-inhibition resistant
VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1
FDA	food and drug administration
ALDH	aldehyddehydrogenáza
DDTC	diethyldithiokarbamát
Cu(DDTC) <sub>2</sub>	bis-diethyldithiokarbamát měďnatý
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)
RNAi	RNA interference (RNA interference)
MMP	matrixová metalloproteináza (matrix metalloproteinase)
SOD	superoxiddismutáza
mnSOD	mitochondriální superoxiddismutáza
MDR	mnohočetná léková rezistence (multiple drug resistance)
ABC	ATP-binding cassette
MRP	multidrug resistance protein
cGMP	cyklický guanozinmonofosfát (cyclic guanosine monophosphate)
NK	přirozený zabíječ (natural killer)
DMSO	dimetylsulfoxid
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Lawrence V.T., Rosenberg S.T., Stephen A. Cancer – principles and practice of oncology, vol. 2, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2008. ISBN: 0-7817-7207-0.
- [2] Tan M.L., Choong P.F., Dass C.R. Osteosarcoma: Conventional treatment vs. gene therapy. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8: 106-117.
- [3] Ta H.T., Dass C.R., Choong P.F., Dunstan D.E. Osteosarcoma treatment: state of the art. *Cancer Metastasis Rev*, 2009, 28: 247-263.
- [4] Cotterill S.J., Wright C.M., Pearce M.S., Craft A.W. Stature of young people with malignant bone tumors. *Pediatr Blood Cancer*, 2004, 42: 59-63.
- [5] Ottaviani G., Jaffe N. The etiology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res*, 2009, 152: 15-32.
- [6] Longhi A., Pasini A., Cicognani A., Baronio F., Pellacani A., Baldini N., Bacci G. Height as a risk factor for osteosarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2005, 27: 314-318.
- [7] Koshy M., Paulino A.C., Mai W.Y., Teh B.S. Radiation-induced osteosarcomas in the pediatric population. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005, 63: 1169-1174.
- [8] Henderson T.O., Whitton J., Stovall M., Mertens A.C., Mitby P., Friedman D., Strong L.C., Hammond S., Neglia J.P., Meadows A.T., Robinson L., Diller L. Secondary sarcomas in childhood cancer survivors: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99: 300-308.
- [9] Sandikovic B., Park P.C., Selvarajah S., Zielenska M. Array comparative genomic hybridization in osteosarcoma. *Methods Mol Biol*, 2013, 973: 227-247.
- [10] Dass C.R., Khachigian L.M., Choong P.F. C-Jun is critical for the progression of osteosarcoma: proof in an orthotopic spontaneously metastasizing model. *Mol Cancer Res*, 2008, 6: 1289-1292.
- [11] Serra M., Picci P., Ferrari S., Bacci G. Prognostic value of P-glykoprotein in high-grade osteosarcoma. *J Clin Oncol*, 2007, 25: 4858-4860.

- [12] Ansari T.Z., Masood N., Parekh A., Jafri R.Z., Niamatullah S.N., Zaidi A.A., Umer M. Four year experience of sarcoma of soft tissues and bones in a tertiary care hospital and review of literature. *World J Surg Oncol*, 2011, 9: 51.
- [13] Nagarajan R., Kamruzzaman A., Ness K.K., Marchese V.G., Sklar C., Mertens A., Yasui Y., Robinson L.L., Marina N. Twenty years of follow-up survivors of childhood osteosarcoma: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Cancer*, 2011, 117: 625-634.
- [14] Barr R.D., Wunder J.S. Bone and soft tissue sarcomas are often curable - but at what cost?: a call to arms (and legs). *Cancer*, 2009, 115: 4046-4054.
- [15] Janeway K.A., Grier H.E. Sequelae of osteosarcoma medical therapy: a review of rare acute toxicities and late effects. *Lancet Oncol*, 2010, 11: 670-678.
- [16] Knight K.R., Kraemer D.F., Neuwelt E.A. Ototoxicity in children receiving platinum chemotherapy: underestimating a commonly occurring toxicity that may influence academic and social development. *J Clin Oncol*, 2005, 23: 8588-8596.
- [17] Howell S., Shalet S. Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1998, 27: 927-943.
- [18] van Dalen E.C., van der Pal H.J., Kok W.E., Caron H.N., Kremer L.C. Clinical heart failure in a cohort of children treated with anthracyclines: a long-term follow-up study. *Eur J Cancer*, 2006, 42: 3191-3198.
- [19] Aleksa K., Matsell D., Krausz K., Gelboin H., Ito S., Koren G. Cytochrome P450 3A and 2B6 in the developing kidney: implications for ifosfamide nephrotoxicity. *Pediatr Nephrol*, 2005, 20: 872-875.
- [20] Brambilla L., Labianca R., Boneschi V., Fossati S., Dallvalle G., Finzi A.F., Luporini G. Mediterranean Kaposi's sarcoma in the elderly. A randomized study of oral etoposide versus vinblastine. *Cancer*, 1994, 74: 2873-2878.
- [21] Subbiah V., Kurzrock R. Phase 1 clinical trials for sarcomas: the cutting edge, *Curr Opin Oncol*, 2011, 23: 352-360.

- [22] Madani S.Y., Naderi N., Dissanayake Q., Tan A., Seifalian A.M. A new era of cancer treatment: carbon nanotubes as drug delivery box. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6: 2963-2979.
- [23] Kimura A., Kato Y., Hirano H. N-myristoylation of the Rpt2 subunit regulates intracellular localization of the yeast 26S proteasome. *Biochemistry*, 2012, 51: 8856-8866.
- [24] Sridevi P., Alexander H., Laviad E.L., Min J., Mesika A., Hannink M., Futerman A.H., Alexander S. Stress-induced ER to Golgi translocation of ceramide synthase 1 is dependent on proteasomal processing. *Exp Cell Res*, 2010, 316: 78-91.
- [25] Kirschner M. Intracellular proteolysis. *Trends Cell Biol*, 1999, 9: M42-M45.
- [26] Ebrahimi-Fakhari D., Cantuti-Castelvetri I., Fan Z., Rockenstein E., Masliah E., Hyman B.T., McLean P.J., Uhni V.K. Distinct roles in vivo for the ubiquitin-proteasome system and the autophagy-lysosomal pathway in the degradation of  $\alpha$ -synuclein. *J Neurosci*, 2011, 31: 14508-14520.
- [27] Li X.J., Li S. Proteasomal dysfunction in aging and Huntington disease. *Neurobiol Dis*, 2011, 43: 4-8.
- [28] Rodriguez K., Gaczynska M., Osmulki P.A. Molecular mechanism of proteasome plasticity in aging. *Mech Ageing Dev*, 2010, 131: 144-155.
- [29] Niclell S., Mihalache O., Beck F., Hegerl R., Korinek A., Baumeister W. Structural analysis of the 26S proteasome by cryoelectron tomography. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 353: 115-120.
- [30] Groll M., Ditzel L., Löve J., Stock D., Bochtler M., Bartunik H.D., Huber R. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, 1997, 386: 463-471.
- [31] Bedford L., Paine S., Shephard P.W., Mayer R.J., Roelofs J. Assembly, structure, and function of the 26S proteasome. *Trends Cell Biol*, 2010, 20: 391-401.
- [32] Rabl L., Smith D.M., Yu Y., Chang S.C., Goldberg A.L., Cheng Y. Mechanism of gate opening in the 20S proteasome by the proteasomal ATPases. *Mol Cell*, 2008, 30: 360-368.

- [33] Park S., Roelofs J., Kim W., Robert J., Schmidt M., Gygi S.P., Finley D. Hexameric assembly of the proteasomal ATPases is templated through their C termini. *Nature*, 2009, 459: 866-870.
- [34] Bar-Nun S., Glickman M.H. Proteasomal AAA-ATPases: structure and function, *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823: 67-82.
- [35] Tomko R.J., Hochstrasser M. Order of the proteasomal ATPases and eukaryotic proteasome assembly. *Cell Biochem Biophys*, 2011, 60: 13-20.
- [36] Köhler A., Cascio P., Leggett D.S., Woo K.M., Goldberg A.L., Finley D. The axial channel of proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell*, 2001, 7: 1143-1152.
- [37] Benaroudj N., Zwickl P., Seemuller E., Baumeister W., Goldberg A.L. ATP hydrolysis by the proteasome regulatory complex PAN serves multiple functions in protein degradation. *Mol Cell*, 2003, 11: 69-78.
- [38] Lander G.C., Estrin E., Matyskiela M.E., Bashore C., Nogales E., Martin A. Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature*, 2012, 482: 186-191.
- [39] Finley D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem*, 2009, 78: 477-513.
- [40] Rosenzweig R., Osmulski P.A., Gaczynska M., Glickman M.H. The central unit within the 19S regulatory particle of the proteasome. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, 15: 573-580.
- [41] Hanna J., Hathaway N.A., Tone Y., Crosas B., Elsasser S., Kirkpatrick D.S., Leggett D.S., Gygi S.P., King R.W., Finley D. Deubiquitinating enzyme Ubp6 functions noncatalytically to delay proteasomal degradation. *Cell*, 2006, 127: 99-111.
- [42] Schreiner P., Chen X., Husnjak K., Randles L., Zhang N., Elsasser S., Finley D., Dikic I., Walters K.J., Groll M. Ubiquitin docking at the proteasome through a novel pleckstrin-homology domain interaction. *Nature*, 2008, 453: 548-552.
- [43] Lam Y.A., Xu W., DeMartino G.N., Cohen R.E. Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome. *Nature*, 1997, 385: 737-740.

- [44] Reyes-Turcu F.E., Ventii K.H., Wilkinson K.D. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem*, 2009, 78:363-397.
- [45] Groll M., Bajorek M., Köhler A., Moroder L., Rubin D.M., Huber R., Glickman H.M., Finley D. A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol*, 2000, 7: 1062-1067.
- [46] Verma R., Aravind L., Oania R., McDonald W.H., Yates J.R., Koonin E.V., Deshaies R.J. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science*, 2002, 298: 611-615.
- [47] Cvek B., Milacic V., Taraba J., Dou Q.P. Ni(II), Cu(II), and Zn(II) diethyldithiocarbamate complexes show various activities against the proteasome in breast cancer cells. *J Med Chem*, 2008, 51: 6256-6258.
- [48] Tran H.J., Allen M.D., Löwe J., Bycroft M. Structure of the Jab1/MPN domain and its implications for proteasome function. *Biochemistry*, 2003, 42: 11460-11465.
- [49] Komander D., Clague M.J., Urbé S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10: 550-563.
- [50] Ambroggio X.I., Rees D.C., Deshaies R.J. JAMM: a metalloprotease-like zinc site in the proteasome and signalosome. *PLoS Biol*, 2004, 2: E2.
- [51] Yao T., Cohen R.E. A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature*, 2002, 419: 403-407.
- [52] D'Arcy P., Linder S. Proteasome deubiquitinases as novel targets for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44: 1729-1738.
- [53] Gallery M., Blank J.L., Lin Y., Gutierrez J.A., Pulido J.C., Rappoli D., Badola S., Rolfe M., Macbeth K.J. The JAMM motif of human deubiquitinase Poh1 is essential for cell viability. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6: 262-268.
- [54] Rechsteiner M., Hill C.P. Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol*, 2005, 15: 27-33.



- [55] Basler M., Kirck C.J., Groettrup M. The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions. *Curr Opin Immunol*, 2013, 25: 74-80.
- [56] Murata S., Kawahara H., Tohma S., Yamamoto K., Kasahara M., Nabeshima Y., Tanaka K., Chiba T. Growth retardation in mice lacking the proteasome activator PA28gamma. *J Biol Chem*, 1999, 274: 38211-38215.
- [57] Okamura T., Taniguchi S., Ohkura T., Yoshida A., Shimizu H., Sakai M., Maeta H., Fukui H., Ueta Y., Hisatome I., Shigemasa C. Abnormally high expression of proteasome activator-gamma in thyroid neoplasm. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88: 1374-1383.
- [58] Zhou P. REGgamma: a shortcut to destruction. *Cell*, 2006, 124: 256-257.
- [59] Ustrell V., Hoffman L., Pratt G., Rechsteiner M. PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair. *EMBO J*, 2002, 21: 3516-3525.
- [60] Elsasser S., Gali P.R., Schwickart M., Larsen C.N., Leggett D.S., Müller B., Feng M.T., Tübing F., Dittmar G.A., Finley D. Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat Cell Biol*, 2002, 4: 725-730.
- [61] Chen L., Madura K. Rad23 promotes the targeting of proteolytic substrates to the proteasome. *Mol Cell Biol*, 2002, 22: 4902-4913.
- [62] Pickart C.M. Back to the future with ubiquitin. *Cell*, 2004, 116: 181-190.
- [63] Finley D., Ciechanover A., Varshavsky A. Ubiquitin as a central cellular regulator. *Cell*, 2004, 116: S29-S32.
- [64] Trempe J.F. Reading the ubiquitin postal code. *Curr Opin Struct Biol*, 2011, 21: 792-801.
- [65] Hochstrasser M. Lingering mysteries of ubiquitin-chain assembly. *Cell*, 2006, 124: 27-34.
- [66] Satija Y.K., Bhardwaj A., Das S. A portrayal of E3 ubiquitin ligases and deubiquitinases in cancer. *Int J Cancer*, 2013, in press.
- [67] Wang M., Pickart C.M., Different HECT domain ubiquitin ligases employ distinct mechanism of polyubiquitin chain synthesis. *EMBO J*, 2005, 24: 4324-4333.

- [68] Verdecia M.A., Joazeiro C.A., Wells N.J., Ferrer J.L., Bowman M.E., Hunter T., Noel J.P. Conformational flexibility underlies ubiquitin ligation mediated by the WWP1 HECT domain E3 ligase. *Mol Cell*, 2003, 11: 249-259.
- [69] Hoppe T. Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends Biochem Sci*, 2005, 30: 183-187.
- [71] Hershko A., Heller H., Eytan E., Reiss Y. The protein substrate binding site of the ubiquitin-protein ligase system. *J Biol Chem*, 1986, 261: 11992-11999.
- [72] Bartel B., Wüning I., Varshavsky A. The recognition component of the N-end rule pathway. *EMBO J*, 1990, 9: 3179-3189.
- [72] Ravid T., Hochstrasser M. Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9: 679-690.
- [73] Sowa M.E., Bennett E.J., Gygi S.P., Harper J.W. Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape. *Cell*, 2009, 138: 389-403.
- [74] Schrader E.K., Harstad K.G., Matouschek A. Targeting proteins for degradation. *Nat Chem Biol*, 2009, 5: 815-822.
- [75] Collins C.A., Brown E.J. Cytosol as battleground: ubiquitin as a weapon for both host and pathogen. *Trends Cell Biol*, 2010, 20: 205-213.
- [76] Komander D., Barford D. Structure of the A2 OUT domain and mechanistic insights into deubiquitination. *Biochem J*, 2008, 409: 77-85.
- [77] Jariel-Encontre I., Bossis G., Piechaczyk M. Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1786: 153-177.
- [78] Paranipe A., Srivenugopal K.S. Degradation of NF-kB, p53 and other regulatory redox-sensitive proteins by thiol-conjugating and -nitrosylating drugs in human tumor cells. *Carcinogenesis*, 2013, in press.
- [79] Shringarpure R., Grune T., Mehlhase J., Davies K.J. Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *J Biol Chem*, 2003, 278: 311-318.

- [80] Beal R., Deveraux Q., Xia G., Rechsteiner M., Pickart C. Surface hydrophobic residues of multiubiquitin chains essential for proteolytic targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93: 861-866.
- [81] Levine R.L., Stadtman E.R. Oxidative modification of proteins during aging. *Exp Gerontol*, 2001, 36: 1495-1502.
- [82] Goldberg A.L. On prions, proteasomes, and mad cows. *N Engl J Med*, 2007, 357: 1150-1152.
- [83] Tarcsa E., Szymaska G., Lecker S., O'Connor C.M., Goldberg A.L. Ca<sup>2+</sup>-free calmodulin and calmodulin damaged by in vitro aging are selectively degraded by 26 S proteasomes without ubiquitination. *J Biol Chem*, 2000, 275: 20295-20301.
- [84] Benaroudi N., Tarcsa E., Cascio P., Goldberg A.L. The unfolding of substrates and ubiquitin-independent protein degradation by proteasomes. *Biochimie*, 2001, 83: 311-318.
- [85] Prakash S., Inobe T., Hatch A.J., Matouschek A. Substrate selection by the proteasome during degradation of protein complexes. *Nat Chem Biol*, 2009, 5: 29-36.
- [86] Gonzales S.L., Stremlau M., He X., Basile J.R., Münger K. Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *J Virol*, 2001, 75: 7583-7891.
- [87] Wan F., Leonardo M.J. The nuclear signaling of NF-kappaB: current knowledge, new insights, and new future perspectives. *Cell Res*, 2010, 20: 24-33.
- [88] Zheng C., Yin Q., Wu H. Structural studies of NF-kB signaling. *Cell Res*, 2011, 21: 183-195.
- [89] Ghosh G., Wang V.Y., Huang D.B., Fusco A. NF-kB regulation: lessons from structures. *Immunol Rev*, 2012, 246: 36-58.
- [90] Ghosh S., Hayden M.S. Celebrating 25 years of NF-kB research. *Immunol Rev*, 2012, 246: 5-13.

- [91] Shih V.F., Tsui R., Caldwell A., Hoffmann A. A single system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Res*, 2011, 21: 86-102.
- [92] Sun S.C. The noncanonical NF- $\kappa$ B pathway. *Immunol Rev*, 2012, 246: 125-140.
- [93] Razani B., Reichardt A.D., Cheng G. Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling activation and regulation: principles and perspectives. *Immunol Rev*, 2011, 244: 44-54.
- [94] Karin M., Cao Y., Greten F.R., Li Z.W. NF- $\kappa$ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2: 301-310.
- [95] Perkins N.D. NF- $\kappa$ B: tumor promoter or suppressor? *Trends Cell Biol*, 2004, 14: 64-9.
- [96] DiDonato J.A., Marcurio F., Karin M. NF- $\kappa$ B and the link between inflammation and cancer. *Immunol Rev*, 2012, 246: 379-400.
- [97] Perkins N.D. The diverse and complex roles of NF- $\kappa$ B subunits in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12: 121-132.
- [98] Baldwin A.S. Regulation of cell death and autophagy by IKK and NF- $\kappa$ B: critical mechanisms in immune function and cancer. *Immunol Rev*, 2012, 246: 327-345.
- [99] Rocha S., Martin A.M., Meek D.W., Perkins N.D. p53 represses cyclin D1 transcription through down regulation of Bcl-3 and inducing increased association of the p52 NF- $\kappa$ B subunit with histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol*, 2003, 23: 4713-4727.
- [100] Nakanishi C., Toi M. Nuclear factor- $\kappa$ B inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5: 297-309.
- [101] Guo X., Xu B., Pandey S., Goessl E., Brown J., Armesilla A.L., Darling J.L., Wang W. Disulfiram/copper complex inhibiting NF $\kappa$ B activity and potentiating cytotoxic effect of gemcitabine on colon and breast cancer cell lines. *Cancer Lett*, 2010, 290: 104-113.
- [102] Skrott Z., Cvek B. Diethyldithiocarbamate complex with copper: the mechanism of action in cancer cells. *Mini Rev Med Chem*, 2012, 12: 1184-1192.

- [103] Shen H.M., Tergaonkar V. NFkappaB signaling in carcinogenesis and as a potential molecular target for cancer therapy. *Apoptosis*, 2009, 14: 348-363.
- [104] Hideshima T., Ikeda H., Chauhan D., Okawa Y., Raje N., Podar K., Mitsiades C., Munshi N.C., Richardson P.G., Carrasco R.D., Anderson K.C. Bortezomib induces canonical nuclear factor-kappaB activation in multiple myeloma cells. *Blood*, 2009, 114: 1046-1052.
- [105] Luedde T., Beraza N., Kotsikoris V., van Loo G., Nenci A., De Vos R., Roskams T., Trautwein C., Pasparakis M. Deletion of NEMO/IKK gamma in liver parenchymal cells causes steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell*, 2007, 11: 119-132.
- [106] Nalepa G., Rolfe M., Harper J.W. Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5: 596-613.
- [107] McConkey D.J., Zhu K. Mechanism of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug Resist Updat*, 2008, 11: 164-179.
- [108] Hoeller D., Dikic I. Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature*, 2009, 458: 438-444.
- [109] Adams J., Palombella V.J., Sausville E.A., Johnson J., Destree A., Lazarus D.D., Maas J., Pien C.S., Prakash S., Elliott P.J. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res*, 1999, 59: 2615-2622.
- [110] Drexler H.C., Risau W., Konecny M.A. Inhibition of proteasome function induces programmed cell death in proliferating endothelial cells. *FASEB J*, 2000, 14: 65-77.
- [111] Rahimi N. The ubiquitin-proteasome system meets angiogenesis. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11: 538-548.
- [112] Urano T., Yashiroda H., Muraoka M., Tanaka K., Hosoi T., Inoue S., Ouchi Y., Toyoshima H. p57(Kip2) is degraded through the proteasome in osteoblasts stimulated to proliferation by transforming growth factor beta1. *J Biol Chem*, 1999, 274: 12197-12200.
- [113] Lu G., Punj V., Chaudhary P.M. Proteasome inhibitor bortezomib induces cell cycle arrest and apoptosis in cell lines derived from Ewing's sarcoma family of tumors and synergized with TRAIL. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7: 603-608.

- [114] Stegh A.H. Targeting the p53 signaling pathway in cancer therapy – the promises, challenges and perils. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, 16: 67-83.
- [115] Maki C.G., Huibregtse J.M., Howley P.M. In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1). *Cancer Res*, 1996, 56: 2649-2654.
- [116] Vaziri S.A., Grabowski D.R., Hill J., Rybicki L.R., Burk R., Bukowski R.M., Ganapathi M.K., Ganapathi R. Inhibition of proteasome activity by bortezomib in renal cancer cells is p53 dependent and VHL independent. *Anticancer Res*, 2009, 29: 2961-2969.
- [117] Adams J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4: 349-360.
- [118] Adams J. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell*, 2004, 5: 417-421.
- [119] Cvek B., Dvorak Z., The ubiquitin-proteasome system (UPS) and the mechanism of action of bortezomib. *Curr Pharm Des*, 2011, 17: 1483-1499.
- [120] Grune T. *Progress in Molecular Biology and Translational Science: The Proteasomal System in Aging and Disease*, Academic Press, 2012. ISBN 0123978637. Kapitola: Proteasome Inhibitors, 161-209.
- [121] Papandreou C.N., Daliani D.D., Nix D., Yang H., Madden T., Wang X., Pien C.S., Millikan R.E., Tu S.M., Pagliaro L., Kim J., Adams J., Elliott P., Esseltine D., Petrusich A., Dieringer P., Perez C., Logothetis C.J. Phase I trial of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with advanced solid tumors with observations in androgen-independent prostate cancer. *J Clin Oncol*, 2004, 22: 2108-2121.
- [122] Maki R.G., Kraft A.S., Scheu K., Yamada J., Wadler S., Antonescu C.R., Wright J.J., Schwartz G.K. A multicenter phase II study of bortezomib in recurrent or metastatic sarcomas. *Cancer*, 2005, 103: 1431-1438.
- [123] Jagannath S., Barlogie B., Berenson J., Siegel D., Irwin D., Richardson P.G., Niesvizky R., Alexanian R., Limentani S.A., Alsina M., Adams J., Kauffman M., Esseltine D.L., Schenkein D.P., Anderson K.C. A phase 2 study of two doses of bortezomib in relapsed or refractory myeloma. *Br J Haematol*, 2004, 127: 165-172.

- [124] Richardson P.G., Barlogie B., Berenson J., Singhal S., Jagannath S., Irwin D., Rajkumar S.V., Srkalovic G., Alsina M., Alexanian R., Siegel D., Orłowski R.Z., Kuter D., Limentani S.A., Lee S., Hideshima T., Esseltine D.L., Kauffman M., Adams J., Schenkein D.P., Anderson K.C. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med*, 2003, 348: 2609-2617.
- [125] Borissenko L., Groll M. 20S proteasome and its inhibitors: crystallographic knowledge for drug development. *Chem Rev*, 2007, 107: 687-717.
- [126] Cvek B., Dvorak Z. The value of proteasome inhibition in cancer: can the old drug, disulfiram, have a bright new future as a novel proteasome inhibitor? *Drug Discov Today*, 2008, 13: 716-722.
- [127] Yerlikaya A., Okur E., Ulukaya E. The p53-independent induction of apoptosis in breast cancer cells in response to proteasome inhibitor bortezomib. *Tumour Biol*, 2012, 33: 1385-1392.
- [128] Fernández Y., Verhaegen M., Miller T.P., Rush J.L., Steiner P., Opipari A.W., Lowe S.W., Soengas M.S. Differential regulation of noxa in normal melanocytes and melanoma cells by proteasome inhibition: therapeutic implications. *Cancer Res*, 2005, 65: 6294-6304.
- [129] Arastu-Kapur S., Anderl J.L., Kraus M., Parlati F., Shenk K.D., Lee S.J., Muchamuel T., Bennett M.K., Driessen C., Ball A.J., Kirk C.J. Nonproteasomal targets of the proteasome inhibitors bortezomib and carfilzomib: a link to a clinical adverse events. *Clin Cancer Res*, 2011, 17: 2734-2743.
- [130] Ruschak A.M., Slassi M., Kay L.E., Schimmer A.D. Novel proteasome inhibitors to overcome bortezomib resistance. *J Natl Cancer Inst*, 2011, 103: 1007-1017.
- [131] Oerlemans R., Franke N.E., Assaraf Y.G., Cloos J., van Zanwijk I., Berkers C.R., Scheffer C.R., Debipersad K., Vojtekova K., Lemos C., van der Heijden J.W., Ylstra B., Peters G.J., Kaspers G.L., Dijkmans B.A., Scheper R.J., Jansen G. Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood*, 2008, 112: 2489-2499.
- [132] Kupperman E., Lee E.C., Cao Y., Bannerman B., Fitzgerald M., Berger A., Yu J., Yang Y., Hales P., Bruzzese F., Liu J., Blank J., Garcia K., Tsu C., Dick L., Fleming P.,

Yu L., Manfredi M., Rolfe M., Bolen J. Evaluation of the proteasome inhibitor MLN9708 in preclinical models of human cancer. *Cancer Res*, 2010, 70: 1970-1980.

[133] Cvek B. Ixazomib citrate. *Drugs Future*, 2012, 37: 561-565.

[134] Dick L.R., Flemming P.E. Building on bortezomib: second-generation proteasome inhibitors as anti-cancer therapy. *Drug Discov Today*, 2010, 15: 243-249.

[135] Hájek R., Bryce R., Ro S., Klencke B., Ludwig H. Design and rationale of FOCUS (PX-171-011): a randomized, open-label, phase 3 study of carfilzomib versus best supportive care regimen in patients with relapsed and refractory multiple myeloma (R/R MM). *BMC Cancer*, 2012, 19: 415.

[136] Neilsen P.M., Pehere A.D., Pishas K.I., Callen D.F., Abell A.D. New 26S proteasome inhibitors with high selectivity for chymotrypsin-like activity and p53-dependent cytotoxicity. *ACS Chem Biol*, 2013, 8: 353-359.

[137] Suh J.J., Pettinati H.M., Kampman K.M., O'Brien C.P. The status of disulfiram: a half of a century later. *J Clin Psychopharmacol*, 2006, 26: 290-302.

[138] Williams E.E. Effects of alcohol on workers with carbon disulfide. *JAMA*, 1937, 109: 1472-1473.

[139] Shorter D., Kosten T.R. Novel pharmacotherapeutic treatments for cocaine addiction. *BMC Med*, 2011, 9: 119.

[140] Eneanya D.I., Bianchine J.R., Duran D.O., Andersen B.D. The actions and metabolic fate of disulfiram. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1981, 21: 575-596.

[141] Lewison E.F. Spontaneous regression of breast cancer. *Prog Clin Biol Res*, 1977, 12: 47-53.

[142] Dufour P., Lang J.M., Giron C., Duclos B., Haehnel P., Jaeck D., Jung J.M., Oberling F. Sodium dithiocarb as adjuvant immunotherapy for high risk breast cancer: a randomized study. *Biotherapy*, 1993, 6: 9-12.

[143] Cvek B. Comment on 'Cytotoxic effect of disulfiram/copper on human glioblastoma cell lines ALDH-positive cancer-stem-like cells'. *Br J Cancer*, 2013, in press.



- [144] Viola-Rhenals M., Rieber M.S., Rieber M. Suppression of survival in human SKBR3 breast carcinoma in response to metal-chelator complexes is preferential for copper-dithiocarbamate. *Biochem Pharmacol*, 2006, 71: 722-734.
- [145] Johansson B. A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of disulfiram and its metabolites. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 1992, 369: 15-26.
- [146] Phase I study of disulfiram and copper gluconate for the treatment of refractory solid tumors involving the liver [online], ClinicalTrials.gov, [citováno dne: 19.3.2013], dostupné z: <http://clinicaltrials.gov/ct2/search>.
- [147] Daniel K.G., Harbach R.H., Guida W.C., Dou Q.P. Copper storage diseases: Menkes, Wilsons, and cancer. *Front Biosci*, 2004, 9: 2652-2662.
- [148] Xie H., Kang Y.J. Role of copper in angiogenesis and its medicinal implications. *Curr Med Chem*, 2009, 16: 1304-1314.
- [149] 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, 118: 1577-1580.
- [150] Daniel K.G., Gupta P., Harbach R.H., Guida W.C., Dou Q.P. Organic copper complexes as a new class of proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human cancer cells. *Biochem Pharmacol*, 2004, 67: 1139-1151.
- [151] Chen D., Cui Q.C., Yang H., Dou Q.P. 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, 66: 10425-10433.
- [152] Cen D., Brayton D., Shahandeh B., Meyskens F.L., Farmer P.J. Disulfiram facilitates intracellular Cu uptake and induces apoptosis in human melanoma cells. *J Med Chem*, 2004, 47: 6914-6920.
- [153] Larsen K.S., Auld D.S. Charakterization of an inhibitory metal binding site in carboxypeptidase A. *Biochemistry*, 1991, 30: 2613-2618.

- [154] Gallery M., Blank J.L., Lin Y., Gutierrez J.A., Pulido J.C., Rappoli D., Badola S., Rolfe M., Macbeth K.J. The JAMM motif of human deubiquitinase Poh1 is essential for cell viability. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6: 262-268.
- [155] John A., Tuszynski G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res*, 2001, 7: 14-23.
- [156] Husmann K., Arlt M.J., Muff R., Langsam B., Bertz J., Born W., Fuchs B. Matrix metalloproteinase 1 promotes tumor formation and lung metastasis in an intratibial injection osteosarcoma mouse model. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1832: 347-354.
- [157] Liao C.L., Lai K.C., Huang A.C., Yang J.S., Lin J.J., Wu S.H., Gibson Wood W., Lin J.G., Chung J.G. Gallic acid inhibits migration and invasion in human osteosarcoma U-2 OS cells through suppressing the matrix metalloproteinase-2/-9, protein kinase B (PKB) and PKC signaling pathways. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50: 1734-1740.
- [158] Cho H.J., Lee T.S., Park J.B., Park K.K., Choe J.Y., Sin D.I., Park Y.Y., Moon Y.S., Lee K.G., Yeo J.H., Han S.M., Cho Y.S., Choi M.R., Park N.G., Lee Y.S., Chang Y.C. Disulfiram suppresses invasive ability of osteosarcoma cells via the inhibition of MMP-2 and MMP-9 expression. *J Biochem Mol Biol*, 2007, 40: 1069-1076.
- [159] Yip N.C., Fombon I.S., Liu P., Brown S., Kannappan V., Armesilla A.L., Xu B., Cassidy J., Darling J.L., Wang W. Disulfiram modulated ROS-MAPK and NFkB pathways and targeted breast cancer cells with cancer stem cell-like properties. *Br J Cancer*, 2011, 104: 1564-1574.
- [160] Sandstorm P.A., Mannie M.D., Buttke T.M. Inhibition of activation-induced death in T cell hybridomas by thiol antioxidants: oxidative stress as a mediator of apoptosis. *J Leukoc Biol*, 1994, 55: 221-226.
- [161] Kwolek-Mirek M., Zadraq-Tecza R., Bartosz G. Ascorbate and thiol antioxidants abolish sensitivity of yeast *Saccharomyces cerevisiae* to disulfiram. *Cell Biol Toxicol*, 2012, 28: 1-9.
- [162] Cen D., Gonzales R.I., Buckmeier J.A., Kahlon R.S., Tohidian N.B., Meyskens F.L. Disulfiram induces apoptosis in human melanoma cells: a redox-related process. *Mol Cancer Ther*, 2002, 1: 197-204.

- [163] Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2: 48-58.
- [164] Fromm M.F., Kim R.B. *Handbook of Experimental Pharmacology: Drug Transporters*, Springer, 2011. ISBN 364214540X. Kapitola: Multidrug resistance proteins (MRPs, ABCs): importance for pathophysiology and drug therapy, 299-323.
- [165] Johnstone R.W., Ruefli A.A., Smyth M.J. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glykoprotein? *Trends Biochem Sci*, 2000, 25: 1-6.
- [166] Sauna Z.E., Shukla S., Ambudkar S.V. Disulfiram, an old drug with new potential therapeutic uses for human cancers and fungal infections. *Mol Biosyst*, 2005, 1: 127-134.
- [167] Pammolli F., Magazzini L., Riccaboni M. The productivity crisis in pharmaceutical R&D. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10: 428-438.
- [168] Koenig J. Does process excellence handcuff drug development? *Drug Discov Today*, 2011, 16: 377-381.
- [169] Keiser M.J., Setola V., Irwin J.J., Laggner C., Abbas A.L., Hufeisen S.J., Jensen N.H., Kuijter M.B., Matos R.C., Tran T.B., Whaley R., Glennon R.A., Hert J., Thomas K.L., Edwards D.D., Shoichet B.K., Roth B.L. Predicting new molecular targets for known drugs. *Nature*, 2009, 462: 175-181.
- [170] Chong C.R., Sullivan D.J. New uses for old drugs. *Nature*, 2007, 448: 645-646.
- [171] Cavalla D., Minhas R. Does R&D pay? *Drug Discov Today*, 2010, 15: 230-234.
- [172] Cressey D. Health economics: Life in the balance. *Nature*, 2009, 461: 336-339.
- [173] Fox E.R., Tyler L.S. Call to action: finding solutions for the drug shortage crisis in the United States.
- [174] Oprea T.I., Bauman J.E., Bologna C.G., Buranda T., Chigaev A., Edwards B.S., Jarvik J.W., Gresham H.D., Haynes M.K., Hjelle B., Hromas R., Hudson L., Mackenzie D.A., Muller C.Y., Reed J.C., Simons P.C., Smagley Y., Strouse J., Surviladze Z., Thompson T., Ursu O., Waller A., Wandinger-Ness A., Winter S.S., Wu Y., Young S.M.,

Larson R.S., Willman C., Sklar L.A. Drug repurposing from an academic perspective. *Drug Discov Today Ther Strateg*, 2011, 8: 61-69.

[175] Boguski M.S., Mandl K.D., Sukhatme V.P. Drug discovery. Repurposing with a difference. *Science*, 2009, 324: 1394-1395.

[176] Silverman W.A. The schizophrenic career of a “monster drug”. *Pediatrics*, 2002, 110: 404-406.

[177] Cvek B. Nonprofit drugs as the salvation of the world’s healthcare systems: the case of Antabuse (disulfiram). *Drug Discov Today*, 2012, 17: 409-412.

[178] Mahadeo K.M., Santizo R., Baker L., Curry J.O., Gorlick R., Levy A.S. Ambulatory high-dose methotrexate administration among pediatric osteosarcoma patients in an urban, underserved setting is feasible, safe, and cost-effective. *Pediatr Blood Cancer*, 2010, 55: 1296-1299.

[179] Häcker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res*, 2000, 301: 5-17.

[180] Cvek B. Targeting malignances with disulfiram (Antabuse): multidrug resistance, angiogenesis, and proteasome. *Curr Cancer Drug Targets*, 2011, 11: 332-337.

[181] Rigas D.A., Eginitis-Rigas C., Head C. Biphasic toxicity of diethyldithiocarbamate, a metal chelation, to T lymphocytes and polymorphonuclear granulocytes: reversal by zinc and copper.

[182] Selimovic D., Porzig B.B., El-Khattouni A., Badura H.E., Ahmad M., Ghanjati F., Santourlidis S., Haikel Y., Hassan M. Bortezomib/proteasome inhibitor triggers both apoptosis and autophagy-dependent pathways in melanoma cells. *Cell Signal*, 2013, 25: 308-318.

[183] Gill J., Ahluwalia M.K., Geller D., Gorlick R. New targets and approaches in osteosarcoma. *Pharmacol Ther*, 2013, 137: 89-99.

[184] Brar S.S., Grigg C., Wilson K.S., Holder W.D., Dreau D., Austin C., Foster M., Ghio A.J., Whorton A.R., Stowell G.W., Whittall L.B., Whittle R.R., White D.P., Kennedy T.P. 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 patient with metastatic disease. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3: 1049-1060.

[185] Shian S.G., Kao Y.R., Wu F.Y., Wu C.W. Inhibition of invasion and angiogenesis by zinc-chelating agent disulfiram. *Mol Pharmacol*, 2003, 64: 1076-1084.

[186] Triscott J., Lee C., Hu K., Fotovati A., Berns R., Pambid M., Luk M., Kast R.E., Kong E., Toyota B., Dunn S.E. Disulfiram, a drug widely used to control alcoholism, suppresses the self-renewal of glioblastoma and over-rides resistance to temozolomide. *Oncotarget*, 2012, 3: 1112-1123.

[187] Loo T.W., Barlett M.C., Clarke D.M. Disulfiram metabolites permanently inactivate the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Mol Pharm*, 2004, 1: 426-433.

[188] Barth K.S., Malcolm R.J. Disulfiram: an old therapeutic with new applications. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2010, 9: 5-12.

## **10 PŘÍLOHY**

Praktická i teoretická část mé bakalářské práce bude dále rozvíjena nejen v podobě práce diplomové, ale také v rámci tříměsíční stáže na pracovišti prof. Q. Ping Doua v Barbara Ann Karmanos Cancer Institute, který poslal zvací dopis, jenž je zde přiložen.