

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2013

Anna Petráčková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Neziskové léky: Aktivita komplexu disulfiramu
(antabusu) s mědí proti buněčné linii odvozené
od karcinomu jater**

Bakalářská práce

Anna Petráčková

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 vypracovala samostatně pod odborným vedením Mgr. Borise Cveka, Ph.D. a pouze s použitím citované literatury.

V Olomouci, 17. dubna 2013

.....
podpis

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

Souhrn

Rakovina jater představuje třetí nejčastější příčinu úmrtí na rakovinu ve světě. Její kurativní léčba se opírá pouze o chirurgické zákroky. I když bylo a v současnosti je testováno velké množství chemoterapeutik, zatím žádnou takovou látkou ani jejich kombinací nedošlo k výraznému zlepšení stavu pacientů nebo alespoň k výraznému prodloužení doby přežití.

Přístup, který vykazuje slibný protinádorový potenciál a je rozebrán v této práci, je založen na proteazomální inhibici. Proteazom je multiproteinový komplex eukaryotických buněk, který je zodpovědný za degradaci až 80 % buněčných proteinů. Proteazom je tak zapojen do spousty buněčných procesů, ať už se jedná o aktivaci signálních drah, regulaci buněčného cyklu nebo třeba roli při tvorbě antigenů. Jeho inhibice překvapivě vede k odumření rakovinných buněk, zatímco zdravé přežívají. Prvním schváleným inhibitorem proteazomu je bortezomib. Bohužel v terapii solidních nádorů vykazuje minimální efekt. Potenciál silné inhibice proteazomu je předpokládán také u disulfiramu, respektive jeho metabolitu dithiokarbamátu v komplexu s mědí.

Praktická část této práce se zabývá stanovením cytotoxicity syntetického dithiokarbamátového komplexu s mědí na buněčné linii odvozené od karcinomu jater. Z výsledků vyplývá, že tento komplex byl *in vitro* vysoce účinný s hodnotou IC_{50} 1,14 $\mu\text{mol/l}$. Hodnocení toxicity bylo provedeno pomocí metody MTT testu.

Přesný mechanismus působení komplexu $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ však ještě není zcela odhalen a je potřeba dalších studií v této oblasti. Výhodou terapie disulfiramem jsou mírné vedlejší účinky (oproti klasické chemoterapii) a také snadná dostupnost, protože se jedná o levný starý lék. Jeho používání by nezatěžovalo zdravotnický systém a byl by dostupný i v chudých zemích.

Summary

Liver cancer is the third most common cause of cancer mortality. Currently, only surgical resection is considered as the sole potentially curative treatment. Even though variety of agents has been tested, any of them or their combination has not provided significant benefits to patients.

Other approach, that shows promising antitumor activity and is analysed in this thesis, is proteasome inhibition. The proteasome is a multiprotein complex of eukaryotic cells and it is responsible for degradation up to 80 % of cellular proteins. It is involved in many cellular processes such as activation of signalling pathways, regulation of cell cycle or formation of antigens. Its inhibition suprisingly leads to death of tumor cells but not to death of normal cells. Bortezomib is the first approved inhibitor of proteasome. Unfortunately, it is not enough effective in solid tumors. The potential of powerful proteasome inhibition is also attributed to disulfiram, respectively to its metabolite dithiocarbamate in complex with copper.

Experimental part of this thesis deals with determining of cytotoxicity of synthetic dithiocarbamate complex with copper on cell line derived from liver carcinoma. The complex was highly effective *in vitro* and IC_{50} was estimated to be $1,14 \mu\text{mol/l}$. MTT test was used to evaluate the toxicity.

The exact mechanism of action of the $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ complex is not fully elucidated and more research is needed. The advantages of usage of disulfiram are mild adverse effects and good availability due to its low price. Its usage would not burden on health care system and the drug would be available even in less developed countries.

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce Mgr. Borisovi Cvekovi, Ph.D. za jeho čas, odborné vedení a rady. Dále pak děkuji Mgr. Jindřichovi Sedláčkovi za pomoc při experimentální části bakalařské práce.

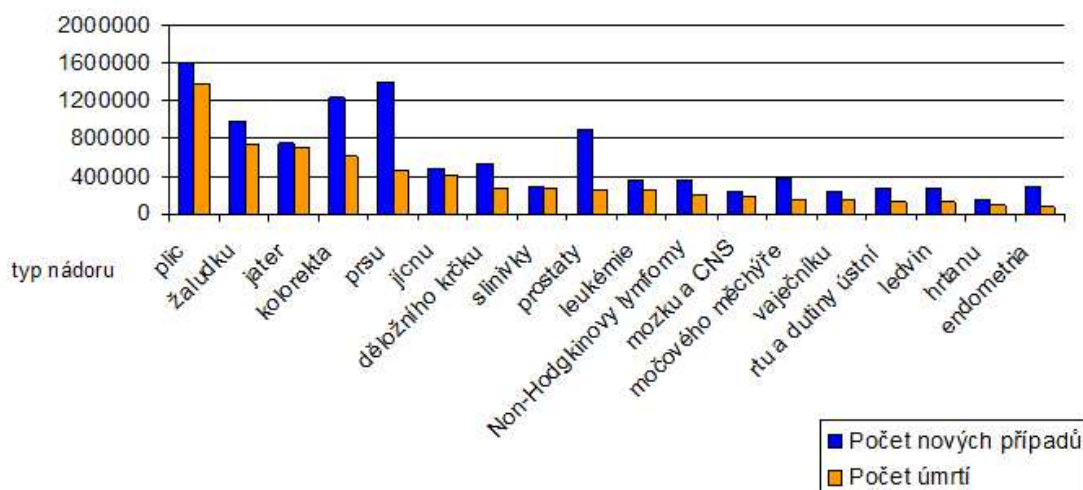
Obsah

1	ÚVOD	2
2	RAKOVINA JATER	4
2.1	Hepatocelulární karcinom	4
2.2	Léčba	8
3	UBIKVITIN-PROTEAZOMOVÝ SYSTÉM	11
3.1	Ubikvitinace	11
3.2	Struktura proteazomu	13
3.3	Další funkce UPS	14
3.4	Inhibice proteazomu	15
4	DISULFIRAM	18
4.1	Mechanismus protinádorového účinku	18
5	PRAKTICKÁ ČÁST	21
5.1	Materiál	21
5.1.1	Biologický materiál	21
5.1.2	Chemikálie	21
5.1.3	Přístroje	22
5.1.4	Materiál	22
5.1.5	Software	23
5.2	Pracovní postupy	23
5.2.1	Kultivace buněčné linie	23
5.2.2	Výměna média a pasážování buněk	23
5.2.3	Počítání buněk	23
5.2.4	Stanovení toxicity pomocí MTT testu	23
5.3	Výsledky	25
6	DISKUZE	31
7	ZÁVĚR	32
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	33
9	LITERATURA	35

1 ÚVOD

Nádor je termín užívaný pro soubor onemocnění, která vznikají z patologické transformace buňky, která se vyznačuje nekontrolovaným množením, rezistencí vůči regulačním mechanismům včetně apoptózy, změnou schopností diferenciací, genetickou nestabilitou a změnou metabolismu. Může napadat okolní tkáně a způsobovat metastáze, tzv. sekundární tumory. Právě nadměrná růstová aktivita nádorových buněk je jejich nejzřejmějším rysem [1]. Neregulovaná proliferace buněk je umožněna díky specifickým genetickým defektům. Jedná se například o mutace v genech, které jsou odpovědné za potlačování buněčného cyklu. Příčinou vzniku rakoviny mohou být náhodné a spontánní mutace, nebo může jít o výsledek vlivu prostředí.

Nádorová onemocnění stále patří mezi nejčastější příčiny úmrtí v důsledku choroby. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) v roce 2004 zemřelo na rakovinu 7,4 milionů lidí ve světě, což představuje 13 % všech úmrtí [2]. V grafu na Obr. 1. je znázorněna incidence a mortalita vybraných typů nádorů ve světě v roce 2008.



Obrázek 1: Incidence a mortalita vybraných typů nádorů ve světě v roce 2008 [7]

V současné době je problematika rakovinových onemocnění lékaři i vědci intenzivně zkoumaná a do rozsáhlého výzkumu je investováno mnoho peněz. Odhaduje se, že náklady na vývoj nového léku se v USA pohybují okolo 800 milionů až jedné miliardy dolarů a samotný schvalovací proces léku pak trvá průměrně 15 let [3], přičemž neúspěšnost ve výzkumu léků proti rakovině v 90. letech byla 70 % ve fázi II a 59 % ve fázi III klinického testování [4]. Během doby schvalovacího procesu procházejí potenciální léčiva několika fázemi klinického testování, při kterých se hodnotí účinnost léčby a bezpečnost látky. Takový výzkum je obvykle placen farmaceutickými firmami anebo z veřejných zdrojů. A aby byly tyto obrovské investice chráněny, jsou nové léky patentovány. Přestože se do výzkumu vkládají obrovské částky peněz (podle US National Institutes of Health se v roce 2003 utratilo za výzkum 27 miliard dolarů), počet nově schválených léků Food and Drug Administration (FDA) od devadesátých let minulého století klesl a v současné době se pohybuje na konstantních číslech 20-30 nových látek ročně schválených FDA [5]. Z těchto důvodů se mnoho odborníků domnívá, že je ve farmaceutickém výzkumu potřeba nových přístupů, aby byl celý systém efektivnější, levnější a méně zdlouhavý [6].

Jedním z návrhů je zaměřit úsilí vědců na monitorování léků, které jsou již dlouho známé a u nichž byly popsány pozitivní vedlejší účinky. Takové látky se už dnes pacientům předepisují v rámci léčby jiných onemocnění než k jakému byly původně schváleny. Uvádí se, že v USA se tyto léky předepisují v 40-60 % z celkového počtu předpisů [8]. Výhodou dlouho známých a používaných léků je bezpečnost jejich užívání, protože s léky jsou mnohaleté zkušenosti, a lepší finanční dostupnost, protože už nejsou chráněny patentem. Dnes známe mnoho příkladů léčivých látek, které jsou využívány k jiným účelům než k jakým byly původně schváleny. Mezi nejznámější patří aspirin, schválený FDA jako lék proti bolesti, který se pro své protisrážlivé účinky využívá ke snižování rizika úmrtí na infarkt myokardu [8] a u kterého bylo také objasněno další potenciální použití v léčbě kolorektálních nádorů [9]. Dalším poněkud neobvyklým příkladem je lék thalidomid, který byl v padesátých letech minulého století předepisován těhotným ženám jako sedativum k tišení ranních nevolností. Avšak následně byl v roce 1961 stažen z trhu, protože způsoboval závažné deformace plodu [8]. Později se díky náhodě ukázalo, že thalidomid má příznivý léčebný efekt u nemocných s komplikacemi lepry, a tak byl v roce 1998 schválen pro léčbu erythema nodosum leprosum [6, 8]. Pozdější výzkum také prokázal, že thalidomid potlačuje nádorovou angiogenezi u mnohočetného myelomu [6].

Jedním z příkladů je také antabus (disulfiram), lék používaný přes padesát let k léčbě alkoholismu [10], a u kterého byly objeveny protinádorové účinky. Ty pravděpodobně souvisí s jeho schopností inhibovat proteazom [11], což je proteinový útvar zodpovědný za degradaci proteinů v buňkách.

Zdá se tedy, že je finančně i časově efektivnější objevovat nová využití starých léků než vytváření léků úplně nových, což je příklad tradičního přístupu farmaceutického výzkumu, kdy se hledá nová léčivá látka, která zasahuje jeden konkrétní biologický cíl [12]. Kromě toho žádná farmaceutická společnost se nebude snažit najít nová použití léku, když už není patentovatelný. Financování výzkumu starých léků se tak děje pouze neziskovým způsobem. Vystává tedy otázka, zda by se nemělo povolit patentování starých preparátů, u kterých došlo k objevení nových použití. Nicméně repatentování léků by nevyřešilo otázku finanční nákladnosti, se kterou se pojí dostupnost léčby v chudých zemích, stejně tak jako prodražení zdravotní péče jinde ve světě. Příkladem starého léku, který nebyl repatentován, je antibiotikum paromomycin, které se dnes užívá k léčbě viscerální leishmaniózy. Ročně se vyskytuje v Indii 100 000 nových případů tohoto parazitického onemocnění a jestliže zůstane neléčené, je smrtelné [13]. Klinické testování léku bylo placeno z Institute for OneWorld Health, Bill and Melinda Gates Foundation a WHO [14]. Cena pro 21 denní léčbu 35 kg pacienta stojí pouze 4.19 € [15]. Výstupem neziskově financovaného výzkumu je tedy levný lék, dostupný v chudých zemích a nezatěžující zdravotnický systém.

2 RAKOVINA JATER

Primární nádory jater tvoří heterogenní skupinu onemocnění. Nejčastěji se vyskytující primární maligní nádor jater je hepatocelulární karcinom (HCC), který v celosvětovém měřítku představuje 70 až 85 % všech primárních jaterních malignit [16]. Zároveň je pátou nejčastější rakovinou [17] a po karcinomu plic a žaludku třetí nejčastější příčinou úmrtí na rakovinu ve světě [18]. Nejvíce metastázuje do plic, lymfatických uzlin, nadledvinek a kostí [19]. Sekundární nádory jater se nejčastěji objevují u pacientů, kteří v historii trpěli některým z těchto tumorů: kolorektální karcinom, rakovina prsu, neuroendokrinní nádory a rakovina slinivky břišní.

Druhým významným typem rakoviny jater je cholangiokarcinom (CCA). CCA je maligní onemocnění epiteliálních buněk žlučových cest v játrech. I když se vyskytuje zřídka, CCA představuje po HCC druhý nejčastější primární jaterní maligní tumor ve většině částech světa [21]. Do oblastí s nejvyšším počtem výskytu patří Thajsko a další části jihovýchodní Asie. V etiologii významně vystupují infekce parazity intrahepatálních žlučových cest [22].

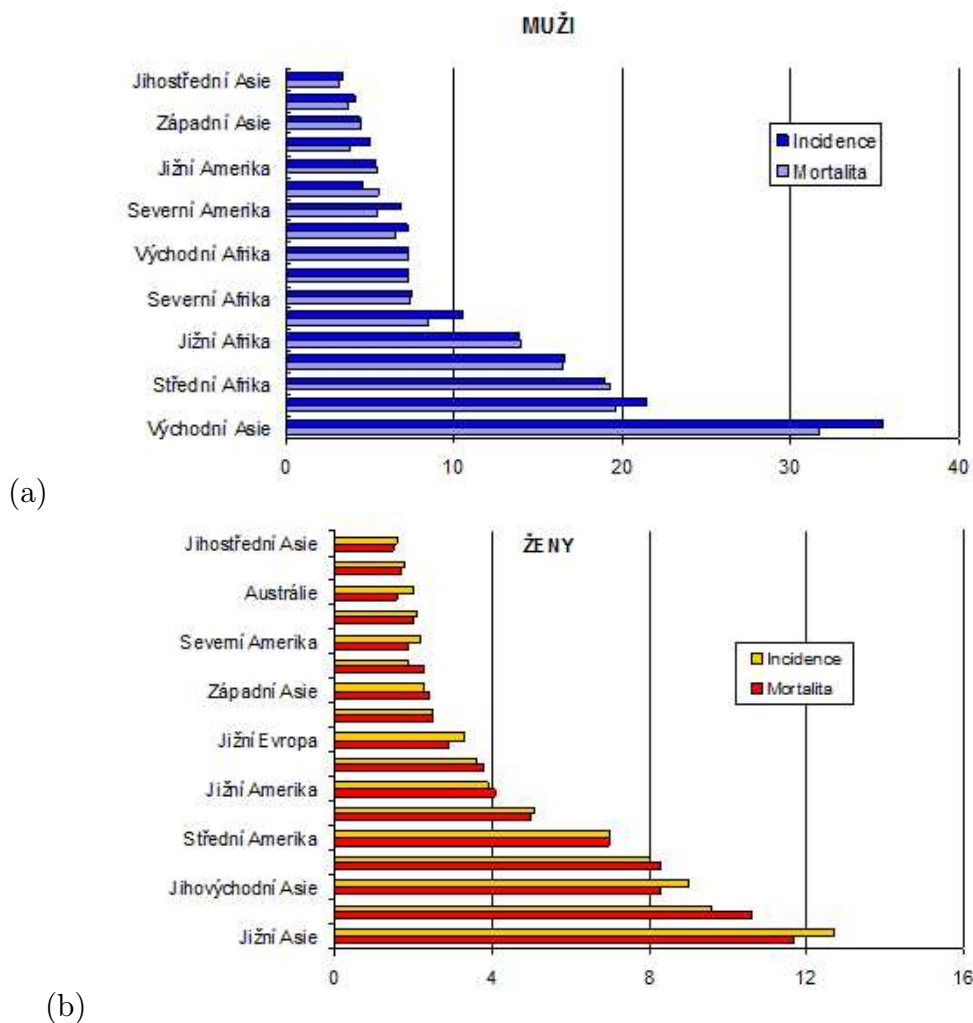
Odhaduje se, že v roce 2008 se celosvětově vyskytlo 748 300 nových případů jaterních nádorů a došlo k 695 900 úmrtí na tuto rakovinu [17]. V České republice bylo v roce 2008 diagnostikováno 856 nemocných s primárním nádorem jater a intrahepatálních žlučových cest. 793 nemocných na tuto chorobu zemřelo [23].

Existují velké geografické rozdíly ve výskytu primárních zhoubných nádorů jater. 80 % nových případů se objevuje v rozvíjejících se zemích. Nejvyšší incidence je v jihovýchodní Asii a subsaharské Africe hlavně díky endemickému výskytu virů hepatitid. Jenom v Číně je 55 % případů úmrtí na nádory jater [26]. Mezi země s vysokou incidencí patří také Thajsko, Japonsko a Korea. Severní a západní Evropa a Severní Amerika jsou země s nízkou incidencí (5 případů na 100 000 mužů a 2,5 případů na 100 000 žen). Konkrétně incidence HCC v Evropě a USA je nízká, nicméně za poslední dvě dekády vzrostla [18], nejspíš jako důsledek zvyšujícího se výskytu infekce virem hepatitidy C (HCV) [20]. Ve střední a jižní Evropě je střední incidence [27]. V poslední době došlo ke snížení incidence v rozvíjejících se zemích, pravděpodobně jako důsledek prevence proti infekci virem hepatitidy B (HBV). Příkladem je Taiwan, kde bylo díky vakcinaci zaznamenáno výrazné snížení počtu osob s chronickou HBV infekcí ve věkové skupině pod 20 let, což korelovalo i se snížením výskytu HCC v této skupině lidí [28].

Dalším faktorem je etnická příslušnost. Například v USA je u lidí asijského původu míra incidence dvakrát vyšší než u afrických Američanů, u kterých je zase incidence dvakrát vyšší než u Američanů bílé rasy [24]. Incidence nádorů jater podle pohlaví a geografických oblastí je vidět na Obr. 2.

2.1 Hepatocelulární karcinom

Hepatokarcinogeneze je vícestupňový proces zahrnující komplex genetických a epigenetických změn, chromozomových aberací, genových mutací a změn v molekulárních drahách. Základním rizikovým faktorem vzniku HCC je v 70-90 % případů chronické jaterní onemocnění, obvykle jaterní cirhóza, která představuje terminální ireverzibilní stádium mnoha jaterních chorob, projevující se kompletní přestavbou původní tkáně prostřednictvím rozsáhlé fibrózy. Ke vzniku cirhózy mohou vyústit infekce HBV a HCV a nadměrná konzumace alkoholu. Mezi další faktory, které zvyšují riziko vzniku HCC, patří příjem aflatoxinu v potravě, poruchy příjmu železa, dlouhodobý příjem orálních kontraceptiv,



Obrázek 2: Incidence a mortalita nádorů jater na 100 000 osob podle geografických oblastí, (a) muži (b) ženy [18].

obezita a diabetes, méně časté jsou dědičné metabolické poruchy, mezi které patří například hemochromatóza (poruchy metabolismu železa), deficit alfa-1-antitrypsinu (porucha metabolismu bílkovin) a poruchy metabolismu porfyrinů [24].

HCC se častěji objevuje u mužů než u žen, obvyklý poměr je mezi 2:1 a 4:1, přičemž v oblastech s vyšší incidencí je i poměr větší. Příčiny mohou být genetické nebo i sociální, kde hraje roli odlišné chování mužů a žen, například vyšší konzumace alkoholu muži než ženami [24]. Incidence HCC se dále zvyšuje s věkem, nejvyšší prevalence je pozorována u lidí nad 65 let [25]. Ve většině případů tedy vzniká HCC na podkladě cirhózy jater, i když se zřídka vyskytnou i případy, kdy vzniku HCC cirhóza nepředcházela (odhaduje se, že u 10-30 % pacientů s HCC se cirhóza nevyskytuje [24]). V chronicky nemocných játrech, pro které je typická vysoká aktivita buněčné proliferace, mohou vznikat ložiskové léze. Jedním z typů ložisek je dysplastický uzol, který je považován za jasnou prekancerózu HCC [29, 30]. Nicméně přesný mechanismus vzniku HCC včetně vývinu preneoplastických ložisek a jejich vývoj v HCC není znám.

U HCC nebyly popsány žádné stálé charakteristické genetické změny, protože tento nádor je poměrně heterogenní a různí se podle etiologie. HBV a HCV jsou nejlépe zdo-

kumentované rizikové faktory HCC.

HBV je DNA-virus, který může integrovat svůj genom do genomu hepatocytů. Tím způsobuje přeuspořádání DNA, nestabilitu chromozomů a může interferovat s onkogenními a tumor supresorovými geny [31, 32]. HBV napomáhá karcinogenezi expresí vlastního virového proteinu HBx, který ovlivňuje transkripční aktivitu hepatocytů tím, že přímo interaguje s jadernými transkripčními faktory nebo ovlivňuje signální dráhy v cytoplasmě. Mezi cíle HBx patří například Ras/Raf/MAPK signální dráha, která reguluje buněčný cyklus, diferenciaci a proliferaci buňky. HBx dále aktivuje protoonkogen c-jun a ovlivňuje signální dráhu NF- κ B, která se mimo jiné podílí na regulaci buněčného růstu a buněčné smrti, ovlivňuje kaskádu Jak-Stat nebo dereguluje dráhu proteinkinázy C, což má za následek zvýšenou transkripci antiapoptotických proteinů, zrychlený buněčný růst a proliferaci [33, 34, 35, 36]. Kromě toho má HBx schopnost vytvářet komplex s p53 a tím jej inaktivovat [37]. p53 je tumor supresorový protein, který při poškození buňky navozuje zastavení buněčného cyklu nebo programovanou buněčnou smrt.

HCV řadíme mezi RNA viry, které nezačleňují svůj genom do genomu hostitelské buňky. Místo toho se v patogenezi přímo uplatňují virální proteiny, které ovlivňují signální dráhy, transkripční a translační aktivitu, buněčný cyklus a apoptózu. Zejména se jedná o core protein a NS5A protein. HCV core protein se například váže na p53, p73 a Rb, což jsou tumor supresorové proteiny [38, 39, 40]. Dále ovlivňuje expresi proteinu p21 [41], což je inhibitor komplexů cyclin-dependentních kináz. Nestrukturální protein NS5A se například přímo váže na p53 a inhibuje tak jeho transkripční aktivitu [42]. Také interaguje s proapoptotickým proteinem Bax jako homolog Bcl-2 a tím brání apoptóze [43]. Core protein i NS5A se podílejí na abnormální regulaci Wnt/ β -catenin signální dráhy, což má za důsledek zvýšenou proliferaci a maligní buněčnou transformaci. Deregulace Wnt/ β -catenin dráhy je obecně považována za důležitý krok v hepatokarcinogenezi. HCV infekce je v současné době příčinou 75-80 % případů HCC v Japonsku [44]. Okolo 40 % pacientů s infekcí HCV bylo nakaženo transfuzí infikované krve v letech 1950 až 1960.

V etiologii se dále výrazně uplatňuje aflatoxin, což je mykotoxin produkovaný plísními *Aspergillus*, které kontaminují potravu hlavně ve špatně uskladněných obilovinách nebo oříchách. Aflatoxin zasahuje gen pro p53, u kterého vyvolává záměnu třetí báze kodonu 249 guaninu za thymin [45]. Tato mutace inaktivuje p53.

V rámci snahy určit geny, které jsou rozhodující pro hepatokarcinogenezi, byly studovány chromozomové změny u HCC. Amplifikace chromozomálních částí bylo pozorováno například na 1q, 6p, 8q, 17q, 20q chromozomech a delece na 4q, 8p, 13q, 16q, 17p chromozomech [46]. Tyto chromozomální změny se nacházejí například v místech genů pro c-myc, PTEN, E-cadherin, AXIN1, p53, Rb1, FGF3/4, cyklin D1, cyklin A2 a IGF-2R [47].

Významnou úlohu v transformaci hepatocytů hrají epigenetické změny. Epigenetika se zabývá změnami genové exprese, při kterých nedochází ke změně v sekvenci nukleotidů DNA. To je umožněno díky strukturním a chemickým modifikacím chromatinu, například se jedná o metylaci DNA nebo acetylaci nukleosomálních histonů. V posledních desetiletí se ukázalo, že epigenetické změny hrají roli i při vzniku nádoru [48], kde je nejvýraznější hypermethylace ostrovů CpG v místě genového promotoru, která vede k represí transkripce cílového genu. Nenormální metylace CpG ostrovů byla pozorována kromě nádorových buněk už u cirhotických jater a jater s chronickou hepatitidou [49]. U HCC dochází díky hypermethylaci k umlčování například těchto tumor supresorových genů: p16, RASSF1, E-cadherin a SOCS1 [50, 51, 52, 53]. Na druhou stranu hypomethylace a reaktivace onkogeny c-myc byla také demonstrována u HCC [54].

Dalším mechanismem, který svou funkcí brání trvalé proliferaci nádorových buněk, je proces zkracování telomer. Telomery jsou specializované struktury, které chrání konce chromozomů proti deoxyribonukleázám, brání fúzím konců chromozomů a umožňují replikaci chromozomů beze ztráty materiálu. Před každým buněčným dělením se replikuje DNA, při tomto procesu ale vždy dochází k mírnému zkracování telomer. Pokud se telomery zkrátí natolik, že již nemohou vykonávat svoji funkci, buňka se nemůže dělit a odumře. Telomery tedy nejen chrání chromozomy před zničením a degradací, ale při zachování určité délky jsou nezbytné k trvalé proliferaci buněk. Prodlužování telomer zajišťuje enzym telomeráza, která je aktivní u mnoha nádorových buněk. Aktivace telomerázy u HCC je spojována s genomovou nestabilitou buňky a její aktivita je zvýšená ve více než 80 % případů [55]. Zajímavé je, že aktivita telomerázy v dysplastických uzlech je srovnatelná s aktivitou telomerázy u HCC [56].

V každém typu rakoviny se nacházejí deregulované signální dráhy. Klíčové dráhy, které jsou zapleteny do patogeneze HCC jsou tyto: Wnt/ β -catenin, EGFR/Ras/MAPK, IGF, Rb, c-MET, Akt/mTOR, VEGF a PDGFR [57, 58].

Wnt/ β -catenin signální dráha hraje významnou roli v kontrole buněčné proliferace. Proteiny Wnt řídí dělení, diferenciaci, přežívání buněk a významně se podílejí na vývoji organismu. Klíčovým proteinem dráhy je β -catenin. K aktivaci dráhy dochází po navázání Wnt ligandů na receptory Frizzled. Následuje kaskáda dějů, jehož výsledkem je uvolnění β -cateninu z E-cadherinu a akumulace β -cateninu v cytoplazmě. Po dosažení určité koncentrace se přesouvá do jádra, kde se váže na transkripční faktory rodiny TCF/LEF, což vede k přepisu skupiny cílových genů mezi které patří například onkogen c-myc anebo gen kódující cyklin D [59, 60]. Při absenci Wnt signálů je β -catenin vázán do multiproteinového komplexu, kde dochází k jeho fosforylaci, která označuje β -catenin jako cíl určený k degradaci pro ubiquitin-proteazomový systém. Jedna z možných deregulací této dráhy u HCC je způsobena mutacemi v genu pro β -catenin. Téměř všechny takové mutace se nacházejí ve třetím exonu genu [61] a jsou spojovány s epigenetickými změnami [62]. Geny pro p53 a β -catenin jsou pravděpodobně nejčastěji mutované geny v HCC [57].

Další důležitou dráhou, která reguluje buněčný růst a diferenciaci, zprostředkovává buněčnou odpověď na růstové signály a u nádorů je často deregulovaná, je kaskáda EGFR/Ras/MAPK, která po aktivaci indukuje transkripci genů rodiny AP1, kam patří například geny c-fos a c-jun, které hrají klíčovou roli v proliferaci buňky [63]. Ligandy, které aktivují dráhu, jsou například EGF, HGF, PDGF a VEGF. EGFR (epidermal growth factor receptor) je transmembránový proteinový receptor, který po navázání ligandu spouští tyrosinkinázovou aktivitu a následkem toho iniciuje signální transdukcii. Dojde k aktivaci intracelulárního proteinu Ras, který dále aktivuje Raf, což je serin-threonin kináza, která fosforyluje MAPK (mitogen-activated protein kinase) kinázy. Ty signál mohou přenášet až do jádra a fosforylovat celou řadu dalších proteinů včetně transkripčních faktorů, které regulují expresi důležitých proteinů buněčného cyklu a diferenciaci. Aberantní aktivace EGFR/Ras/MAPK dráhy u HCC je pravděpodobně výsledkem deregulované EGFR a IGF signální kaskády nebo inaktivací tumor supresorových genů (jako například NOE1A) díky hypermethylaci [64].

Neregulovaná aktivace IGF (insulin-like growth factor) signální dráhy je další abnormalitou u HCC. Nadměrná exprese IGF-1 a IGF-2 receptorů a umlčení IGF vázajících proteinů (IGFBP-1-5) přispívá k buněčné proliferaci, potlačování apoptózy a invazivnímu chování nádoru. Vazba ligandů IGF-1 a IGF-2 s IGF1R (insulin-like growth factor receptor) způsobí aktivaci tyrosinkinázové domény, iniciující mnoho signálních drah včetně PI3K/Akt a Ras/MAPK [65].

Další dráha, také indukovaná IGF, je PI3K/Akt/mTOR, která hraje důležitou úlohu v karcinogenezi. Aktivace proteinové kinázy Akt může nastat skrze EGF nebo IGF signální kaskádu, přes PI3K (fosfatidylinositol-3 kináza) aktivaci nebo ztrátou funkce tumor supresorového genu PTEN epigenetickým umlčením nebo mutací. Aktivace Akt pak vede přes řadu kroků k aktivaci mTOR (mammalian target of rapamycin). mTOR kináza se chová jako centrální regulátor buněčného růstu a proliferace, kontrolující stav živin a dovolující postup buňky z G1 do S fáze buněčného cyklu [66]. Aberantní signální funkce mTOR je pozorována v 50 % HCC [57].

c-MET gen je protoonkogen důležitý pro regeneraci jater po poranění [67], který kóduje HGFR (hepatocyte growth factor receptor) neboli c-MET protein, který je receptorem pro HGF (hepatocyte growth factor). Deregulace c-MET a HGF jsou u HCC časté a přispívají k nádorové angiogenezi a růstu tumoru [68].

Další deregulovaná dráha je dráha tumor supresorového proteinu Rb, která je dysfunkční ve velké většině lidských nádorů [69]. V normálních buňkách reguluje postup buněčného cyklu z G1 do S fáze. Nefosforylovaný Rb se váže na transkripční faktor E2F-1, kterému tak brání interagovat s transkripční mašinérií. Fosforylovaný Rb nemá na E2F-1 inhibiční účinek, a tak může dojít k transkripci genů nezbytných pro postup do další fáze. Mezi cílové geny patří například cyklin E, který po navázání na CDK2 indukuje DNA replikaci [70]. Inaktivovaný Rb byl demonstrován v 28 % lidských HCC buňkách [71, 72]. I další členové Rb dráhy mohou být deregulováni, například cyklin D1, který po navázání na CDK4 fosforyluje Rb, vykazoval nadměrnou expresi v 58 % HCC [71, 73]. Protein p16 je další regulátor dráhy díky své schopnosti inhibice CDK4. Funkční p16 chyběl v 34 % HCC [74].

Nádor potřebuje ke svému růstu přísun živin a kyslíku. Jestliže je tak velký, že tyto látky nemůže získávat difúzí z okolí, je další růst podmíněn novotvorbou cév. Angiogeneze je u HCC typický jev, který je pozorovatelný už v počátečních stádiích a hraje důležitou roli při dalším růstu a vývoji nádoru. V normálních buňkách se jedná o proces koordinovaný faktory, které buď stimulují nebo inhibují angiogenezi. Mezi angiogenní faktory patří například VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF (platelet-derived endothelial growth factor), angiopoietin 2 a heparanáza [202]. Nadměrná exprese těchto faktorů byla pozorována u HCC [75, 76, 77]. Díky interakci s VEGFR receptory, které jsou umístěny na endoteliálních buňkách, VEGF spouští intracelulární kaskádu, jejímž výsledkem je tvorba nových cév, lymfangiogeneze nebo vyšší permeabilita cév. Kromě růstových faktorů způsobuje zvýšenou VEGF expresi hypoxie, oxid dusnatý, některé cytokiny a produkty onkogenů. Nové cévy formované pod vlivem angiogenních faktorů jsou však nezralé. Začlenění podpůrných stabilizačních buněk pericytů a hladkých svalových buněk do nově formovaných cév umožňuje signální dráha PDGF [202].

2.2 Léčba

Základem kurativní léčby HCC je chirurgická resekce nádoru a transplantace jater. U těchto pacientů je pozorováno pětileté přežití až v 70 % [78]. Kromě chirurgické léčby je možná například radiofrekvenční ablace nebo chemoembolizace, což jsou metody způsobující lokální destrukci tkáně. V případě nemožnosti provést chirurgický zákrok je možné přistoupit k chemoterapii. Mezi základní cytostatika patří doxorubicin a 5-fluorouracil. I když bylo a v současnosti je testováno velké množství chemoterapeutik, zatím žádnou takovou látkou ani jejich kombinací nedošlo k výraznému zlepšení stavu pacientů nebo alespoň k výraznějšímu prodloužení doby přežití [197].

Další možností je biologická léčba, která se opírá o poznatky molekulární biologie nádoru. Díky tomu lze identifikovat cíle v nádorové buňce, na které by potenciální léčiva selektivně působila.

Sorafenib (komerčně Nexavar) je zástupcem biologické léčby pokročilého HCC, který byl schválen v roce 2007. Jedná se o multikinázový inhibitor, který má antiproliferační a antiangiogenní vlastnosti a je aktivní například proti EGFR, VEGFR, Raf, PDGFR, c-Kit, Abl a Src [79]. V klinickém testu třetí fáze byla srovnána účinnost sorafenibu oproti placebo skupině. Medián přežití byl delší ve skupině, které byl podáván sorafenib: 10,7 měsíců versus 7,9 měsíců v placebo skupině [198].

Everolimus patří mezi inhibitory mTOR a používá se v léčbě pacientů, kteří jsou netolerantní k sorafenibu nebo došlo k progresi nemoci při užívání sorafenibu [79].

V současné době jsou v rámci terapie HCC testovány další látky, například bevacizumab, který přímo působí na VEGF, nebo jeho kombinace s erlotinibem, inhibitorem EGFR tyrosinkinázy. Dále sem patří například brivanib, tyrosinkinázový inhibitor FGF a VEGF, který se ukázal jako účinný v mnoha preklinických studiích u HCC xenograftů a dále pak v klinickém testu u pacientů s pokročilým nebo metastatickým HCC [80, 81].

Další látky, které jsou v rámci terapie HCC právě testovány, jsou uvedeny v Tab. 1. včetně jejich biologických cílů. Zatím však účinkem žádných těchto látek (včetně sorafenibu) nedošlo k úplnému vyléčení pacientů s HCC.

Jedním z testovaných léčiv v rámci terapie HCC byl bortezomib, látka, která patří mezi inhibitory ubikvitin-proteazomového systému. Klinický test byl ukončen v roce 2012, avšak žádné výsledky dosud nebyly publikovány.

Tabulka 1: Seznam látek, které jsou v klinických testech ve II. nebo III. fázi, pro léčbu HCC v rámci molekulární terapie (v roce 2012) [82, 83].

LÉČIVÁ LÁTKA	MOLEKULÁRNÍ CÍL	FÁZE KLINICKÉHO TESTU	IDENTIFIKAČNÍ ČÍSLO*
<i>Adjuvantní léčba po resekci nebo ablaci</i>			
Sorafenib	BRAF, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- β , c-KIT, Flt3	3	NCT00692770
<i>Adjuvantní léčba po transarteriální chemoembolizaci</i>			
Sorafenib	BRAF, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- β , c-KIT, Flt3	2	NCT00855218
Brivanib	VEGFR, FGFR	3	NCT00908752
<i>Léčba první linie pokročilého HCC</i>			
Sorafenib a erlotinib	BRAF, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- β , c-KIT, Flt3, EGFR	3	NCT00901901
Sorafenib a doxorubicin	BRAF, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- β , c-KIT, Flt3	3	NCT01015833
Sorafenib a C1008	BRAF, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- β , c-KIT, Flt3, TRAIL-R2	2	NCT01033240
Sorafenib a mapatumumab	BRAF, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- β , c-KIT, Flt3, TRAIL-R1	2	NCT01258608
Sorafenib a BIBF-1120	BRAF, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- β , c-KIT, Flt3, EGFR-2, PDGFR-?, FGFR	2	NCT01004003
Sorafenib a oxaliplatin a kapecitabin	BRAF, VEGFR/ β , VEGFR-3, PDGFR- β , c-KIT, Flt3	3	NCT01245582
Sorafenib a bevacizumab	BRAF, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- β , c-KIT, Flt3, VEGF	2	NCT00867321
Bevacizumab a erlotinib	VEGF, EGFR	2	NCT00881751
Brivanib	VEGFR, FGFR 3		NCT00858871
Dovitinib	FGFR3	2	NCT01232296
Linifanib	VEGFR-1, VEGFR-2, PDGFR- β , c-KIT, Flt3	3	NCT01009593
<i>Léčba druhé linie pokročilého HCC</i>			
Brivanib	VEGFR- 2, VEGFR-3, FGFR-2, FGFR-3	3	NCT00825955
ARQ 197	c-MET	2	NCT00988741
Axitinib	VEGF, PDGF	2	NCT01210495
Ramucirumab	VEGFR-2	3	NCT01140347
Everolimus	mTOR	3	NCT01035229
OSI-906	IGF-1R	2	NCT01101906

*podle NCI, dostupné z <http://www.clinicaltrials.gov>

3 UBIKVITIN-PROTEAZOMOVÝ SYSTÉM

Ubikvitin-proteazomový systém (UPS) představuje zajímavou kapitolu ze života eukaryotických buněk. Již od roku 1958, kdy bylo formulováno centrální dogma molekulární biologie, víme, jakým způsobem dochází k syntéze proteinů v buňkách. Nicméně dalším krokem k poznání buněčných pochodů je pochopení, jak dochází k degradaci již hotových proteinů, které mohou být například nefunkční nebo nadbytečné. Více než 70-80 % takových proteinů je „sešrotováno“ právě ubikvitin-proteazomovým systémem [184, 102]. Další způsob likvidace proteinů spočívá v jejich rozkladu pomocí membránových organel lysosomů, které obsahují hydrolytické enzymy. Tento děj nazýváme autofagií.

3.1 Ubikvitinace

UPS zahrnuje komplex dějů končících likvidací příslušných proteinů. Ty jsou nejdříve označeny malým proteinem ubikvitinem, který se v buňkách vyskytuje v hojném počtu. Ubikvitin je polypeptid složený ze 76 aminokyselin. Označování cílového proteinu je realizováno přes izopeptidovou vazbu na lysin tohoto proteinu [84]. Jestliže již protein nese ubikvitinovou značku, pak se další molekula tohoto malého proteinu váže C-koncem glycínu na lysin té poslední a vytvářejí tak lineární polyubikvitinový řetězec. Ubikvitin obsahuje sedm lysinů, z nichž každý potenciálně může vázat glycin a vytvářet izopeptidovou vazbu. Nicméně běžně v přírodě pozorujeme spojení K6, K11, K27, K29, K33, K48 a K63 [85]. Pro úspěšnou degradaci proteinu je nutný řetězec alespoň ze čtyř ubikvitinů a správný typ vazby mezi nimi. Nejčastější je vazba přes lysin 48, která je považována za jasný signál určující protein k degradaci [102]. Spojení přes lysin 63 obvykle hraje roli v opravě DNA a endocytóze [186], i když bylo prokázáno, že K63 řetězec je dostatečným signálem pro degradaci *in vitro* [185]. Například řetězce K11 hrají důležitou roli v ERAD (degradace spojená s ER) [86, 87].

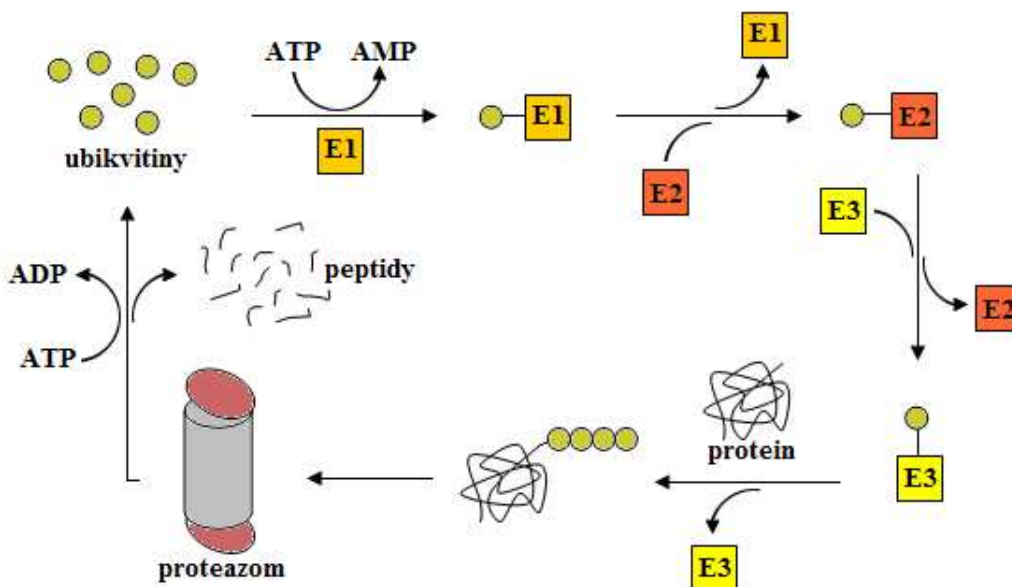
Samotnou ubikvitinaci umožňují tři různé enzymy. První z nich váže molekulu ubikvitinu za spotřeby ATP a jedná se o tzv. ubikvitin-aktivující enzym E1. V tomto kroku je glycin na C-konci ubikvitinu aktivován ATP. Následně dojde k tvorbě thioesterové vazby mezi cysteinem enzymu E1 a C-koncem ubikvitinu. Takto aktivovaný ubikvitin je následně rozpoznán ubikvitin-konjugujícím enzymem E2 a je na něj připojen thioesterovou vazbou [82]. Jakmile se takový komplex dostane do blízkosti proteinu určeného k degradaci, dojde ke konečnému navázání ubikvitinu na tento protein. Tento krok zprostředkovává enzym ubikvitin-ligáza E3 [88]. E3 dokážou specificky rozpoznat, jaký protein má být poslán k likvidaci a podle toho zprostředkují konečné navěšení ubikvitinu. Protože E3 ligázy rozpoznávají proteiny na základě specifity, buňka musí vytvářet mnoho různých E3 enzymů. Pomocí komparativní genomiky bylo prokázáno, že existuje jen několik genů kódujících E1, ale okolo desítky genů kódujících E2 a přibližně sto genů pro E3 ligázy [89].

Podle struktury rozlišujeme dva základní typy ubikvitin-ligáz: ty, které obsahují doménu RING (Really Interesting New Gene), a ty, jež nesou doménu HECT (Homologous to E6-Associated Protein C-Terminus). E3 s doménou HECT obsahují ve struktuře cystein, přes který přímo vážou ubikvitin, než jím označují cílový protein [90]. Naopak E3 ligázy s RING doménou samy ubikvitin nevážou, ale katalyzují jeho přenos z E2 přímo na cílový protein [91].

Později byl objeven další enzymatický faktor, ligázy E4, které se uplatňují při prodlužování ubikvitinové značky některých proteinů [92, 93].

Ubikvitinovaný protein je dále rozpoznán proteazomem, klíčovým elementem UPS,

kde dochází k samotné degradaci proteinu. Schéma UPS je znázorněno na Obr. 3.



Obrázek 3: UPS. Ubikvitinace cílových proteinů je zprostředkována ubikvitin-aktivujícím enzymem (E1), ubikvitin-konjugujícím enzymem (E2) a ubikvitin-ligázou (E3). Polyubikvitinovaný protein je dále rozpoznán proteazomem, ve kterém dochází k degradaci proteinu a odštěpení ubikvitinové značky.

V buňce jsou proteiny často modifikovány také jen jedním ubikvitinem. Monoubikvitinace se typicky uplatňuje při regulaci transportu proteinů nebo regulaci genové transkripce [187]. Příkladem může být p53, který je mimo jiné posttranslačně kontrolován monoubikvitinací, kterou zprostředkovává E3 enzym MDM2 a která obecně inhibuje funkce tumor supresoru [94]. Mnohočetná monoubikvitinace proteinů p53 způsobuje zvýšený export p53 z jádra buňky do cytoplasmy, kde v případě absence signálů stresu je polyubikvitinován a následně degradován proteazomem [95, 96]. Jako regulační molekula vystupuje ubikvitin také v případě nejčastější úpravy savčích histonů, monoubikvitinaci histonu H2A, která je důležitá pro umlčování genů, progresi buněčného cyklu a v odpovědi na poškození DNA [121].

Kromě klasické představy proteazomální degradace závislé na ubikvitinu existují proteiny, které proteazom dokáže „sešrotovat“, aniž by na sobě nesly ubikvitinovou značku. Příkladem je kalmodulin [97], který se podílí na regulačních procesech buňky, v nichž vápenaté kationty působí jako druhý posel. Dalším příkladem může být ornitindekarboxyláza, která katalyzuje tvorbu putrescinu, což je první krok v biosyntéze polyaminů. Také zde patří rodina Rb proteinů, tumor supresor p53 (prokázána proteazomální degradace závislá i nezávislá na ubikvitinu) nebo inhibitor cyklin-dependentních kináz p21WAF1/CIP1 [98]. Jakým způsobem jsou ale v tomto případě substráty rozpoznány proteazomem a s jakou specifičností, není ještě objasněno.

Také prokaryota obsahují ve svých buňkách proteazom, ale na rozdíl od eukaryot nevyužívají ubikvitiny. V případě *Mycobacterium tuberculosis* se podařilo najít protein Pup, který je, stejně jako ubikvitin, značkou pro proteazomální degradaci [99]. Je tedy možné, že i prokaryota mají obdobnou posttranslační úpravu se schopností zasahovat do

buněčných procesů.

3.2 Struktura proteazomu

Proteiny, které jsou již označené polyubikvitinovým řetězcem, jsou následně rozpoznány proteazomem. Proteazom je klíčový element UPS, kde dochází k samotné degradaci. V buňce se vyskytuje v cytoplazmě, jádře, [199] endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu [111]. Jedná se o multiproteinový komplex, jehož sedimentační konstanta je 26S a relativní molekulová hmotnost přibližně 2,5 MDa. Rozlišujeme jeho dvě základní části: katalytickou jednotku 20S proteazom a 19S proteazom s regulační funkcí [188].

19S proteazom (PA700) je zodpovědný za rozeznání, rozpletení a přesunutí polyubikvitinovaného proteinu do 20S za spotřeby energie. 19S se nachází navázaný na jednom nebo obou koncích 20S proteazomu, je složen z 19 podjednotek [101] a rozlišujeme u něj dvě navzájem spojené části: bázi a víko. Báze nasedá na 20S proteazom a její funkcí je rozpoznat polyubikvitinovou značku a rozplést protein do primární struktury. Je tvořena z desíti podjednotek, z nichž šest (Rpt1-6) patří do rodiny AAA+ ATPáz (ATPázy asociované s různými buněčnými aktivitami), které vytvářejí heterohexamerický kruh v pořadí Rpt1, 2, 6, 3, 4, 5 [100]. Ukazuje se, že konkrétně tyto podjednotky jsou odpovědné za rozbalení proteinů a následný přesun do 20S proteazomu za spotřeby ATP, a tak tvoří jakýsi molekulární motor proteazomu [101]. Další čtyři podjednotky báze nemají ATPázovou aktivitu. Jsou to Rpn1, Rpn2 a ubikvitinové receptory Rpn10 a Rpn13 [101, 102]. Na Rpn1 mohou být navázané další ubikvitinové receptory (Rad23, Ddi1 a Dsk2) a neesenciální deubikvitináza Ubp6 [103, 104].

Víko 19S proteazomu je připojeno na bázi a tvoří jej devět podjednotek bez ATPázové aktivity (názvy kvasinkových podjednotek: Rpn3, 5-9, 11-12 a Sem1). Funkcí víka je odštěpit ubikvitinovou značku od proteinového substrátu [105].

Polyubikvitinový řetězec specificky vážou podjednotky Rpn10, Rpt5 a Rpn13 [106, 107, 108, 189]. Rpn10 obsahuje ve struktuře doménu ubikvitin-interagující motiv (UIM), která zprostředkovává navázání polyubikvitinového řetězce K48. UIM doména je dlouhá přibližně 20 aminokyselin a obsahuje konzervovanou sekvenci LAL(M)AL [106, 107, 109]. ATPáza Rpt5 je také schopna vázat řetězec ubikvitinů, nicméně přesný mechanismus zatím není znám [108]. Klíčovou roli v deubikvitinaci hraje JAMM doménová deubikvitináza, která je v lidských buňkách označována jako Pohl nebo v případě kvasinek jako Rpn11, a jejíž enzymatická činnost vyžaduje přítomnost zinečnatých kationtů [110]. Po odštěpení ubikvitinové značky je řetězec recyklován na volné jednotlivé ubikvitiny [190].

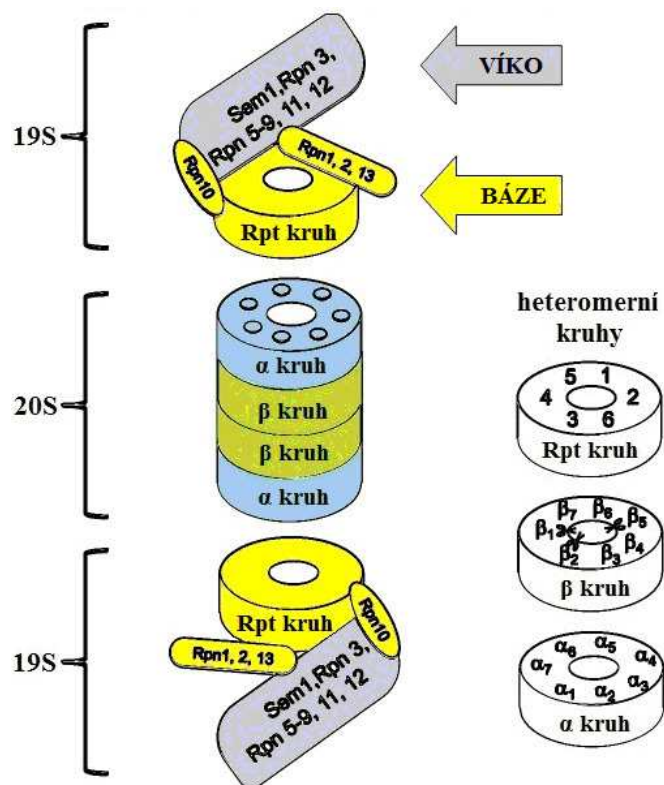
Jakmile je protein rozpleten do primární struktury a zbaven ubikvitinů, přesune se do hlavní partikule, 20S proteazomu, což je místo, kde probíhá vlastní proteolýza. Soudkovitý útvar 20S proteazomu se skládá ze čtyř heptamerních prstenců: dva vnější α kruhy, mezi kterými jsou umístěny dva kruhy β . α a β podjednotky jsou rozlišené na homologní α 1-7 a β 1-7 podjednotky [188].

Jako vstupní brána do dutiny proteazomu slouží α prstence. Na ně je navázána báze 19S proteazomu a spolu kontrolují vstup substrátu tak, že podjednotky α prstence vytvářejí svými N-konci uzavíratelnou bránu, kterou otvírají C-konce volných řetězců báze vycházející z ATPázových podjednotek. Hydrolýza ATP totiž způsobí konformační změny, jejichž výsledkem je otevření brány z N-konců α prstence [111, 112, 113, 114]. α prstence jsou tedy místem vstupu a výstupu substrátů, navíc jsou i místem vazby regulačních molekul.

Dutinu 20S proteazomu tvoří prstence β , které obsahují aktivní místa zajišťující ka-

talýzu. Konkrétně se jedná o podjednotky $\beta 1$, $\beta 2$ a $\beta 5$ s proteolytickou aktivitou, které obsahují na svém N-konci katalytický threoninový zbytek [115]. $\beta 1$ podjednotka vykazuje aktivitu podobnou kaspázám, $\beta 2$ štěpí peptidové vazby vycházející z argininu nebo lysinu (trypsinová aktivita) a $\beta 5$ štěpí vazbu vycházející z hydrofobních aminokyselin (aktivita chymotrypsinu) [133]. Štěpení proteinů probíhá až do vzniku oligopeptidů, které jsou již dostatečně malé, aby samovolně difundovaly ven. Oligopeptidy mohou být v buňce znovu využity nebo jsou buněčným aparátem dále rozštěpeny na jednotlivé aminokyseliny [117].

Schéma struktury proteazomu je znázorněno na Obr. 4.



Obrázek 4: Struktura proteazomu. Proteazom se skládá z katalytické části cylindrického tvaru 20S a regulačních jednotek 19S. 20S je složen ze čtyř heptamerních prstenců: ze dvou vnějších α kruhů, mezi kterými jsou umístěny dva kruhy β , které obsahují podjednotky s proteolytickou aktivitou. 19S se dále dělí na bázi a víko. Víko je složeno z devíti podjednotek: Rpn3, 5-9, 11-12 a Sem1 a dochází zde ke štěpení ubiquitinové značky. Báze nasedá na 20S proteazom a je tvořena z desíti podjednotek: Rpn1, Rpn2; ubiquitinové receptory Rpn10, Rpn13 a z Rpt kruhu šesti AAA+ ATPáz, které jsou zodpovědné za rozbalení a přesun proteinů do 20S proteazomu [188].

3.3 Další funkce UPS

Kromě klasického 20S proteazomu existují také imunoproteazomy, které se podílejí na imunitní odpovědi buněk. Jejich katalytické podjednotky jsou nahrazeny homology $\beta 1i$, $\beta 2i$ a $\beta 5i$, jejichž expresi indukuje přítomnost cytokinu $IFN\gamma$. Imunoproteazomy produkují peptidy, které jsou použity jako antigeny [118, 133].

Dalším speciálním typem je thymoproteazom, který se nachází v brzlíku a který ve své struktuře obsahuje $\beta 5$ t podjednotku. Thymoproteazom je nezbytný pro pozitivní selekci $CD8^+$ T lymfocytů [119].

UPS hraje důležitou roli v životě buňky. Nejen že reguluje množství proteinů v buňce (funkčních i nefunkčních), ale také svou katalytickou činností kontroluje aktivitu různých proteinů. Typickým příkladem je jaderný faktor kappa B (NF- κ B), jenž představuje komplex transkripčních faktorů zapojených do mnoha signálních kaskád v buňce. Běžně je v cytoplazmě přítomen v neaktivní formě, vázán na inhibitor I κ B, který brání přesunu NF- κ B z cytoplazmy do jádra. Aktivace se děje skrz fosforylaci a následné ubikvitinaci I κ B, po které je I κ B degradován. NF- κ B je tak uvolněn z inhibičního komplexu a translokuje se do jádra [120].

3.4 Inhibice proteazomu

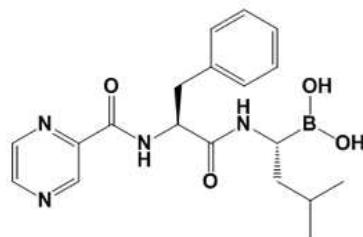
Postupem času se ukázalo, že inhibice proteazomu způsobuje apoptózu buněk mnoha rakovinných linií *in vitro*. To je poměrně překvapivé zjištění vzhledem k tomu, že UPS je odpovědný za degradaci více než 80 % všech buněčných proteinů [184, 102], mezi kterými je samozřejmě spousta regulačních elementů. Teoreticky by tedy inhibice proteazomu měla znamenat smrt pro každou buňku, vzhledem k tomu, že proteazomální inhibicí dojde k ovlivnění většiny proteinů buňky. V praxi se ale tato hypotéza nepotvrdila, a i když ještě není vše zcela objasněno, inhibitory proteazomu jsou překvapivě selektivně toxické jen pro rakovinné buňky, zatímco zdravé přežívají.

Inhibitory proteazomu se dají rozdělit do pěti hlavních skupin: peptidové aldehydy, vinylpeptidové sulfony, peptidové boráty, peptidové epoxyketony a β -laktony [116].

První schválené léčivo ze třídy inhibitorů proteazomu je bortezomib, komerčně dostupný pod názvem Velcade, který byl schválen FDA pro léčbu mnohočetného myelomu [122] a lymfomu plášťových buněk [123]. V současné době probíhají klinické testy u dalších typů krevních rakovin. Bohužel u solidních nádorů bortezomib vykazuje minimální efekt a přestože se ukázal jako účinný *in vitro*, ve druhé fázi mnoha klinických testů byl neúspěšný [124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132].

Z chemického hlediska se jedná o dipeptidyl boronát (viz Obr. 5.), látku schopnou specificky inhibovat proteázu $\beta 5$ 20S proteazomu [116]. Využívá přitom boronovou kyselinu, která vytváří komplex s hydroxylovou skupinou na N-terminálním threoninu $\beta 5$ podjednotky. Dojde tak k zablokování katalytické aktivity proteazomu, přičemž tato inhibice má na rakovinnou buňku rozmanité důsledky [133, 191]: indukce exprese NOXA proteinu [134], ovlivnění NF- κ B signální dráhy, inhibice angiogeneze [138, 139], narušení vzájemného působení rakovinných buněk s dendritickými buňkami (tato interakce podporuje růst tumoru) [140], aktivace kaspázy-8 a kaspázy-9, což vede k apoptóze [141, 142], indukce ER stresu a s tím spojený vznik reaktivních kyslíkových radikálů [143, 144] a aktivace p38 mitogen-aktivanou proteinkinázovou (MAPK) dráhu [145].

Mohutná indukce exprese proteinu NOXA [134], což je proapoptotický člen rodiny Bcl-2, způsobuje p53-zprostředkovanou apoptózu [135]. Bylo zjištěno, že bortezomibem indukovaná apoptóza v melanomových a myelomových nádorových buňkách byla spojena s indukcí apoptózy zprostředkovanou NOXA, ale vznikla nezávisle na p53. Když bylo v experimentu bráněno expresi NOXA, apoptotická odpověď byla redukována o 30 - 50 % [134]. NOXA je indukována bortezomibem v různých typech nádorových buněk s defektním p53. V genu pro NOXA se nachází vazebné místo pro c-MYC. Právě na onkogenu c-MYC je závislá bortezomibem způsobená indukce NOXA [136].



Obrázek 5: Chemická struktura bortezomibu [195]

Původně se myslelo, že nejvýznamnějším důvodem protinádorového účinku inhibitorů proteazomu je inhibice aktivity NF- κ B. NF- κ B představuje komplex transkripčních faktorů, které hrají významnou roli v imunitní odpovědi buňky, při rozvoji zánětu, v regulaci buněčného růstu a buněčné smrti, při karcinogenezi a neurodegenerativních procesech. NF κ B vyžaduje aktivní činnost proteazomu kvůli degradaci I κ B, inhibice proteazomu pak bude logicky vést k zablokování NF κ B dráhy. Nicméně překvapivě vyšlo najevo, že bortezomib v buňkách mnohočetného myelomu naopak NF κ B dráhu aktivuje. Dále byl objeven inhibitor I κ B kinázy MLN120B, který blokuje fosforylaci I κ B a tím i NF κ B aktivaci u myelomových buněk pod vlivem bortezomibu [137].

U pacientů léčených bortezomibem se ukázalo, že má řadu závažných vedlejších účinků: celková slabost, nevolnost, snížená chuť k jídlu, zažívací potíže, trombocytopenie, periferní neuropatie, horečka, zvracení, anémie, snížený tlak a srdeční potíže [146, 147]. Navíc se u poloviny pacientů vyskytuje rezistence k bortezomibu [148, 149, 150].

V protinádorové léčbě je také možno použít bortezomib v kombinované terapii, která zvyšuje citlivost nádorových buněk k chemoterapeutikům (například melphalan, doxorubicin, mitoxantron a dexamethason [151]) nebo ozařování.

Synergistický protinádorový efekt rapamycinu a bortezomibu byl demonstrován u HCC [152]. Je známo, že typickým znakem HCC je deregulace PI3K/Akt/mTOR dráhy [57]. Rapamycin, inhibitor mTOR, je užíván v léčbě mnoha pevných nádorů. Nicméně dalším účinkem rapamycinu je zvýšená fosforylace Akt, která působí příznivě pro přežívání a růst nádoru [153, 154], což je zřejmě důvod, proč inhibitory mTOR vykazují pouze mírnou protinádorovou aktivitu u onkologických pacientů. V nedávné studii se ukázalo, že bortezomib významně potlačuje rapamycinem indukovanou aktivaci Akt, což vede k inhibici proliferace a angiogeneze nádoru [152].

V současné době již existují látky, které patří do nové generace inhibitorů proteazomu. V létě 2012 byl schválen FDA carfilzomib (komerčně Kyprolis) pro léčbu mnohočetného myelomu. Je to ireverzibilní epoxyketonový inhibitor β 5 podjednotky proteazomu [155]. V klinických testech vykazoval částečnou účinnost proti myelomovým nádorům rezistentním vůči bortezomibu a dále také vykazoval nízký výskyt periferní neuropatie [156]. Dalším proteazomovým inhibitorem druhé generace je marizomib, β -laktónová sloučenina, která ireverzibilně inhibuje všechny tři katalytické podjednotky proteazomu [157] a v současné době je v klinickém testování. Protinádorová aktivita marizomibu byla v preklinických testech demonstrována v hematologických i solidních nádorech [158]. Testy již také prochází látka MLN4924, která je jako první zaměřená proti specifické E3-ligáze. Jedná se o inhibitor enzymu NAE (NEDD8-aktivující enzym), který reguluje jednu skupinu E3-ligáz [159].

Dalšími inhibitory UPS jsou látky patřící do skupiny dithiokarbamátů, které mají v

komplexu s kovy potenciál silné inhibice proteazomu. Mezi ně patří metabolit léku disulfiramu, který je jinak také známý pod jménem antabus, což je staré léčivo alkoholismu.

4 DISULFIRAM

Disulfiram, chemicky tetraethylthiuram disulfid, byl v roce 1951 schválen pro léčbu alkoholismu. Mechanismus účinku spočívá v inhibici acetaldehyddehydrogenázy, enzymu zapojeného do metabolismu ethanolu, který katalyzuje oxidaci acetaldehydu na acétát. Jestliže je acetaldehyddehydrogenáza inhibována, dojde k hromadění acetaldehydu v organismu, což se projeví bolestí hlavy, pocením a rudnutím v obličeji, což je nepříjemný stav, který pacienta nutí k abstinenci [192]. Další zvyšování hladiny acetaldehydu vede k silné nevolnosti, zvracení, křečím, srdeční arytmií až k selhání srdce [160]. Jako první si této vlastnosti disulfiramu všiml jeden lékař, pracující v podniku gumárenského průmyslu, kde dělníci, kteří byli vystaveni této látce, byli nuceni abstinence, protože po požití alkoholu trpěli silnou nevolností [161].

Počátkem 20. století byl disulfiram také používán jako pesticid díky své komplexotvorné vlastnosti s kovy. Byl totiž schopen vyvázat měď, kterou má mnoho škůdců obsaženou v hemolymfě, a tím blokovat jejich dýchací řetězec [193].

V roce 1977 byl publikován případ pacientky, která trpěla rakovinou prsu s četnými metastázemi. Kvůli alkoholismu musela přerušit léčbu a byl jí podáván po několik let pouze antabus. Během této doby došlo k vymizení nádoru a pacientka žila dál bez příznaků rakoviny, než nešťastnou náhodou zemřela [162].

Mezi metabolity disulfiramu patří dithiokarbamáty, reaktivní látky, které mají velkou schopnost tvořit komplexní sloučeniny [193]. Jsou používány také ve zdravotnictví, kde slouží jako antidota při otravě těžkými kovy, které na sebe vážou [196].

V následujících letech byla vytvořena hypotéza, která dithiokarbamátu přisuzovala imunomodulační schopnosti, které by mohly být využity v léčbě AIDS. I přes počáteční slibné výsledky disulfiram v klinických testech selhal a zjistilo se, že nemá vliv na imunitní systém pacientů s AIDS [194]. Ještě před tímto zjištěním byl ale zkoumán imunoterapeutický účinek dithiokarbamátu v kombinaci s anthracyklinovou chemoterapií na 64 pacientech trpících rakovinou prsu. Zajímavé je, že kombinovaná léčba se ukázala jako účinnější než standardní chemoterapie. Celkové přežití skupiny pacientů užívajících dithiokarbamát po šesti letech bylo 81 %, v kontrolní skupině to bylo 55 % [163].

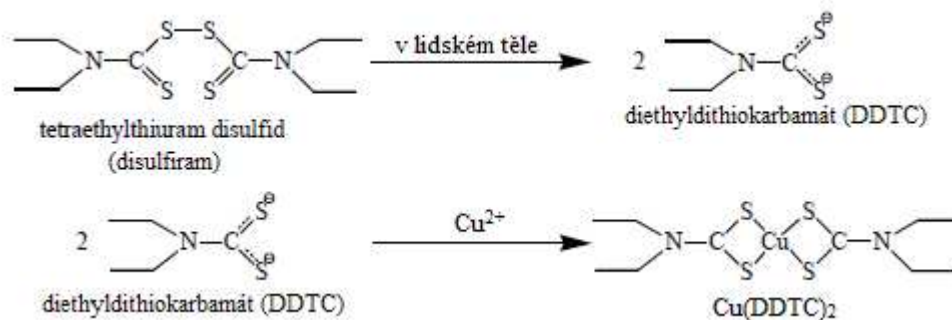
V roce 2004 byl publikován případ pacientky, která trpěla metastází melanomu v játrech. Pacientka brala denně zvláště antabus a glukonát zinečnatý. Po třech měsících metastáze vymizela a pacientka dál žila bez příznaků rakoviny [164].

V roce 2006 následoval objev disulfiramu, respektive jeho metabolitu dithiokarbamátu v komplexu s mědí jako inhibitor proteazomu. Byla navržena hypotéza, že právě tato inhibiční vlastnost je zodpovědná za protinádorovou aktivitu [165].

Nedávné klinické testy, které byly prováděny na pacientech závislých zároveň na kokainu a alkoholu, ukazují, že disulfiram dokázal efektivně snížit příjem kokainu u těchto pacientů. Zdá se, že disulfiram je schopen inhibice dopamin- β -hydroxylázy, což by mohl být mechanismus účinku v rámci léčby závislosti na kokainu [166].

4.1 Mechanismus protinádorového účinku

Disulfiram se po požití metabolizuje na diethyldithiokarbamát (DDTC), který vzniká v krevním řečišti nebo v kyselém prostředí žaludku (Obr. 6.) [167]. Samotný DDTC je reaktivní látkou, která může interagovat s dvojmocným kovem v krevní plazmě za tvorby komplexní sloučeniny. Nejeftivnějších protinádorových výsledků bylo dosaženo při použití DDTC v komplexu s mědí [168].



Obrázek 6: Chemická struktura disulfiram a schéma vzniku diethyldithiokarbamátu a komplexu Cu(DDTC)_2 [203]

Zároveň byla u směsi mědi a disulfiram prokázána schopnost inhibovat UPS [165]. Na rozdíl od bortezomibu ale disulfiram neinhubuje 20S proteazom [169]. To ukazuje, že cílem inhibice bude spíše regulační část 26S proteazomu. Tato hypotéza byla podpořena dalším experimentem, ve kterém byly testovány různé organické komplexy s mědí a u kterých byla prokázána schopnost inhibovat funkci proteazomu [170]. Dále žádný experiment neprokázal, že by za inhibicí 26S proteazomu stála samotná měď nebo zinek. Zatím se zdá nejpravděpodobnější, že cílem Cu(DDTC)_2 komplexu je regulační část proteazomu 19S, konkrétně pak byla navržena podjednotka víka Rpn11 (Poh1) [171], která ve struktuře obsahuje JAMM doménu [110]. Naznačuje to experiment s karboxypeptidázou A, která obsahuje doménu velmi podobnou JAMM a která je inhibována komplexy dvojmocných kovů [172]. Mechanismus inhibice 26S proteazomu by tedy mohl být obdobný. Další vlastností Cu(DDTC)_2 komplexu je lipofilní charakter [204], díky kterému se předpokládá schopnost komplexu procházet přes cytoplazmatickou membránu do nitra buňky, kde může působit.

Zdá se, že hlavním mechanismem protinádorového účinku disulfiram je schopnost tvořit v těle komplexní sloučeniny s kovy (nejčastěji měď nebo zinek), a tím inhibovat UPS. Mezi další účinky, které mohou vysvětlovat terapeutický efekt, patří inhibice $\text{NF}\kappa\text{B}$, útlum angiogeneze a tvorby metastáz, překonání lékové rezistence a indukce oxidačního stresu.

Mnohočetná léková rezistence je výrazná překážka v léčbě onkologických pacientů. Jde o zvýšení odolnosti rakovinných buněk vůči léčbě chemoterapeutiky, která vzniká na základě genetických změn. Zvýšená exprese P-glykoproteinů je jeden z faktorů, který je zodpovědný za tuto rezistenci [173]. P-glykoproteiny, známé také jako MDR1 (multi-drug resistance protein 1), patří do rodiny ABC transportérů, což jsou transmembránové proteiny zajišťující transport xenobiotik a některých dalších molekul z buňky do extracelulárního prostoru za spotřeby ATP. Na rozdíl od většiny ABC transportérů mohou být substráty pro P-glykoproteiny chemicky i funkčně odlišné látky. Při zvýšené expresi P-glykoproteinů tedy dochází k mohutnému vylučování léčiva ven z buňky [174]. DDTC také zasahuje P-glykoproteiny, a to tím, že zabraňuje jejich maturaci, a nedochází ke tvorbě funkčního proteinu [175]. Dále působí ve struktuře P-glykoproteinů v místě vazby ATP, kde způsobuje tvorbu disulfidické vazby, a tím jej inhibuje [176].

Disulfiram také působí proti tvorbě metastáz. V této souvislosti inhibuje enzymy MM-2 a MM-9, které patří do skupiny matrixových metaloproteináz (MM), což jsou enzymy narušující extracelulární matrix. Ty jsou nezbytné pro úspěšné uvolnění maligní buňky do krevního oběhu. Po usazení této buňky v určité tkáni dochází k proliferaci a tvorbě

metastáze. Pro nádorové buňky je typická deregulace MM enzymů [177]. Inhibice MM-2 a MM-9 disulfiramem byla prokázána na buňkách osteosarkomu, rakoviny plic a močového měchýře [178, 179].

Angiogeneze je klíčová pro růst nádoru. Disulfiram se ukázal jako antiangiogenní na buňkách rakoviny plic a močového měchýře [179]. Mezi možné mechanismy účinku patří inhibice NF κ B, který kontroluje expresi růstového faktoru VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), na kterém je závislá tvorba cév. Další zajímavou, ale neověřenou hypotézou je chelatace mědi v tumoru způsobená DDTC. Přítomnost mědi je totiž nutná pro expresi VEGF a v tumorech je její hladina zvýšená [180]. Jiným vysvětlením může být inhibice superoxiddismutázy, což je enzym působící při novotvorbě cév [181].

Disulfiram byl také prokázán jako agens způsobující oxidační stres v melanomových buňkách, což je stav, který vede buňku směrem do programované buněčné smrti [182, 183].

Všechny výše zmíněné poznatky vedly k zahájení čtyř klinických testů disulfiramu vůči nádorům. První studie klinického testu (I. fáze) se zabývá účinkem disulfiramu a glukonátu měďnatého v léčbě nádorů jater a začala v roce 2008 pod záštitou University of Utah, která také tento test sponzoruje. Záznam o testu lze najít na internetových stránkách amerického NCI (National Cancer Institute) pod identifikačním číslem NCT0074291. Zatím žádné výsledky nebyly publikovány. Další studie se zabývají protinádorovou aktivitou disulfiramu v kombinaci s oxidem arzenitým proti melanomu, dále účinek samotného disulfiramu na melanomové metastáze, na rakovinu prostaty a na rakovinu plic, kde je podáván v rámci standardní chemoterapie.

5 PRAKTICKÁ ČÁST

Praktická část této práce se zabývá stanovením cytotoxicity syntetického dithiokarbamátového komplexu s mědí na buněčné linii odvozené od karcinomu jater.

5.1 Materiál

5.1.1 Biologický materiál

V experimentu byla použita buněčná linie SK-HEP1; jedná se o buňky odvozené od adenokarcinomu jater, adherentně rostoucí, které byly odebrány 54-letému muži [211].

5.1.2 Chemikálie

Bortezomib, Millenium Pharmaceuticals

Bis-(diethyldithiokarbamát)-měďnatý komplex $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$, Mgr. Boris Cvek, PhD.

Trypanová modř, T6146-256, Sigma-Aldrich

Chlorid měďnatý dihydrát, 307483-100G, Sigma-Aldrich

Diethyldithiokarbamát sodný trihydrát, 22,868-0, Sigma-Aldrich

Triton-X 100, 37240, Serva

RPMI-1640 médium; With sodium bicarbonate, without L-glutamine, liquid, sterile-filtered, cell culture tested, R0883-6X500ML, Sigma-Aldrich

Penicillin-Streptomycin (100ml), P11-010 PAA, The Cell Culture Company

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

L-glutamin, G63921-VL, Sigma-Aldrich

MEM Non-essential Amino Acid Solution (100 \times), M7145-100ML, Sigma-Aldrich

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

Dimethylsulfoxid (DMSO), 1000 ml, Lachner

PBS pufr (Phosphate buffered saline) 1x (pH 7,4) NaCl 4g, KCl 0,1g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ 1,605g, KH_2PO_4 0,01g

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyyl tetrazolium bromid), Sigma-Aldrich, používaný roztok: 3 mg MTT/ml PBS

MTT rozpouštěcí roztok: DMSO/ 1 % NH_3

Deionizovaná voda (pomocí přístroje Aqua osmotic)

5.1.3 Přístroje

Autokláv PS20A Chirana

Box skříňový mrazící (-80) SAN Sanyo

Inkubátor Contherm

Laminární box SafeFASTTop, faster

Lednice Calex

Mikroskop T2 103411 Olympus

Spektrofotometr Tecan

Sada pipet (0,1-2,5 μl , 0,5-10 μl , 2-20 μl , 10-100 μl , 50-200 μl , 100-1000 μl) Eppendorf

Pipeta multikanálová (30-300 μM), biohit Proline plus

Přístroj na výrobu deionizované vody, Aqua osmotic

Váhy Kern ABS 80-4

pH metr PL600RK, G.O.N Electronic

Centrifuga Mini Labnet International

Třepačka reax Top Heidolf

Vodní lázeň LCB 11D Thermo-circulator, LabTech

Membránová vývěva, KNF lab

5.1.4 Materiál

Mikrozkumavky (1,5 ml, 0,5 ml a 2 ml), Tubes for you

Kutivační destičky 96-ti jamkové a 6-ti jamkové, Orange Scientific

Kultivační láhve (25 cm^2 , 75 cm^2 a 150 cm^2 s filtrem), Orange Scientific

50ml a 15ml centrifugační zkumavky, konické (Orange Scientific)

Stříkačka plastová z PP pro jednorázové použití (2 ml a 20 ml), Chirana

Špičky 50 - 1 000 μl , 0,1 - 10 μl a 2 - 200 μl , Eppendorf

Bürkerova komůrka, krycí sklíčko

Lihový kahan

5.1.5 Software

StatSoft STATISTICA v. 10

Tecan I-Control

GIMP v. 2. 8

MATLAB

LaTeX

5.2 Pracovní postupy

Práce s buněčnou kulturou byla prováděna ve sterilních podmínkách boxu s laminárním prouděním vzduchu. Taktéž použité roztoky a média byly sterilní. Kultivační médium a roztok PBS 1x byly vždy před použitím ohřáty na teplotu 37 °C.

5.2.1 Kultivace buněčné linie

Buněčná linie byla kultivována v 75cm² kultivačních lahvích při 37 °C a 5 % koncentraci CO₂. Kultivační médium bylo před prací upraveno následujícími roztoky do výsledné koncentrace 10 % FBS, 1 % L-glutamin, 1 % Penicilin/Streptomycin, 1 % esenciální aminokyseliny.

5.2.2 Výměna média a pasážování buněk

Linie byla pasážována po dosažení 80 % konfluentní vrstvy na povrchu kultivační nádoby, přičemž kontrola růstu buněk byla prováděna pomocí inverzního mikroskopu. Nejdříve bylo z kultivační láhve odsáto staré médium, následně byly buňky omyty 5-10 ml PBS 1x. Po odsátí PBS byly buňky inkubovány 2 min s 1 ml trypsinu a uvolňování buněk bylo kontrolováno mikroskopem. Trypsin byl poté zneutralizován přidáním 9 ml média a následně byly buňky ještě důkladně resuspendovány. Suspenze byla dále přenesena do 50ml zkumavky a použita pro další kultivaci nebo experimentální práci.

Pro další kultivaci byl odebrán 1 ml suspenze a přenesen do kultivační láhve s 15 ml média.

5.2.3 Počítání buněk

Pro experimentální práci bylo vždy nutno nejdříve spočítat hustotu buněk. Nejprve bylo odebráno 10 μ l buněčné suspenze, ke které bylo přidáno 90 μ l trypanové modři. Z roztoku bylo následně odebráno a přeneseno po 5 μ l do obou polí Bürkerovy komůrky. Buňky byly počítány pod mikroskopem, byl zaznamenán počet buněk z desíti čtverců ohraničených dvěma čarami, z nichž byl vypočítán průměr. Výsledek byl pak získán vynásobením tohoto průměru číslem 10⁵. Výsledné číslo udává počet buněk v 1 ml suspenze.

5.2.4 Stanovení toxicity pomocí MTT testu

Jedná se o jednoduchou metodu, založenou na redukci žlutého 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan fialové barvy. Tato

reakce je katalyzována dehydrogenázami na mitochondriální membráně živých buněk a tudíž množství vyprodukovaného fialového formazanu je přímo úměrné viabilitě buněk. Formazan je následně rozpuštěn a vyhodnocen spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm [200].

Testovanými látkami byl komplex diethyldithiokarbamátu s mědí ($\text{Cu}(\text{DDTC})_2$), bortezomib, diethyldithiokarbamát (ve formě soli diethyldithiokarbamát sodný) a chlorid měďnatý. V důsledku nestability byl v případě $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ připraven před každým experimentem čerstvý zásobní roztok. Jako rozpouštědlo byla použita deionizovaná sterilní voda mimo látek bortezomibu a $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$, které byly rozpouštěny v DMSO.

Zásobní roztok dihydrátu chloridu měďnatého ($M_r = 170,5 \text{ g/mol}$) o koncentraci 1 mol/l byl připraven rozpuštěním 340,96 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 2 ml deionizované vody. Před používáním byl přefiltrován přes sterilní membránu kvůli možné kontaminaci. Ze zásobního roztoku byly připravovány roztoky o koncentracích 250, 500, 750 a 1000 mmol/l.

Zásobní roztok trihydrátu diethyldithiokarbamátu sodného ($M_r = 225,3 \text{ g/mol}$) o koncentraci 200 mmol/l byl připraven rozpuštěním 90,12 mg DDTC ve 2 ml deionizované vody. Před používáním byl přefiltrován přes sterilní membránu kvůli možné kontaminaci. Ze zásobního roztoku byly připravovány roztoky o koncentracích 10, 50, 100 a 200 mmol/l.

Ze zásobního roztoku bortezomibu o koncentraci 3,5 mmol/l byly připravovány roztoky o koncentracích 0,01; 0,1; 1 a 2,5 mmol/l.

Zásobní roztok syntetického $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ ($M_r = 360,1 \text{ g/mol}$) o koncentraci 15 mmol/l byl připraven rozpuštěním 1,1 mg $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ v 200 μl DMSO. Ze zásobního roztoku byly připravovány roztoky o koncentracích 0,1; 1; 2,5; 5 a 10 mmol/l.

Připravené roztoky byly před aplikací na buňky ještě 1000x zředěny médiem (odebráním 1 μl z každého připraveného roztoku testované látky a následným smícháním s 999 μl média).

Na začátku experimentu byl proveden výsev buněk na 96-jamkovou destičku v počtu 20 000 buněk na jamku v objemu 200 μl . Buňky byly vysety pro každou sledovanou koncentraci v tripletu. Další den byly přidány sledované látky v médiu, po předchozím odsátí starého média, o celkovém objemu 200 μl . Jako pozitivní kontrola (maximální buněčné poškození) byl použit roztok Tritonu, který byl připraven smícháním 630 μl média s 270 μl 20 % Tritonu-X 100. V jamkách negativní kontroly byly buňky kultivované pouze v médiu a rozpouštědle, aplikovaném ve stejné koncentraci jako u vzorků. Destička s buňkami byla inkubována 24 hodin. Poté bylo médium vyklepnuto a jamky promyty 100 μl PBS 1x, které bylo následně také vyklepnuto. Poté bylo do každé jamky přidáno 100 μl média s 10x zředěným roztokem MTT (3 mg/ml). Takto ošetřená destička byla 15-20 min inkubována při 37 °C, poté opět vyklepnuta a do každé jamky bylo přidáno 100 μl 1 % roztoku NH_3 v DMSO pro rozpuštění fialových krystalků formazanu. Poté byla spektrofotometricky změřena absorbance každé jamky. Absorbance byly dále použity pro výpočet viability buněk a hodnoty IC_{50} pro jednotlivé testované látky.

Viabilita buněk byla vypočítána následně: nejprve bylo provedeno aritmetické zprůměrování hodnot absorbancí každého tripletu (jak u sledovaných látek, tak i u negativních kontrol), dále byl od tohoto průměru odečten průměr absorbancí pozitivní kontroly (kvůli odstranění pozadí) a takto upravené průměrné hodnoty absorbancí byly použity pro výpočet viability podle vzorce: $\text{viabilita} [\%] = (A_{vz}/A_{nk}) * 100$, kde A_{vz} představuje upravenou průměrnou absorbanci vzorku a A_{nk} upravenou průměrnou absorbanci negativní kontroly.

Hodnota IC_{50} představuje koncentraci látky, která způsobí odumření 50 % buněk. Stanovení IC_{50} testovaných látek bylo provedeno pomocí lineární regrese. Regresní přímkou

byla proložena závislost viability buněk na logaritmu koncentrace sledované látky a z její rovnice vypočteny hodnoty IC_{50} . Pro lepší vizualizaci jsou v použitých grafech zobrazeny hodnoty koncentrace v lineárním měřítku.

Výsledky byly pro úplnost ještě zhodnoceny pomocí Studentova T-testu a za statisticky významnou hladinu byla považována hodnota 0,05 ($p = 0,05$). Tato hladina představuje pravděpodobnost náhody 5 %.

Dále byl také zkoumán vliv testovaných látek na morfologii buněk. Při tomto experimentu byly buňky kultivovány na 6 jamkové destičce, kde bylo vyseto 120 tisíc buněk na jamku. Další den byly k buňkám přidány testované látky o koncentraci, která odpovídá jejich IC_{50} , a destička byla po následujících 24 hodin inkubována při 37 °C. Poté byly buňky propláchnuty 1x PBS a vyfoceny v mikroskopu s kamerou.

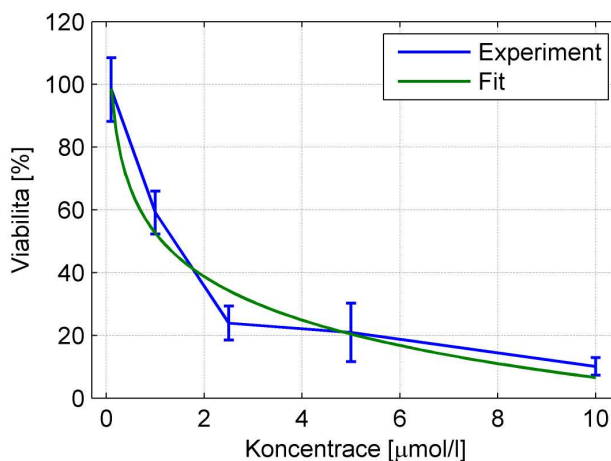
5.3 Výsledky

Výsledky byly získány ze tří nezávislých experimentů pro každou testovanou látku. Látky $CuCl_2$ a diethyldithiokarbamat byly použity jako kontrolní sloučeniny pro vyloučení možnosti, že by za protinádorový efekt byly odpovědné tyto látky samotné a ne jejich komplex.

Tabulka 2: Vliv $Cu(DDTC)_2$ na viabilitu buněk

koncentrace [$\mu\text{mol/l}$]	viabilita [%]				
	1. test	2. test	3. test	průměr	SD*
0,1	92,87	110,05	92,13	98,35	10,14
1	61,39	51,45	64,60	59,15	6,86
2,5	30,11	21,28	20,35	23,91	5,39
5	29,79	21,77	11,22	20,93	9,31
10	11,42	11,92	6,84	10,06	2,80

*směrodatná odchylka



Obrázek 7: Graf závislosti viability buněk na koncentraci $Cu(DDTC)_2$. Naměřené hodnoty jsou spojeny modrou čarou a zeleně je vyznačena křivka odlogaritmované regrese.

Vliv komplexu disulfiramu s mědí na SK-HEP1 buněčné linii byl testován syntetickým komplexem $Cu(DDTC)_2$ rozpuštěným v DMSO ve zvoleném rozsahu pěti koncentrací. Hodnoty viability jsou uvedeny v Tab. 2. a byly použity pro výpočet IC_{50} , která byla

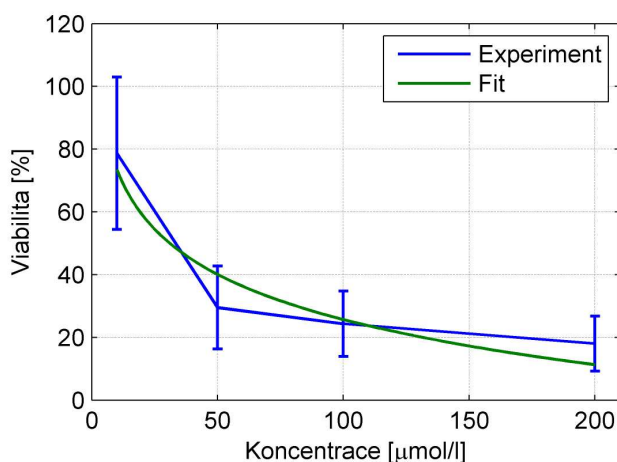
stanovena na $1,14 \mu\text{mol/l}$ (viz Tab. 6.). Z grafu na Obr. 7. je patrné, že koncentrace 2,5 až $10 \mu\text{mol/l}$ jsou výrazně toxické. Nejnižší koncentrace $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ $0,1 \mu\text{mol/l}$ neměla na viabilitu téměř žádný vliv. Statisticky významně odlišné výsledky od kontroly byly od koncentrace $1 \mu\text{mol/l}$ ($p < 0,05$; $n = 3$).

Vliv diethyldithiokarbamátu (DDTC) byl ve formě jeho sodné soli testován v rozsahu čtyř koncentrací, které jsou společně s hodnotami viability uvedeny v Tab. 3. IC_{50} byla vypočtena na $31,0 \mu\text{mol/l}$ (viz Tab. 6.). DDTC byl toxický až o několik desítek $\mu\text{mol/l}$ výš než komplex $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$. Toxicita DDTC je znázorněna na Obr. 8. Statisticky významné byly výsledky od koncentrace rovné $50 \mu\text{mol/l}$ ($p < 0,05$; $n = 3$).

Tabulka 3: Vliv DDTC na viabilitu buněk

koncentrace [$\mu\text{mol/l}$]	viabilita [%]				
	1. test	2. test	3. test	průměr	SD*
10	52,58	100,72	82,76	78,69	24,33
50	14,50	34,48	39,56	29,51	13,25
100	12,28	29,76	30,97	24,33	10,46
200	10,72	27,79	15,49	18,00	8,81

*směrodatná odchylna



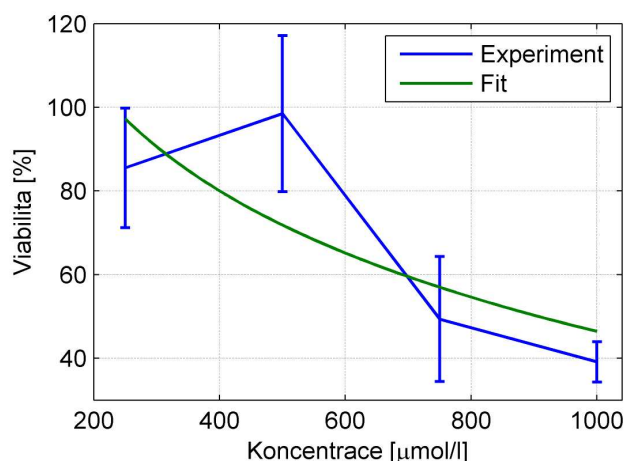
Obrázek 8: Graf závislosti viability buněk na koncentraci DDTC. Naměřené hodnoty jsou spojeny modrou čarou a zeleně je vyznačena křivka odlogaritmované regrese.

Tabulka 4: Vliv CuCl_2 na viabilitu buněk

koncentrace [$\mu\text{mol/l}$]	viabilita [%]				
	1. test	2. test	3. test	průměr	SD*
250	84,02	72,03	100,47	85,50	14,28
500	84,47	91,38	119,69	98,51	18,66
750	41,48	40,00	66,61	49,36	14,96
1000	41,40	33,60	42,41	39,13	4,82

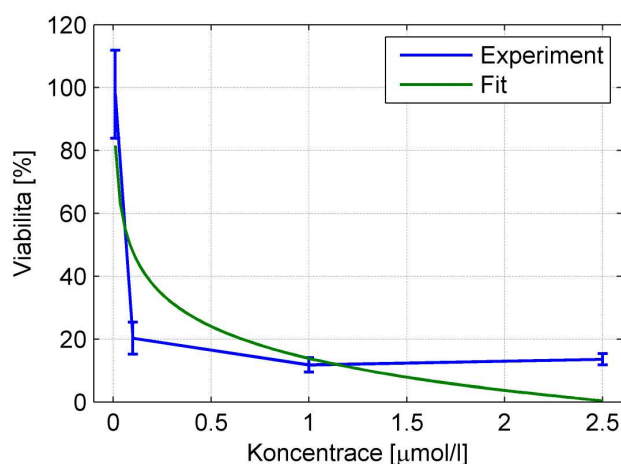
*směrodatná odchylna

Dále byla testována také toxicita samotné mědi ve formě CuCl_2 . Pokles viability byl patrný při vysokých koncentracích, viz Obr. 9. Rozsah koncentrací CuCl_2 a hodnoty viability jsou uvedeny v Tab. 4. IC_{50} byla stanovena na $907,26 \mu\text{mol/l}$ (viz Tab. 6.), což je



Obrázek 9: Graf závislosti viability buněk na koncentraci CuCl_2 . Naměřené hodnoty jsou spojeny modrou čarou a zeleně je vyznačena křivka odlogaritmované regrese.

několikanásobně vyšší číslo než u $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$. Statisticky významné byly výsledky od koncentrace rovné $750 \mu\text{mol/l}$ ($p < 0,05$; $n = 3$).



Obrázek 10: Graf závislosti viability buněk na koncentraci bortezomibu. Naměřené hodnoty jsou spojeny modrou čarou a zeleně je vyznačena křivka odlogaritmované regrese.

Pro porovnání byly buňky SK-HEP1 také vystaveny působení prvního schváleného inhibitoru proteazomu, bortezomibu, který byl výrazně toxický již při $0,1 \mu\text{mol/l}$ koncentraci, viz Obr. 10. Rozsah testovaných koncentrací bortezomibu a hodnoty viability jsou uvedeny v Tab. 5. IC_{50} byla stanovena na $0,09 \mu\text{mol/l}$ (viz Tab. 6.). Statisticky významně odlišné výsledky od kontroly byly od koncentrace $0,1 \mu\text{mol/l}$ ($p < 0,05$; $n = 3$).

Výše uvedené IC_{50} jsou shrnuty v Tab. 6., ze které je patrné, že se pro jednotlivé látky liší. Bortezomib a $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ se vyznačují nízkou IC_{50} oproti DDTC a CuCl_2 .

Dále byl zkoumán vliv testovaných látek na morfologii buněk. Při tomto experimentu byly buňky vystaveny působení testovaných látek o koncentraci rovné jejich IC_{50} a po uplynutí 24 hodin byly snímány pod mikroskopem při zvětšení 200x a 400x. Fotografická dokumentace je uvedena na Obr. 11 až 16. Na snímcích kontroly jsou buňky kultivované

Tabulka 5: Vliv bortezomibu na viabilitu buněk

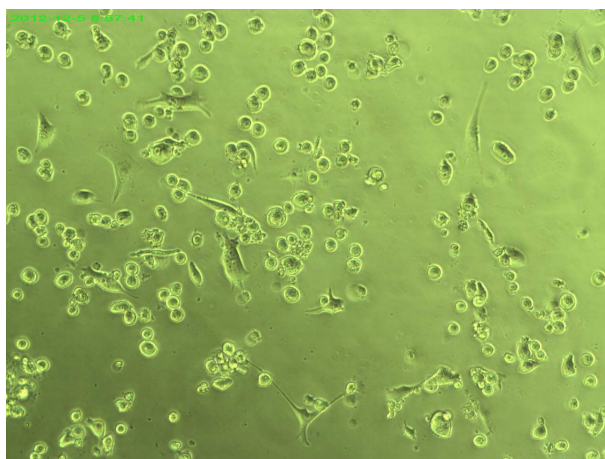
koncentrace [$\mu\text{mol/l}$]	viabilita [%]				
	1. test	2. test	3. test	průměr	SD*
0,01	81,70	106,03	105,84	97,86	13,99
0,1	14,59	21,72	24,54	20,28	5,13
1	9,15	12,81	13,40	11,78	2,30
2,5	11,79	13,50	15,37	13,55	1,79

*směrodatná odchylka

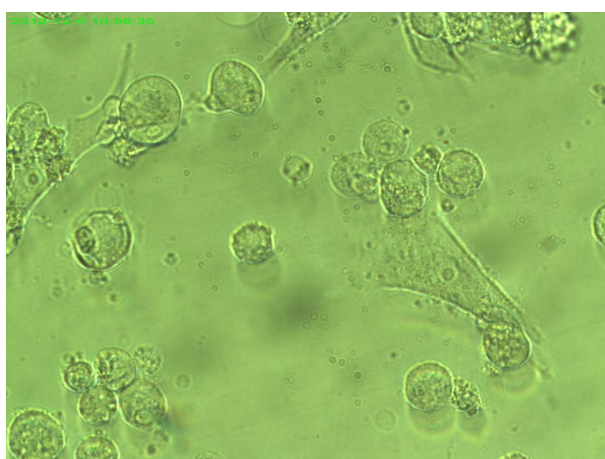
Tabulka 6: Hodnoty IC_{50} pro testované látky

látka	IC_{50} [$\mu\text{mol/l}$]
bortezomib	0,09
$\text{Cu}(\text{DDTC})_2$	1,14
DDTC	31,0
CuCl_2	907,26

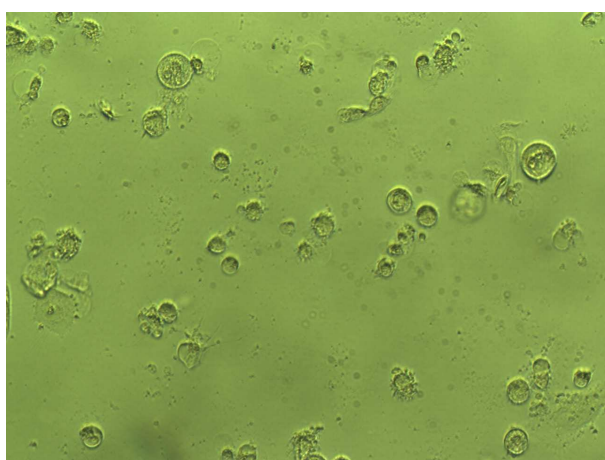
pouze v médiu, jsou živé a aktivně se dělí. Na fotografiích buněk inkubovaných s testovanými látkami lze pozorovat živé i mrtvé buňky v přibližně stejném počtu. U mrtvých buněk jsou patrné morfologické známky apoptózy: puchýřkovatění cytoplazmatické membrány, fragmentaci buněk a tvorbu apoptotických tělísek [201].



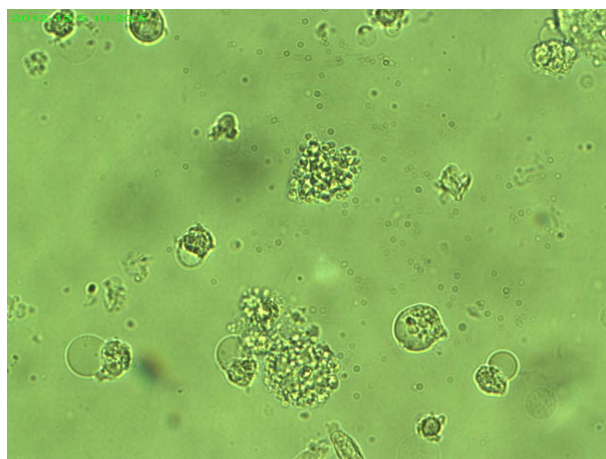
Obrázek 11: Kontrola (200x)



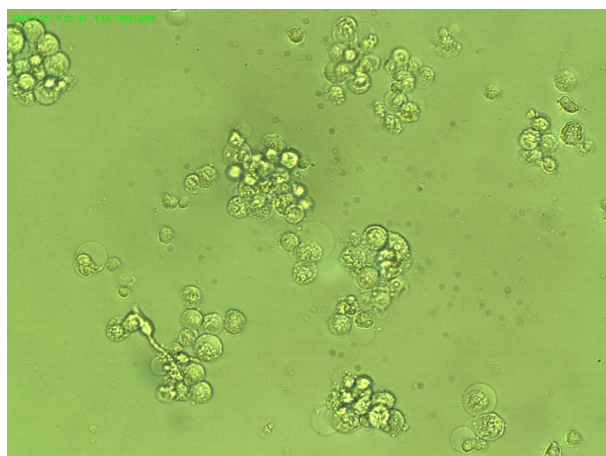
Obrázek 12: Kontrola (400x)



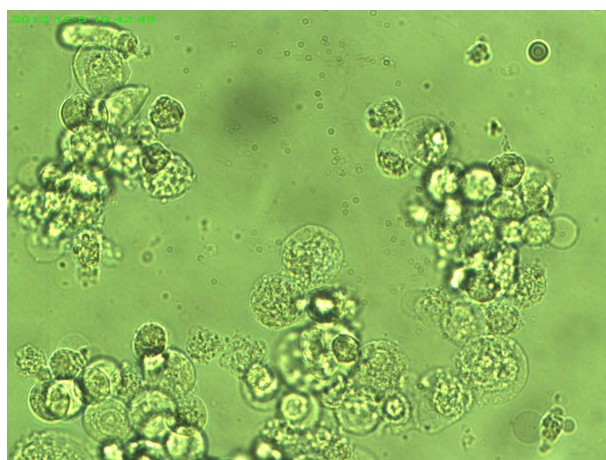
Obrázek 13: Bortezomib (200x)



Obrázek 14: Bortezomib (400x)



Obrázek 15: Cu(DDTC)_2 (200x)



Obrázek 16: Cu(DDTC)_2 (400x)

6 DISKUZE

V experimentální části této práce byl zjišťován účinek syntetického $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ na buněčné linii SK-HEP1 odvozené od rakoviny jater pomocí MTT testu. Získaná IC_{50} pro $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ byla $1,14 \mu\text{mol/l}$, což je hodnota výrazně nižší než u jednotlivých komponent tohoto komplexu. V případě CuCl_2 byla hodnota IC_{50} $907,26 \mu\text{mol/l}$ a v případě DDTC $31,0 \mu\text{mol/l}$. Toxické koncentrace samotné mědi byly tak vysoké, že je z důvodu osmotické toxicity nelze v klinické terapii využít. V případě DDTC byla toxicita opět nižší než u komplexu $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ a těžko říci, co v tomto případě vedlo ke snížení viability buněk vzhledem k velké reaktivitě DDTC. Z uvedeného vyplývá, že samotná měď ani DDTC nejsou odpovědné za výrazný toxický efekt komplexu $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$, který byl pozorován právě již při nízkých koncentracích. Snížení viability proběhlo pravděpodobně cestou apoptózy, což podporuje pozorování útvarů v buňkách, které vypadají jako apoptotická tělíška (viz Obr. 5). Z testovaných látek byl nejvíce toxický bortezomib (IC_{50} $0,09 \mu\text{mol/l}$) a v porovnání s $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ byl přibližně desetkrát účinnější.

Také v jiných experimentech vykazuje syntetický $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ protinádorovou aktivitu. Výsledky MTT testů ukazují, že na dalších pevných nádorech je *in vitro* výrazně toxický již při nízkých koncentracích. V případě osteosarkomu byla IC_{50} $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ stanovena na $1,3 \mu\text{mol/l}$ (u bortezomibu $0,4 \mu\text{mol/l}$) [207], v případě melanomu byla IC_{50} $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ $4,04 \mu\text{mol/l}$ (bortezomib $0,45 \mu\text{mol/l}$) [208]. U buněk odvozených od rakoviny žaludku byla hodnota IC_{50} u $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ $0,55 \mu\text{mol/l}$ (bortezomib $0,78 \mu\text{mol/l}$) [209] a dále například u buněk nemalobuněčného karcinomu plic byla IC_{50} u $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ $10,87 \mu\text{mol/l}$ (bortezomib $1,07 \mu\text{mol/l}$) [210].

Syntetický komplex $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ se v experimentu ukázal jako efektivní protinádorové agens vůči buňkám SK-HEP1. Je ale třeba mít na paměti, že MTT test poskytuje výsledky pouze orientační [200] a k odhalení zatím slibného terapeutického potenciálu $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ je nutno provést další testování.

7 ZÁVĚR

Rakovina jater představuje třetí nejčastější příčinu úmrtí na rakovinu ve světě [18]. Její kurativní léčba se opírá pouze o chirurgické zákroky. I když bylo a v současnosti je testováno velké množství chemoterapeutik, zatím žádnou takovou látkou ani jejich kombinací nedošlo k výraznému zlepšení stavu pacientů nebo alespoň k výraznému prodloužení doby přežití [197]. Další možností je biologická léčba, která se opírá o poznatky molekulární biologie nádoru. Nejvýznamnějším zástupcem biologické léčby pokročilého hepatocelulárního karcinomu je sorafenib. Jedná se o multikinázový inhibitor s antiproliferačními a antiangiogenními účinky [79].

Další přístup, který vykazuje slibný protinádorový potenciál a je rozebrán v teoretické části této práce, je založen na proteazomální inhibici. Proteazom je multiproteinový komplex eukaryotických buněk, který je zodpovědný za degradaci až 80 % buněčných proteinů [184, 102]. Může se jednat například o nefunkční, nadbytečné nebo různé regulační proteiny. Proteazom je tak zapojen do spousty buněčných procesů, ať už se jedná o aktivaci signálních drah, regulaci buněčného cyklu nebo třeba roli při tvorbě antigenů [205]. Jeho inhibice překvapivě vede k odumření rakovinných buněk, zatímco zdravé přežívají [206]. Bortezomib je prvním schváleným inhibitorem proteazomu a je určený pro léčbu mnohočetného myelomu [122] a lymfomu plášťových buněk [123]. Bohužel u solidních nádorů vykazuje minimální efekt a přestože se ukázal jako účinný *in vitro*, ve druhé fázi mnoha klinických testů byl neúspěšný [124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132]. Potenciál silné inhibice proteazomu je předpokládán také u disulfiram, respektive jeho metabolitu dithiokarbamátu v komplexu s mědí [165].

Praktická část této práce se zabývá stanovením cytotoxicity syntetického dithiokarbamátového komplexu s mědí na buněčné linii odvozené od karcinomu jater. Z výsledků vyplývá, že tento komplex byl *in vitro* vysoce účinný s hodnotou IC_{50} $1,14 \mu\text{mol/l}$. Hodnocení toxicity bylo provedeno pomocí metody MTT testu. Přesný mechanismus působení komplexu $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ však ještě není zcela odhalen a je potřeba dalších studií v této oblasti. Výhodou terapie disulfirame jsou mírné vedlejší účinky (oproti klasické chemoterapii) a také snadná dostupnost, protože se jedná o levný starý lék. Jeho používání by nezatěžovalo zdravotnický systém a byl by dostupný i v chudých zemích.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- AIDS** syndrom získaného selhání imunity
- ATP** adenosintrifosfát
- CCA** cholangiokarcinom
- CDK** cyklin dependentní kinázy
- Cu(DDTC)₂** bis-(diethyldithiokarbamát) měďnatý komplex
- DDTC** diethyldithiokarbamát
- DMSO** dimethylsulfoxid
- DNA** deoxyribonukleová kyselina
- EGF** epidermal growth factor
- EGFR** epidermal growth factor receptor
- ERAD** proteinová degradace asociovaná s endoplasmatickým retikulem
- FDA** Food and Drug Administration
- FGF** fibroblastový růstový faktor
- HECT** homologous to E6-associated protein C-terminus
- HGF** hepatocyte growth factor
- HGFR** hepatocyte growth factor receptor
- HBV** virus hepatitidy B
- HCC** hepatocelulární karcinom
- HCV** virus hepatitidy C
- IC₅₀** maximální poloviční inhibiční koncentrace
- IGF** insulinu podobný růstový faktor
- IFN γ** interferon gamma
- I κ B** inhibitor κ B
- JAMM** Jab1/MPN/Mov34 metaloenzym doména
- MAPK** mitogen aktivované proteinkinázy
- MDM2** mouse double minute 2
- MDR1** multidrug resistance protein 1
- MM** matrixové metaloproteinázy

mTOR mammalian target of rapamycin
MTT 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyyl tetrazolium bromid
NCI National Cancer Institute
NEDD8 neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 8
NF- κ B jaderný faktor κ B
PBS fosfátový pufr
PDGFR platelet-derived growth factor receptor
PI3K fosfatidylinositol-3 kináza
PTEN phosphatase and tensin homolog
RING really interesting new gene
UIM ubikvitin-interagující motiv
UPS ubikvitin-proteazomový systém
VEGF vascular endothelial growth factor
WHO Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

9 LITERATURA

- [1] W. A. Schulz. 2005. *Molecular biology of human cancers*. Dodrecht: Springer.
- [2] World Health Organization. 2008. The global burden of disease: 2004 update. Dostupné z: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf.
- [3] J. A. DiMasi, R. W. Hansen, H. G. Grabowski. 2003. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *Journal of Health Economics* 22: 151-185.
- [4] S. M. Paul et al. 2010. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature Review Drug Discovery* 9: 203-214.
- [5] F. J. Cohen. 2005. Macro trends in pharmaceutical innovation. *Nature Reviews Drug Discovery* 4: 78-84.
- [6] M. S. Boguski, K. D. Mandl, V. P. Sukhatme. 2009. Repurposing with a difference. *Science* 324: 1394-1395.
- [7] J. Ferlay et al. 2010. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Dostupné z: <http://globocan.iarc.fr>.
- [8] U. Verma et al. 2005. New uses for old drugs: novel therapeutic options. *Indian Journal of Pharmacology* 5: 279-287.
- [9] A. T. Chan, S. Ogino, C. S. Fuchs. 2007. Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of COX-2. *New England Journal of Medicine* 356: 2131-2142.
- [10] J. J. Suh et al. 2006. The status of disulfiram: a half of a century later. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 26: 290-302.
- [11] B. Cvek, Z. Dvořák. 2008. The value of proteasome inhibition in cancer. *Drug Discovery Today* 13: 716-722.
- [12] J. T. Dudley et al. 2010. Drug discovery in a multidimensional world: systems, patterns, and networks. *Journal of Cardiovascular Translational Research* 3: 438-447.
- [13] R. K. Singh et al. 2006. Visceral leishmaniasis (kala-azar): challenges ahead. *Indian Journal of Medical Research* 123: 331-344.
- [14] S. Sundar et al. 2007. Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. *The New England Journal of Medicine* 356: 2571-2581.
- [15] R. N. Davidson et al. 2009. Paromomycin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 103: 653-660.

- [16] J. F. Perz et al. 2006. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *Journal of Hepatology* 45: 529-538.
- [17] A. Jemal et al. 2011. Global Cancer Statistics. *Cancer Journal for Clinicians* 61: 69-90.
- [18] D. M. Parkin et al. 2001. Estimating the world cancer burden: GLOBOCAN 2000. *International Journal of Cancer* 94: 153-156.
- [19] S. Kummar, N. Q. Shafi. 2003. Metastatic Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Oncology* 15: 288-294.
- [20] H. B. El-Serag et al. 2003. The continuing increase in the incidence of hepatocellular carcinoma in the United States: an update. *Annals of Internal Medicine* 139: 817-823.
- [21] Y. Ustundag, Y. Bayraktar. 2008. Cholangiocarcinoma: A compact review of the literature. *World Journal of Gastroenterology* 14: 6458-6466.
- [22] H. R. Shin et al. 2010. Epidemiology of cholangiocarcinoma: an update focusing on risk factors. *Cancer Science* 101: 579-585.
- [23] Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. 2008. Novotvary 2008 ČR. Dostupné z: www.uzis.cz.
- [24] H. B. El-Serag, K. L. Rudolph. 2007. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology* 132: 2557-2576.
- [25] H. B. El-Serag. 2007. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in USA. *Hepatology Research* 37: 88-94.
- [26] J. Ferlay et al. 2004. Globocan 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC CancerBase No. 5. Version 2.0. Lyon: IARC Press.
- [27] D. M. Parkin et al. 2002. Cancer incidence in five continents. Vol. VIII. IARC Scientific Publications No. 155. Lyon: IARC Press.
- [28] M. H. Chang et al. 2009. Decreased incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B vaccinees: a 20-year follow-up study. *Journal of the National Cancer Institute* 101: 1348-1355.
- [29] G. Orsatti et al. 1993. DNA image cytometric analysis of macroregenerative nodules (adenomatous hyperplasia) of the liver: evidence support of their preneoplastic nature. *Hepatology* 17: 621-627.
- [30] T. Takayma et al. 1990. Malignant transformation of adenomatous hyperplasia to hepatocellular carcinoma. *Lancet* 336: 1150-1153.
- [31] R. B. Guerrero, L. R. Roberts. 2005. The role of hepatitis B virus integrations in the pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* 42: 760-777.

- [32] M. A. Feitelson, J. Lee. 2007. Hepatitis B virus integration, fragile sites, and hepatocarcinogenesis. *Cancer Letters* 252: 157-170.
- [33] Y. Murakami et al. 2005. Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas. *Gut* 54: 1162-1168.
- [34] J. C. Oh et al. 2003. Activation of calcium signaling by hepatitis B virus-X protein in liver cells. *Experimental & Molecular Medicine* 35: 301-309.
- [35] J. Benn, R. J. Schneider. 1994. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 10350-10354.
- [36] F. Su, R. J. Schneider. 1996. HBx protein activates transcription factor NF-kappaB by acting on multiple cytoplasmic inhibitors of rel-related proteins. *Journal of Virology* 70: 4558-4566.
- [37] D. Kremsdorf et al. 2006. Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: paradigms for viral-related human carcinogenesis. *Oncogene* 25: 3823-3833.
- [38] R. B. Ray et al. 1997. Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 10983-10986.
- [39] J. Cho et al. 2001. HCV core protein modulates Rb pathway through pRb down-regulation and E2F-1 up-regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1538: 59-66.
- [40] A. Alisi et al. 2003. Physical and functional interaction between HCV core protein and the different p73 isoforms. *Oncogene* 22: 2573-2580.
- [41] T. Yamanaka, T. Kodama, T. Doi. 2002. Subcellular localization of HCV core protein regulates its ability for p53 activation and p21 suppression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 294: 528-534.
- [42] M. Majumder et al. 2001. Hepatitis C virus NS5A physically associates with p53 and regulates p21/waf1 gene expression in a p53-dependent manner. *Journal of Virology* 75: 1401-1407.
- [43] Y. L. Chung, M. L. Sheu, S. H. Yen. 2003. Hepatitis C virus NS5A as a potential viral Bcl-2 homologue interacts with Bax and inhibits apoptosis in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer* 107: 65-73.
- [44] M. Omata, H. Yoshida, Y. Shiratori. 2005. Prevention of hepatocellular carcinoma and its recurrence in chronic hepatitis C patients by interferon therapy. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 3: 141-143.
- [45] B. Bressac et al. 1991. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 350: 429-431.
- [46] P. Moizadeh et al. 2005. Chromosome alterations in human hepatocellular carcinomas correlate with aetiology and histological grade - results of an explorative CGH meta-analysis. *British Journal of Cancer* 92: 935-941.

- [47] S. S. Thorgeirsson, J. W. Grisham. 2002. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nature Genetics* 31: 339-346.
- [48] P. A. Jones, S. B. Baylin. 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews Genetics* 3: 415-428.
- [49] Y. Kondo et al. 2000. Genetic instability and aberrant DNA methylation in chronic hepatitis and cirrhosis - A comprehensive study of loss of heterozygosity and microsatellite instability at 39 loci and DNA hypermethylation on 8 CpG islands in microdissected specimens from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 32: 970-979.
- [50] Y. Matsuda et al. 1999. p16(INK4) is inactivated by extensive CpG methylation in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 116: 394-400.
- [51] U. Schagdarsurengin et al. 2003. Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A gene in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 22: 1866-1871.
- [52] Y. Kanai et al. 1997. The E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human hepatocellular carcinomas. *International Journal of Cancer* 71: 355-359.
- [53] H. Yoshikawa et al. 2001. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nature Genetics* 28: 29-35.
- [54] M. Esteller et al. 2001. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Research* 61: 3225-3229.
- [55] P. A. Farazi et al. 2003. Differential impact of telomere dysfunction on initiation and progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Research* 63: 5021-5027.
- [56] B. K. Oh et al. 2003. Telomere shortening and telomerase reactivation in dysplastic nodules of human hepatocarcinogenesis. *Journal of Hepatology* 39: 786-792.
- [57] J. M. Llovet, J. Bruix. 2008. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 48: 1312-1327.
- [58] S. Whittaker, R. Marais, A. X. Zhu. 2010. The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 36: 4989-5005.
- [59] T. C. He et al. 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281: 1509-1512.
- [60] M. Shtutman et al. 1999. The cyclin D1 gene is a target of the β -catenin/LEF-1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 5522-5527.
- [61] C. M. Wong, S. T. Fan, I. O. Ng. 2001. Beta-Catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma: clinicopathologic and prognostic significance. *Cancer* 92: 136-145.
- [62] N. Nishida et al. 2007. Extensive methylation is associated with beta-catenin mutations in hepatocellular carcinoma: evidence for two distinct pathways of human hepatocarcinogenesis. *Cancer Research* 67: 4586-4594.

- [63] D. R. Robinson, Y. M. Wu, S. F. Lin. 2000. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 19: 5548-5557.
- [64] D. F. Calvisi et al. 2006. Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology* 130: 1117-1128.
- [65] Lachenmayer et al. 2010. Molecular approaches to treatment of hepatocellular carcinoma. *Digestive and Liver Disease* 42: 264-272.
- [66] D. M. Sabatini. 2006. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nature Reviews Cancer* 6: 729-734.
- [67] N. Fausto, J. S. Campbell, K. J. Riehle. 2006. Liver regeneration. *Hepatology* 43: 45-53.
- [68] A. Villanueva et al. 2007. Genes and signaling pathways involved in the pathogenesis of HCC. *Seminars in Liver Disease* 27: 55-76.
- [69] D. L. Burkhardt, J. Sage. 2008. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature Reviews Cancer* 8: 671-682.
- [70] C. J. Sherr, F. McCormick. 2002. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2: 103-112.
- [71] S. I. Suh et al. 2000. 5-Aza-2'-deoxycytidine leads to down-regulation of aberrant p16INK4A RNA transcripts and restores the functional retinoblastoma protein pathway in hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Letters* 160: 81-88.
- [72] H. Azechi et al. 2001. Disruption of the p16/cyclin D1/retinoblastoma protein pathway in the majority of human hepatocellular carcinomas. *Oncology* 60: 346-354.
- [73] M. Joo et al. 2001. Cyclin D1 overexpression in hepatocellular carcinoma. *Liver* 21: 89-95.
- [74] A. M. Hui et al. 1996. Inactivation of p16INK4 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 24: 575-579.
- [75] D. K. Dhar et al. 2002. Requisite role of VEGF receptors in angiogenesis of hepatocellular carcinoma: a comparison with angiopoietin/Tie pathway. *Anticancer Research* 22: 379-386.
- [76] S. Tanaka et al. 1999. Biologic significance of angiopoietin-2 expression in human hepatocellular carcinoma. *The Journal of Clinical Investigation* 103: 341-345.
- [77] O. N. El-Assal et al. 2001. The clinicopathological significance of heparanase and basic fibroblast growth factor expressions in hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research* 7: 1299-1305.
- [78] J. M. Llovet, M. Schwartz, V. Mazzaferro. 2005. Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Seminars in Liver Disease* 25: 181-200.
- [79] M. Kudo. 2012. Signaling pathway/molecular targets and new targeted agents under development in hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology* 18: 6005-6017.

- [80] R. S. Finn et al. 2012. Phase II, Open-Label Study of Brivanib as Second-Line Therapy in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Cancer Research* 18: 1-9.
- [81] J. Park et al. 2011. Phase II, Open-Label Study of Brivanib as First-Line Therapy in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Cancer Research* 17: 1973-1983.
- [82] A. Forner, J. M. Llovet, J. Bruix. 2012. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 379: 1245-1255.
- [83] M. Cervello et al. 2012. Targeted therapy for hepatocellular carcinoma: novel agents on the horizon. *Oncotarget* 3: 236-260.
- [84] C. M. Pickart. 2004. Back to the future with ubiquitin. *Cell* 116: 181-90.
- [85] A. M. Weissman. 2001. Themes and variations on ubiquitylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2: 169-178.
- [86] A. Adhikari, Z. J. Chen. 2009. Diversity of Polyubiquitin Chains. *Developmental Cell* 16: 485-486.
- [87] P. Xu et al. 2009. Quantitative Proteomics Reveals the Function of Unconventional Ubiquitin Chains in Proteasomal Degradation. *Cell* 137: 133-145.
- [88] A. L. Schwartz, A. Ciechanover. 1999. The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. *Annual Review of Medicine* 50: 57-74.
- [89] C. A. Semple et al. 2003. The comparative proteomics of ubiquitination in mouse. *Genome Research* 13: 1389-1394.
- [90] D. Rotin, S. Kumar. 2009. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10: 398-409.
- [91] R. J. Deshaies, C. A. Joazeiro. 2009. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annual Review of Biochemistry* 78: 399-434.
- [92] T. Hoppe. 2005. Multiubiquitylation by E4 enzymes: "one size" doesn't fit all. *Trends in Biochemical Sciences* 30: 183-187.
- [93] M. Koegl et al. 1999. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96: 635-644.
- [94] C. L. Brooks, W. Gu. 2003. Ubiquitination, phosphorylation, and acetylation: The molecular basis for p53 regulation. *Current Opinion in Cell Biology* 15: 164-171.
- [95] C. L. Brooks, M. Li, W. Gu. 2004. Monoubiquitination: The signal for p53 nuclear export?. *Cell Cycle* 3: 436-438.
- [96] M. Li et al. 2003. Mono- versus polyubiquitination: Differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* 302: 1972-1975.
- [97] E. Tarcsa et al. 2000. Ca²⁺-free calmodulin and calmodulin damaged by aging are selectively degraded by 26 S proteasomes without ubiquitination. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 20295-20301.

- [98] I. Jariel-Encontre, G. Bossis, M. Piechaczyk. 2008. Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. *Biochimica et Biophysica Acta* 2: 153-177.
- [99] M. J. Pearce et al. 2008. Ubiquitin-like protein involved in the proteasome pathway of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 322: 1104-1107.
- [100] R. J. Tomko et al. 2010. Heterohexameric ring arrangement of the eukaryotic proteasomal ATPases: implications for proteasome structure and assembly. *Molecular Cell* 38: 393-403.
- [101] G. C. Lander et al. 2012. Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature* 482: 186-191.
- [102] D. Finley. 2009. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annual Review of Biochemistry* 78: 477-513.
- [103] S. Elsasser et al. 2002. Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nature Cell Biology* 4: 725-730.
- [104] T. A. Gomez et al. 2011. Identification of a functional docking site in the Rpn1 LRR domain for the UBA-UBL domain protein Ddi1. *BMC Biology* 9: 33.
- [105] M. Sharon et al. 2006. Structural organization of the 19S proteasome lid: insights from MS of intact complexes. *PLOS Biology* 4: 1314-1323.
- [106] Q. Deveraux et al. 1994. A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 7059-7061.
- [107] S. Elsasser et al. 2004. Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 26817-26822.
- [108] Y. A. Lam et al. 2002. A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* 416: 763-767.
- [109] H. Fu et al. 1998. Multiubiquitin chain binding and protein degradation are mediated by distinct domains within the 26 S proteasome subunit Mcb1. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 1970-1981.
- [110] R. Verma et al. 2002. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 298: 611-615.
- [111] J. Rabl et al. 2008. Mechanism of gate opening in the 20S proteasome by the proteasomal ATPases. *Molecular Cell* 3: 360-368.
- [112] D. M. Smith et al. 2007. Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. *Molecular Cell* 27: 731-744.
- [113] T. G. Gillette et al. 2008. Differential roles of the COOH termini of AAA subunits of PA700 (19 S regulator) in asymmetric assembly and activation of the 26 S proteasome. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 31813-31822.

- [114] P. C. da Fonseca, E. P. Morris. 2008. Structure of the human 26S proteasome: subunit radial displacements open the gate into the proteolytic core. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 23305-23314.
- [115] H. M. Kim, Y. Yu, Y. Cheng. 2011. Structure characterization of the 26S proteasome. *Biochimica et Biophysica Acta* 1809: 67-79.
- [116] J. Adams. 2004. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell* 5: 417-421.
- [117] A. Kohler et al. 2001. The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Molecular Cell* 7: 1143-1152.
- [118] A. L. Goldberg et al. 2002. The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Molecular Immunology* 39: 147-164.
- [119] S. Murata et al. 2008. Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides. *Current Opinion in Immunology* 20: 192-196.
- [120] M. Rape, S. Jentsch. 2004. Productive RUpture: activation of transcription factors by proteasomal processing. *Biochimica et Biophysica Acta* 1695: 209-213.
- [121] J. H. A. Vissers et al. 2008. The many faces of ubiquitinated histone H2A: insights from the DUBs. *Cell Division* 3: 8.
- [122] A. Chari, A. Mazumder, S. Jagannath. 2010. Proteasome inhibition and its therapeutic potential in multiple myeloma. *Biologics: Targets & Therapy* 4: 273-287.
- [123] R. C. Kane et al. 2007. Bortezomib for the treatment of mantle cell lymphoma. *Clinical Cancer Research* 13: 5291-5294.
- [124] H. Mackay et al. 2005. A phase II trial with pharmacodynamic endpoints of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with metastatic colorectal cancer. *Clinical Cancer Research* 11: 5526-5533.
- [125] R. G. Maki et al. 2005. A multicenter Phase II study of bortezomib in recurrent or metastatic sarcomas. *Cancer* 103: 1431-1438.
- [126] S. N. Markovic et al. 2005. A phase II study of bortezomib in the treatment of metastatic malignant melanoma. *Cancer* 103: 2584-2589.
- [127] C. H. Yang et al. 2006. Bortezomib (VELCADE) in metastatic breast cancer: pharmacodynamics, biological effects, and prediction of clinical benefits. *Annals of Oncology* 17: 813-817.
- [128] R. H. Engel et al. 2007. A phase II study of single agent bortezomib in patients with metastatic breast cancer: a single institution experience. *Cancer Investigation* 25: 733-737.
- [129] P. S. Kozuch et al. 2008. Bortezomib with or without irinotecan in relapsed or refractory colorectal cancer: results from a randomized phase II study. *Journal of Clinical Oncology* 26: 2320-2326.

- [130] C. Aghajanian et al. 2009. A phase II evaluation of bortezomib in the treatment of recurrent platinum-sensitive ovarian or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic Oncology* 115: 215-220.
- [131] M. A. Shah et al. 2011. A multicenter, phase II study of Bortezomib (PS-341) in patients with unresectable or metastatic gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma. *Investigational New Drugs* 29: 1475-1481.
- [132] T. Li et al. 2010. Phase II study of the proteasome inhibitor bortezomib (PS-341, Velcade) in chemotherapy-naive patients with advanced stage non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* 68: 89-93.
- [133] L. Borissenko, M. Groll. 2007. 20S proteasome and its inhibitors: crystallographic knowledge for drug development. *Chemical Reviews* 107: 687-717.
- [134] J. Z. Qin et al. 2005. Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer Research* 65: 6282-6293.
- [135] E. Oda et al. 2000. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288: 1053-1058.
- [136] M. A. Nikiforov et al. 2007. Tumor cell-selective regulation of NOXA by c-MYC in response to proteasome inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 19488-19493.
- [137] T. Hideshima et al. 2009. Bortezomib induces canonical nuclear factor- κ B activation in multiple myeloma cells. *Blood* 114: 1046-1052.
- [138] J. B. Sunwoo et al. 2001. Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kappa B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research* 7: 1419-1428.
- [139] S. T. Nawrocki et al. 2002. Effects of the proteasome inhibitor PS-341 on apoptosis and angiogenesis in orthotopic human pancreatic tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics* 1: 1243-1253.
- [140] A. Kukreja et al. 2007. Bortezomib disrupts tumour-dendritic cell interactions in myeloma and lymphoma: therapeutic implications. *British Journal Haematology* 136: 106-110.
- [141] N. Mitsiades et al. 2002. Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 14374-14379.
- [142] S. J. Strauss et al. 2007. The proteasome inhibitor bortezomib acts independently of p53 and induces cell death via apoptosis and mitotic catastrophe in B-cell lymphoma cell lines. *Cancer Research* 67: 2783-2790.
- [143] A. Fribley, C. Y. Wang. 2006. Proteasome inhibitor induces apoptosis through induction of endoplasmic reticulum stress. *Cancer Biology and Therapy* 5: 745-748.

- [144] A. Fribley, Q. Zeng, C. Y. Wang. 2004. Proteasome inhibitor PS-341 induces apoptosis through induction of endoplasmic reticulum stress-reactive oxygen species in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Molecular and Cellular Biology* 24: 9695-9704.
- [145] M. Lioni et al. 2008. Bortezomib induces apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells through activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Molecular Cancer Therapeutics* 7: 2866-2875.
- [146] A. A. Argyriou, G. Iconomou, H. P. Kalofonos. 2008. Bortezomib-induced peripheral neuropathy in multiple myeloma: a comprehensive review of the literature. *Blood* 112: 1593-1599.
- [147] A. Gupta, A. Pandey, S. Sethi. 2011. Bortezomib-induced congestive cardiac failure in a patient with multiple myeloma. *Cardiovascular Toxicology* 12: 184-187.
- [148] R. I. Fisher et al. 2006. Multicenter phase II study of bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 24: 4867-4874.
- [149] P. G. Richardson et al. 2003. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *The New England Journal of Medicine* 8: 2609-2617.
- [150] O. A. O'Connor et al. 2005. Phase II clinical experience with the novel proteasome inhibitor bortezomib in patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma and mantle cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 23: 676-684.
- [151] N. Mitsiades et al. 2003. The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. *Blood* 101: 2377-2380.
- [152] C. Wang et al. 2012. Novel synergistic antitumor effects of rapamycin with bortezomib on hepatocellular carcinoma cells and orthotopic tumor model. *BMC Cancer*. 12: 166.
- [153] S. Y. Sun et al. 2005. Activation of Akt and eIF4E survival pathways by rapamycin-mediated mammalian target of rapamycin inhibition. *Cancer Research* 65: 7052-7058.
- [154] K. E. O'Reilly et al. 2006. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Research* 66: 1500-1508.
- [155] S. D. Demo et al. 2007. Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome. *Cancer Research* 67: 6383-6391.
- [156] K. Fostier, A. De Becker, R. Schots. 2012. Carfilzomib: a novel treatment in relapsed and refractory multiple myeloma. *OncoTargets and Therapy* 5: 237-244.
- [157] D. Chauhan et al. 2005. A novel orally active proteasome inhibitor induces apoptosis in multiple myeloma cells with mechanisms distinct from Bortezomib. *Cancer Cell* 8: 407-409.

- [158] B. C. Potts et al. 2011. Marizomib, a proteasome inhibitor for all seasons: preclinical profile and a framework for clinical trials. *Current Cancer Drug Targets* 11: 254-284.
- [159] T. A. Soucy et al. 2009. An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature* 458: 732-736.
- [160] B. Johansson. 1992. A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of disulfiram and its metabolites. *Acta Acta psychiatrica Scandinavica. Supplementum* 369: 15-26.
- [161] E. E. Williams. 1937. Effects of alcohol on workers with carbon disulfide. *The Journal of the American Medical Association* 109: 1472-1473.
- [162] E. F. Lewison. 1977. Spontaneous regression of breast cancer. *Progress in Clinical and Biological Research* 12: 47-53.
- [163] P. Dufour et al. 1993. Sodium dithiocarbamate as adjuvant immunotherapy for high risk breast cancer: a randomized study. *Biotherapy* 6: 9-12.
- [164] S. S. Brar et al. 2004. Disulfiram inhibits activating transcription factor/cyclic AMP-responsive element binding protein and human melanoma growth in a metal-dependent manner in vitro, in mice and in a patient with metastatic disease. *Molecular Cancer Therapeutics* 3: 1049-1060.
- [165] D. Chen et al. 2006. 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 Research* 66: 10425-10433.
- [166] M. Gaval-Cruz, D. Weinshenker. 2009. Mechanisms of disulfiram-induced cocaine abstinence: antabuse and cocaine relapse. *Molecular Interventions* 9: 175-187.
- [167] D. I. Eneanya et al. 1981. The action of metabolic fate of disulfiram. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 21: 576-596.
- [168] M. Viola-Rhenals, M. S. Rieber, M. Rieber. 2006. Suppression of survival in human SKBR3 breast carcinoma in response to metal-chelator complexes is preferential for copper-dithiocarbamate. *Biochemical Pharmacology* 71: 722-734.
- [169] H. Lövborg et al. 2006. Inhibition of proteasome activity, nuclear factor-KappaB translocation and cell survival by the antialcoholism drug disulfiram. *International Journal of Cancer* 118: 1577-1580.
- [170] K. G. Daniel et al. 2004. Organic copper complexes as a new class of proteasome inhibitors and apoptosis in human cancer cells. *Biochemical Pharmacology* 67: 1139-1151.
- [171] B. Cvek et al. 2008. Ni(II), Cu(II), and Zn(II) diethyldithiocarbamate complexes show various activities against the proteasome in breast cancer cells. *Journal of Medicinal Chemistry* 51: 6256-6258.
- [172] K. S. Larsen, D. S. Auld. 1991. Characterization of an inhibitory metal binding site in carboxypeptidase A. *Biochemistry* 30: 2613-2618.

- [173] M. M. Gottesman, I. Pastan, S. V. Ambudkar. 1996. P-glycoprotein and multidrug resistance. *Current Opinion in Genetics & Development* 6: 610-617.
- [174] M. M. Gottesman, T. Fojo, S. E. Bates. 2002. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer* 2: 48-58.
- [175] T. W. Loo, D. M. Clarke. 2000. Blockage of drug resistance in vitro by disulfiram, a drug used to treat alcoholism. *Journal of the National Cancer Institute* 92: 898-902.
- [176] Z. E. Sauna et al. 2004. The molecular basis of the action of disulfiram as a modulator of the multidrug resistance-linked ATP binding cassette transporters MDR1 (ABCB1) and MRP1 (ABCC1). *Molecular Pharmacology* 65: 675-684.
- [177] A. John, G. Tuszynsky. 2001. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathology & Oncology Research* 7: 14-23.
- [178] H. J. Cho et al. 2007. Disulfiram suppresses invasive ability of osteosarcoma cells via the inhibition of MMP-2 and MMP-9 expression. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 40: 1069-1076.
- [179] S. G. Shian et al. 2003. Inhibition of invasion and angiogenesis by zinc-chelating agent disulfiram. *Molecular Pharmacology* 64: 1076-1084.
- [180] K. G. Daniel et al. 2004. Copper storage diseases: Menkes, Wilsons, and cancers. *Frontiers in Bioscience* 9: 2652-2662.
- [181] M. Marikovsky et al. 2002. Cu/Zn superoxide dismutase plays a role in angiogenesis. *International Journal of Cancer* 97: 34-41.
- [182] D. Cen et al. 2002. Disulfiram induces apoptosis in human melanoma cells: a redox-related process. *Molecular Cancer Therapeutics* 1: 197-204.
- [183] B. W. Morrison. 2010. Disulfiram induces copper-dependent stimulation of reactive oxygen species and activation of the extrinsic apoptotic pathway in melanoma. *Melanoma Research* 20: 11-20.
- [184] K. L. Rock et al. 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78: 761-771.
- [185] Y. Saeki et al. 2009. Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome. *Journal of the European Molecular Biology Organization* 28: 359-371.
- [186] C. M. Pickart, D. Fushman. 2004. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Current Opinion in Chemical Biology* 8: 610-616.
- [187] H. N. Ramanathan, Y. Ye. Cellular strategies for making monoubiquitin signals. 2012. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 47: 17-28.
- [188] L. Bedford et al. 2010. Assembly, Structure and Function of the 26S proteasome. *Trends in Cell Biology* 20: 391-401.

- [189] K. Husnjak et al. 2008. Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature* 453: 481–488.
- [190] F. E. Reyes-Turcu, K. H. Ventii, K. D. Wilkinson. 2009. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annual Review of Biochemistry* 78: 363–397.
- [191] D. Chen, Q. P. Dou. 2010. The ubiquitin-proteasome system as a prospective molecular target for cancer treatment and prevention. *Current Protein & Peptide Science* 11: 459–470.
- [192] R. C. Vallari, R. Pietruszko. 1982. Human aldehyde dehydrogenase: mechanism of inhibition of disulfiram. *Science* 216: 637-639.
- [193] G. D. Thorn, R. A. Ludwig. 1962. The dithiocarbamates and related compounds. Amsterdam: Elsevier.
- [194] B. Cvek. 2009. Failure of ditiocarb (diethyldithiocarbamate) therapy: was diet the reason? *Current HIV Research* 7: 254.
- [195] T. Mujtaba, Q. P. Dou. 2011. Advances in the understanding of mechanisms and therapeutic use of bortezomib. *Discovery Medicine* 12: 471-480.
- [196] B. Macias et al. 1991. Dithiocarbamate derivatives from α -amino acids as chelating agents for toxic metal ions. *Journal of Inorganic Biochemistry* 42: 17-24.
- [197] A. Zhu. 2010. Systemic Treatment of Hepatocellular Carcinoma: Dawn of a New Era?. *Annals of Surgical Oncology* 17:1247-1256.
- [198] J. M. Llovet et al. 2008. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *The New England Journal of Medicine* 359: 378-390.
- [199] M. Groll et. al. 1997. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386: 463-471.
- [200] A. M. Sieuwerts et al. 1995. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC₅₀-values and cell survival. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 33: 813-823.
- [201] G. Hacker. 2000. The morphology of apoptosis. *Cell and Tissue Research* 301: 5-17.
- [202] G. Bergers, L. E. Benjamin. 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer* 3:401-410.
- [203] B. Cvek. 2011. Targeting Malignancies with Disulfiram (Antabuse): Multidrug Resistance, Angiogenesis, and Proteasome. *Current Cancer Drug Targets* 11: 332-337.
- [204] B. Johansson, Z. Stankiewicz. 1985. Bis-(diethyldithiocarbamate) copper complex: A new metabolite of disulfiram?. *Biochemical Pharmacology* 34: 2989–2991.
- [205] Y. Xie. 2010. Structure, assembly and homeostatic regulation of the 26S proteasome. *Journal of Molecular Cell Biology* 2: 308-317.

- [206] G. Nalepa, M. Rolfe, J. W. Harper. 2006. Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system. *Nature Reviews Drug Discovery* 5: 596-613.
- [207] Petr Daněk, ústní sdělení
- [208] Monika Horáková, ústní sdělení
- [209] Z. Škrott. 2012. Neziskové léky: Aktivita komplexu disulfiramu (antabusu) s mědí proti buněčné linii odvozené od karcinomu žaludku. Bakalářská práce.
- [210] Z. Macečková. 2012. Neziskové léky: Aktivita komplexu disulfiramu (antabusu) s mědí proti buněčné linii odvozené od nemalobuněčného karcinomu plic. Bakalářská práce.
- [211] List produktu SK-HEP 1. Dostupné z: http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=91091816&collection=ecacc_gc