

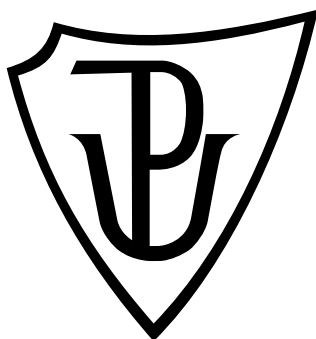
**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2015**

**Jiří Hodoň**

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



**Zkoumání mechanismu účinku cytotoxicky  
aktivních triterpenů**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Jiří Hodoň**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2015**

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

## **Prohlášení**

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

V Olomouci, 30. 4. 2015

.....

Podpis

## **Poděkování**

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

## Souhrn

Tato práce se zabývá zjišťováním mechanismu účinku několika cytotoxicky aktivních triterpenů a hledáním jejich molekulárních cílů. Z aktivních derivátů byly připraveny propargylestery a ty byly biotinylovány pomocí Huisgenovy cykloadice. Byly změřeny cytotoxické aktivity všech derivátů. Vzniklé konjugáty (terpen - PEG linker - biotin) pak byly použity v pull down esejích vyhodnocovaných pomocí kvantitativní proteomiky v kombinaci se SILAC. V prvních experimentech byla nalezena pro každou sloučeninu skupina proteinů, se kterými selektivně interagují, v budoucnu však bude nutné experimenty dále optimalizovat a potenciální cíle validovat. Pro kyselinu betulinovou byla mezi potenciálními cíli nalezena i topoisomerasa I, která je z literatury známým cílem.

## **Summary**

The aim of this thesis is investigation of mechanism of action of cytotoxic active triterpenes. Propargyl esters were prepared from all active compounds and they were biotinylated using Huisgen cycloaddition. Cytotoxic activities of all prepared compounds were measured. The conjugates (terpene – PEG linker – biotin) were then used in pull down assays evaluated by quantitative proteomics and SILAC. During the first experiments, a set of proteins with specific interaction for each studied triterpene was found. In the future, experiments need more optimization and the potential targets will have to be validated. Topoisomerase I was found among the potential molecular targets for betulinic acid which is in agreement with literature precedents.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Cíle práce .....</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>Teoretická část .....</b>	<b>12</b>
3.1	Současný stav studované problematiky .....	13
3.2	Kvantitativní proteomika .....	15
3.3	SILAC .....	15
3.4	MTT test.....	17
3.5	Syntéza jednotlivých derivátů .....	17
3.5.1	Příprava pyrazinu 3.....	17
3.5.2	Příprava aldehydu kyseliny betulínové 4.....	18
3.5.3	Syntéza biotinylovaných molekul.....	18
3.5.4	Příprava propargylovaných sloučenin .....	18
3.5.5	Příprava linkeru s biotinem .....	19
3.5.6	Příprava biotinylovaných sloučenin .....	19
<b>4</b>	<b>Experimentální část.....</b>	<b>21</b>
4.1	Chemická část .....	22
4.1.1	Obecné poznámky k experimentální části .....	22
4.1.2	Příprava sloučenin .....	23
4.2	Biologická část .....	30
4.2.1	Přístrojové vybavení.....	30
4.2.2	Chemikálie .....	30
4.2.3	Seznam a příprava použitých kultivačních médií .....	31
4.2.4	Seznam a příprava použitých roztoků .....	31
4.2.5	Testované látky.....	35
4.2.6	Biologický materiál .....	35
4.2.7	Kultivace a pasážování buněk.....	35
4.2.8	MTT test.....	36
4.2.9	Metoda SILAC .....	37
4.2.10	Příprava proteinových lyzátů .....	38
4.2.11	Afinní purifikace proteinů pomocí magnetických kuliček.....	38
4.2.12	Separace jednotlivých proteinů pomocí SDS-PAGE elektroforézy.....	39

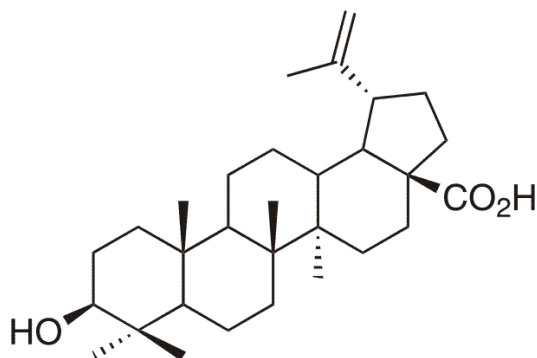
4.2.13	Fixace a barvení gelu po SDS-PAGE elektroforéze .....	39
4.2.14	Digestce proteinů pro hmotnostní spektrometrii .....	40
4.2.15	Purifikace peptidů na C18 koloně ve špičkách .....	41
4.2.16	Stranovení koncentrace proteinů podle Bradfordové v mikrotitrační destičce.	41
<b>5</b>	<b>Výsledky a diskuze .....</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>47</b>
<b>8</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů.....</b>	<b>51</b>
<b>9</b>	<b>Přílohy.....</b>	<b>53</b>



# 1 Úvod

Terpenoidy reprezentují jednu z největších skupin sekundárních metabolitů, doposud jich bylo z přírodního materiálu izolováno a charakterizováno více než 55 000 (Mirata *et al.*, 2015). Významnou podskupinou terpenoidů jsou triterpeny, které se mimo jiné vyskytují ve vyšších rostlinách, mořských organizmech anebo vzácněji v plísních či houbách. Biosyntéza triterpenů probíhá mevalonátovou cestou přes skvalen, nenasycený třicetiuhlíkatý uhlovodík, formálně složený ze šesti izoprenových jednotek, který je také prekurzorem všech steroidů.

První triterpeny byly objeveny již na začátku 19. století, a přestože byly přirozenou součástí mnoha přírodních léčivých extraktů, o biologických aktivitách čistých terpenických substancí nebylo dlouho známo nic. Extrakty s obsahem triterpenoidů se využívají k léčebným účelům v mnoha asijských zemích a to hlavně díky protizánětlivým, analgetickým, sedativním, antipyretickým a mnoha dalším účinkům (Huang, 1993; Ovesná *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2014). S rozvojem metodologií organické chemie a dalších vědních disciplín byly konkrétním terpenům přiřazeny specifické biologické účinky a s rozvojem biologického testování byly nové účinky odhaleny i u nových, dosud nepoužívaných derivátů. Dnes známe triterpeny, které mají účinky antimikrobiální, antifungální, antiparazitární, protipožerové, ale zejména protinádorové a anti-HIV (příklady v Sultana *et al.*, 2008; Zuo *et al.*, 2011; Innocente *et al.*, 2014). V naší laboratoři se zabýváme deriváty lupanu a oleananu, a jednou z důležitých výchozích látek je kyselina betulinová **1**.



**Obrázek 1:** Strukturální vzorec kyseliny betulinové (**1**)

Jednou z prvních prací, která popisuje cytotoxické účinky extraktů s obsahem kyseliny betulinové na buňkách lymfoblastické leukemie je (Trumbull 1976), ale teprve roku 1995 byla publikována práce o selektivní cytotoxické aktivitě izolované sloučeniny, v tomto případě však na různých liniích melanomu (Pisha *et al.*, 1995). Rozsáhlý výzkum od 90. let také poskytl důkazy o aktivitách kyseliny **1** proti HIV. Řada derivátů kyseliny **1** se ukázala aktivní i v *in vivo* testech na zvířatech. Existují i deriváty potlačující vznik metastáz. Několik výzkumných týmů se také pokusilo poodhalit mechanismus účinku derivátů kyseliny betulinové **1**. Mnoho z nich má vliv na buněčný cyklus, některé indukují apoptózu, jiné autofagii nebo angiogenezi (např. Xu *et al.*, 2007; Petronelli *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2010). Z konkrétních molekulárních cílů několika derivátů kyseliny betulinové pak byla prokázána inhibice topoisomeras nebo proteasomu (Ganguly *et al.*, 2007; Qian *et al.*, 2011). Je zřejmé, že molekulárních cílů sloučenin odvozených od kyseliny betulinové je vzhledem ke škále jejich biologických aktivit více, a proto je důležité je dále zkoumat.

## 2 Cíle práce

Tato bakalářská práce je zaměřena na zkoumání mechanismu účinku derivátů kyseliny betulinové, které během dřívějšího výzkumu vykazaly významné cytotoxické aktivity. Jedná se o kyselinu betulinovou (bude použita jako standard), pyrazin **3** a aldehyd **4**. Bylo proto potřeba:

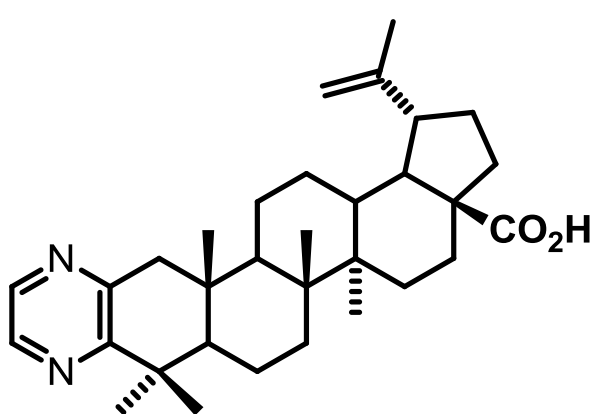
1. Provést literární rešerši.
2. Připravit sloučeninu **3** a **4** dle literatury (Sejbal *et al.*, 1986; Sarek *et al.*, 2003).
3. Připravit propargylestery **5 – 7**.
4. Připravit vhodný linker s biotinem a pomocí Huisgenovy cykloadice syntetizovat biotinylované sloučeniny **8 – 10**.
5. Změřit cytotoxickou aktivitu všech derivátů pomocí MTT testu.
6. Optimalizovat biotin/streptavidin afinitní chromatografii a vyhodnotit výsledky, pokusit se o vytipování možných molekulárních cílů.

### **3 Teoretická část**

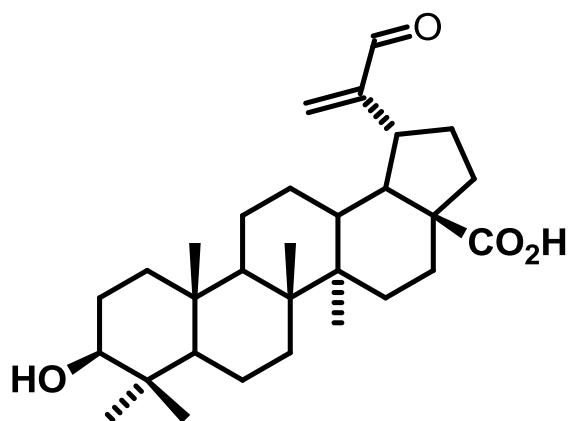
### 3.1 Současný stav studované problematiky

Vzhledem k rozmanitým biologickým aktivitám se řada týmů věnuje syntéze nových analogů triterpenů a jejich cílem je najít derivát s lepšími vlastnostmi než mají současná léčiva. Tyto cíle zahrnují nalezení sloučenin s vyšší  $IC_{50}$  než mají existující deriváty nebo sloučeninu s novým mechanismem účinku, který by byl alternativou pro řešení rezistentních onemocnění. Přes všechny zajímavé biologické aktivity a obvykle i nízkou toxicitu na nenádorových buňkách mají triterpeny jednu nevýhodu. Jsou špatně rozpustné ve vodných médiích a s tím je spojená jejich špatná biodostupnost. Z tohoto důvodu se mnoho týmů věnuje syntéze proléků, které by byly rozpustnější anebo vyvíjejí vhodné farmakologické formulace, např. na bázi cyklodextrinů. Na našem pracovišti je značná pozornost věnována všem třem oblastem vývoje a tato bakalářská práce úzce souvisí s vývojem derivátů s vysokou aktivitou a návrhem jejich mechanismu účinku.

Během předchozího výzkumu byla nalezena řada sloučenin s  $IC_{50}$  v jednotkách  $\mu M$ . Jednou skupinou takových perspektivních sloučenin jsou deriváty kyseliny betulinové s dusíkatým heterocyklickým kruhem kondenzovaným ke kruhu A terpenického skeletu. Z této skupiny byl neaktivnější pyrazin **3** (Urban *et al.*, 2007; Urban *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2012;). Další zajímavou a velmi aktivní molekulou proti široké škále nádorových linií je 30-oxoderivát **4** (Sarek, *et al.*, 2003).



Obrázek 2: Sloučenina 3



Obrázek 3: Sloučenina 4

Pro studium mechanismu účinku biologicky aktivních derivátů je možné použít řadu metod.

V této práci byl hledán molekulárních cíl pomocí pull down esejí na principu imobilizace a zachycení interagujících proteinů s využitím kvantitativní proteomiky a SILAC.

Metoda biotin/streptavidin afinitní chromatografie spočívá v tom, že aktivní molekula je navázána přes definovaný linker k molekule biotinu a k takto modifikované molekule je přidán lysát nádorových buněk. Aktivní molekula se při tom naváže na cílový protein. Po přidání streptavidinem modifikované pevné fáze (např. magnetických kuliček) se komplex biotin-aktivní molekula-molekulární cíl naváže na tuto pevnou fázi a zbytek lysátu je odmyt. Následuje gradientová eluce molekulárních cílů pomocí pufru a eluované molekuly proteinů jsou charakterizovány pomocí hmotnostní spektroskopie.

Jednou z variant této metodiky je metoda popsaná v práci: (Ong *et al.*, 2012), která umožňuje provedení velkého kvanta pull down esejí v jednom jediném experimentu.

Aby bylo metodu možno použít, je potřeba připravit konjugáty aktivní molekuly s biotinem a je potřeba navázat biotin z více míst (kvůli kontrole). Vzhledem k omezenosti času byly v rámci této bakalářské práce připraveny biotinylované deriváty pouze přes karboxylovou funkci v poloze 17, nicméně tato práce je součástí širší studie a deriváty biotinylované na C-3 a na C-30 budou připraveny v nejbližší budoucnosti. Pro biotinylace byla zvolena Huisgenova cykloadice, moderní metoda, tzv. click chemie, protože umožňuje velmi snadno, rychle a kontrolovaně spojit molekulu obsahující koncovou trojnou vazbu s organickým azidem (Huisgen, 1961; Colb *et al.*, 2001).

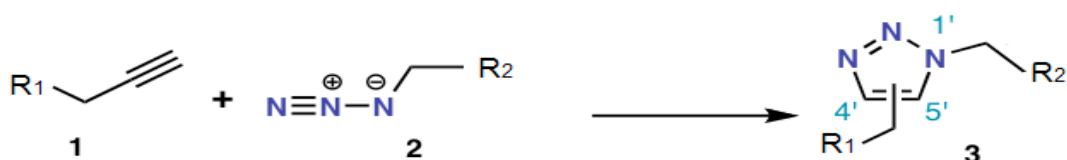


Schéma 1: Princip click reakce

## 3.2 Kvantitativní proteomika

Kvantitativní proteomika dokáže detekovat malé změny v proteinu nebo peptidu, a to ve velmi složité směsi proteinů (Ong *et Mann*, 2005). Rozdíly se analyzují pomocí LC-MS a mohou být provedeny různými metodami. U neznačené neboli „Label free“ metody jsou proteiny kvantifikovány intenzitou signálu v hmotnostním spektru (Kopylov *et al.*, 2009). Přesnější metoda je založena na značení proteinů stabilní značkou. Pro značení proteinů se používají chemické modifikace specifických skupin na molekule např. u metod AQUA, iTRAQ anebo využití média jakožto zdroje izotopicky značených anabolitů - SILAC (Ong *et al.*, 2003).

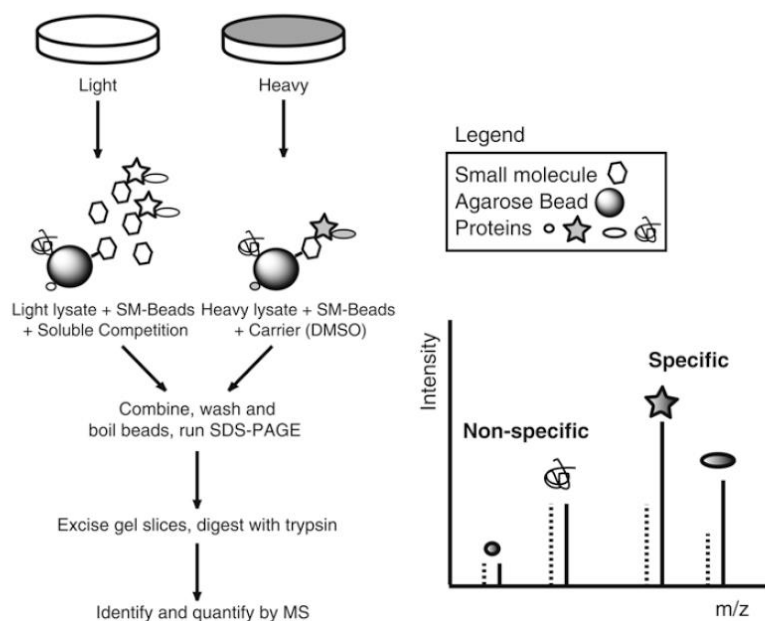
Kvantitativní proteomiku rozlišujeme na dva typy: absolutní a relativní. Relativní kvantifikace porovnává úroveň konkrétního proteinu v různých vzorcích a výsledky jsou vyjádřeny jako relativní změna násobného množství proteinů (Elliott *et al.*, 2009). Absolutní kvantifikace je založena na stanovení přesného množství nebo koncentraci proteinu.

Vývoj metod pro přesnou kvantifikaci proteinů je jednou z nejnáročnějších oblastí proteomiky, a i přes složitost této techniky je kvantitativní proteomika rozhodující pro naše celkové pochopení exprese proteinů a jejich úprav souvisejících s různými molekulárními procesy.

## 3.3 SILAC

Metoda SILAC (stable isotope labeling by amino acids in cell culture) je jednoduchá, efektivní metoda kvantitativní proteomiky využívající hmotnostní spektrometrii. Je založena na značení proteomu buněk prostřednictvím značených esenciálních aminokyselin. Nejčastěji se pro izotopické značení aminokyselin používá deuterium,  $^{13}\text{C}$ , nebo  $^{15}\text{N}$ .

V praxi se připraví dvě média, kdy jedno obsahuje již zmíněné neznačené a druhé značené aminokyseliny. Kultivované buňky, během pěti buněčných dělení v médiu, nahradí standardní esenciální aminokyselinu svou izotopicky značenou formou. Těžší izotopy peptidu aminokyseliny se v hmotnostním spektru projeví posunem molekulové hmotnosti o specifickou hodnotu např. o 6 Da u lysinu značeného  $^{13}\text{C}$ . Rozdíl těchto hodnot nám umožňuje rozlišit peptidové páry pocházející ze značených a neznačených proteinů (Ong *et al.*, 2002; Ong *et Mann*, 2007).

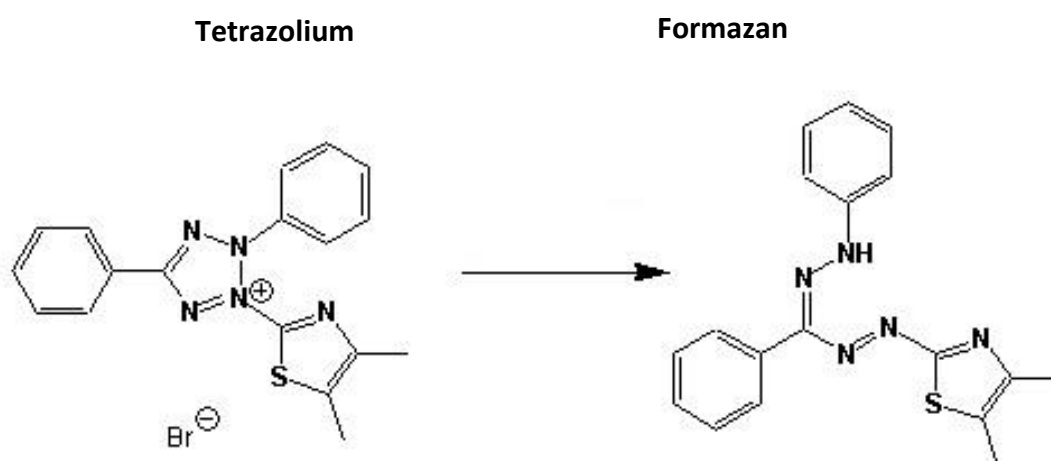


**Obrázek 4:** Identifikace specifických proteinových interakcí pomocí kvantitativní proteomiky. Tato metoda byla použita v této práci. Spočívá v tom, že se připraví dvě buněčné linie, jedna obsahuje standardní (neznačené) aminokyseliny a druhá aminokyseliny značené těžkými (značenými) isotopy. K lyzátu ze standardní linie se přidá pevná fáze s navázanými molekulami zkoumané látky a zároveň vysoká koncentrace volné zkoumané látky, která vystupuje jako kompetitor. K lyzátu z linie obsahující těžké aminokyseliny se přidá pouze pevná fáze s navázanou aktivní molekulou. Pevná fáze z obou experimentů se smíchá v poměru 1:1, provedou se všechny promývací kroky, proteiny se oddělí od pevné fáze, naštěpí trypsinem a následně se obsah a identita navázaných proteinů (jim odpovídajících peptidů) určí pomocí hmotnostní spektrometrie. Vzhledem k tomu, že k lyzátu z normální linie byl přidán kompetitor, velká část molekulárních cílů je jím vyvázána a odmyta před samotnou identifikací. U lyzátu obsahujících těžké proteiny naopak nic neruší navázání molekulárních cílů na pevnou fázi, a proto je v tomto uspořádání signál pro peptid ze značeného proteinu intenzivnější než signál pro peptid z neznačeného proteinu. V dalším kroku se experiment provede s opačným uspořádáním a výsledkem musí být vyšší intenzita signálu pro peptid z neznačeného proteinu. V případě, že tomu tak je, je to důkazem, že protein se váže specificky ke zkoumané molekule a je tedy pravděpodobně molekulárním cílem. V případě, že se protein váže nespecificky, signál pro peptid z neznačeného i značeného proteinu bude v obou experimentech stejně intenzivní. (Ong, 2012)



## 3.4 MTT test

MTT test je jednoduchý kolorimetrický test, měřící životaschopnost nádorových buněk (Mosmann, 1983). Princip metody spočívá v redukcí žlutého a rozpustného 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan. Reakce probíhá na mitochondriální membráně živých buněk. Po přidání silného detergentu se formazan rozpustí a zbarvení je vyhodnoceno spektrofotometricky. Množství živých buněk odpovídá hodnotě absorpance, tedy čím tmavší barva roztoku, tím vyšší množství živých buněk (Black *et Speer*, 1954).



**Obrázek 5:** Chemická struktura tetrazoliové soli a její přeměny na formazan při MTT testu

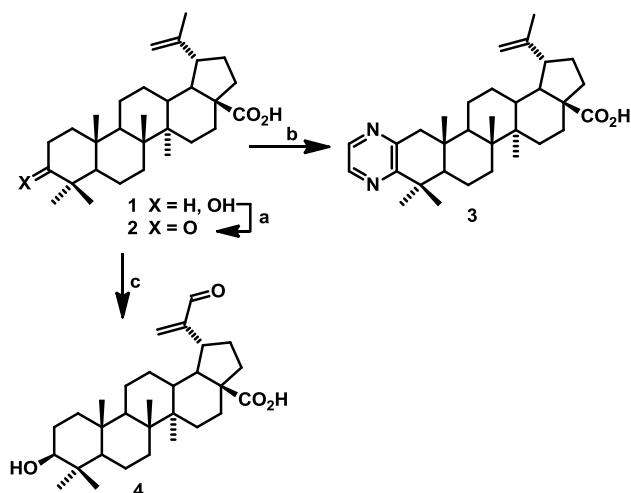
## 3.5 Syntéza jednotlivých derivátů

### 3.5.1 Příprava pyrazinu 3

Pyrazin **3** byl připraven reakcí kyseliny betulonové **2** s ethylendiaminem a sírou ve vroucím morfolinu dle literatury (Sejbal *et al.*, 1986). Bylo získáno 39 % pyrazinu **3** (schéma 2), fyzikální a spektrální data odpovídají datům nalezeným v literatuře.

### 3.5.2 Příprava aldehydu kyseliny betulinové **4**

Allylovou oxidací kyseliny **1** oxidem seleničitým byl připraven aldehyd **4** (Sarek *et al.*, 2003). Bylo získáno 43,6 % aldehydu **4** (schéma 2). Fyzikální a spektrální data jsou ve shodě s literaturou.



**Schéma 2.** (a) CrO<sub>3</sub>/ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, DMF, r.t., 2 h; (b) Ethylendiamin/morfolin, S, reflux 3 h; (c) SeO<sub>2</sub>, GLYM, reflux 4 h.

**Schéma 2:** Příprava sloučenin **2**, **3**, **4**

### 3.5.3 Syntéza biotinylovaných molekul

Vzhledem k našemu zájmu o nalezení molekulového cíle, bylo zapotřebí připojit k již nasyntetizovaným sloučeninám **1**, **3**, **4** biotin. Jako snadná a rychlá cesta se zdála být Huisgenova cykloadice, tzv. click reakce, pro spojení dané molekuly, obsahující trojnou vazbu s linkerem **11**, který nese organický azid (viz schéma 3).

### 3.5.4 Příprava propargylovaných sloučenin

Sloučeniny **5** - **7** byly připraveny analogickým postupem (Wang *et al.*, 2014), reakcí triterpenoidní kyseliny s propargyl bromidem za přítomnosti uhličitanu draselného jako báze. Reakce byla monitorována pomocí TLC a následně chromatograficky zpracována. Propargylace kyseliny betulinové **1** a pyrazinového derivátu **3**, za vzniku sloučenin **5** a **6**,

proběhly s výtěžkem podobným literatuře, tedy v rozmezí 70 – 80 %. U derivátů obsahujících aldehyd v poloze 30 byl výtěžek výrazně nižší. Propargylace aldehydu **4** proběhla za vzniku sloučeniny **7** s výtěžkem 49 %. Výtěžek se nepodařilo zvýšit ani při prodloužení reakční doby na 18 h, či přidáním dalšího propargyl bromidu. Zbytek látky se v průběhu reakce rozložil.

### 3.5.5 Příprava linkeru s biotinem

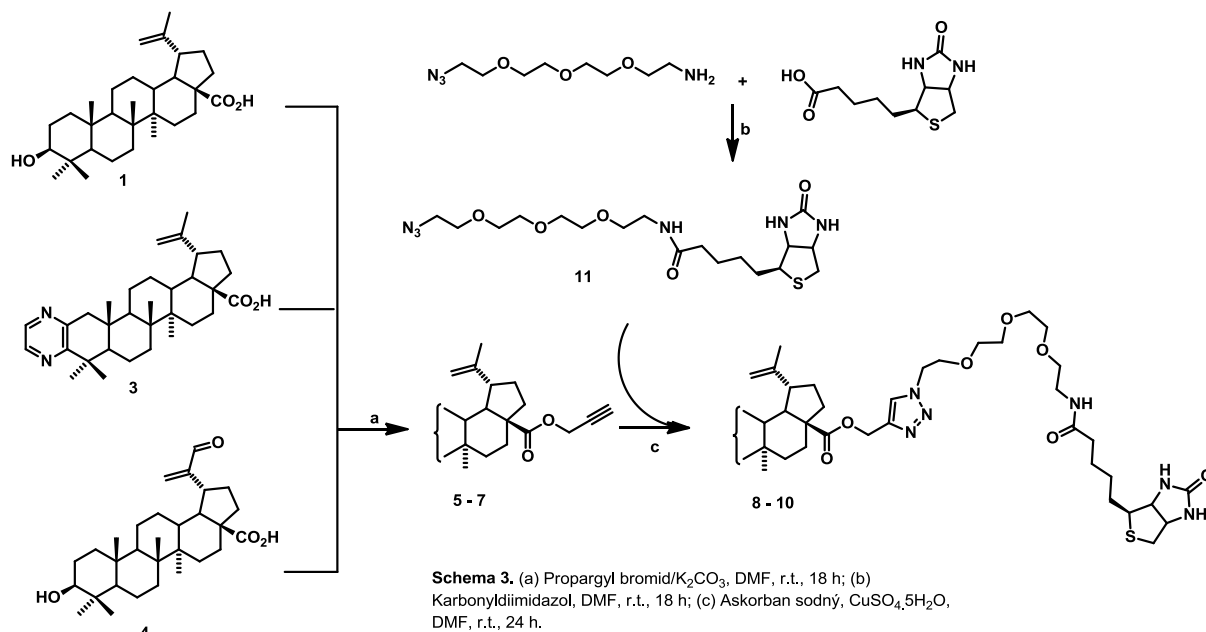
Linker s biotinem byl připraven modifikovaným postupem dle literatury (Vundyala *et al.*, 2008). Nejdříve byl biotin rozpuštěn v DMF při 80°C a následně přidán CDI, kvůli aktivaci karboxylové skupiny. Poté byl do reakční směsi přidán 11-azido-3,6,9-trioxaundekan-1-amin a míchán při laboratorní teplotě 18 hodin. První pokus o přípravu linkeru **11** proběhl s výtěžkem 12 %, jelikož se před zpracováním produktu nepodařilo zcela odpařit DMF, které způsobovalo ztráty při extrakci s chloroformem. Následná reakce nebyla zpracována podle literatury, a reakční směs byla, po odpaření DMF za vysokého vakua, přímo purifikována pomocí kolonové chromatografie s výtěžkem 62 %.

Jelikož byl použit jiný azid-PEG-amin než v literatuře (Vundyala *et al.*, 2008), byla sloučenina charakterizována pomocí MS-ESI, <sup>1</sup>H, a <sup>13</sup>C NMR spekter.

### 3.5.6 Příprava biotinylovaných sloučenin

První sloučeninou, na které byla biotinylace ověřena, byla kyselina **1**, vzhledem k její dobré dostupnosti. K linkeru **11** a kyselině **1** byl přidán askorban sodný a pentahydrát síranu měďnatého v DMF. Směs byla míchána po dobu 24 hodin za laboratorní teploty, podle modifikovaného postupu literatury (Antimonova *et al.*, 2013). Reakční směs po 24 hodinách změnila barvu z modro-zelené na žluto-oranžovou. Přítomnost produktu byla ověřována pomocí LC-ESI. Při pokusu o zpracování reakční směsi nalitím do ledové lázně a následné extrakci došlo k obrovským ztrátám produktu, jelikož biotinylovaná molekula v přítomnosti DMF přechází nejen do organické fáze, ale i do vodného prostředí. Následná purifikace produktu proběhla na HPLC s výtěžkem pouhých 7,8 % sloučeniny **8**. Po zkušenosti se sloučeninou **8** byl u dalších sloučenin použit jiný postup zpracování reakční směsi. Příprava

sloučeniny **9** byla připravena z pyrazinu **3** za stejných reakčních podmínek jako sloučenina **8**. Přítomnost produktu byla ověřena pomocí LC-ESI a následně přefiltrována, aby byla odstraněna nerozpustná měď. Ze směsi bylo odpařeno DMF a produkt purifikován pomocí HPLC s výtěžkem 41 %. Analogickým postupem byl připraven biotinylovaný aldehyd **10** s výtěžkem 42 %.



**Schéma 3:** Příprava linkeru **11**, propargylovaných sloučenin **5 - 7** a biotinylovaných derivátů **8-10**.

## **4 Experimentální část**

## 4.1 Chemická část

### 4.1.1 Obecné poznámky k experimentální části

Teploty tání byly vymezeny na bodotávku Büchi B-545 a nejsou korigovány. NMR spektra byla měřena na přístroji Jeol 500 MHz, v roztoku  $\text{CDCl}_3$  (pokud není uvedeno jinak). Pro  $^1\text{H}$  NMR spektra byl použit jako vnitřní standard signál zbytkového  $\text{CHCl}_3$ . Chemické posuny  $^{13}\text{C}$  NMR spekter byly referencovány vůči  $\delta(\text{CDCl}_3) = 77.00$  ppm. Multiplicita signálů v  $^{13}\text{C}$  NMR spekter byla určena z DEPT spekter. Hodnoty chemických posunů a interakčních konstant byly určeny pomocí analýzy prvního řádu. Hodnoty chemických posunů byly zaokrouhleny na dvě desetinná místa, interakční konstanty na jedno desetinné místo (uvedeny v jednotkách Hz). Průběh reakcí a čistota vzorků byly sledovány pomocí TLC na fóliích Kieselgel 60 F254 (Merck). Detekce TLC fólií byla prováděna nejprve UV zářením (254 nm), a poté postřikem 10% kyselinou sírovou a zahřáním na 110 - 200 °C. Eluční soustavy pro vyvíjení TLC fólií (vždy uvedeny u experimentu).

Pro sloupcovou chromatografii byl používán Kieselgel 60 (63 - 200  $\mu\text{m}$ ; Merck 7734). Mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii jsou uvedeny vždy u experimentu. K odpařování rozpouštědel byla použita RVO (Büchi Rotovapor R-200). Veškerá rozpouštědla používaná pro reakce, krystalizace a chromatografie byla předem destilována. Sloučeniny pro syntézy byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich, s.r.o. v nejvyšší dostupné kvalitě. Běžné rozpouštědla a DMF, acetonitril, 2-methoxyethanol, oxid seleničitý, oxid chromový, hexan, kyselina sírová, hydroxid draselný, uhličitan draselný, byly zakoupeny u firmy Lachner, s.r.o. Kyselina betulínová a kyselina betulonová byly získány z dřívějších přísunů provedených v laboratořích Betulinines.

Eluční soustavy pro vyvíjení TLC fólií (jsou vždy uvedeny u experimentu):

A toluen : diethylether 3:1 (obj.)

B toluen : diethylether 5:1 (obj.)

Mobilní fáze použité pr sloupcové chromatografie na silikagelu:

Fáze 1 – 25% (objemových) diethyletheru v toluenu

Fáze 2 – 20% (objemových) diethyletheru v toluenu

Mobilní fáze pro HPLC (fáze 3) – Gradientová eluce pro HPLC probíhala pro všechny sloučeniny z 80% ACN/H<sub>2</sub>O pufru do 100% ACN. Na H<sub>2</sub>O pufr bylo použito 2 g NH<sub>4</sub>OAc ve 2 l H<sub>2</sub>O.

### **Obvyklé zpracování reakčních směsí**

#### Postup A

Reakční směs byla nalita do pětinasobného množství vody a extrahována ethylacetátem. Spojené organické podíly byly promyty vodou, vysušeny bezvodým síranem hořečnatým a rozpouštědla byla odpařena na RVO.

## **4.1.2 Příprava sloučenin**

### **Příprava pyrazinu 3**

2,7 g (5,94 mmol) ketokyseliny **2** bylo rozpuštěno v 23,5 ml morfolinu, k roztoku bylo přidáno 1,8 ml (30 mmol) ethylendiaminu a 1,8 g (56,3 mmol) síry. Směs byla za stálého míchání zahřívána k varu 4 hodiny. Poté byla zpracována postupem A. Odparek byl přečištěn chromatografií na sloupci 270 g silikagelu (fáze 2). Bylo získáno 1,13 g (39 %) pyrazinu **3** ve formě tuhé pěny o t. t. 232-237 °C. Literatura uvádí t. t 240-243 °C (krystalizováno z MeOH).

## Příprava aldehydu kyseliny betulinové **4**

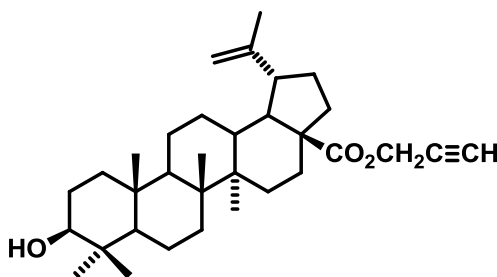
K roztoku 3 g (6,58 mmol) kyseliny **1** v 90 ml 2-methoxyethanolu bylo pomalu přidáno 1,38 g (12,4 mmol) oxidu seleničitého. Reakční směs byla za míchání zahřívána k varu 4 hodiny. Konec reakce byl indikován pomocí TLC (soustava A). Reakční směs byla za horka zfiltrována přes skládaný filtr a zpracována postupem A. Produkt byl dále přečištěn přes sloupec 300 g silikagelu (fáze 1). Chromatograficky jednotné frakce obsahující aldehyd **4** byly spojeny. Bylo získáno 1,35 g (43,5 %) lehce nažloutlých krystalů o t. t. 210-217 °C. <sup>1</sup>H NMR spektrum je shodné s literaturou (Dina *et al.*, 1955).

## Obecný postup přípravy propargylovaných sloučenin derivátů kyseliny betulinové

Bylo použito modifikovaného postupu podle literatury (Wang *et al.*, 2014).

K roztoku 2,2 mmol kyseliny v 20 ml DMF byl přidán K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,89 g; 6,5 mmol) a propargyl bromid (342 μl; 4,4 mmol). Směs byla míchána za laboratorní teploty 4 hodiny. Reakce byla monitorována pomocí TLC (soustava B). Po skončení reakce byl zbývající uhličitán vápenatý a vzniklý bromid draselný odstraněn filtrací. Surový produkt byl zpracován postupem A a rozpouštědla odpařena na RVO. Produkt byl přečištěn chromatografií na sloupci silikagelu (hmotnost = 100x hmotnost odparku).

## Propargyl ester kyseliny betulinové **5**

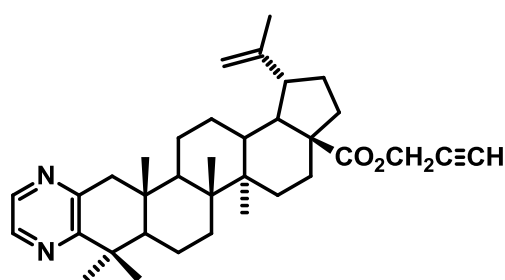


Byl připraven obecným postupem z 3 g (6,6 mmol) kyseliny betulinové **1**. Bylo získáno 2,3 g (70,7 %) bílých krystalů propargylesteru **5** o t. t. 181 – 186 °C. Literatura



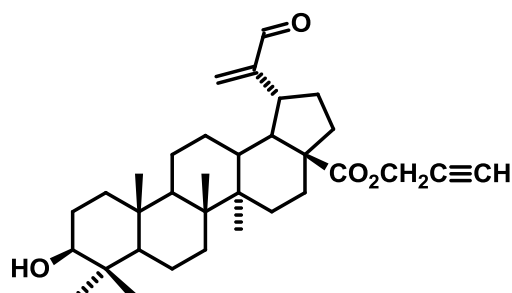
(Wang *et al.*, 2014) udává t. t. 185 – 187 °C.  $^1\text{H-NMR}$ : 0.76 (s, 3H); 0.83 (s, 3H); 0.93 (s, 3H); 0.93 (s, 3H); 0.97 (s, 3H); 1.91-1.93 (m, 2H); 2.22 (td, 1H,  $J_1=12,6$  Hz,  $J_2=12,6$  Hz,  $J_3=3,5$  Hz); 2.26-2.34 (m, 1H); 2.44 (t, 1H,  $J_1=2,3$  Hz, C33); 3.02 (td, 1H,  $J_1=10,6$  Hz,  $J_2=10,6$  Hz,  $J_3=4,6$  Hz, H-19 $\beta$ ); 3.19 (ddd, 1H,  $J_1=10,3$  Hz,  $J_2=5,3$  Hz,  $J_3=5,3$  Hz, H-3); 4.61 (m, 1H, H-29-*pro E*); 4.64 (dd, 1H,  $J_1=15,6$  Hz,  $J_2=2,3$  Hz, H-31a); 4.72 (dd, 1H,  $J_1=15,6$  Hz,  $J_2=2,3$  Hz, H-31b); 4.74 (m, 1H, H-29-*pro Z*). MS (ESI $^-$ ):  $m/z$  (%) = 493 (100, [M-H] $^-$ ). MS (ESI $^+$ ):  $m/z$  (%) = 517 (75, [M+Na] $^+$ )

### Propargyl ester pyrazinu 6



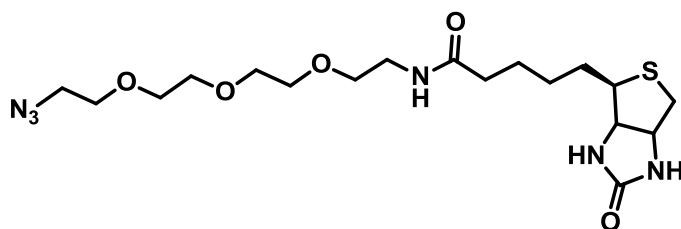
Byl připraven obecným postupem z 0,5 g (1 mmol) pyrazinu **3**. Bylo získáno 0,45 g (83,4 %) bílých drobných krystalů propargylovaného pyrazinu **6** o t. t. 177-181.  $^1\text{H-NMR}$ : 0.81 (s, 3H); 1.02 (s, 3H); 1.03 (s, 3H); 1.29 (s, 3H); 1.31 (s, 3H); 1.72 (s, 3H, 6x CH $_3$ ); 1.78 (m, 1H); 1.93 (m, 2H); 2.25-2.36 (m, 2H); 2.43-2.50 (m, 2H); 3.00-3.09 (m, 1H, H-19 $\beta$ ); 3.04 (d, 1H,  $J=16,6$  Hz); 4.67 (m, 1H, H-29 *pro-E*); 4.67 (dd, 1H,  $J_1=15,5$  Hz,  $J_2=2,3$  Hz, H-33a); 4.73 (dd, 1H,  $J_1=15,5$  Hz,  $J_2=2,3$  Hz, H-33b); 4.78 (bd,  $J=1,7$  Hz, H-29 *pro-Z*); 8.28 (d, 1H,  $J=2,3$  Hz); 8.41 (d, 1H,  $J=2,3$  Hz, 2 x H – pyrazin). MS (ESI $^-$ ):  $m/z$  (%) = 527 (55, [M-H] $^-$ ). MS (ESI $^+$ ):  $m/z$  (%) = 529 (95, [M+H] $^+$ )

## Propargyl ester aldehydu 7



Byl připraven obecným postupem z 1 g (1,97 mmol) aldehydu **4**. Bylo získáno 509 mg (47 %) bílých krystalů propargylovaného aldehydu **7** o t. t. 188-192 °C. <sup>1</sup>H-NMR: 0.76 (s, 3H); 0.81 (s, 3H); 0.92 (s, 3H); 0.94 (s, 3H); 0.96 (s, 3H); 1.89-1.96 (m, 1H); 1.97-2.1 (m, 2H); 2.21 (td, 1H,  $J_1=12,6$  Hz,  $J_2=12,6$  Hz,  $J_3=4$ ); 2.26- 2.39 (m, 1H); 2.44-2.45 (m, 1H); 3.17-3.31 (m, 1H, H-19 $\beta$ ); 3.33 (td, 1H,  $J_1= 11,5$  Hz,  $J_2=11,5$  Hz,  $J_3= 4,6$  Hz, H-3 $\alpha$ ); 4.62 (dd, 1H,  $J_1=15,5$  Hz,  $J_2=2,3$  Hz); 4.71 (dd, 1H,  $J_1=15,5$  Hz,  $J_2=2,3$  Hz); 5.91 (s, 1H, H-29a); 6.28 (s, 1H, H-29b); 9.53 (s, 1H, H-30). MS (ESI<sup>-</sup>):  $m/z$  (%) = 507 (100, [M-H]<sup>-</sup>). MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  (%) = 510 (75, [M+H]<sup>+</sup>)

## Příprava linkeru s biotinem 11



Byl připraven modifikovaným postupem podle literatury (Vundyala *et al.*, 2008).

D(+)-Biotin (0,48 g, 2 mmol) byl přidán k 10 ml DMF a zahříván na 80 °C než se biotin rozpustil. Poté byl přidán 0,38 g (2,4 mmol) CDI a směs míchána při pokojové teplotě 4 hodiny. Poté byl přidán 11-azido-3,6,9-trioxaundecyl-amin (476  $\mu$ l, 2,4 mmol) a směs míchána pod inertní atmosférou za laboratorní teploty 18 hodin. Konec reakce byl indikován pomocí MS-ESI. Z reakce byl odpařeno DMF pomocí RVO. Odparek byl rozpuštěn

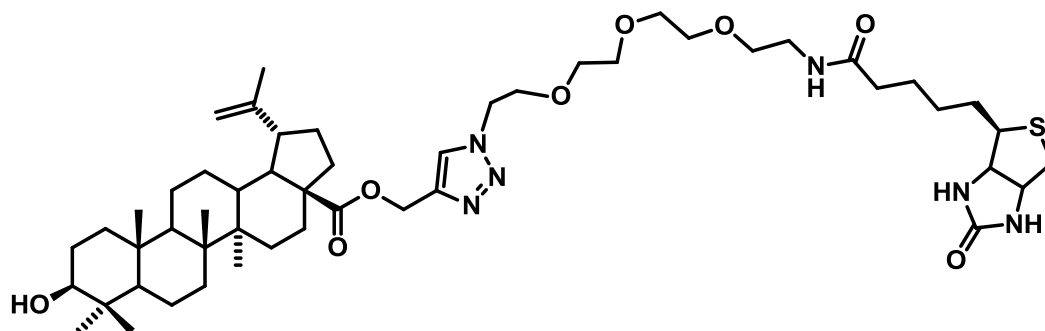
v chloroformu a přečištěn chromatografií na sloupci 50 g silikagelu. Chromatograficky jednotné frakce linkeru **11** byly spojeny s výtěžkem 0,66 g (62,3%) o t. t. 84-89 °C. <sup>1</sup>H-NMR: 0.9-1.1 (m, 1H); 1.4-1.5 (m, 2H); 1.6-1.8 (m, 4H); 2.23 (td, 2H, J<sub>1</sub>=7,45 Hz, J<sub>2</sub>=7,45 Hz, J<sub>3</sub>= 1,72 Hz); 2.75 (d, 1H, J<sub>1</sub>=12,61 Hz); 2.92 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=4,59 Hz, J<sub>2</sub>= 5,83 Hz); 3.2-3.3 (m, 1H); 3.3-3.4 (m, 4H); 3.5-3.6 (m, 2H); 3.67 (m, 10H); 4.32 (m, 1H); 4.5 (m, 1H); 5.49(s, 1H); 6.48 (s, 1H); 6.73 (t, 1H, J<sub>1</sub>=15,15 Hz). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz; CDCl<sub>3</sub>): δ = 25.67, 28.07, 28.15, 35.94, 39.13, 40.51, 50.66, 55.53, 60.16, 61.74, 69.95, 70.01, 70.08, 70.46, 70.65, 77.20, 163.90, 173,29. MS (ESI<sup>+</sup>): m/z (%) = 445 (M<sup>+</sup>+H).

### Obecný postup přípravy biotinylovaných látek

Bylo použito modifikovaného postupu podle literatury (Antimonova *et al.*, 2013).

K propargylované kyselině (0,19 mmol) a linkeru **11** (0,18 mmol v 5 ml DMF) bylo přidáno 21 mg (0,11 mmol) askorbanu sodného s 27 mg (0,11 mmol) CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O. Reakční směs byla 24 hodin míchána při laboratorní teplotě. Poté byla z reakční směsi odfiltrována měď a na RVO odpařeno DMF. Odparek byl rozpuštěn v acetonitrilu a čištěn pomocí HPLC.

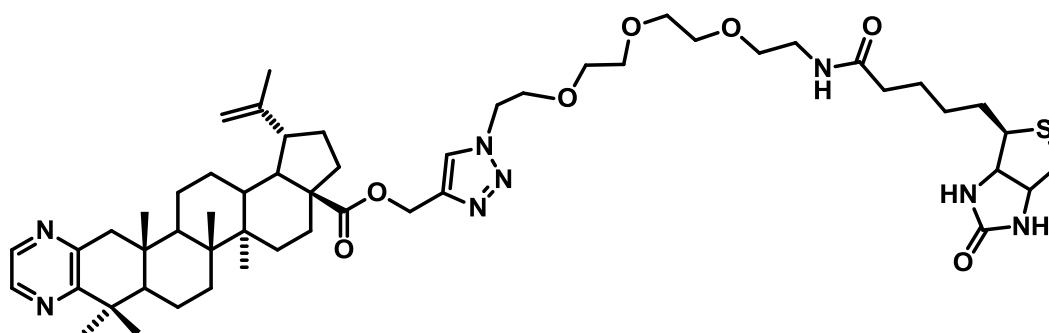
### Příprava biotinylovaného derivátu **8**



Sloučenina byla připravena obecným postupem z 222 mg (0,45 mmol) propargylesteru **5**. Bylo získáno 33 mg (7,8 %) biotinylované kyseliny **8** o t. t. 161-164 °C. <sup>1</sup>H-NMR: 0.73 (s, 3H); 0.75 (s, 3H); 0.80 (s, 3H); 0.93 (s, 3H); 0.95 (s, 3H); 1.67 (s, 5H); 1.94 (m,

4H); 1.93 (m, 4H); 2.11 (td, 2H,  $J_1=11,67$  Hz,  $J_2=2,51$  Hz,  $J_3=2,51$  Hz); 2.19-2.29 (m, 3H); 2.62 (s, 1H); 2.70-2.77 (m, 1H); 2.91 (dd, 1H,  $J_1=4,58$  Hz,  $J_2=4,8$  Hz); 2.29-3.03 (m, 1H); 3.16 (m, 2H); 3.45 (m, 2H); 3.56 (t, 2H,  $J=5,03$  Hz); 3.58-3.64 (m, 9H); 3.88-3.90 (m, 2H); 4.31-4.34 (m, 1H); 4.49-4.60 (m, 4H); 4.72 (d,  $J=2,06$ ); 5.21 (m, 2H); 5.37 (s, 1H); 6.28 (s, 1H); 6.64-6.74 (m, 1H); 7.79 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 14.65, 15.38, 15.60, 16.15, 18.24, 19.29, 20.82, 25.44, 25.53, 27.32, 27.94, 28.05, 28.11, 29.54, 30.50, 31.92, 34.19, 35.85, 36.84, 37.13, 38.25, 38.65, 38.81, 39.09, 40.50, 40.62, 42.32, 46.94, 49.37, 50.19, 50.43, 55.25, 55.47, 46.48, 57.05, 60.13, 61.73, 69.39, 69.93, 70.03, 70.35, 70.40, 70.54, 77.20, 78.87, 109.68, 125.07, 150.41, 163.69, 173.26, 176.04$ . MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  (%) = 940 ( $\text{M}^+\text{+H}$ ).

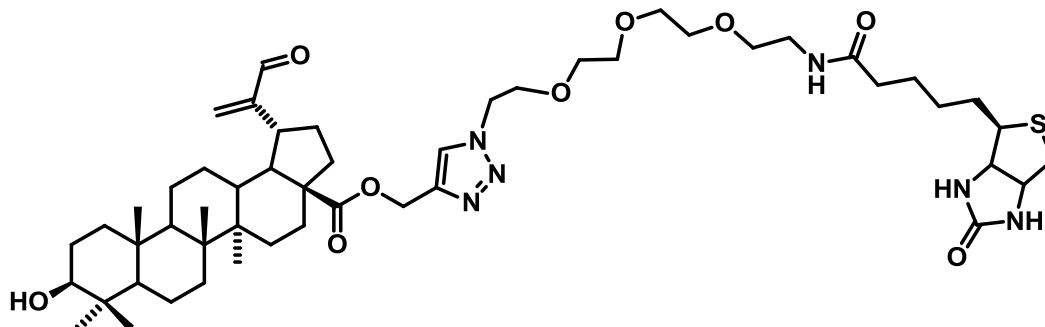
### Příprava biotinylovaného derivátu 9



Byl připraven obecným postupem z 0,2 g (0,38 mmol) propargylovaného pyrazinu **6**. Bylo získáno 150 mg (40,7 %) biotinylovaného pyrazinu **9** o t. t. 164,171.  $^1\text{H}$ -NMR: 0.78 (s, 3H); 0.82 (s, 3H); 0.99 (s, 3H); 1.27 (s, 4H); 1.29 (s, 4H); 1.69 (s, 5H); 2.02 (s, 2H); 2.14-2.3 (m, 4H); 2.44 (d, 1H,  $J=16,5$  Hz); 2.73 (d, 1H,  $J=12,82$  Hz); 2.9 (dd, 1H,  $J_1=12,8$  Hz,  $J_2=4,8$  Hz); 2.96-3.06 (m, 2H); 3.14 (td, 1H,  $J_1=7,33$  Hz,  $J_2=4,7$  Hz,  $J_3=4,7$  Hz), 3.38-3.48 (m, 2H); 3.54-3.57 (m, 2H); 3.6 (d, 8H,  $J=1,49$  Hz); 3.87-3.90 (m, 2H); 4.30-4.33 (m, 1H); 4.46-4.59 (m, 3H); 4.63 (s, 1H); 4.74 (s, 1H,  $J=1,6$  Hz); 5.22 (d, 2H,  $J=2,29$  Hz); 5.49 (s, 1H); 6.43 (s, 1H); 6.70 (m, 1H); 7.79 (s, 1H); 8.27 (d, 1H,  $J=2,29$  Hz); 8.40 (d, 1H,  $J=2,06$  Hz).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 14.61, 15.19, 16.12, 19.34, 20.02, 21.36, 24.01, 25.45, 25.54, 28.04, 28.12, 29.54, 30.51, 31.44, 31.83, 33.21, 35.88, 36.72, 36.80, 38.31, 39.07, 39.42, 40.48, 42.39, 46.88, 48.61, 48.67, 49.27, 50.20, 52.93, 55.30, 56.51, 57.08, 60.12, 61.72, 69.38, 69.93, 70.01, 70.34,$

70.37, 70.53, 99.87, 109.79, 125.05, 141.47, 142.28, 142.97, 150.25, 150.74, 159.58, 163.83, 173.25, 175.99. MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  (%) = 974 (M<sup>+</sup>+H).

### Příprava biotinylovaného derivátu 10



Byl připraven obecným postupem ze 115 mg (0,23 mmol) propargylovaného aldehydu **7**. Bylo získáno 90 mg (41,9 %) biotinylovaného pyrazinu **10** o t. t. 167-170 °C. <sup>1</sup>H-NMR: 0.71 (s, 3H); 0.74 (s, 3H); 0.78 (s, 3H); 0.90 (s, 3H); 0.95 (s, 3H); 1.8-2.1 (m, 4H); 2.09 (td, 2H,  $J_1=11,45$  Hz,  $J_2=3,44$  Hz,  $J_3=3,44$  Hz); 2.17 (s, 1H); 2.21-2.29 (m, 4H); 2.74 (d, 1H,  $J=12,61$  Hz); 2.91 (dd, 1H,  $J_1=13,18$  Hz,  $J_2=4,58$  Hz); 3.13-3.19 (m, 2H); 3.32 (dd, 1H,  $J_1=10,8$  Hz,  $J_2=4,58$  Hz); 3.44 (m, 2H); 3.55 (t, 2H,  $J=5,16$  Hz); 3.61 (s, 8H); 3.88-3.90 (m, 2H); 4.29-4.34 (m, 1H); 4.44-4.64 (m, 3H); 5.23 (dd, 2H,  $J_1=18,9$  Hz,  $J_2=6,3$  Hz); 5.47 (s, 1H); 5.91 (s, 1H); 6.27 (s, 1H); 6.33 (s, 1H); 6.73-6.75 (m, 1H); 7.27 (s, 1H); 7.83 (s, 1H); 9.50 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz; CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 14.51, 15.14, 16.07, 19.99, 21.34, 24.00, 25.53, 27.20, 28.05, 28.13, 29.47, 31.43, 31.62, 33.18, 35.86, 36.60, 36.69, 38.16, 39.08, 39.42, 40.41, 42.30, 48.48, 48.59, 50.18, 52.90, 55.50, 56.57, 57.25, 60.16, 61.73, 69.35, 69.90, 70.02, 70.34, 70.52, 125.10, 134.00, 141.47, 142.31, 142.92, 150.63, 156.01, 159.57, 153.80, 173.29, 175.70, 195.03. MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  (%) = 954 (M<sup>+</sup>+H).

## 4.2 Biologická část

### 4.2.1 Přístrojové vybavení

Sonifikační lázeň (Bandelin sonorex); čistič vody (Direct Q-8, Merck); vortex (Heindolph); pH metr (Denver instrument), laboratorní váhy (Scaltec); inkubátor (Major Science); stolní centrifuga (Eppendorf); odparka vzorků (Eppendorf); termomixér (Eppendorf); Termoblok (Biosan); Vi-CELL XR2.03 (Beckman Coulter); magnet (Life Technologies); temomixér (Biosan); spektrofotometry (Labsystems a Perkin Elmer); inkubátor (Thermo Scientific); mikroskop (Olympus); iontový zdroj (easy spray, Thermo Scientific); prekolona (Aclaim PepMap 100, 100  $\mu\text{m}$  x 2cm, C18, 5  $\mu\text{m}$  100 Å, Thermo Scientific); vlastní kolona (PepMap RSLC, C18, 75  $\mu\text{m}$  x 50 cm, 2  $\mu\text{m}$ , 100 Å, Thermo Scientific); kapalinový chromatograf (ultimate 3000, Dionex); hmotnostní spektrometr (LBQ Orbitrap Elite, Thermo Scientific); software Biolab/Chemorezist; Genesis; MaxQuant v 1.5.2.8; Perseus 1.5.1.6.

### 4.2.2 Chemikálie

Deionizovaná voda; DMSO (Sigma); trypsin gold (Promega); kyselina octová (Fluka); acetonitril (Avantor Performance Materials); Jodoacetamid (Sigma); Tris(2 karboxyethyl)fosfin hydrochlorid (Sigma); kyselina trifluoroctová (Sigma); methanol (Prolabo); 4-ethylmorfolin (Fluka); Inhibitory fosfatáz (Roche); Inhibitory proteáz (Roche); BSA (Sigma); dithiothreitol (Sigma); dodecylsíran sodný (Sigma); peroxidisíran amonný (Serva); N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (Serva);  $^{13}\text{C}_6$  L-Arginin hydrochlorid (Sigma);  $^{13}\text{C}_6$  L-lysin (Sigma);  $^{12}\text{C}_6$  L-Arginin hydrochlorid (Sigma-Aldrich);  $^{12}\text{C}_6$  L-lysin hydrochlorid (Sigma-Aldrich); streptavidinové magnetické kuličky (Life Technologies); Coomassie brilliant blue R-250 (Life Technologies); 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid (Sigma); Penicilin (Biotika); Streptomycin (Biotika); médium RPMI-1640 (Sigma-Aldrich); Médium RPMI-1640 pro SILAC bez argininu a lysinu (Thermo Scientific); fetální telecí sérum (PAN-Biotech); KCl (Sigma-Aldrich); NaCl (Sigma-Aldrich);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Lach-Ner, s.r.o.);  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (Lach-Ner, s.r.o.), Acr-Bis (Amresco), Bradford Reagent (Sigma-Aldrich); tris(hydroxymethyl)aminometan (Serva); kyselina ethylenglykoltetraoctová (Serva); kyselina

ethylendiamintetraoctová (Serva); Triton X-100 (Sigma-Aldrich); Nonidet P 40 (Sigma-Aldrich).

### **4.2.3 Seznam a příprava použitých kultivačních médií**

#### **RPMI-1640**

Bylo připraveno médium obsahující 10 % fetálního telecího séra, 0,01 mg/ml streptomycinu a 10 000 jednotek/ml penicilinu.

#### **Neznačené médium – RPMI-1640 pro SILAC**

Bylo připraveno médium obsahující 10 % fetálního telecího séra 0,004 %  $^{12}\text{C}_6$  L-Lysin hydrochloridu, 0,02 %  $^{12}\text{C}_6$  L-Arginin hydrochloridu, 0,01 mg/ml streptomycinu a 10 000 jednotek/ml penicilinu.

#### **Značené médium – RPMI-1640 pro SILAC**

Bylo připraveno médium obsahující 10 % fetálního telecího séra 0,004 %  $^{13}\text{C}_6$  L-Lysin hydrochloridu, 0,02 %  $^{13}\text{C}_6$  L-Arginin hydrochloridu, 0,01 mg/ml streptomycinu a 10 000 jednotek/ml penicilinu.

### **4.2.4 Seznam a příprava použitých roztoků**

#### 10x koncentrovaný PBS

80 g NaCl, 2g KCl, 32,1 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ , 2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  byl rozpuštěn v 700 ml deionizované vody, pH bylo upraveno na hodnotu 7,4 pomocí HCl a bylo doplněno se do 1 litru deionizovanou vodou, pH bylo zkontrolováno a případně znovu upraveno.

#### 1x koncentrovaný PBS

1 l roztoku 1x PBS byl připraven použitím 100 ml 10x koncentrovaného PBS a 900 ml destilované vody.

### Roztok MTT

MTT bylo rozpuštěno ve sterilním fyziologickém roztoku na výslednou koncentraci 5 mg/ml, roztok byl přefiltrován.

### Roztok 10% SDS

5 g SDS (dodecylsulfátu sodného) bylo doplněno do 500 ml destilovanou vodou, pH bylo upraveno se upravilo na hodnotu 5.

### Denaturační pufr

Složení pufru bylo 250 mmol/l TrisHCl pH 6,8, 10% SDS, 30% glycerol, 25 mmol/l DTT, 0,02% bromfenolová modř.

### Lyzační pufr bez inhibitorů

Obsahoval 20 mmol/l Tris (pH 7,5), 150 mmol/l NaCl, 1mmol/l EGTA, 1 mmol/l EDTA, 0,5% TritonX-100, 0,5% NP-40.

### Zásobní roztok inhibitorů fosfatáz a proteáz

Jednotlivé tablety byly vloženy do mikrozkušavek a rozpuštěny v 500 µl destilované vody a vznikl 100x koncentrovaný roztok.

### 1x PBS + 0,1% BSA

10 mg BSA bylo doplněno do 10 ml 1x PBS.

### 50 mmol/l TCEP

107,49 mg TCEP bylo doplněno na objem 7,5 ml.

### 50 mmol/l IAA

69,36 mg IAA bylo doplněno na objem 7,5 ml.

### EtMf pufr

50 mmol/l EtMF s 10 % ACN, pH 8,3, pH upravovat pomocí AA nebo EtMf.

### Trypsin o koncentraci 500 ng/µl

100 µg trypsinu rozpustíme ve 200 µl 50 mmol/l kyselině octové.



### Trypsinový pufr

Trypsin koncentraci 500 ng/ $\mu$ l naředíme 80x v EtMf pufru.

### 0,1% TFA v 80% ACN

10  $\mu$ l TFA bylo smícháno s 8 ml ACN a doplněno na objem 10 ml MS H<sub>2</sub>O.

### 0,1% TFA

10  $\mu$ l TFA bylo doplněno na objem 10 ml MS H<sub>2</sub>O.

### 50% ACN

5 ml ACN bylo smícháno s 5 ml MS H<sub>2</sub>O.

### 0,5% AA

50  $\mu$ l kyseliny octové bylo doplněno na objem 10 ml MS H<sub>2</sub>O.

### 60% ACN s 0,5% AA

50  $\mu$ l kyseliny octové bylo smícháno s 6 ml ACN a doplněno na objem 10 ml MS H<sub>2</sub>O.

### 0,1% FA

10  $\mu$ l kyseliny mravenčí bylo doplněno na 10 ml MS H<sub>2</sub>O.

### 10x TGS

25 mmol/l Tris, 192 mmol/l glycin, 0,1% (w/v), pH 8,3.

### 1x TGS

1 l roztoku 1x TGS byl připraven použitím 100 ml 10x koncentrovaného TGS a 900 ml destilované vody.

### 4x dělicí pufr

1,5 M Tris-Cl, pH 8,8, 0,4% SDS

### 4x zaostřovací pufr

0,5 M Tris-Cl, pH 6,8, 0,4% SDS

### 10% dělicí gel pro SDS-PAGE

5 ml 4x rozdělovacího pufru, 5 ml 40% Acr-Bis, 10 ml MS H<sub>2</sub>O, 100 µl 10% APS a 20 µl TEMED

### 4% zaostřovací gel pro SDS-PAGE

2,5 ml 4x zaostřovacího pufru, 1 ml 40% Acr-Bis, 6,5 ml MS H<sub>2</sub>O, 100 µl 10% APS a 20 µl TEMED

### Fixační roztok

50% methanol, 10% ledová kyselina octová

### Barvicí roztok

0,1% Coomasie Brilliant Blue R-250, 50% methanol a 10% ledová kyselina octová

### Odbarvovací roztok

40% methanol a 10% ledová kyselina octová

### Skladovací roztok

5% ledová kyselina octová

### MS H<sub>2</sub>O

Voda s čistotou pro hmotnostní spektrometrii byla čištěna přístrojem Direct Q-8

### Analýza pomocí hmotnostní spektrometrie

Loading pumpa – A - 0,1 % (v/v) TFA v MS vodě

B – 80 % ACN v 10% TFE

Průtok - 6 µl/min, izokratiký gradient

Nano pumpa - A – 97,9 % MS vody, 2% ACN, 0,1% FA

B – 9,92 % MS vody, 80% ACN, 10 % TFE, 0,08% FA

Průtok – 0,275 µl/min, lineární gradient

## 4.2.5 Testované látky

Testované látky, patřící do skupiny triterpenů, byly označeny vlastními kódy, které jsou uvedeny u struktur v kapitole 3.1 *Současný stav studované problematiky*. Tyto kódy jsou **1, 3, 4, 8, 9, 10** a jejich chemická struktura je uvedena ve schématu 2 a 3. Příklad ředění látek je uveden v tabulce 1.

**Tabulka 1:** Vzor 96-jamkového panelu pro MTT (ohraničeno dvojitou čarou) a sestupné ředící řady testovaných sloučenin. Koncentrace je uváděna v  $\mu\text{mol/l}$ .

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	BLANK	KONTROLA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	-	
B			33,333	33,333	33,333	33,333	33,333	33,333	33,333	33,333	33,333	33,333	-
C			11,111	11,111	11,111	11,111	11,111	11,111	11,111	11,111	11,111	11,111	-
D			3,704	3,704	3,704	3,704	3,704	3,704	3,704	3,704	3,704	3,704	-
E			1,235	1,235	1,235	1,235	1,235	1,235	1,235	1,235	1,235	1,235	-
F			0,412	0,412	0,412	0,412	0,412	0,412	0,412	0,412	0,412	0,412	-
G			0,137	0,137	0,137	0,137	0,137	0,137	0,137	0,137	0,137	0,137	-
H			0,046	0,046	0,046	0,046	0,046	0,046	0,046	0,046	0,046	0,046	-
			SLOUČENINA 1			SLOUČENINA 2			SLOUČENINA 3				

## 4.2.6 Biologický materiál

Buněčná linie CCRF-CEM, používaná pro experimenty této bakalářské práce, byla zakoupena od firmy ATCC. Tato linie je odvozená od lidské akutní lymfoblastické leukémie.

## 4.2.7 Kultivace a pasážování buněk

Kultivace buněk probíhala v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% atmosféře CO<sub>2</sub>. Veškerá práce s buňkami a jejich médii probíhala ve sterilním prostředí.

Kultivace byla zahájena v plastové kultivační lahvi o objemu 25 ml. Buňky byly dále pasážovány pravidelně třikrát týdně.

Pro pasážování buněčné linie CCRF-CEM byl použit následující postup. Láhev byla zkontrolována pod inverzním světelným mikroskopem, aby byla vyloučena kontaminace. Přesná koncentrace a životaschopnost buněk v kultivační lahvi byla spočítána pomocí přístroje Vi-CELL. Buňky byly přeneseny do plastové zkumavky o objemu 50 ml a centrifugovány při laboratorní teplotě 5 minut a 1600 rpm. Staré a nutričně vypotřebované médium bylo slito invertováním zkumavky a peleta byla resuspendována v 1 ml nového média. Tato peleta byla převedena do nové kultivační lahve a doplněna 37°C médiem RPMI-1640 na požadovanou koncentraci 400 000 – 600 000 buněk na 1 mililitr. Kultivační láhev byla poté vrácena zpět do inkubátoru.

## **4.2.8 MTT test**

### **Příprava zásobních panelů**

Syntetizované látky v rámci této bakalářské práce byly rozpuštěny v DMSO na koncentraci 10 mmol/l a tyto zásobní roztoky byly uchovávány v -20 °C. Na test byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 500 µmol/l.

### **Příprava pracovních panelů**

Bylo nasazeno 125 000 buněk na 1 jamku. Množství buněk v kultivační lahvi bylo spočítáno přístrojem Vi-CELL a potřebný objem buněčné suspenze, které bylo potřeba na celý 96ti jamkový panel, přenesen do plastové zkumavky a centrifugován 5 minut při 1600 rpm a laboratorní teplotě. Médium bylo slito invertováním zkumavky a peleta byla resuspendována v 1 ml média. Peleta byla přenesena do Petriho misky s médiem, aby vznikla požadovaná koncentrace 125 000 buněk na jamku. Do prvního sloupce, blanku viz tabulka 1, bylo napipetováno 100 µl média. Do druhého sloupce, tedy kontroly, bylo napipetováno 100 µl buněk a do zbývajících sloupců 80 µl buněk. Do sloupců 3 až 11 bylo v tripletech přeneseno multikanálovou mikropipetou po 20 µl ředící řady sloučeniny předem připravené

v zásobních panelech. Panely byly popsány a inkubovány po dobu 72 hodin. Každý MTT test proběhl ve trojím opakování.

### **Ukončení MTT testu**

Po 72 hodinové inkubaci bylo do každé využití jamky v panelech napipetováno 10  $\mu$ l MTT a panely vloženy zpět do inkubátoru. Po dvou až třech hodinách byly panely zkontrolovány, zda se v jamkách vytvořilo dostatečné množství nerozpustných krystalů formazanu. Pokud byla tvorba krystalů dostatečná bylo do každé jamky multikanálovou pipetou přidáno 100  $\mu$ l 10% SDS, který rozpustil krystaly formazanu.

### **Spektrofotometrie a analýza výsledků MTT testu**

Měření proběhlo následující den po přidání 10% SDS. Všechny panely byly měřeny spektrofotometricky při vlnové délce 540 nm. Interpretace výsledků proběhla pomocí programu Cytorezist verze 3.3.3.

## **4.2.9 Metoda SILAC**

Buněčná linie CCRF-CEM byla nasazena na kultivační lahve o objemu 25 ml. Po třech dnech byla linie nasazena do 50 ml kultivační lahve. Třikrát týdně byla poté provedena pasáž buněk tímto způsobem.

Počet značených a neznačených buněk v kultivační lahvi byl spočítán a z každé kultivační lahve bylo asi 2/3 buněčné suspenze slito do odpadu a doplněno značeným nebo neznačeným médiem na koncentraci 400 000 – 600 000 buněk na 1 mililitr. Po 5 - 6 pasážích obsahovala každá buňka v kultivační lahvi buď značenou, nebo neznačenou aminokyselinu, kterou začlenila do svých proteinů.

#### **4.2.10 Příprava proteinových lyzátů**

Bylo odebráno  $50 \times 10^6$  buněk. Suspenze byla centrifugována v 50 ml plastových zkumavkách 5 minut při 1600 rpm v centrifuze vychlazené na 4 °C. Médium bylo slito invertováním zkumavky a peleta resuspendována v 1 ml 1x PBS a doplněna 19 ml 1x PBS. Buňky byly opět centrifugovány 5 minut při 1600 rpm a 4 °C (tento postup byl opakován 2x). Z pelety bylo odlito PBS invertováním zkumavky a bylo přidáno 0,5 ml vychlazeného lyzačního pufru spolu s 5  $\mu$ l zásobního roztoku inhibitoru fosfatáz a 5  $\mu$ l zásobního roztoku inhibitoru proteáz. Lýza buněk proběhla na ledu během 30 minut. Lyzát buněk byl centrifugován při 14 000 rpm 10 minut ve vychlazené centrifuze na 4°C. Supernatant, obsahující proteiny, byl odebrán a použit v dalším kroku.

#### **4.2.11 Afinitní purifikace proteinů pomocí magnetických kuliček**

Testovaná sloučenina je v tomto uspořádání ukotvena na streptavidinem modifikované pevné fázi (magnetických kuličkách) přes triethylenglykolový linker zakončený molekulou biotinu. Takto ukotvená testovaná sloučenina interaguje s proteiny buněčného lyzátu, které se na ní mohou specificky vázat.

Streptavidinem modifikované magnetické kuličky (pevná fáze) byly resuspendovány v původním obalu na vortexu. Do čtyř minieppendorfek bylo přidáno 50  $\mu$ l magnetických kuliček a 100  $\mu$ l 1x PBS. Magnetické kuličky byly resuspendovány, umístěny na magnet a pufr odsát. Promývání 1x PBS bylo opakováno třikrát. Ke kuličkám bylo přidáno 100  $\mu$ l pracovního roztoku s biotinylovanou molekulou o koncentraci 100  $\mu$ mol/l a tento roztok se nechal inkubovat 30 minut při laboratorní teplotě na třepačce. Magnetické kuličky s navázanou biotinylovanou molekulou byly separovány na magnetu po dobu 2-3 minut a nenavázaná biotinylovaná sloučenina odsáta. Kuličky byly pětkrát promyty ve 100  $\mu$ l 1x PBS s 0,1% BSA. Do dvou minieppendorfek bylo přidáno 50  $\mu$ l neznačeného buněčného lyzátu. Do jedné z těchto minieppendorfek bylo přidáno 100  $\mu$ l 500  $\mu$ M volného terpenu a do druhé minieppendorfky 100  $\mu$ l DMSO. Stejný postup byl použit také u značeného lyzátu. Minieppendorfky byly inkubovány dvě hodiny za občasného promíchání na ledu. Po inkubaci byly magnetické kuličky umístěny na magnet, lyzát byl odsát a magnetické kuličky promyty 100  $\mu$ l 1x PBS. Neznačený lyzát byl spojen se značeným lyzátem a v dalším kroku se

experiment provedl s opačným uspořádáním. Po spojení byly magnetické kuličky promyty 100  $\mu$ l 1x PBS a pufr odsát a tento postup byl dále opakován dvakrát. Od magnetických kuliček bylo dokonale odsáto PBS a přidáno 30  $\mu$ l denaturačního pufru, s kterým byly kuličky povařeny 5 minut při teplotě 95 °C. Tímto krokem proběhla denaturace proteinů, navázaných na biotinylovanou molekulu, které se uvolnily do eluátu. Eluát byl odebrán do nových minieppendorfek a nanesen na SDS-PAGE elektroforézu.

#### **4.2.12 Separace jednotlivých proteinů pomocí SDS-PAGE elektroforézy**

SDS-PAGE elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného je metoda využívaná k rozdělení proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti, délce polypeptidového řetězce a na stupni rozbalení neboli denaturace. Pro digesci proteinů v gelu bylo potřeba proteiny rozdělit pomocí SDS-PAGE elektroforézy v polyakrylamidovém gelu.

Eluát s proteiny z kapitoly 4.2.11 *Afinitní purifikace proteinů pomocí magnetických kuliček* byl denaturován 5 minut při teplotě 95 °C. Pro separaci proteinů byla zvolena tloušťka gelu 1 mm. Mezi skla byl injekční stříkačkou nanesen asi do 3/4 výšky dělicí gel a zalit asi 100  $\mu$ l MS H<sub>2</sub>O pro vyrovnání vrstvy. Gel se nechal zatuhnout 45 minut. Po zatuhnutí byla voda odsáta filtračním papírem, injekční stříkačkou byl po horní hranici skla nanesen zaostřovací gel (složení viz kapitola *Seznam a příprava použitých roztoků*) a vložen hřebínek. Během tuhnutí byla sestavena elektroforetická aparatura a zalita roztokem 1x TGS. Do další jamky bylo opatrně naneseo 30  $\mu$ l vzorku. Pro zaostření vzorku bylo nastaveno napětí 80 V po dobu 20 minut. Po této době bylo nastaveno napětí na 100 V a separace proteinů probíhala asi hodinu, než byly proteiny rozděleny.

#### **4.2.13 Fixace a barvení gelu po SDS-PAGE elektroforéze**

Fixace byla provedena v Petriho misce ve fixačním roztoku po dobu dvou hodin při mírném míchání. Během první hodiny fixace byl roztok vyměněn za nový. Barvení proteinů v gelu pomocí Comassie Blue probíhalo barvicím roztokem po dobu 20 minut při laboratorní teplotě za mírného míchání. Gel byl odbarven odbarvovacím roztokem za laboratorní

teploty, který byl měněn, dokud nebylo pozadí gelu zcela odbarveno. Gel byl skladován v lednici v 5% ledové kyselině octové.

#### **4.2.14 Digesce proteinů pro hmotnostní spektrometrii**

Gel z elektroforézy byl opláchnut vodou s čistotou pro hmotnostní spektrometrii (MS H<sub>2</sub>O). Gel byl nařezán na jednocentimetrové plátky. Každý plátek byl nařezán na 1x1 mm kostky, které byly přeneseny do čisté eppendorfky. K nakrájeným plátkům bylo přidáno 800 µl ACN a sonifikováno pět minut, poté byl ACN odebrán.

Redukce proteinů proběhla přidáním 300 µl 50 mM TCEP a povařením při 90°C po dobu deset minut a poté byl TCEP odebrán. Po redukcí proběhlo promytí pomocí 800 µl MS H<sub>2</sub>O a sonifikace po dobu pět minut, poté byla MS H<sub>2</sub>O odebrána. Ke gelu bylo přidáno 800 µl ACN, který se sonifikoval pět minut a následně byl odebrán.

Alkylace proteinů proběhla přidáním 300 µl 50 mM IAA. Roztok byl inkubován 1 hodinu ve tmě a IAA poté odebráno. Po alkylationi byl gel promyt pomocí 800 µl MS H<sub>2</sub>O a sonifikace po dobu pěti minut, poté byla MS H<sub>2</sub>O odebrána. Ke gelu bylo přidáno 800 µl ACN, který se sonifikoval pět minut a následně byl odebrán. Postupně byly předešlé dva kroky promývání ještě dvakrát opakovány. V posledním kroku promývání bylo ke gelu přidáno 800 µl 50% ACN, který byl pět minut sonifikován a následně odebrán.

Trypsinizace proteinů proběhla přidáním 300 µl trypsinového pufru ke gelu, který byl následně inkubován při 37°C přes noc. Následná extrakce peptidů proběhla následujícím způsobem.

Eppendorfky byly zchlazeny na laboratorní teplotu, stočeny v centrifuze a kapalný obsah byl přenesen do nových eppendorfek. Ke gelu bylo přidáno 200 µl 0,1% TFA v 80% ACN, deset minut byl sonifikován a poté byl kapaný obsah přenesen do již zmíněných nových eppendorfek. Ke gelu bylo přidáno 300 µl 0,1 % TFA, 10 minut sonifikováno, poté byl obsah přenesen do nových eppendorfek. Ke gelu bylo přidáno 200 µl 50 % ACN, 10 minut sonifikováno, poté byl obsah opět přenesen do nových eppendorfek. Extrakty byly odpařeny.



#### **4.2.15 Purifikace peptidů na C18 koloně ve špičkách**

Do žlutých špiček byla vložena C18 kolona a označené špičky vloženy do 1,5 ml eppendorfek. Vzorky po trypsinizaci byly rozpuštěny 100  $\mu$ l 0,5% AA. Do špiček bylo přidáno 100  $\mu$ l MeOH a byly stočeny dvě minuty při 3000x g. Do špiček bylo poté přidáno 100  $\mu$ l 60% ACN s 0,5% AA, stočeno při 3000x g, dvě minuty. Dále bylo do špiček přidáno 100  $\mu$ l 0,5% AA a byly stočeny dvě minuty při 3000x g. Následně bylo do špiček přidáno 100  $\mu$ l vzorku a špičky stočeny dvě minuty při 3000x g. Po stočení bylo do špiček přidáno 100  $\mu$ l 0,5% AA, stočeno při 3000x g, dvě minuty a špičky přeneseny do nových eppendorfek. Eluce peptidu z C18 kolony proběhla přidáním 100  $\mu$ l 60% ACN s 0,5% AA a stočením 5000x g po dobu pěti minut. Eluát byl následně připraven na analýzu pomocí hmotnostního spektrometru tímto způsobem.

Eluát byl po purifikaci odpařen a čisté peptidy byly rozpuštěny pomocí 1  $\mu$ l 0,1% TFA v 80% ACN. Peptidy byly naředěny 19  $\mu$ l 0,1% FA na konečný objem vzorku 20  $\mu$ l. Vzorek byl přenesen do inzertu, který byl umístěn do vialky.

#### **4.2.16 Stranovení koncentrace proteinů podle Bradfordové v mikrotitrační destičce.**

Byla připravena koncentrační řada standardu BSA od 0,1 – 1,4 mg/ml. Do 96-ti jamkového panelu bylo přidáno 5  $\mu$ l proteinových standardů a do jamek s blankem přidáno 5  $\mu$ l lyzovacího pufru. 5  $\mu$ l lyzátu bylo inkubováno 30 minut s 250  $\mu$ l roztoku Bradford Reagent. Absorbance byla odečtena při 595 nm. Standardní křivka byla sestrojena pomocí standardů BSA. V případě obsahu proteinů vyšší než 1,4 mg byl lyzát 2x zředěn lyzačním pufrem.

## 5 Výsledky a diskuze

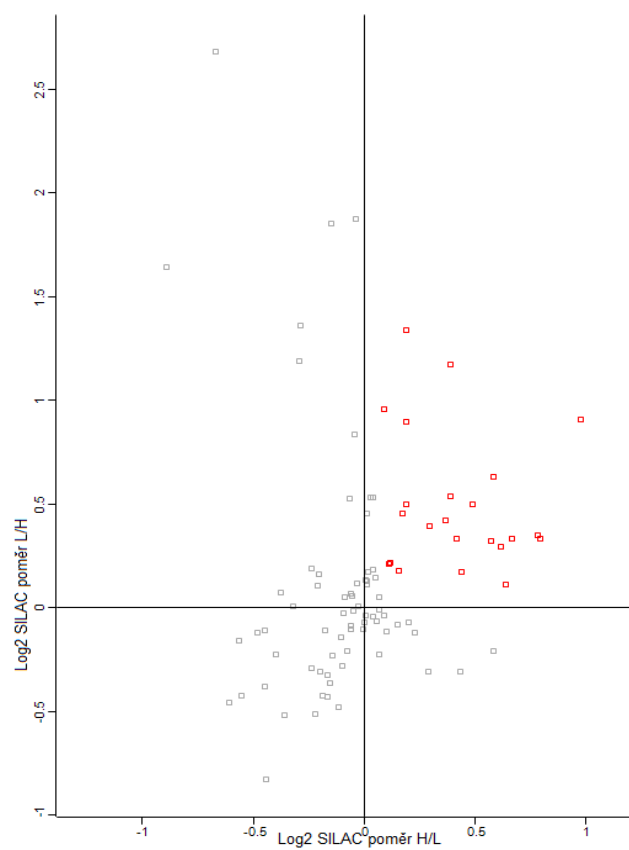
V chemické části této bakalářské práce byly úspěšně připraveny tři biotinylované sloučeniny a metody jejich syntézy a purifikace byly optimalizovány. Biotinylované sloučeniny byly společně s jejich volnými (nebiotinylovanými) deriváty otestovány pomocí MTT testu, který hodnotí míru cytotoxicity. Buněčná linie CCRF-CEM se inkubovala tři dny s testovanými látkami **1**, **3**, **4** a **8**, **9**, **10**. Testování proběhlo ve třech nezávislých opakováních a hodnoty jednotlivých měření byly zprůměrovány.

**Tabulka 2:** Výsledné hodnoty ze tří měření (průměr hodnot  $IC_{50}^a \pm$  směrodatná odchylka) získané při vyhodnocování jednotlivých MTT testů. Hodnoty jsou uvedeny v  $\mu\text{mol/l}$ .

Kód sloučenin					
<b>1</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
17,72 $\pm$ 0,87	1,14 $\pm$ 0,09	2,46 $\pm$ 0,33	16,28 $\pm$ 1,76	1,66 $\pm$ 0,36	3,63 $\pm$ 1,45

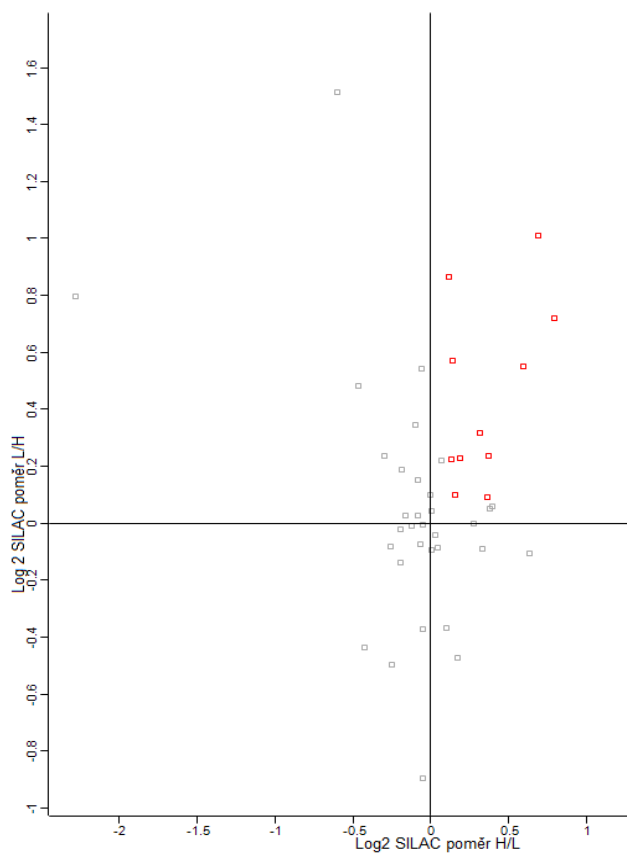
<sup>a</sup> Nejnižší koncentrace, která zabije 50 % nádorových buněk.

Během prvních experimentů bylo nalezeno mnoho proteinů, které by mohly být molekulárními cíli testovaných sloučenin. Jako první sloučenina pro hledání molekulárního cíle byla zvolena kyselina betulinová **1**. Z 2 mg/ml celkových proteinů v buněčném lyzátu, bylo nalezeno celkem 24 specificky se vážících proteinů. Jedním z nich byla i DNA topoisomerasa I, jež byla identifikována jako molekulární cíl i předchozími vědeckými skupinami pomocí jiné metodiky (Chowdhury *et al.*, 2002; Ganguly *et al.*, 2007).



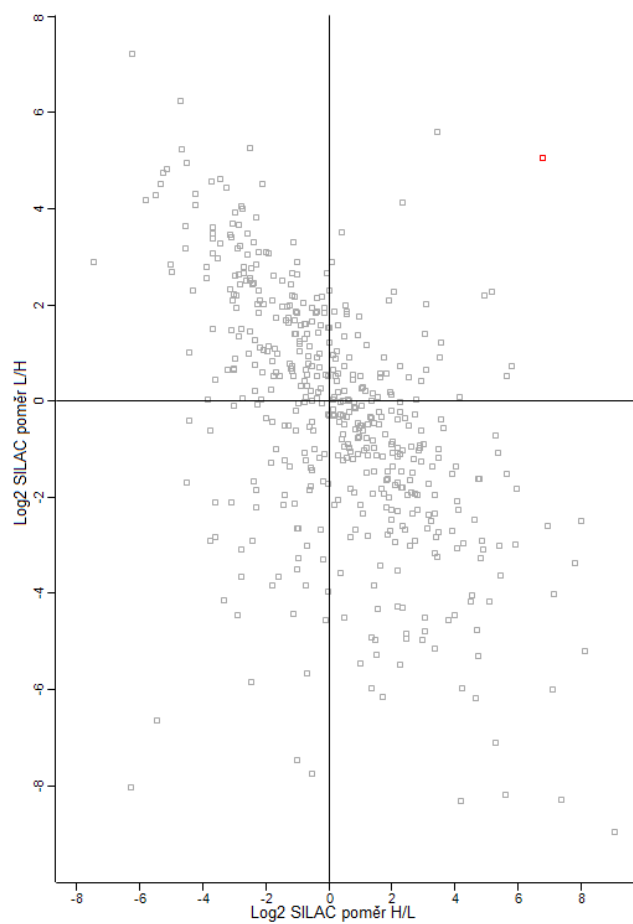
**Obrázek 6:** Diagram Log2 SILAC experimentu, kde jsou specificky vázané proteiny v pravém horním kvadrantu. Kyselina betulinová **1**.

Další testovaná látka byl pyrazin **3**, u kterého se z celkového množství 2 mg/ml proteinů podařilo nalézt 11 proteinů, které se specificky vázaly ke sloučenině **3**.



**Obrázek 7:** Diagram Log2 SILAC experimentu, kde jsou specificky vázané proteiny v pravém horním kvadrantu. Sloučenina **3**.

Poslední testovanou látkou byl aldehyd **4**. Z celkového počtu 2 mg/ml proteinů bylo nalezeno celkem 34 specificky se vážících proteinů.



**Obrázek 8:** Diagram Log2 SILAC experimentu, kde jsou specificky vázané proteiny v pravém horním kvadrantu. Sloučenina **4**.

## 6 Závěr

V této práci jsme se věnovali problematice tritepenů, jejich derivátů a pokusu o nalezení mechanismu účinku. Jako první byly připraveny deriváty kyseliny betulinové a jejich propargyl estery, ke kterým byl pomocí Huisgenovy cykloadice připojen vhodně substituovaný biotin. Metoda přípravy biotinylovaných sloučen byla optimalizována a bude použita v dalším výzkumu.

Dalším cílem této práce bylo stanovení cytotoxicity připravených sloučenin pomocí MTT testu. Cytotoxicita byla stanovena na nádorové buněčné linie akutní lymfoblastické leukemie. Bylo zjištěno, že některé biotinylované sloučeniny měly, oproti očekávání, podobnou hodnotu  $IC_{50}$  jako jejich volné (nebiotinylované deriváty). V dalších experimentech by bylo vhodné stanovit cytotoxicitu i na dalších nádorových buněčných liniích.

V neposlední řadě bylo našim cílem optimalizovat biotin/streptavidin afinitní chromatografii pomocí kvantitativní proteomiky a metody SILAC. V prvních experimentech byla u každé sloučeniny nalezena skupina proteinů, se kterými sloučeniny **1**, **3** a **4** selektivně interagují. Za úspěch můžeme považovat nalezení enzymu topoisomerasy I, která je již známým cílem. Názvy ostatních selektivně se vážících proteinů neuvádím z důvodů možné patentové ochrany, pro tu bude ovšem nutná jejich validace.

Na tomto místě je však nutné zdůraznit, že se jedná o první výsledky z několika málo experimentů a že pro jejich potvrzení bude nutné provést další optimalizace promývacích kroků, koncentrace proteinů v lyzátu, experimenty z různou délkou linkeru apod. Stejně tak finální interpretace těchto výsledků bude možná až po provedení experimentů s molekulami navázanými přes jiné funkční skupiny (jednak přes a jednak mimo předpokládaný farmakofor) a po srovnání výsledků z větší skupiny modifikovaných terpenických molekul.

Na závěr lze konstatovat, že stanovené cíle bakalářské práce byly beze zbytku splněny.

## 7 Seznam použité literatury

Antimonova, A. N., Petrenko, N. I., Shakirov, M. M., Rybalova, T. V., Frolova, T. S., Shults, E. E., Kukina, T. P., Sinitsyna, O. I., Tolstikov, G. A. (2013): Synthesis and study of mutagenic properties of lupane triterpenoids containing 1,2,3-triazole fragments in the c-30 position. *Chemistry of Natural Compounds*;49(4): 657-664.

Black, M. M., Speer, F. D. (1954): Effects of glucocorticoids and mineralocorticoids on dehydrogenase activity of adrenal slices; in vitro experiments with control and tumor-bearing mice. *AMA Arch Pathol.*;58(5):433-42.

Fu, Y., Zhou, E., Wei, Z., Liang, D., Wang, W., Wang, T., Guo, M., Zhang, N., Yang, Z. (2014): Glycyrrhizin inhibits the inflammatory response in mouse mammary epithelial cells and a mouse mastitis model. *FEBS J.*;281(11): 2543-57.

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

Gao, X., Deeb, D., Hao, J., Liu, Y., Arbab, A. S., Dulchavsky, S. A., Gautam, S. C. (2010): Synthetic triterpenoids inhibit growth, induce apoptosis and suppress pro-survival Akt, mTOR and NF- $\kappa$ B signaling proteins in colorectal cancer cells. *Anticancer Res.*;30(3):785-92.

Huang, K. C. (1993): *The Pharmacology of Chinese Herbs*. Tokyo: CRC Press.

Huisgen, R. (1961): "Centenary Lecture - 1,3-Dipolar Cycloadditions". *Proceedings of the Chemical Society of London*: 357.

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

Innocente, B., Casanova, B. B., Klein, F., Lana, A. D., Pereira, D., Muniz, M. N., Sonnet, G. G., Fuentefria, A. M., Gnoatto, S. C. (2014): Synthesis of isosteric triterpenoid derivatives and antifungal activity. *Chem Biol Drug Des.*;83(3):344-9.

Kolb, H. C., Finn, M. G., Sharpless, K. B. (2001). Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew Chem Int Ed Engl.*;40(11):2004-2021.

Mirata, M. A., Schewe, H., Schrader, J., (2015): Integrated bioprocess approaches for the microbial production of terpenoids. V knize *Terpenoids and squalene – biosynthesis, functions, and health implications*, editor Alanna R. Bates, Nova Science Publishers, Inc., New York, USA. 1 – 24.

Mosmann T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.*;65(1-2):55-63.

Ovesná, Z., Vachalková, A., Horváthová, K., Táthová, D. (2004): Pentacyclic triterpenoid acids: new chemoprotective compounds. *Neoplasma.*;51: 327–333.

Petronelli, A., Pannitteri, G., Testa, U. (2009): Triterpenoids as new promising anticancer drugs. *Anticancer Drugs.*;20(10):880-92.



Pisha, E., Chai, H., Lee, I. S., Chagwedera, T. E., Farnsworth, N. R., Cordell, G. A., Beecher, C. W., Fong, H. H., Kinghorn, A. D., Brown, D. M., *et al.* (1995): Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis., *Nat Med.*; 1(10): 1046-51.

Qian, K., Kim, S. Y., Hung, H. Y., Huang, L., Chen, C. H., Lee, K. H. (2011): New betulinic acid derivatives as potent proteasome inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.*;21(19):5944-7.

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

Sarek, J., Klinot, J., Dzubak, P., Klinotova, E., Noskova, V., Krecek, V., Korinková, G., Thomson, J. O., Janostakova, A., Wang, S., Parsons, S., Fischer, P. M., Zhelev, N. Z., Hajduch, M. (2003): New lupane derived compounds with pro-apoptotic activity in cancer cells: synthesis and structure-activity relationships. *J Med Chem.*;46(25):5402-15.

Sarek, J., Klinot, J., Dzubak, P., Klinotova, E., Noskova, V., Krecek, V., Korinkova, G., Thomson, J. O., Janostaková, A., Wang, S., Parsons, S., Fischer, P. M., Zhelev, N. Z., Hajduch, M. J. (2003): New lupane derived compounds with pro-apoptotic activity in cancer cells: synthesis and structure-activity relationships. *J Med Chem.*;46(25):5402-15.

Sejbal, J., Klinot, J., Protiva, J., Vystrcil, A. (1986): Reactions of triterpenoid ketones with sulfur and morpholine under the conditions of Willgerodt-Kindler reaction *Collect. Czech. Chem. Commun.*;51, 118-127.

Sultana, N., Ata, A. (2008): Oleanolic acid and related derivatives as medicinally important compounds. *J Enzyme Inhibition Med Chem.*; 23: 739–756.

Trumbul, E. R., Bianchi, E., Eckert, D. J., Wiedhopf, R. M., Cole, J. R., (1976): Tumor inhibitory agents from *Vauquelinia corymbosa* (Rosaceae)., *J Pharm Sci.*; 65(9): 1407-8.

Urban, M., Sarek, J., Kvasnica, M., Tislerova, I., Hajduch, M. (2007): Triterpenoid pyrazines and benzopyrazines with cytotoxic activity. *J Nat Prod.*; 70(4):526-32.

Urban, M., Vlk, M., Dzubak, P., Hajduch, M., Sarek, J. (2012): Cytotoxic heterocyclic triterpenoids derived from betulin and betulinic acid. *Bioorg Med Chem.*;20(11):3666-74.

Vundyala, N., Sun, C., Sidime, F., Shi, W., L'Amoreaux, W., Raja, K., Peetz, R. M. (2008): Biotin-functional oligo(*p*-phenylene vinylene)s synthesized using click chemistry. *Tetrahedron Letters.*;49(45):6386–6389.

Wang, C., Lu, L., Na, H., Li, X., Wang, Q., Jiang, X., Xu, X., Yu, F., Zhang, T., Li, J., Zhang, Z., Zheng, B., Liang, G., Cai, L., Jiang, S., Liu, K. (2014): Conjugation of a nonspecific antiviral sapogenin with a specific HIV fusion inhibitor: a promising strategy for discovering new antiviral therapeutics. *J Med Chem.*;57(17):7342-54.

Xu, J., Li, Z., Luo, J., Yang, F., Liu, T., Liu, M., Qiu, W. W., Tang J. (2012): Synthesis and biological evaluation of heterocyclic ring-fused betulinic acid derivatives as novel inhibitors of osteoclast differentiation and bone resorption. *J Med Chem.*;55(7):3122-34.

Xu, Z. X., Liang, J., Haridas, V., Gaikwad, A., Connolly, F. P., Mills, G. B., Gutterman, J. U. (2007): A plant triterpenoid, avicin D, induces autophagy by activation of AMP-activated protein kinase. *Cell Death Differ.*;14(11):1948-57.

Zuo, W. J., Dai, H. F., Chen, J., Chen, H. Q., Zhao, Y. X., Mei, W. L., Wang, J. H. (2011):  
Triterpenes and triterpenoid saponins from the leaves of *Ilex kudincha*. *Planta  
Med.*;77(16):1835-40.

## 8 Seznam použitých zkratek a symbolů

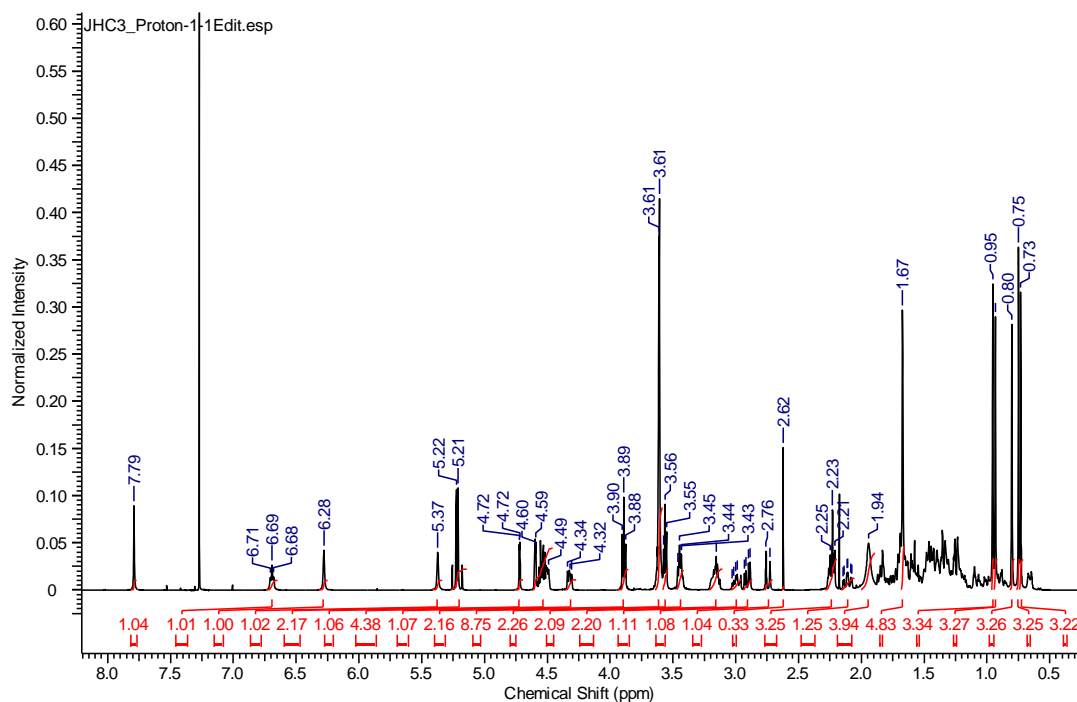
AA-	kyselina octová
ACN-	acetonitril
Acr-Bis-	acrylamid/bis-acrylamid
APS-	persíran amonný
BSA-	bovine serum albumin/Hovězí sérový albumin
CDI-	karbonyldiimidazol
DDT-	dithiotreitol
DMF-	dimethylformamid
DMSO-	dimethylsulfoxid
EDTA-	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGTA-	kyselina ethylenglykoltetraoctová
ELFO-	elektroforéza
FA-	kyselina mravenčí
HPLC-	high-performance liquid chromatography/vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IAA-	kyselina indoloctová
IR-	infrared spectroscopy/infračervená spektroskopie
LC-ESI-	liquid chromatography–mass spektrometry/ kapalinová chromatografie-hmotnostní spektrometrie
MeOH-	methanol
MS H <sub>2</sub> O-	voda s čistotou pro hmotnostní spektrometrii
NMR-	nuclear magnetic resonance spectroscopy/ spektroskopie nukleární magnetické resonance
r. t. -	laboratorní teplota

rpm-	otáčky za minutu
RVO –	rotační vakuová odparka
SDS-	dodecylsírán sodný
t. t- t	eplota tání
TCEP-	tris(2-karboxyethyl)fosfin
TEMED-	N,N,N',N'-tetramethylethyldiaminu
TFA-	kyselina trifluoroctová
TFE-	trifluoroethanol
TGS-	tris/glycin/SDS pufr
TK H <sub>2</sub> O-	autoklávovaná sterilní voda
TLC-	thin layer chromatography/chromatografie na tenké vrstvě
Tris-	tris(hydroxymethyl)aminometan

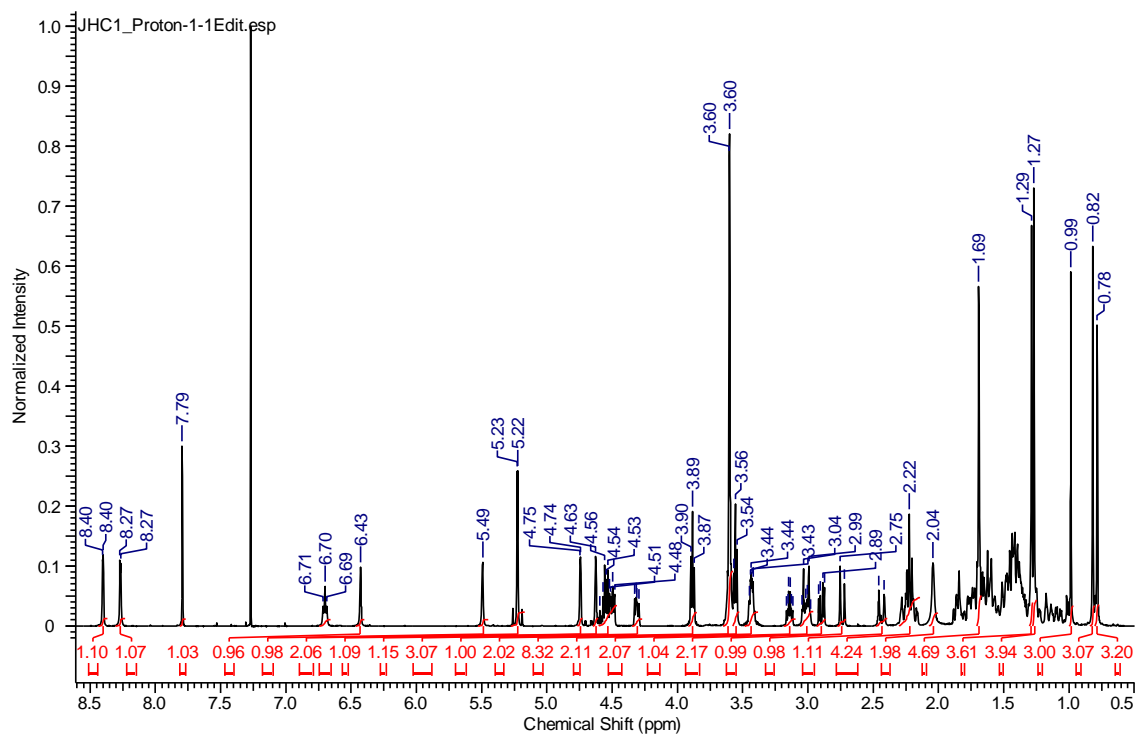
# 9 Přílohy

## <sup>1</sup>H NMR spektra biotinylovaných derivátů 8 – 10.

### Sloučenina 8



### Sloučenina 9



Sloučenina 10.

