

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Cílení proteinu NPL4 v protinádorové terapii

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Magdaléna Kempná
Studijní program: Biochemie
Studijní obor: Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: Mgr. Zdeněk Škrott, Ph.D.
Rok: 2022

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením Mgr. Zdeňka Škrotta, Ph.D., a pouze s použitím citované literatury. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena, že se na mou práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci,

.....

Podpis bakaláře

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především mému vedoucímu práce Mgr. Zdeňku Škrottovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady, které mi při vypracování této bakalářské práce věnoval. Děkuji také za všechnu pomoc, věnovaný čas, a hlavně neobyčejnou trpělivost, kterou se mnou měl během experimentální části této práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Magdaléna Kempná
Název práce	Cílení proteinu NPL4 v protinádorové terapii
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Zdeněk Škrott, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022

Abstrakt

Bakalářská práce se věnuje cílení derivátů komplexů DTC s mědí na kofaktor segregasy p97 NPL4. Literární přehled je zaměřen na ubikvitin-proteazomový systém a segregasu p97, jež je nedílnou a nezbytnou součástí UPS jako regulátor proteostázy. Kofaktory p97 Ufd1/NPL4 obsahují motiv rozpoznávající ubikvitin, čímž umožňují segregase rozpoznávat polyubikvitinované substráty a následně je zpracovat. V posledních letech byl výzkum zaměřen na znovuvyužití již známých léků pro jiné indikace, např. léčbu rakoviny, čímž si získal pozornost lék na bázi diethylthiokarbamátu Antabus a jeho inhibiční účinky na p97 a protinádorové vlastnosti. Narušení proteostázy lze využít i pro léčebné účely, kdy narušení vede k akumulaci proteinů, proteotoxicitě a následnému navození apoptózy čímž se zpomalí či úplně zastaví růst tumoru.

Klíčová slova	UPS, p97, proteinová agregace, HSR, DSF, CuET
Počet stran	68
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Magdaléna Kempná
Title	Targeting NPL4 protein in cancer therapy
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Zdeněk Škrott. Ph.D.
The year of presentation	2022

Abstract

This bachelor thesis deals with the topic of targeting the cofactor of segregase p97 NPL4 by derivatives of DTC. The literary review is focused on the ubiquitin-proteasome system and segregase p97, which is as regulator of proteostasis an essential component of the UPS. Its cofactors Ufd1/NPL4 contain a ubiquitin-recognizing motif, which allows the segregase to recognize the polyubiquitinated substrates for furthermore processing. In the last years the attention of researches was focused on drug repurposing, where diethylthiocarbamate based drug Antabus was put in the light because of its inhibition effects on p97 and anticancer properties. Disruption of proteostasis can be used for medical purposes, as the disruption leads to accumulation of proteins, proteotoxicity and further on to induction of apoptosis, which slows down or completely stops the growth of the tumor. The effector substance CuET unfortunately was not a big success in clinical trials, but its research is still ongoing, because of its low stability.

Keywords	UPS, p97, protein aggregation, HSR, DSF, CuET
Number of pages	68
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1. Úvod	1
2. Současný stav řešené problematiky	2
2.1 Ubikvitin proteazomový systém (UPS)	2
2.1.2 Biologické funkce	2
2.1.3 Základní struktura proteazomu	2
2.1.4 Mechanismus	6
2.1.5 Ubikvitinace	7
2.2 p97	11
2.2.1 Základní stavba	11
2.2.2 Kofaktory p97	12
2.2.3 Mechanismus účinku	14
2.2.4 Funkce p97	16
2.2.5 Kontrola kvality proteinů (PQC)	18
2.2.6 Nemoci spojené s p97	20
2.2.7 Specifické inhibitory p97	21
2.3 Proteinová agregace	23
2.3.1 Skládání proteinů	23
2.3.2 Proteinové agregáty	25
2.3.3 UPR (unfolded protein response)	27
2.3.4 Patologie spojená s nesprávně složenými proteiny	28
2.3.5 Proteostáza	28
2.4 Heat shock response (HSR)	29
2.4.1 Aktivace HSR, a HSF (heat shock factor)	29
2.4.2 HSP	30
2.4.3 sHSPs (small heat-shock proteins)	31
2.4.4 Kochaperony	32
2.5 Protinádorová terapie	32

2.5.1 Proteotoxický stres rakovinných buněk	33
2.6 Dithiokarbamáty	33
2.6.1 Disulfiram	33
2.6.2 Protirakovinné účinky DTC a DSF	35
2.6.3 Komplex CuET	35
3. Experimentální část	38
3.1 Materiál	38
3.1.1 Biologický materiál	38
3.1.2 Použité soupravy a chemikálie	38
3.1.3 Seznam použitých přístrojů	39
3.2 Metodika	40
3.2.1 Kultivace buněčné linie	40
3.2.2 Pasážování a počítání buněk	40
3.2.3 Zamrazování a rozmrazování buněčné linie	40
3.3 Určení vlivu zkoumaných látek na viabilitu buněk	41
3.3.1 Příprava komplexů	41
3.3.2 XTT	41
3.3.3 Fluorescenční mikroskopie	42
3.4 Zpracování výsledků	42
4. Výsledky	43
4.1 XTT	43
4.2 Fluorescenční analýza NPL4-GFP	45
5. Diskuze	47
6. Závěr	48
7. Seznam použité literatury	49
8. Seznam zkratk	64

Cíle práce

Teoretická část bakalářské práce se snaží shrnout a pojmout teoretické poznatky o UPS a proteinovém komplexu p97-Ufd1-NPL4. Následně se práce zaměřuje na látky narušující tyto dráhy a jejich cílení konkrétně na protein NPL4 v protinádorové terapii.

Experimentální část této práce je zaměřena na dynamiku GFP-značených proteinů NPL4 a jejich agregaci způsobenou deriváty dithiokarbamátů v komplexu s dvojmocnou mědí. V práci je studována jak cytotoxicita látek, tak jejich agregační vlastnosti na protein NPL4.

1. Úvod

Jednou ze základních stavebních jednotek všech buněk je protein. Proteiny jsou v buňkách syntetizovány, a zároveň poškozené či už nevyužité proteiny jsou degradovány. Tato homeostáza proteinů, tzv.: proteostáza, je zásadní pro vývoj buňky. V rakovinných buňkách je kvůli rychlému dělení obtížné udržet proteostázu. Mají tedy zvýšenou funkci degradačních mechanismů a jsou na nich výrazně závislé. V důsledku chyb v opravných mechanismech buněk dochází k akumulaci chybně složených buněčných proteinů, následnému proteotoxickému stresu a iniciaci apoptózy. Tyto chybné procesy jsou výrazně zmnožené u rakovinných buněk, kvůli jejich rychlému dělení.

Nejvýznamnějším mechanismem kontroly kvality proteinů a jejich následné degradace je ubikvitin-proteazomový systém. Proteiny určené k degradaci jsou označeny malým proteinem ubikvitinem, který se pomocí třístupňové enzymatické kaskády váže na lysinové zbytky proteinových substrátů. Tento proces se nazývá ubikvitinace. Polyubikvitinované proteiny jsou rozpoznávány regulačními částicemi proteazomu, které takto označený a rozvolněný substrát směřují do centrálního póru proteazomu k proteolýze.

Důležitým proteinem UPS zachovávajícím integritu proteostázy je protein p97. Prostřednictvím svých kofaktorů Ufd1-NPL4, které rozpoznávají polyUb signál, se segreguje p97 váže na proteinové substráty, které následně extrahuje z buněčných struktur a transportuje je k proteozomální degradaci. Široké zapojení proteinu p97 v UPS naznačuje, že jeho inhibice má slibný potenciál pro protirakovinnou terapii.

V této práci byl zkoumán efekt komplexů dithiokarbamatů s mědí na rakovinné buňky linie U2OS.

2. Současný stav řešené problematiky

2.1 Ubikvitin proteazomový systém (UPS)

Většina buněčných proteinů je neustále syntetizována a degradována po celou délku života buňky. Degradaci velkého množství proteinů zajišťuje proteazom (Wójcik *et al.*, 2002) společně s ubikvitin proteazomovým systémem, který zajišťuje označení proteinů před jejich degradací (Finley, 2009).

Proteazom je 2,5Mda velká proteasa, která modifikované proteiny rozkládá. Proteazom se nachází v cytoplazmě i volně v jádru všech eukaryotických buněk (Baumeister *et al.*, 1998). V cytoplazmě je proteazom propojen s centrozomem, cytoskeletem a vnějším povrchem endoplazmatického retikula (ER) (Murata *et al.*, 2009).

2.1.2 Biologické funkce

Ubikvitin proteazomový systém (UPS) je hlavní cytosolický proteolytický systém eukaryot. Mezi jeho funkce patří kontrola buněčného cyklu, apoptózy, transkripce, přenos signálu, PQC (kontrola kvality proteinů), vývojové programy (Murata *et al.*, 2009), a skrze produkci proteinů i buňkou řízené imunitní odpovědi (Yu *et al.*, 2017). Proteazom katalyzuje i degradaci mnoha enzymů, které jsou omezovány rychlostí přeměny produktů (ornithin-2-dekarboxylasa), transkripčních regulátorů (I κ B (IkappaB kinase)) a důležitých regulačních proteinů (cykliny) (Coux *et al.*, 1996). UPS katalyzuje přesnou, rychlou a včasnou degradaci proteinů, což zajišťuje jednostrannou posloupnost těchto biologických pochodů (Murata *et al.*, 2009).

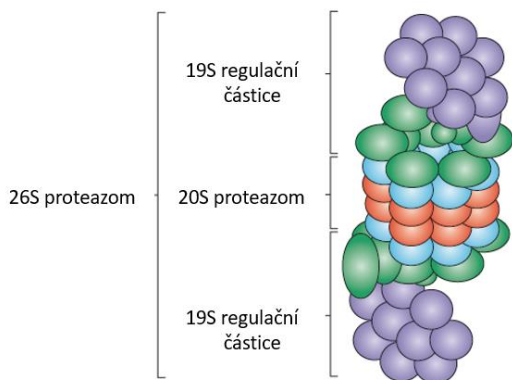
Jeho rychlost je esenciální pro odstranění abnormálních proteinů, které by mohly zapříčinit mutaci nebo poškození buňky po replikaci. Obecně proteazom zajišťuje degradaci proteinů na krátké peptidy, které jsou poté hydrolyzovány cytoplasmickými exopeptidasami (Coux *et al.*, 1996).

Kromě role proteasy má i funkce, které nesouvisí s jeho proteolytickou aktivitou. Jedná se například o: buněčné procesy zahrnující transkripci, opravu DNA, remodelaci chromatinu, aktivitu podobnou chaperonům (DeMartino *et al.*, 2007).

Existují proteazomy, které jsou specifické pro určitou tkáň se specifickou funkcí, například: imunoproteazom či thymoproteazom (Kloetzel, 2004).

2.1.3 Základní struktura proteazomu

Proteazom existuje v mnoha isoformách (DeMartino *et al.*, 2007), ale vždy se skládá z těchto dvou multipodjednotkových komplexů:



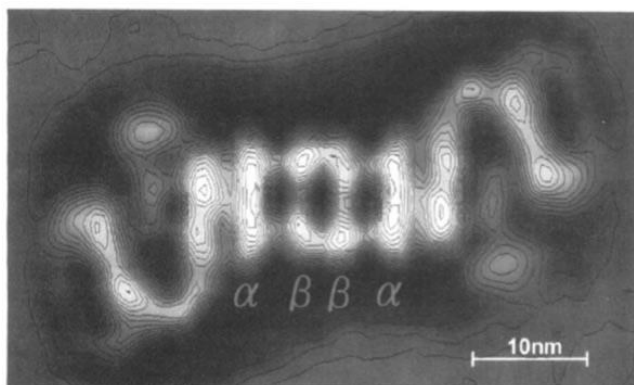
Obrázek 1: Schematický diagram 26S proteazomu. Převzato z Murata *et al.*, 2009.

1. jádrová částice (CP), 20S proteazom s katalytickou funkcí
2. 2. regulační částice (RP), například: 19S regulační element (Murata *et al.*, 2009) (Obr. 1).

Centrální částice

CP je sudovitá struktura, jejíž podjednotky jsou poskládány do čtyř heptamerických kruhů (Finley, 2009), dva kruhy skládající se ze sedmi α -podjednotek a dva kruhy poskládané ze sedmi β podjednotek (Yu *et al.*, 2017) v uspořádání $\alpha\beta\beta\alpha$ (Tanaka, 2009) (Obr. 2).

Vnitřní prostor centrální částice je tvořen β -typem p. odjednotek, ze kterých tři tvoří aktivní místa proteolýzy ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) (Finley, 2009). Tato proteolytická místa obsahují threoninový aminokyselinový zbytek na N-konci podjednotky, který dodává na peptidovou vazbu substrátu nukleofil s katalytickou funkcí (Yu *et al.*, 2017).



Obrázek 2: Snímek z elektronového mikrografu 26S proteazomu krysích jater s vyznačenými α a β podjednotkami 20S proteazomu, měřítko 10 nm. Převzato z Coux *et al.*, 1996)

Každé aktivní místo může štěpit velkou škálu peptidových sekvencí, mají ovšem preferovaná štěpná místa. B1 upřednostňuje štěpení na C-konci kyselých aminokyselin (kaspasam podobná aktivita), $\beta 2$ štěpí po bazických aminokyselinách argininu a lysinu (Lys; K) (trypsinu podobná aktivita), $\beta 5$ štěpí po hydrofobních aminokyselinách (chymotrypsinu podobná aktivita) (Murata *et al.*, 2009).

Jelikož jsou aktivní místa směřována do vnitřního prostoru CP, musí zde vstoupit proteolytický substrát (Finley, 2009), který se sem dostává skrze pór na cylindrickém konci CP (DeMartino *et al.*, 2007). Tento vstupní proces je kontrolován RP (Finley, 2009), čímž RP aktivuje proteazom (Tanaka, 2009).

Regulační částice (RP)

Jedním z možných RP je 19S proteazom. Je složen z 19 různých podjednotek, které jsou rozděleny na 2 komplexy: bázi a víko (Schmidt *et al.*, 2005).

Báze se skládá ze šesti homologních AAA⁺ (ATPases associated with diverse cellular activities) ATPas, které tvoří hexamerický kruh: Rpt1-Rpt6 (regulatory particle triple-1 protein 1-6) (Murata *et al.*, 2009). ATP-dependentní interakce podporují otevírání pórů a poskytují substrátu přístup ke kanálu. ATPasové podjednotky regulační částice proteazomu slouží jako mediátory neproteolytických funkcí, jako je například aktivita podobná chaperonům (DeMartino *et al.*, 2007).

Báze je složena z dalších tří podjednotek bez ATPasové aktivity: Rpn1, Rpn2 a Rpn13 (regulatory particle non-ATPase 1, 2, 13) (Murata *et al.*, 2009). Mezi nejdůležitější podjednotky patří Rpn1 a Rpn2, které propojují místo příjmu substrátu s místem proteolýzy. Rpn2 sousedí s 20S proteazomem. Rpn1 se nachází nad Rpn2, a slouží k přichycení faktoru (proteinu), který váže substrát. Na Rpn1 je navázáno víko proteazomu. Rpn1-Rpn2 je společně s ATPasami heterodimer nezbytný k translokaci substrátu a otevření proteolytického kanálu (Rosenzweig *et al.*, 2008).

Takzvané víko proteazomu tvoří podjednotky bez ATPasové aktivity – Rpn3, Rpn5-Rpn9, Rpn11, Rpn12 a Rpn15 (regulatory particle non-ATPase) (Funakoshi *et al.*, 2004). Hlavní funkcí víka je deubikvitinovat zachycené substráty (Tanaka, 2009).

Ubikvitinové receptory

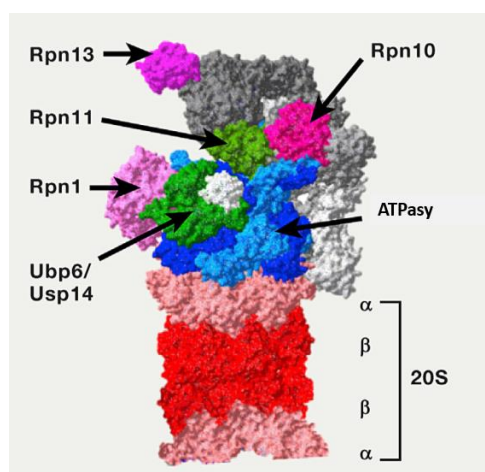
Jakmile se ubikvitinový řetězec skládá alespoň ze čtyř jednotek, je rozpoznán receptory 26S proteazomu (Hartmann-Petersen and Gordon, 2003). Překvapivě velké množství

proteinů může zprostředkovávat rozpoznání Ub na proteazomu (Obr. 5). Dvě podjednotky RP: Rpn10 a Rpn13; a tři reverzibilně přidružené k proteazomu: Rad23 (radiation sensitive 23), Dsk2 (dominant supressor of Karl 2) a Ddi1 (DNA-damage-inducible 1) (Finley, 2009).

Rad23, Dsk2 a Ddi1 mohou UBA (ubiquitin-associated domains) doménou vázat ubikvitinované substráty. Díky jejich N-koncové domény UBL (ubiquitin-like domains) tyto substráty připojují k Rpn10, Rpn13, nebo Rpn1 podjednotkám proteozomální báze, a tím nepřímo cílí na proteazom (Grabbe *et al.*, 2011). Proteiny Rad23, Dsk2 a Ddi1 se společně označují jako UBL/UBA proteiny (DeMartino *et al.*, 2007). UBL/UBA proteiny slouží jako tzv.: shuttle faktory, jelikož dopravují substráty ze vzdálenějších lokalit buňky do proteazomu (Finley, 2009). Patrně také stabilizují komplex substrát-proteazom a chrání ubikvitinové řetězce před nepřiměřeným prodloužením či odpoutáním během transferu (Grabbe *et al.*, 2011).

Mezi další ubikvitinové receptory patří p97/Ufd1 (ubiquitin fusion degradation 1)/NPL4 (nuclear protein localization homolog 4) komplex a p62 (DeMartino *et al.*, 2007). P97/Ufd1/NPL4 komplex je nutný pro proteolýzu, také přesouvá některé proteiny na Rad23 a dále do proteazomu (Collins and Goldberg, 2017).

Funkce Rad23 a Rpn10 se překrývají (Chen and Madura., 2001), oba slouží pro přímou signalizaci cílení proteazomu (Grabbe *et al.*, 2011). Ztráta těchto shuttle faktorů vede ke zvýšené senzitivě na podmínky prostředí, které zvyšují pravděpodobnost špatného složení proteinů (Collins and Goldberg, 2017).



Obrázek 3: Struktura proteazomu s označenými Ub receptory na RP. Převzato z Collins and Goldberg, 2017.

Rpn10 rozeznává Ub přes 2 UIM (Ub-interacting motif) (Finley, 2009). Nachází se ve velké míře volně v cytosolu, tudíž se předpokládá, že má funkce přesahující 26S (Collins and Goldberg, 2017). Environmentální stres, zejména tepelný šok (chlad, horko), či těžké kovy snižují ubikvitinaci Rpn10, patrně kvůli navýšení proteozomální degradační kapacity (Yu *et al.*, 2017). Rpn10 také může chránit řetězec před rozpadem. Potlačováním rozkladu ubikvitiového řetězce prodlužuje dobu, během které je nutno řetězec přesunout do proteazomu, a stabilizací komplexu proteazomsubstrát podporuje substrátovou degradaci (Finley, 2009). Propojení mezi ubikvitinací a proteolýzou napomáhá k větší selektivitě a přesnější regulaci (Collin *et al.*, 2017).

Rpn13, také známý jako vnitřní receptor proteazomu, váže Ub přes Pru doménu (pleckstrin-like receptor for ubiquitin) (Finley, 2009). Váže se na N-koncový region RP, který připojuje Rpn2. C-koncová oblast Rpn13 napojuje deubikvitinační enzym Uch37 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase 37) a podporuje isopeptidasovou aktivitu (Husnjak *et al.*, 2008). Rpn13 je schopný pojit mono- a diubikvitinované proteiny. Takovéto substráty jsou velmi vzácné, tudíž se předpokládá, že jsou zcela závislé na Rpn13. Rpn10 a Rpn13 jsou hlavní proteiny, díky kterým dochází k počáteční konjugaci substrátu k proteazomu (Collins and Goldberg, 2017).

2.1.4 Mechanismus

Proteazom funguje na mnoha úrovních s přímou posloupností (Finley, 2009). Pro účinnou degradaci proteinu je potřeba, aby byl substrát označen Ub (pro počáteční rozpoznání substrátu), a je nutná přítomnost nesložené oblasti (Collins and Goldberg, 2017). Zda je proteazom schopen započít degradaci závisí na třech faktorech: délce iniciačního (rozpleteného) regionu, umístění iniciačního regionu v proteinu, aminokyselinová sekvence iniciační oblasti. Aby mohl proteazom započít degradaci, musí mít neorganizovaný region délku alespoň 20-30 aminokyselin, patrně aby polypeptidový řetězec dosáhl na receptor. Jelikož se složené domény na koncích nespletené oblasti nevejdou do degradační komory, vnitřní nesložený region musí být alespoň dvakrát delší než nesložené oblasti na krajích, aby byla zahájena degradace (Yu *et al.*, 2017).

Následuje navázání substrátu na RP, za účasti ubikvitinových receptorů (Finley, 2009), následované deubikvitinací zprostředkovanou deubikvitinačními enzymy. Jakmile je proteazom propojen se substrátovým proteinem, naváže rozpletený

region pro zahájení degradace a přesune polypeptidový řetězec do 20S proteazomu (Murata *et al.*, 2009). V holoenzymu RP-CP je vstup substrátu do komplexu kontrolován RP: navázáním na CP otevírá substrátový translokační kanál a směřuje do něj substrát (Yang *et al.*, 2004). Translokační proces vede k rozplétání všech kompaktních domén (Lee *et al.*, 2001), které jsou vtahovány do degradační komory. Polypeptidový řetězec je tažen substrátovým kanálem konformačními změnami AAA⁺ podjednotek a poháněn hydrolýzou ATP (Yu *et al.*, 2017). Proteolytická komora je velmi úzká, mohou do ní tedy vstoupit pouze rozpletené polypeptidy. Přizpůsobivý N-konec CP kontroluje vstup substrátu a pravděpodobně i výstup produktu. Tímto způsobem CP fyzicky omezuje proteolýzu proteinů, které jsou záměrně rozpleteny (Yang *et al.*, 2004). Ve vnitřním prostoru CP se nachází proteolyticky aktivní místa, která štěpí peptidové vazby rozpleteného proteinu na jedno tlivé polypeptidy. Proteazom tedy degraduje substráty po částech, což pomáhá předcházet genezi produktů, které by mohly ohrozit správné fungování buňky (Finley, 2009).

2.1.5 Ubikvitinace

Ubikvitin (Ub)

Ubikvitin je malý (ze 76 aminokyselin složený) termostabilní protein (Ciechanover, 2009). Ovlivňuje funkci a homeostázu všech buněčných kompartmentů (Grabbe *et al.*, 2011). Ub zároveň slouží jako signál v mnoha jiných procesech, například v membránovém transportu, signální kaskádě, opravě DNA a remodelaci chromatinu (Yu *et al.*, 2017).

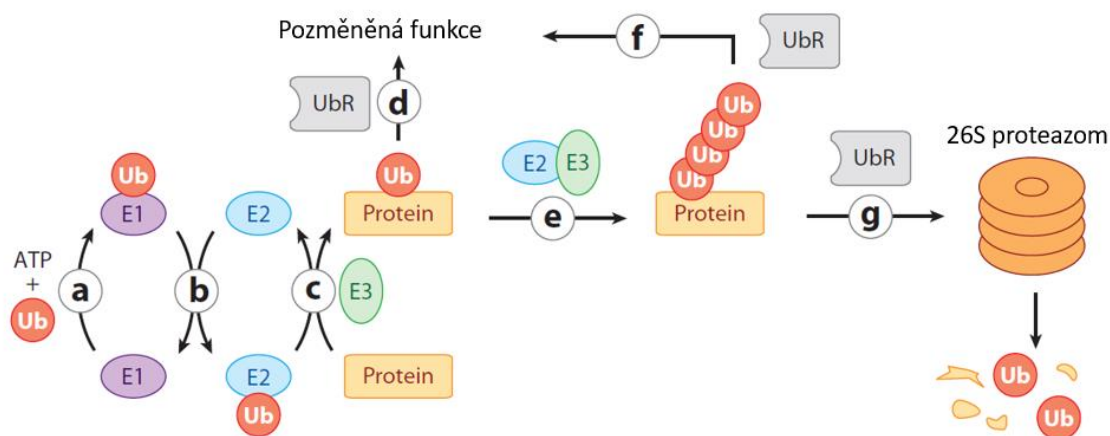
Mechanismus ubikvitinace a rozpoznání ubikvitinu

Proces ubikvitinace zprostředkovává kaskáda enzymů známá jako E1, E2 a E3 (Finley, 2009): E1 Ub-aktivační enzym, který aktivuje Ub pomocí ATP. E2 Ub-konjugační enzym, jehož aktivní místa cysteinu tvoří thioesterovou vazbu s C-kocovou karboxylovou skupinou Ub (Pickard, 2001). Kdy zároveň s tvorbou této thioesterové vazby se spojuje s E3 Ub ligasou. E3 Ub-ligasa katalyzuje tvorbu isopeptidové vazby mezi C-koncem ubikvitinu a ϵ -amino skupinou lysinu substrátu (proteinu či následně do řetězce připojeného ubikvitinu) (Zheng *et al.*, 2017) (Obr. 4).

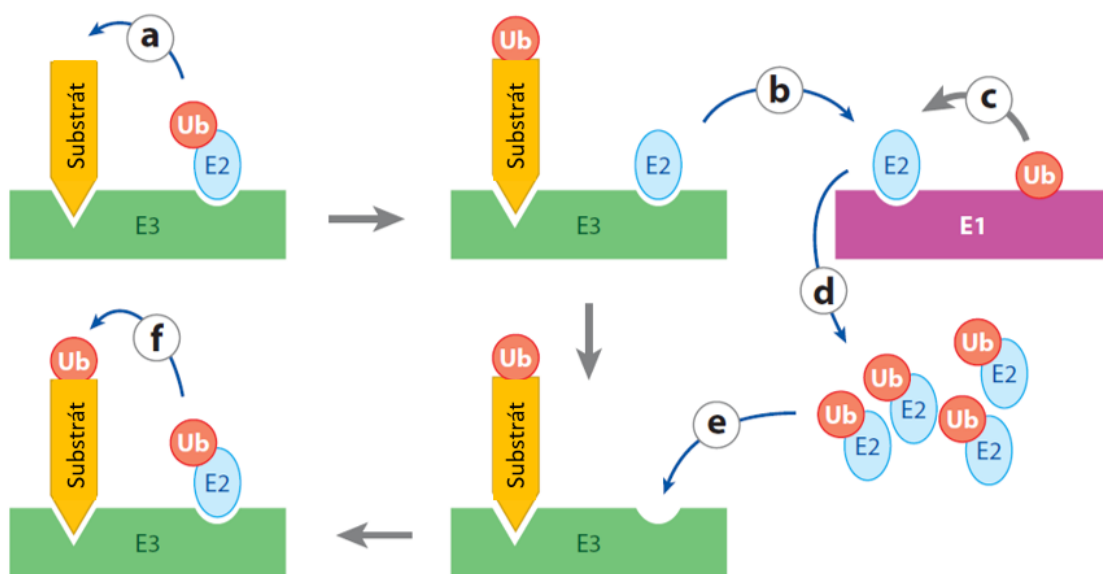
Monoubikvitinovaný substrát (protein) buď může disociovat z E3 (Obr. 4d), nebo naněj může být navázán další Ub, čímž se Ub řetězec prodlouží (Obr. 4e). V ubikvitinovém řetězci se může nacházet více druhů ubikvitinových zbytků (nejhojněji

je zastoupený Lys48). Monoubikvitinové a některé jiné typy řetězců slouží ke změně funkce modifikovaného proteinu (Obr. 4f). (Deshaies et al., 2009). Řetězce polyubikvitinované vazbou K48 odvádějí substrát k degradaci (Obr. 4g) (Freemont *et al.*, 1991).

U eukaryot jsou dva hlavní typy E3, které jsou definovány přítomností buď HECT (homologous to the E6AP carboxyl terminus) (Zheng *et al.*, 2017), či RING (really interesting new gene) domény (Deshaies *et al.*, 2009). RING doména Ub ligasy může katalyzovat přenos Ub z E2~Ub na substrát (Grabbe *et al.*, 2011). Pokaždé, když E2 přesune ubikvitin na substrát (Ub je zde kovalentně vázán (Yu *et al.*, 2017)), musí disociovat od E3, aby uvolnil místo nové molekule E2~Ub (Obr. 5) (Deshaies *et al.*, 2009).



Obrázek 4: Schéma mechanismu ubikvitinového systému. UbR = ubikvitinové receptory). E1 při spotřebování ATP aktivuje Ub (a) a přesouvá ho na E2 (b). Následně interaguje E2~Ub s Lysinovým reziduem specifického substrátu (c). Přímá ubikvitinace nastává při předání substrátu enzymem E3 thioesterifikovanému E2~Ub. E3 ubikvitinová ligasa řídí poslední krok transferu Ub, tedy tvorbě isopeptidové vazby (e). Převezato z Deshaies et al., 2009.



Obrázek 5: Schéma vazby ubikvitinu na substrát enzymovou kaskádou E1, E2 a E3. Po přesunutí ubikvitinového nákladu (a) musí E2 disociovat z E3 (b), aby se mohl navázat na E1, aby se k němu mohl připojit Ub (c) a poté se vrátit do buněčného bazénu E2 s navázanými Ub (d). Následně se molekula E2-Ub naváže na E3 (e), což kočí sekundární ubikvitinací substrátu (f). Převzato z Deshaies *et al.*, 2009.

V protikladu k RING, HECT E3 tvoří meziprodukt vázaný k Ub trioesterovou vazbou. Tedy Ub transfer z E2 na E3 vyžaduje jiné chemické reakce, než u RING E3 (transthiolace u RING a thioesterová aminolýza u HECT). HECT obsahují C-koncovou katalytickou doménu (Rotin and Kumar, 2009).

C-koncová doména HECT váže konec Ub řetězce, který je připoután k E2 (Maspero *et al.*, 2013). Jakmile je donorový Ub přesunut do aktivního místa HECT E3, Ub řetězec se plně natáhne. Plně natažený Ub řetězec připomíná aktivní formu RING E3. HECT s navázaným Ub na C-konci je schopen navázat E2-substrát na N-konec (Kamadurai *et al.*, 2013). Podobně jako RING, HECT E3 také podporují postupnou polyubikvitinaci substrátu specifickými vazebnými řetězci. Ovšem u HECT, není hlavním faktorem určujícím typ řetězce je C-konec E2, nýbrž C-konec HECT (Zheng *et al.*, 2017).

Posttranslační modifikace

Ubikvitin jako protein složený ze 76 aminokyselin obsahuje mnoho míst potenciálně výhodných pro další posttranslační modifikace. Samotný proces ubikvitinace je považován za dynamickou posttranslační modifikaci (Swatek and Komander, 2016).

Aktivita ligas ze skupiny RING je kontrolována posttranslačně kovalentními modifikacemi, například: fosforylací, konjugací s UBL proteiny (Grabbe *et al.*, 2011)

(nejběžnější způsob posttranslační regulace), nekovalentní vazbou proteinu nebo malé molekuly ligandu, či substrátovou kompeticí (Deshaies *et al.*, 2009).

Mnoho RING E3 je ubikvitinováno, často autokatalytickým procesem. Autokatalýza bývá důsledkem pozmněněné aktivity E3 (pozmněněný funkční význam, místo ligace autokatalýza) (Galan and Peter, 1999), případně také může vést ke snížení aktivity E3 důsledkem degradace proteazomem. Autoubikvitinace pravděpodobně slouží jako mechanismus pro udržení homeostázy (Deshaies *et al.*, 2009).

Jak je výše zmíněno, ubikvitin obsahuje lysinové zbytky, které slouží jako kotvící místa pro ubikvitinovou vazbu. Polyubikvitinové řetězce tvořené různými zbytky lysinu vykonávají rozličné fyziologické funkce. Řetězce vázající K63 jsou zapojeny do přenosu signálu, oprav a replikace DNA a jsou nečastějším důvodem, kdy ubikvitinem označené substráty nejsou degradovány proteazomem (Shen *et al.*, 2013).

Deubikvitinace

V eukaryotních buňkách dochází nevyhnutelně kromě ubikvitinace proteinů i k jejich deubikvitinaci. Za tento proces jsou zodpovědné deubikvitinací enzymy (DUB). Dnes je známo 75 DUB, které v buňkách reagují na velké množství podnětů s různými proteiny a zastávají mnoho buněčných rolí (Cvek, 2011). Na proteozomální degradaci se podílí 3 DUB: Ubp6 a Uch37 (Finley, 2009) a metaloisopeptidasa Rpn11 (Murata *et al.*, 2009). Tyto tři DUB se váží na víko proteazomu pomocí tzv.: JAMM (JAB1/MPN/MOV34 metaloenzym) domény.

Rpn11 odštěpuje polyubikvitinový řetězec proximálně (Grabbe *et al.*, 2011), kdežto Usp14 a Uch 17 odstraňují ubikvitinové zbytky z distálního konce řetězce. Což ústí v progresivní redukci polyubikvitinového řetězce (Kirkin *et al.*, 2009). Čím kratší polyubikvitinový řetězec, tím má substrát menší afinitu k proteazomu a jeho degradace je tedy zpomalena (Finley, 2009). Tímto procesem dochází nejen k recyklaci ubikvitinu (Yang *et al.*, 2004), ale zároveň pozitivní regulaci proteinové degradace (Meyer *et al.*, 2012).

K aktivaci hydrolýzy substrátu před jeho deubikvitinací dojde při navázání ubikvitinového řetězce do 19S komplexu proteazomu, kdy polyubikvitinový řetězec interaguje s Uch37 (DUB) a volně složená oblast polypeptidu interaguje s jednou ATPasou (Colling and Goldberg, 2017).

Stejně jako ubikvitinový konjugací systém i DUB obsahují strukturní odlišnosti. Tyto rozdíly přispívají k substrátové specifitě, vnitrobuněčné lokalizaci a protein-protein interakcím (Grabbe *et al.*, 2011).

2.2 p97

Lidská AAA⁺ ATPasa p97, také známá jako VCP (valosin containing protein) je velmi důležitá pro široké spektrum buněčných funkcí:

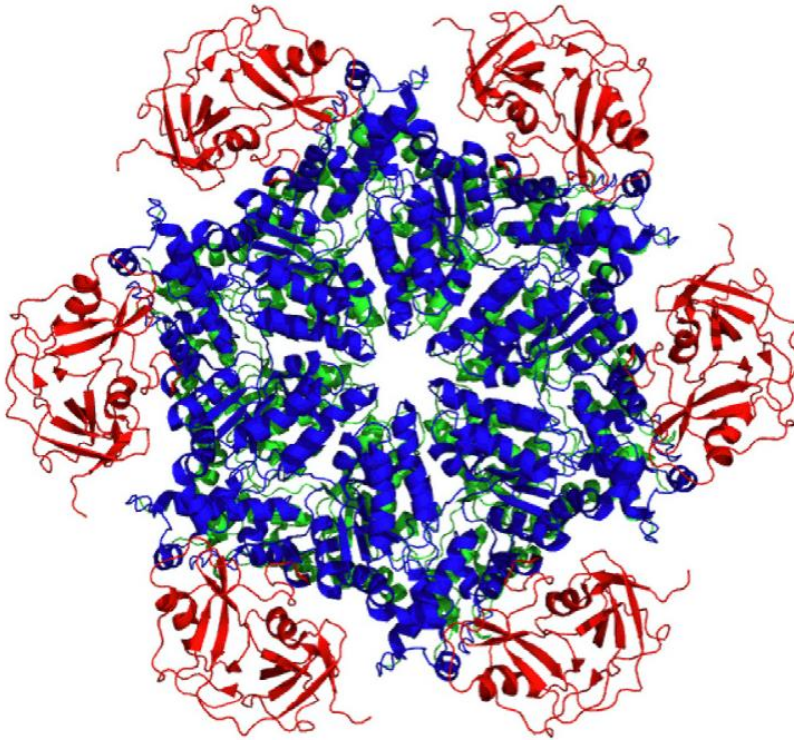
- replikaci DNA
- ERAD (degradace spojená s endoplazmatickým retikulem)
- formaci Golgiho aparátu
- autofáгии
- membránovou fúzi
- procesy spojené s chromatinem, které jsou řízeny ubikvitinací, a které se účastní lysozomální degradace (Stach and Freemont, 2017).

Nachází se v cytoplazmě, membránách, jádru všech eukaryotických buněk (Meyer *et al.*, 2002). V savčích buňkách se také nachází v Golgiho aparátu, jaderné membráně, ER, mitochondriích (Sun and Qiu, 2020). Reprezentuje ~ 1 % celkových cytosolických proteinů (Isaacson *et al.*, 2006). Je centrálním a všestranným elementem ubikvitinového systému. Po kontrole kvality pomáhá doručovat proteinové substráty do proteazomu, reguluje různé dráhy a řídí procesy nezávislé na proteazomu. Řídí genovou regulaci, aktivaci T- a B- buněk. Účastní se skládání proteinů pomocí chaperonů (Dai *et al.*, 2001). Podporuje extrakci a segregaci ubikvitinovaných proteinů z buněčných struktur, jako jsou Endoplasmatické retikulum, Golgiho aparát či chromatin. Jeho centrální role při signalizaci, opravě DNA a buněčném cyklu jej dělá jedním z hlavních cílů ve vývinu léčiv (Meyer *et al.*, 2012).

Tento enzym konvertuje energii z hydrolýzy ATP na mechanickou energii, kterou využívá k extrakci ubikvitinovaných proteinů z lipidických membrán či makromolekulárních komplexů (Stach and Freemont, 2017).

2.2.1 Základní stavba

p97 patří do skupiny hexamerických AAA⁺ proteinů (Obr. 7) (Dai *et al.*, 2001). Má jednu Nkoncovou doménu (N) a 2 ATPasové domény (D1, D2) (Bodnar and Rapport, 2017).



Obrázek 7: Struktura ATPasy p97: N-koncová doména (červeně), D1 ATPasová doména (modře) a D2 ATPasová doména (zeleně). Převzato z Bodnar and Rapport, 2017.

Šest VCP monomerů formuje kruhovitou strukturu obklopující centrální pór (Bodnar and Rapport, 2017). Dokáže použít energii z hydrolýzy ATP pro strukturní přeměnu nebo rozpletení proteinů. Energie je z velké části dodávána hydrolýzou ATP v D2, která vyžaduje vazbu nukleotidů. D2 dokáže hydrolyzovat nukleotidy pouze pokud je D1 vázán s nukleotidy. Oproti tomu ATPasová aktivita D1 závisí jak na vazbě ATP, tak na hydrolýze pomocí D2. (Ye *et al.*, 2003).

Globulární N-doména na periferii D1 je významná pro vázání substrátu a kofaktorů. Dokáže stabilizovat rozpletené proteiny, může regulovat hydrolýzu ATP. Také reguluje adaptory vázající se na hydrolýzu ATP (Dai *et al.*, 2001).

2.2.2 Kofaktory p97

Další funkcí p97 v UPS je koordinovat ubikvitinaci. Spojuje se s množstvím interakčních proteinů a proteinových kofaktorů. Tyto interakce jsou velmi důležité pro jeho aktivitu a funkční rozmanitost (Meyer *et al.*, 2012). Kofaktory p97 se váží buďto na N-koncovou doménu nebo na C-koncový ocas (Bodnar and Rapport, 2017).

Nejvýznamnější skupinou kofaktorů jsou proteiny obsahující ubikvitin-X (UBX) doménu nebo doménu podobnou UBX (UBXL). Předpokládá se, že tyto domény zajišťují skladbu ubikvitinu a spolupracují s N-doménou p97. VCP váže ubikvitinové ligasy přímo nebo přes adaptorové proteiny Ubx7/Ubx5. p97 váže faktory, které upravují ubikvitinový řetězec pro následné zpracování provedených modifikací (Meyer et al., 2012). p97 také váže mnoho DUB – VCIP135, Otu1, YOD1, ataxin-3 (Rumpf and Jentsch, 2006).

Pravděpodobně interaguje s jiným kofaktorem pro každou reakci. Tento model byl rozšířen na hierarchický systém, v němž p97 funguje jako centrální částice. Tento model jaderného komplexu se tedy skládá z p97 jako centrální částice, na kterou se napojují vedlejší kofaktory. Na p97 se může vázat vícero kofaktorů, jeden má ovšem vždy významnější roli a předurčuje aktivitu p97. Mezi tyto kofaktory patří heterodimer UFD1-NPL4, p47 nebo Ubx1.

Každý jadrový komplex vytvořený spojením p97 a hlavním kofaktorem se poté může chovat různými způsoby v závislosti na navázaných přídatných proteinech, které určují umístění komplexu, či poskytují dodatečnou enzymatickou aktivitu. Mnoho z těchto kofaktorů obsahují domény vázající ubikvitin. Slouží tedy jako ubikvitinové adaptory pro p97. Mimo to i p97 je schopen vázat ubikvitin (Meyer et al., 2012).

Ufd1-NPL4 (UN)

Ufd1-NPL4 je jedním z nejdůležitějších kofaktorů p97. Účastní se mnoha procesů, které závisí na p97, jako je ERAD. UN se nachází u všech eukaryot a je esenciální pro jejich životaschopnost (Bodnar and Rapport, 2017).

Ufd1-NPL4 adaptor je nutný pro:

- správnou degradaci proteinů
- formaci jaderné membrány
- rozpadu vřeténka po mitóze (Meyer *et al.*, 2002).

UN nereguluje ATPasovou aktivitu p97, což naznačuje, že neřídí přímo p97, ale napomáhají přidružení dalších adaptorových domén, které jsou důležité pro následnou specifickou modulaci p97-řízených reakcí (Bruderer *et al.*, 2004).

UN váží p97 kooperační vazbou a pouze heterodimer je funkčně aktivní (Meyer *et al.*, 2002).

Ufd1 se skládá ze dvou funkčních domén: N-koncová UT3 a C-koncová UT6. UT3 strukturně připomíná N-koncovou doménu p97 a obsahuje 2 vazebná místa pro monoubikvitinované a dipolyubikvitinované substráty. UT3 je pravděpodobně velmi důležitá při ERAD. UT6 je patrně destrukuralizovaná a slouží k vazbě NPL4 i p97 (Pye *et al.*, 2007). Jelikož Ufd1 je protein obsahující samostatná vazebná místa pro monoubikvitin a polyubikvitinové řetězce, je pravděpodobné, že hraje důležité signální v buněčných procesech, které využívají monoubikvitin či polyubikvitin (Isaacson *et al.*, 2006). Ufd1 může vázat p97 i NPL4 samostatně, je tudíž nepostradatelnou složkou celého komplexu (Meyer *et al.*, 2000).

NPL4 se v největší koncentraci vyskytuje u dospělého člověka v srdci, mozku, kosterních svalech a ledvinách (Botta *et al.*, 2001). NPL4 zvětšuje afinitu Ufd1 k p97 (Meyer *et al.*, 2000).

NPL4 se zaslouhuje o rozpoznání substrátu označeného poly-Ub řetězcem. Skládá se z UBXL domény, zinkové domény (NZF), MPN domény (Mpr1/Pad1 N-koncová doména), CTD (C-koncová doména) (Sato *et al.*, 2019) a UBD (ubiquitin binding domain) (Bruderer *et al.*, 2004). NPL4 (C-koncově) i p97 (N-koncově) obsahují domény zinkového prstu (Bodnar *et al.*, 2018). NZF domény jsou složeny typicky z cca 30 aminokyselinových zbytků (Sato *et al.*, 2011). Tyto NZF váží Ub, primárně monoUb a polyUb konjugáty (Meyer *et al.*, 2002). Samotný NPL4 bez vazby na Ufd1 je velmi flexibilní a nestabilní (Isaacson *et al.*, 2006).

Propojení p97 s Ufd1-NPL4 se uskutečňuje skrze dvě místa. Prvním vazebným místem je krátký hydrofobní řetězec na C-konci Ufd1. Druhé vazebné místo se nachází na N-konci NPL4. N-konec NPL4 – UBD je aktivována vazbou Ufd1 (Bruderer *et al.*, 2004).

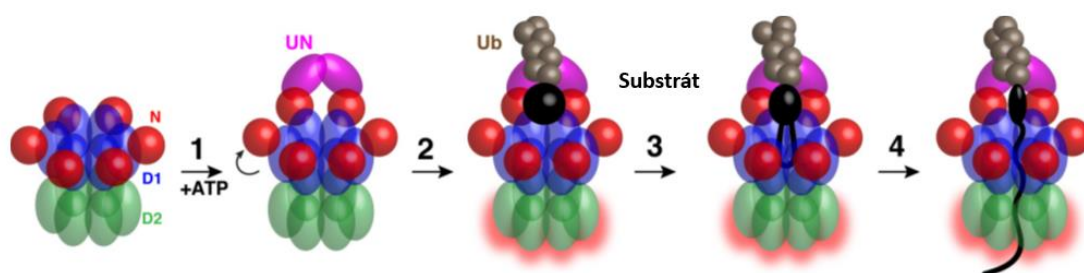
2.2.3 Mechanismus účinku

UN se váže na cis stranu Cdc48 (Obr. 8, krok 1), což umožňuje komplexu navázat polyubikvitinový řetězec (Obr. 8, krok 2), který je rozpoznáván UN. Navázání polyubikvitinu stimuluje ATPasovou aktivitu komplexu Cdc48/UN. D1 doména zůstává navázána na ATP spolu s N-koncovou doménou, přičemž hydrolýza ATP na D2 doméne

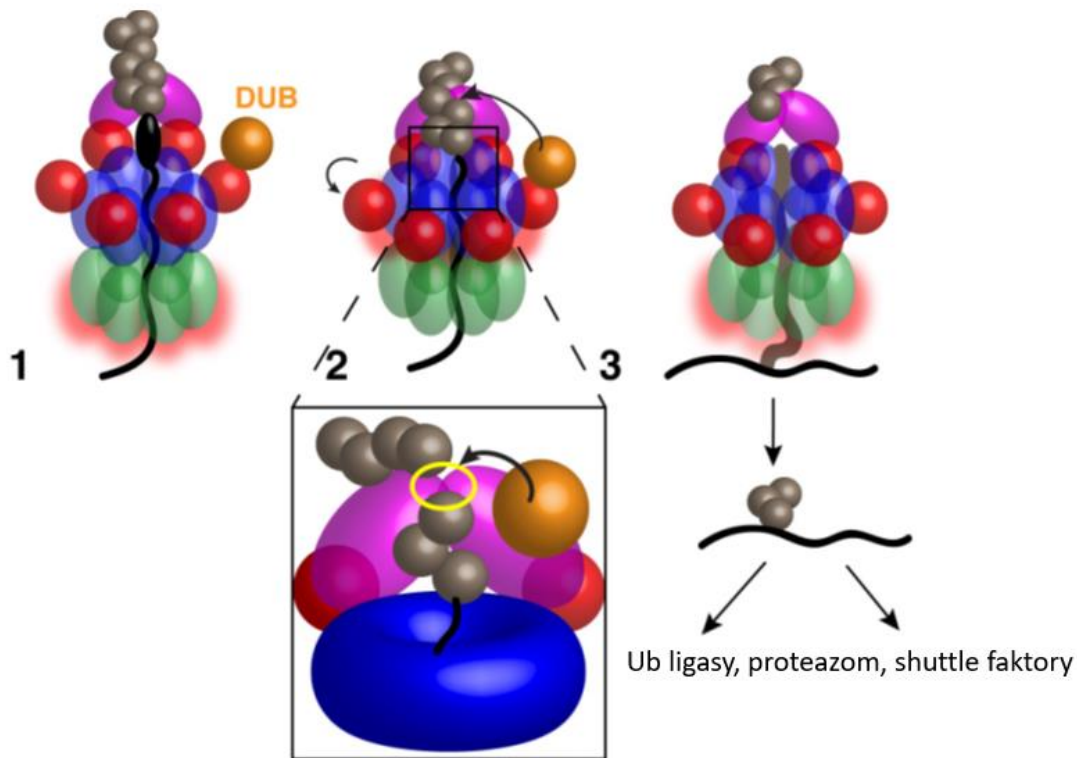
posouvá substrátový polypeptid centrálním pórem Cdc48 (Obr. 8, krok 3) a přesune jej skrze pór až na trans stranu Cdc48 (Obr. 8, krok 4) (Bodnar and Rapport, 2017).

Podle místa vazby ubiquitinů se polypeptid naváže touto označenou částí na dané substrátově specifické místo (Bodnar and Rapport, 2017).

Za pomoci ATPasového kruhu je substrát vtažen do centrálního póru. Vazba polyubikvitinového řetězce s UN potlačuje úplnou translokaci přes pór, i při pokračující hydrolýze ATP na D1. Zároveň navázaná D1 na ATP brání přístupu DUB k polyubikvitinovému řetězci (Obr. 9, krok 1). Jakmile substrát zahájí či dokončí svou translokaci, pohybující se N-koncová doména naváže DUB (pomocí UBX-like domény), připojená DUB je schopna redukovat polyubikvitinový řetězec. Místo štěpení ubiquitinového řetězce se nachází mezi vazebným místem UN a centrálním pórem (Obr. 9, kroky 2 a 3) (Bodnar and Rapport, 2017).



Obrázek 8: Mechanismus rozkladu substrátu pomocí Cdc48. Převzato z Bodnar and Rapport, 2017.



Obrázek 9: Schéma uvolnění substrátu z Cdc48. Převzato z Bodnar and Rapport, 2017.

Většina proteinů neztrácí všechny připojený ubikvitin, ale oligoubikvitinový řetězec s maximálně deseti molekulami zůstává připojen. Tyto oligoubikvitiny procházejí přes pór Cdc48 rozpleteny, po translokaci jsou znovu složeny a substrátový protein je poté přesunut k dalšímu zpracování (např. ERAD) (Bodnar and Rapport, 2017).

V jednom modelu mechanismu p97 se předpokládá, že substrát přechodně vstupuje do D2 kruhu či se pohybuje skrze kruh D2 a odstupuje mezi D1 a D2 kruhy. Jiný model naznačuje, že polypeptidový řetězec pouze povrchně vstupuje do D1 kruhu. Další návrh poukazuje, že velká konformační změna N-domény je schopna pohnout polypeptidovým řetězcem. V žádné z těchto teorií není jasné, jak by byla tato pokračující tažná síla produkována (Bodnar and Rapport, 2017).

2.2.4 Funkce p97

Komplexy p97 fungují jako molekulární chaperony, váží se na ubikvitinované proteiny a katalyzují remodelaci jejich struktury (Bruderer *et al.*, 2004). Změna struktury spouští extrakci proteinu z komplexu či buněčného povrchu, která vede k následné degradaci proteazomem. Tento mechanismus se uplatňuje při ERAD a patrně i v degračních procesech propojených s chromatinem nebo v mitochondriálních procesech, ve kterých hraje roli p97 (Obr. 10). Další komplexy s p97 (například p97-p47, či p97-UBXD1)

katalyzují jiné remodelační reakce, například segregaci membránových proteinů (Meyer *et al.*, 2012).

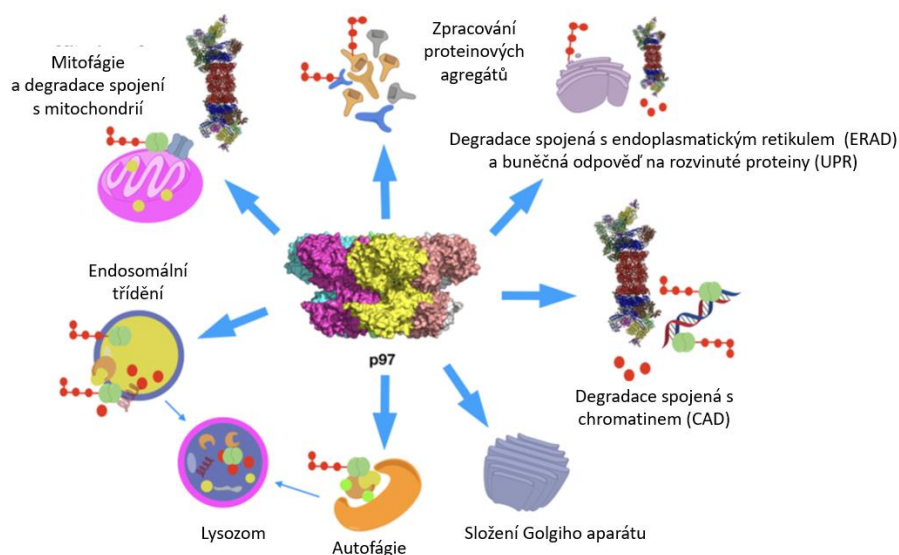
Po inhibici ATPasové aktivity p97 se v buňce shromažďují ubikvitinové konjugáty, což odráží důležitost remodelační aktivity řízené ATP. Tato schopnost reguluje nepřehledné množství drah řídicích buněčnou fyziologii, což hraje důležitou roli různých onemocnění, jako je rakovina či degenerativní onemocnění (Meyer *et al.*, 2012).

Signalizace a regulace buněčného cyklu

Aktivita p97 v ubikvitinovém systému je klíčová v intracelulárních signálních pochodech. p97 řídí degradaci proteinů a transkripčních faktorů, které regulují hypoxickou buněčnou odpověď. Je také spojováno s regulací buněčné proliferace a přežití. Inhibicí p97 je během hodin aktivována apoptóza (Meyer *et al.*, 2012).

p97 a Ufd1-NPL4 jsou důležité pro účinnou replikaci. Vypotřebování komplexu vede k aktivaci kontrolních bodů, které dohlížejí na případná poškození DNA, což zpozdí vstup do mitotického cyklu. p97 je během samotné mitózy vyžadován pro správnou chromosomální segregaci, jeho aktivace vede k inaktivaci kontrolního bodu dělicího vřeténka. (Meyer *et al.*, 2012).

Funkce propojené s chromatinem a poškození DNA



Obrázek 10: Schéma hlavních funkcí p97. Převzato z Huryn *et al.*, 2019.

Mezi nejtoxičtější z typů DNA lézí patří dvouřetězcové zlomy (double strand breaks - DSB). Jako odpověď na toto poškození DNA jsou přivolány signální faktory a opravné faktory chromatinu, se kterými p97 interaguje (Lukáš *et al.*, 2004).

Signalizace DSB probíhá rozsáhlou ubikvitinací a fosforylací v místě zlomu. Tyto posttranslační modifikace slouží ke skladbě multiproteinových komplexů, které jsou pro opravu DNA nezbytné. Komplex p97-Ufd1-NPL4 napomáhá extrakci proteinů z poškozeného chromatinu. Tyto procesy vyžadují rozpad proteinových komplexů na místech poškozené DNA sekvence a rozpad propojovací vazby přidružených replikačních helikas (Stach and Freemont, 2017). Komplex následně napomáhá odstraňování K48 konjugovaných substrátů (polyubikvitinové řetězce s vazbou K48 obecně přispívají v cílení proteinů na proteozomální degradaci (Shen *et al.*, 2013)), pro následnou vazbu dalších signálních faktorů, jako jsou Rad51, BRCA1 (Breast Cancer type 1 susceptibility protein) a 53BP1 (p53 binding protein 1) (Meerang *et al.*, 2011).

Dohromady tato zjištění odhalují roli p97-Ufd1-NPL4 v základních s chromatinem spojených procesech, které zajišťují správnou transkripci, replikaci a stabilitu genomu (Meyer *et al.*, 2012).

2.2.5 Kontrola kvality proteinů (PQC)

Správná skladba proteinů je důležitá pro buněčnou a organelovou homeostázu (Metzger *et al.*, 2020), zvláště během stresových podmínek (Meyer *et al.*, 2012). Kvůli genetickému či environmentálnímu poškození není tvorba biologicky funkční konformace proteinů vždy správná, buňky proto byly nuceny vyvinout mechanismus kontroly kvality proteinů odstraňující tuto špatnou skladbu. PQC rozpoznává nesprávně složené proteiny, a pokud je nelze degradovat či zabránit jejich biologické aktivitě, alespoň brání jejich škodlivé akumulaci (Metzger *et al.*, 2020). Proteazom předchází akumulaci těchto nefunkčních, poškozených či špatně složených, potenciálně toxických proteinů (Škrott and Cvek, 2012). UPS také řídí degradaci těchto proteinů v ribozomu, ER, jádru, vnitřní jaderné membráně a cytosolu (Metzger *et al.*, 2020).

Luminální i membránové proteiny vyžadují pro svou degradaci p97. Během inaktivace p97 nesložené proteiny vyvolávají reakce, které mohou spustit apoptózu způsobenou stresem endoplazmatického retikula. V regulačních procesech p97 zprostředkovává

degradaci individuálních proteinů v jádře a cytosolu. Bylo geneticky prokázáno, že p97 chrání proti toxickým účinkům proteinových skupin, které jsou náchylné ke shlukování. Předpokládá se, že p97 předchází vzniku proteinových shluků, a tím napomáhá proteozomální degradaci (Kothe *et al.*, 2005). P97 má roli při autofágii, tak její specifické části – mitofágii (Meyer *et al.*, 2012).

Degradace spojená s endoplazmatickým retikulem ERAD

Endoplazmatické retikulum (ER) je jednou z největších membránových organel v buňce, hraje důležitou roli při syntéze proteinů, proteinové skladbě a kontrole kvality proteinů, lipidickém metabolismu a Ca^{2+} homeostáze. Poškozená funkce ER je spojována s buněčnou smrtí a jí předcházejícím dysfunkcím. Největší z domén ER je dvouvrstvá jaderná membrána, která je okolo jádra. Ostatní periferní membrány ER jsou napojeny na tuto jadernou membránu a odtud propojeny s cytoplazmou, kde interagují s jinými organelami, např. mitochondriemi. Mitochondrie komunikují s ER přes membrány, které jsou s ER propojeny – tzv.: MAMs (mitochondria-associated ER membranes). Poškození tohoto komunikačního kanálu mezi ER a mitochondriemi je spojováno s šikrou škálou patogenezí: rakovina, neurodegenerativní onemocnění, srdeční choroby a jiné (Sun and Qiu, 2020).

ERAD slouží jako velmi specializovaný mechanismus kontroly kvality proteinů v ER, který katalyzuje skladbu proteinů a zajišťuje doručení správně složených sekretorních proteinů do jejich cílové destinace (Neuber *et al.*, 2005).

ERAD vyžaduje přesun vybraného substrátu z membrány ER do cytosolu pro degradaci v UPS. V lumenu ER probíhá rozpoznání nesprávně složených polypeptidů, i když jejich degradace probíhá v cytosolu (Neuber *et al.*, 2005).

p97 zpracovává substráty, které jsou určeny k proteozomální degradaci před samotnou degradací. Proteiny, které jsou uvolněny z vazby na D1 a obsahují alespoň 4 ubikvitiny, jsou znovu poskládány, U ERAD se substráty neváží přímo na proteazom, ale nejprve interagují s Rad23 nebo Dsk2 (Bodnar and Rapport, 2017).

Retrotranslokace je velmi energeticky nevýhodná a p97 s navázaným UN je důležitý pro výše zmíněnou dislokaci (Stach and Freemont, 2017). Po retrotranslokaci substrátového segmentu přes membránu ER je polyubikvitinový řetězec připojen k substrátu ligasou propojenou s ER. Polyubikvitinový řetězec se váže na komplex p97,

který je veden k membráně ER svou N-koncovou doménou membránovým proteinem Ubx2. p97 postupně extrahuje substrát z ER membrány přes svůj centrální pór. Jakmile je polypeptid plně odstraněn z ER, p97 disociuje z Ubx2 a difunduje pryč z membrány s připojeným substrátem.

Tento dislokační krok vyžaduje volnou N-koncovou doménu. Dále je substrát zpracován přídatnými faktory a přesunut na proteazom (Bodnar and Rapport, 2017). Při absenci p97 dochází k akumulaci ERAD substrátů v ER (Desdhaies, 2014).

Motiv interagující s p97 je regulován hlavně třemi proteiny: E3 ubikvitinová ligasa gp78 (Glycoprotein 78), faktor pro přizvání E3 VIMP (sialoprotein S) a SVIP (small VCP/p97-interacting protein). Gp78 a VIMP podporují ERAD v rakovinných buňkách, SVIP má inhibiční efekt na tento proces. U mnoha lidských rakovin je účinek SVIP potlačen, což vyvolává nadprodukcí p97, která umožňuje ERAD vyhnout se programované buněčné smrti. Tímto mechanismem se rakovinné buňky vyhýbají buněčné smrti vyvolané stresem ER (Sun and Qiu, 2020).

2.2.6 Nemoci spojené s p97

Vzhledem k širokému spektru mechanismů, ve kterých p97 působí, je cílen při iniciaci různých onemocnění. p97 souvisí s rozpuštěm rakoviny a širokého spektra neurodegenerativních onemocnění (Haines, 2010).

Zvýšená exprese p97 sice koreluje se špatnou prognózou určitých druhů rakoviny, ale zároveň pomáhá předcházet aneuploidii a jiným genomovým nestabilitám, což jsou typické počáteční znaky pro rakovinné buňky. Díky zmírnění cytotoxického efektu špatně složených proteinů či amyloidů a regulaci homeostázy proteinů se p97 také pojí k různým agregačním nemocem (Meyer et al., 2012). Nesmyslné mutace p97 vedou ke dvěma fatálním proteinopatiím (nemoci způsobené shlukováním proteinů): IBMPFD (Inclusion Body Myopathy with Paget's disease of the bone and Frontotemporal Dementia) and fALS (familial Amyotrophic Lateral Sclerosis) (Buchberger *et al.*, 2015). Mutace p97 spojené s mutacemi jsou specificky přidruženy pouze k jeho určitým kofaktorům (Ritz *et al.*, 2011), funkce p97 spojené s ostatními kofaktory tedy zůstávají neporušeny (Weihl *et al.*, 2006).

Mezi další neurodegenerativní onemocnění, kterých se p97 účastní, patří: Parkinsonova choroba (PD), LBD (Lewy body disease), Huntingtovova choroba (HD), SCAIII (spinocerebellar ataxia type III) (Hänzelmann *et al.*, 2011).

Nepřímo je p97 spojováno s agregáty, které způsobují Alzheimerovu chorobu (AD), Machado-Josephovu chorobu, chorobu způsobenou priony a množství tausopathií (Sun and Qiu, 2020).

Vysokorepetitivní aminokyselinové sekvence, jako polyglutaminy (způsobující neurodegenerativní nemoci), polyalaniny (způsobující svalové dystrofie) či opakování dipeptidů (způsobující ALS) pravděpodobně poškozují translokaci a degradaci. Tyto účinky a rezistence repetitivních sekvencí k hydrolýze 20S proteazomem mohou vysvětlovat neschopnost ubikvitinového systému účinně degradovat tyto proteiny a jejich akumulaci při nemocech způsobených proteotoxicitou. Expres nových proteazomů může omezit účinnost inhibitorů proteazomu (Collins and Goldberg, 2017).

2.2.7 Specifické inhibitory p97

Jelikož je ATPasová aktivita p97 nezbytná ke správné funkci UPS (Freemont and Stach, 2017), bylo prokázáno, že inhibice p97 indukuje proteotoxický stres a apoptózu v rakovinných buňkách (Sun and Qiu, 2020). V buňkách NSCLC (non-small cell lung carcinoma) bylo zjištěno, že p97 byl nadregulovaný a zároveň inhibice p97 způsobila zastavení buněčného cyklu v G₀/G₁. Obecně vzato rakovinné buňky jsou snadno ovlivnitelné inhibicí p97 (Chapman *et al.*, 2015).

V selektivní funkci bortezomibu jako proteozomálního inhibitoru patrně hraje významnou roli sekreční dráha. Což je pravděpodobně důvodem, proč jsou proteozomálně cílené terapie účinné při léčbě rakoviny krve, jako jsou MCL (mantle cell lymphoma) a rakoviny kostní dřeně (vícečetný myelom). Tyto typy rakoviny jsou derivovány z buněk, které produkují velké množství sekrečních proteinů. Pacienti rezistentní k bortezomibu mohou být od roku 2012 léčeni carfilzomibem. Léčba bortezomibem a carfilzomibem prokázala, že obecná léčba cestou inhibice PQC by mohla být vhodnou volbou při těchto typech onemocnění (Chapman *et al.*, 2015).

Inhibicí p97 je ovlivněno mnoho procesů, většina z drah inhibice p97 se projevila jako terapeutická možnost pro léčbu rakoviny, primárně ERAD. Buňky, které produkují nadbytek sekrečních proteinů, jako B-buňky, mají přirozeně vytiženější sekreční dráhu, což by mohl být potenciální bod pro terapeutické objevy (Valle *et al.*, 2011).

Eeyarestatin I (EerI)

EerI by prvním objeveným inhibitorem p97 (Ding *et al.*, 2016). V buňkách ošetřených EerI se zvyšuje množství nesprávně složených proteinů, což v ER vede k UPR (unfolded

protein response), která směřuje k aktivaci apoptózy- RrrI ve spolupráci s bortezomibem vyvolává v rakovinných buňkách apoptózu způsobenou stresem ER (Chapman *et al.*, 2015).

Chinazoliny

Inhibice chinazoliny indukuje p97 postrádající Cys aminokyselinové zbytky v aktivních místech. Chinazoliny také skrže p97 inhibují fúzi autofagozomu s lysozomem. Určité chinazoliny také inhibují D1 či D2 domény p97 (Chapman *et al.*, 2015). Např.: DBeQ (N², N⁴-dibenzyl chinazolin-2,4-diamin) (Vekaria *et al.*, 2016) cílí primárně na D2 doménu (Ding *et al.*, 2016), a N-benzyl-2-(2-fluorofenyl) chinazolin-4-amin (Vekaria *et al.*, 2016).

Xantohumol

Výše zmíněné látky jsou syntetického původu, kdežto Xantohumol je přírodním inhibítozem p97, který se nachází ve chmelu (*Humulus lupulus*). Inhibuje hlavně autofágii vazbou na N-doménu p97 (Chapman *et al.*, 2015).

Další specifické inhibitory p97

CB-5083 (1-[4-(benzylamino)-5H, 7H, 8H-pyrano[4,3-d]pyrimidin-2-yl]-2-methyl-1H-indol-4-karboxamid) je dalším inhibítozem p97, který vyvolává UPR. Rozrušuje proteinovou homeostázu. Korelace mezi expresí genů propojených s UPR a ERAD s citlivostí k CB-5083 podporuje důležitost role UPR jako primárního spouštěče buněčné cytotoxicity (Anderson *et al.*, 2015). Mezi další příklady inhibítozů p97 lze uvést 2-(cyklohexylmethylamino)pyrimidiny, 2-anilino.4-aryl-1,3-thiazoly a alkylsulfanyl-1,2,3-thiazoly (Chapman *et al.*, 2015).

Kompetitivní inhibitory p97

Nízko molekulové inhibitory jsou důležitou farmaceutickou pomůckou pro obecný výzkum. Jejich jednoduchost dopravy do těla, relativní stabilita a schopnost selektivně a specificky vyhledat určitý enzym nebo buněčný proces z nich dělá atraktivní pomůcky pro výzkum. I přes jejich mnohé výhody a farmaceutický potenciál, mohou mít vedlejší účinky (Lynch *et al.*, 2017).

ML240 a ML241 inhibují degradaci proteinů závislou na p97 (Chou *et al.*, 2013), jsou kompetitivními inhibítozem p97 (Vekaria *et al.*, 2016). Obě látky sdílejí podobné strukturní

elementy (Chou *et al.*, 2011) a selektivně se váží na D2 doménu p97 (Zhang *et al.*, 2020). Specifická schopnost těchto látek je vyvolat apoptózu inhibicí autofagických vlastností p97, či souběžnou blokadou autofagické dráhy a UPS (Chou *et al.*, 2013). ML240 způsobuje rychlejší aktivaci UPR než ML241 (Chou *et al.*, 2011).

NMS-873 je vysoce selektivním (Bouwer *et al.*, 2021) alosterickým inhibitorem p97, který indukuje akumulaci polyUb proteinů, což vede ke stresu ER a bránění maturace autofagozomu (Vekaria *et al.*, 2016). Alosterická inhibice je jednou z nejselektivnějších, jelikož alosterická místa enzymů bývají méně konzervovaná než aktivní místa enzymů (Magnaghi *et al.*, 2013).

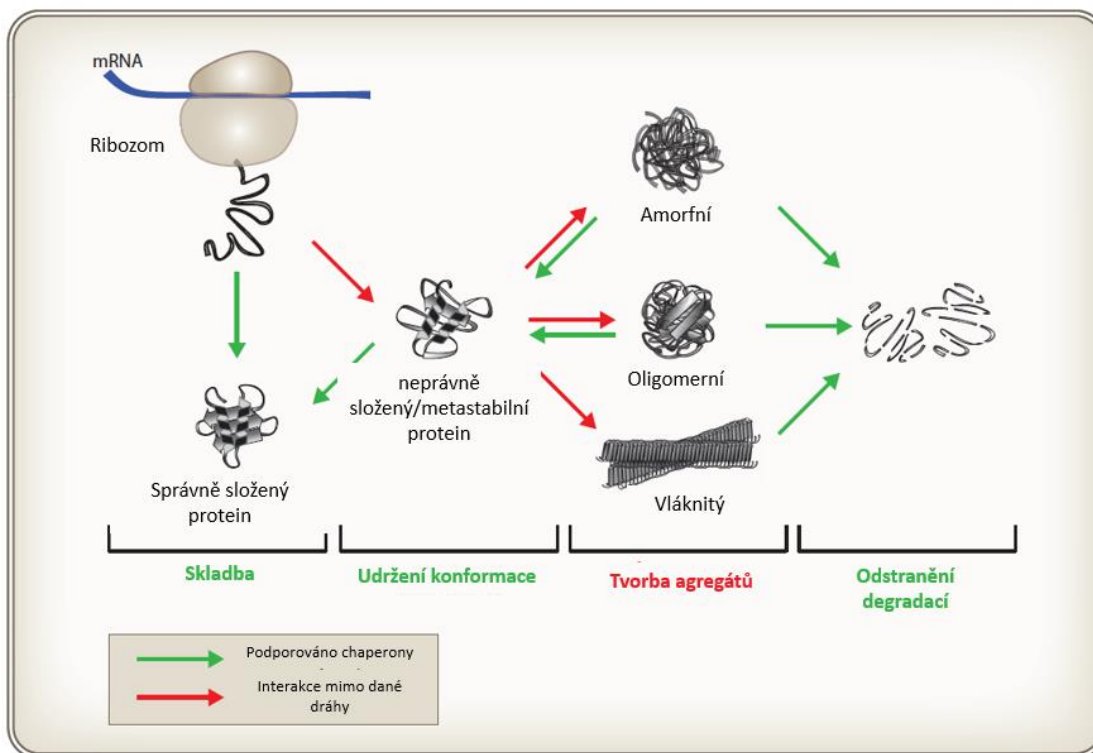
2.3 Proteinová agregace

Proteiny jsou nejvšestrannější makromolekuly. Informace určující specifickou strukturu proteinu, která je důležitá pro jeho biologickou aktivitu, je kódována v lineární aminokyselinové sekvenci nově syntetizovaného polypeptidového řetězce (Hartl, 2017).

Počet konformací i malého proteinu, o cca 100 AMK, může přesáhnout 10^{30} . Biologicky aktivní konformace (přirozený stav), je v omezené míře stabilní při fyziologických podmínkách. Není tedy překvapující, že skládání proteinů je velmi chybový proces (Hartl, 2017).

2.3.1 Skládání proteinů

Proteiny jsou schopné v buněčném prostředí přejímat mnoho různých konformačních stavů (Obr. 16). Konformace proteinů není určována pouze proteinovou aminokyselinovou sekvencí, ale i interakcemi s jinými proteiny (Balchin *et al.*, 2016). Skládání proteinů je proces, kdy je lineární řetězec aminokyselin konvertován do jedinečné funkční 3D struktury (Johnston *et al.*, 1998). Tento proces vyžaduje koordinaci více organel a proteinů v různých buněčných kompartmentech. Jelikož se jedná o děj závislý na energii, je mu dodávána z více metabolických drah (Wang *et al.*, 2016).



Obrázek 15: Schéma konformačních změn proteinu v závislosti na účasti chaperonů (Hartl, 2017).

Chaperony

Mnoho proteinů potřebuje pro správné složení asistenci určitých molekul – chaperonů. Různé chaperonové proteiny doprovázejí nově syntetizovaný polypeptidový řetězec během translace na ribozomu a postupným skládáním předchází špatnému skládání a agregaci (Hartl, 2017). Chaperony nejenže asistují při skládání, ale usnadňují i proteinovou degradaci, když správné skládání selže (Dikic, 2017).

Proteiny v nepřírozené konformaci vystavují hydrofobní aminokyselinové zbytky, ty se u proteinů ve správné konformaci nachází uvnitř a nemohou tak interagovat s jinými molekulami. Chaperony tyto aminokyseliny přechodně stíní (Hartl, 2017).

Chaperony vážou proteiny v nepřírozených konformacích, odnímají z cytosolu špatně složené proteiny a meziproducty mající předpoklady k agregaci (Johnston *et al.*, 1998). Mezi další hlavní aktivity, které chaperony vykonávají, patří předcházení vzniku agregátů schopnost znovu složit aberantně složené proteiny a kapacita aktivně rozvolňovat určité proteinové agregáty (Hipp *et al.*, 2014). Tímto mechanismem snižují pravděpodobnost tvorby shluků (Johnston *et al.*, 1998).

Dále regulují interakce jako je oddělování shluků, degradace a pohyb proteinů v buňce (Labbadia and Morimoto, 2015). Nesprávně složené proteiny mohou mít mnoho škodlivých efektů v buňce (Sontag *et al.*, 2017).

2.3.2 Proteinové agregáty

Peptidy a proteiny mají tendence přeměňovat se ze svého přirozeného funkčního stavu do spletitých dysfunkčních agregátů (Chiti and Dobson, 2017). Proteinové agregáty jsou definované jako asociace dvou a více proteinových molekul v nepřirozené konformaci. Shluky mohou nabývat mnoho struktur, od amorfních po vysoce organizovaná vlákna (amyloid). Náchylnost proteinů k agregaci je řízena primárně chemickými vlastnostmi proteinu, například jeho buněčnou koncentrací a konformační stabilitou ve složeném stavu (Hipp *et al.*, 2014).

Mechanismus proteinové agregace

Částečně složené, či nesprávně složené proteiny vystavují hydrofobní aminokyselinové zbytky a regiony nestrukturalizovaných polypeptidových vazeb cytosolu, což vede ke shlukování. Během skládání hydrofobní síly pohybují celou molekulou tak, aby stabilizovaly její jádro (Hartl, 2017).

V buňkách dochází k chybovému skládání z mnoha důvodů: včlenění špatné AMK do řetězce, chyba v transkripci či translaci (Johnston *et al.*, 1998), mutacemi, proteotoxickým stresem či selháním molekulárních chaperonů (Mogk *et al.*, 2018), pochybením PN (proteostasis network), chybami v posttranslačních modifikacích, přepravou proteinů v buňce (Sami *et al.*, 2017). Tato chybovost způsobuje změnu konformačního stavu proteinu, při kterém vystavuje interagující hydrofobní rezidua náchylná k agregaci (Mogk *et al.*, 2018).

Shlukování proteinů přímo interferuje s obecnou kontrolou kvality proteinů a je symptomem i příčinou snížení proteostázy (Hartl, 2017). Dále tvorba agregátů je i příčinou nerovnováhy proteostázy přetížením kapacity chaperonů a degradačních mechanismů, což eventuelně vede ke kolapsu proteostázy a buněčné smrti (Hipp *et al.*, 2014).

Proteiny při počátku shlukování tvoří klastry z malého množství molekul, které jsou ve svém monomerním stavu. Pokud tyto shluky pochází z proteinů, které byly nesprávně složené, částečně složené nebo seskládány z monomerních stavů, tvoří vysoce

destrukturalizované, částečně strukturalizované či nativní konformaci podobné oligomery (Chiti and Dobson, 2017).

Tyto brzké agregáty jsou nestabilní, mohou snadno disociovat a přetvořit se v rozpustné sloučeniny. Většina z těchto agregátů podstoupí vnitřní reorganizaci do stabilnějšího β -strukturního stavu. Při pokračování shlukování je tento proces doprovázen kompaktností a velikostí agregátů (Chiti and Dobson, 2017).

β -strukturalizované oligomery mohou dále růst asociací dalších oligomerů či monomerů. Po jejich připojení dochází ke strukturní reorganizaci a k tvorbě fibril s vysokou úrovní strukturního řádu (amyloidních fibril) (Chiti and Dobson, 2017).

Růst agregátů

Počáteční oligomery mohou růst do větších shluků. Agregáty rostou více mechanismy:

1. připojováním monomerů
2. řetězcovou polymerizací
3. interakcí agregátu s agregátem
4. kondenzací shluků
5. kombinací předešlých možností (Wang and Roberts, 2018).

Potenciálně lze růst agregátů kontrolovat skrze konformační stabilitu proteinu (Borzova *et al.*, 2015), či koloidní stabilitou (protein-proteinové interakce) (Kim *et al.*, 2013). Růst shluků bývá nelineárně závislý, hlavně při formaci amyloidů. V tomto případě je růst shluků dokonce exponenciální vzhledem k časovému přírůstku nových agregátů, které se mohou shlukovat (Saluja *et al.*, 2014).

Jak proteinové agregáty rostou, mohou se stát nerozpustnými a morfologicky rozdílnými částicemi (Wang and Roberts, 2018). Je nutné poznamenat, že nerozpustné částice mohou částečně disociovat do rozpustných shluků (Kiese *et al.*, 2010).

Toxicita agregátů

Toxicita agregátů souvisí s mnoha hledisky, například reaktivním povrchem, umístěním, kompartmentalizací a stabilitou agregátů. Mezi mechanismy toxicity shluků patří fyzické poškození membrán, bránění transportním procesům, oslabení translace, či stresem vynucené zastavení translace, a ko-agregace s klíčovými proteiny jako jsou transkripční

faktory. Všechny tyto aspekty vedou k sekundární ztrátě funkce proteinů. Přichycení chaperonů a jiných kompartmentů PQC přispívá ke kolapsu buněčné proteostázy, což vede k zachování progresivní toxické povahy agregátů (Mogk *et al.*, 2018).

Mnoho studií potvrdilo, že agregáty mohou inhibovat proteinovou degradaci zprostředkovanou proteazomem a autofágickým systémem, a mohou odstavit velmi důležité komponenty chaperonů. (Hartl, 2017).

Uskladnění proteinových shluků

Nedílnou součástí správy špatně spletených proteinů je jejich prostorové oddělení. Kompartmenty pro přechodné oddělení špatně složených proteinů se nazývají Q-tělíska. Q-tělíska jsou malé a rychle se tvoří v místě vzniku nespleteného proteinu, například při stresových podmínkách (Hartl, 2017).

Pokud degradace proteinů v proteazomu selže, shlukují se proteiny v Juxt nukleárním kompartmentu pro kontrolu kvality (JUNQ) (Hartl, 2017). Agresomy a JUNQ umožňují depozici agregovaných proteinů v netoxické ukládací formě, dokud není dostupná kapacita pro jejich degradaci. Některé druhy nesprávně složených proteinů jsou dopravovány přímo do lysozomu pomocí HSP70 (Hipp *et al.*, 2014).

2.3.3 UPR (unfolded protein response)

ER se stará o syntézu, skládání a transport přibližně jedné třetiny proteinů v eukaryotické buňce (Wang *et al.*, 2016). Membránové a sekreční proteiny, které nejsou schopny docílit správné konformace, jsou degradovány na povrchu ER, kde jsou přesunuty retrotranslokací (viz 2.2.6.3). (Johnston *et al.*, 1998).

UPR je buněčná odpověď založená na přísné kontrole kvality proteinů sekreční dráhy zvýšením hladiny chaperonů propojených s ER a snížením obecné syntézy proteinů, může být vyvolána i stresem ER (Chapman *et al.*, 2015).

Nerovnováha v homeostáze ER vede k akumulaci nesložených či nesprávně složených proteinů v lumenu ER. Tato akumulace způsobuje stres ER, který vede ke spuštění UPR. UPR následně podporuje přežití buňky (Wang *et al.*, 2016). Pokud je kapacita UPR pro udržení proteostázy přetížena (stres je příliš velký či chronický (Wang *et al.*, 2016)), buňka vstoupí do apoptózy (Hetz *et al.*, 2020).

2.3.4 Patologie spojená s nesprávně složenými proteiny

Proteinové agregáty jsou těžko rozložitelné a degradovatelné (Johnston *et al.*, 1998). Aberantní skládání je spojováno s velmi rychle rostoucí patologií. Jsou rozlišovány dvě skupiny nemocí vzniklé špatným složením proteinů: nemoci ze ztráty funkce a nemoci ze získání toxicity (Hartl, 2017).

První skupina je charakteristická dysfunkčními proteiny, které jsou výsledkem SNP (single nucleotide polymorphism) mutací, která činí proteiny metastabilní se sklony k degradaci. Jako například při cystické fibróze a jiných metabolických defektech (Hartl, 2017).

V druhé skupině onemocnění metastabilní proteiny podléhají agregaci, která způsobuje buněčnou toxicitu. Tyto patologie zahrnují neurodegenerativní onemocnění, hlavně AD a PD, pak diabetes typu II a určité formy srdečních onemocnění a rakoviny (Hartl, 2017).č

Shlukování může být způsobeno dědičnými mutacemi v postižených proteinech, jako při HD a brzo propukajících AD a PD (Hartl, 2017). Tato onemocnění jsou charakteristická intracelulárními inkluzemi složenými z agregátů a ubikvitinovaných proteinů (Johnston *et al.*, 1998). Většina případů je náhodných a manifestují se v závislosti na věku, pravděpodobně doprovázeném snižující se kapacitou PN (Hartl, 2017).

2.3.5 Proteostáza

Aby byla zachována integrita proteomu a zdraví buňky, musí být v buňce dosažena proteostáza. Proteostáza je zajištěna koordinací mnoha procesů, které se dohromady nazývají PN (proteostasis network). Mezi tyto procesy patří syntéza, skládání, rozplétání, degradace a udržování proteinů. PN zahrnuje translační aparát, molekulární chaperony a kochaperony, UPS a autofagický aparát.

Mezi důležité komponenty pro správnou funkci PN a proteostázu lze považovat transkripční faktory, metabolické faktory, signální dráhy a regulátory posttranslačních modifikací. Velmi důležité pro správnou funkci PN jsou také stresové odpovědi jako HSR (heat shock response) a UPR. PN zahrnuje všechny subcelulární kompartmenty, a je nepostradatelná pro životaschopnost buněk a celkové zdraví organismu (Powers *et al.*, 2009). S přibývajícím věkem klesá funkce PN (Balchin *et al.*, 2016).

Molekulární chaperony hrají klíčovou roli pro správnou funkci PN. Mohou působit samostatně nebo v různých kombinacích s odlišnými kochaperony. Regulují proteinové skládání, oddělování shluků, degradace a pohyb proteinů po buňce (Labbadia and Morimoto, 2015).

PN jako cíl léčiv

Mechanismy, které podporují proteostázu mají potenciál udržet mutantní proteiny ve funkčním, neagregovaném stavu. Zvýšení kapacity PN by mohlo být výhodné pro obě skupiny nemocí způsobenými proteinovou agregací – nemoci ze ztráty funkce a nemoci ze získání toxicity (Balchin *et al.*, 2016).

Složení PN je velmi dynamické. Pro poskytnutí dodatečné ochrany proti akutním a chronickým špatným složením proteinů může být obsah molekulárních chaperonů, kochaperonů a proteozomálních podjednotek zvýšen celkově, nebo v závislosti na buněčném kompartmentu (Labbadia and Morimoto, 2015).

Oslabením PN inhibicí specifických chaperonů či degradačních drah je docíleno účinné léčby rakoviny, jelikož jsou často onkogenní proteiny metastabilní, a tudíž vysoce závislé na chaperonech (Balchin *et al.*, 2016).

2.4 Heat shock response (HSR)

HSP chaperonový systém, objevující se u eukaryot i prokaryot, pro skládání proteinů a regulace degradace je evolučně starší vůči například autofágii, která je výlučně eukaryotická (Dokladny *et al.*, 2015).

HSR systém a autofágie jsou dva nezávislé procesy, které se navzájem doplňují. Ovšem, pokud jsou oba tyto systémy aktivovány, je autofágie inhibována HSR (Dokladny *et al.*, 2015). HSR rozšiřuje cytosolickou a jadernou část PN, UPR endoplazmatického retikula a mitochondrií (Labbadia and Morimoto, 2015).

2.4.1 Aktivace HSR, a HSF (heat shock factor)

HSR je způsobena primárně proteotoxickým stresem. Mnoho HSP předchází proteinové agregaci a účastní se opakovaného skládání proteinů či eliminace nenávratně denaturovaných proteinů (Pirkkala *et al.*, 2001).

I když existuje více mechanismů pro regulaci četnosti cytosolických a jaderných chaperonů (Voellmy and Boellmann, 2007), je aktivace pomocí HSF nejčastější (Labbadia and Morimoto, 2015). HSF se chovají jako indukibilní transkripční faktory

HSP. Přítomnost HSF je nutná pro expresi většiny HSP (Wu *et al.*, 2016). Z těchto HSF je nejdůležitějším aktivátorem HSR HSF1 (heat shock factor 1) (Voellmy and Boellmann, 2007).

Transkripční faktory stresových odpovědí jsou udržovány v potlačeném či inaktivním stavu. HSF1 je udržován v cytosolu ve formě inaktivovaného monomeru skrze přechodné interakce s HSP80 a HSP90. Se zvýšenou hladinou proteinů mimo svou nativní konformaci je HSF1 uvolněn z represivního komplexu, homotrimerizuje a rychle se přesouvá do jádra, kde způsobuje expresi genů kódujících molekulární chaperony (Akerfelt *et al.*, 2010). Jakmile je stres uvolněn, aktivita HSF1 je potlačena acetylací a vazbou molekulárních chaperonů (Labbadia and Morimoto, 2015).

HSP a chaperony tvoří multichaperonové komplexy regulující aktivitu HSF1 v různých úrovních (Voellmy and Boellmann, 2007). HSF1 vyvolává transkripci HSP, což podporuje nové poskládání proteinů (Vekaria *et al.*, 2016).

Před geny HSP se na sekvenci nachází HSE (heat shock elements), což jsou cis-aktivní sekvence, na které se váží HSF. Po navázání tedy indukují expresi HSP (Wu *et al.*, 2016).

2.4.2 HSP

Některé nesprávně složené proteiny vyžadují chaperony řízený transport z cytosolu do jádra pro proteosomální degradaci (Balchin *et al.*, 2016). HSP jsou také známé díky svým fyziologickým a ochranným funkcím v buňce jako molekulární chaperony. Usnadňují proteinové skládání a pomáhají proteinům zůstat v přirozené struktuře a funkci, když je buňka vystavena stresu. HSP je skupina proteinů, jejíž funkce předchází, či inhibuje denaturaci či rozplétání buněčných proteinů při stresové odpovědi na teplo či proteotoxický stres (Wu *et al.*, 2016).

HSP jsou klasifikovány dle svých molekulových hmotností: HSP27, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 a velké HSP (HSP110). HSP jsou proteiny závislé na ATP s ATPasovou aktivitou (Wu *et al.*, 2016).

HSP70 a HSP90

Mezi nejlépe prostudované molekulární chaperony patří členy rodin HSP70 a HSP90. Homology HSP70 a HSP90 jsou nepostradatelné pro správnou funkci endoplazmatického retikula a mitochondrií. Jedná se o hojně se vyskytující proteiny (Labbadia and Morimoto, 2015).

Aktivita HSP70 a HSP90 je zajišťována hydrolýzou ATP, což vyvolává konformační změny, díky kterým se může navázat substrát. Uvolnění substrátu z vazebného místa zaručuje nukleotidová výměna. Pro kompletní znovusložení proteinů je někdy třeba i více cyklů vazby a uvolnění substrátu (Kim *et al.*, 2013).

Pokud je znovusložení proteinů neúčinné, HSP70 nebo HSP90 tvoří komplexy s kochaperony, které podporují ubikvitinaci substrátu (Labbadia and Morimoto, 2015). Pokud se jedná o agregáty, je nutné nejdříve shluky rozvolnit pomocí komplexu HSP70, HSP110 a HSP40 (Balchin *et al.*, 2016). Následně proteiny směřují z HSP70 nebo HSP90 do proteazomu (Labbadia and Morimoto, 2015) a shluky, které nelze rozvolnit jsou odstraněny selektivní autofágií a lysozomální degradací (Balchin *et al.*, 2016).

HSP70 podporuje onkogenezi, množení, migraci nádorových buněk a metastáze, navíc snižuje pravděpodobnost iniciace apoptózy. Jeho exprese je zvýšena při různých typech rakovin. HSP70 také řídí rezistenci k léčivům při terapii rakoviny (k bortezomib) (Wu *et al.*, 2016). HSP70 se také účastní rozkladu proteinů (Hipp *et al.*, 2014).

HSP90 podporuje adhezi nádorových buněk, pohyblivost nádorů a metastáze, angiogenezi a snižuje pravděpodobnost iniciace apoptózy. Jelikož se na HSP90 váže mnoho různých signálních proteinů, inhibitory HSP90 mohou simultánně cílit na více signálních drah (Wu *et al.*, 2016). HSP90 tvoří cca 1-2 % celkových proteinů v eukaryotních buňkách (Jacob *et al.*, 2016).

2.4.3 sHSPs (small heat-shock proteins)

sHSPs a chaperony jsou obecně přímo zodpovědné za skladbu, protekci a obnovení funkčnosti proteinů (Voellmy and Boellmann, 2007).

sHSP kooperují s HSP70, které přeskládávají proteiny díky cyklických interakcí vzájemných a uvolňujících proteiny. Tyto interakce jsou závislé na ATP (Hipp *et al.*, 2014). sHSPs ovlivňují proteinové skládání tvorbou velkých homo-oligomerních pastí, které zachytávají nesprávně složené proteiny a předcházejí tvorbě nechtěných intra- nebo intermolekulárních interakcí v cytosolu (Labbadia and Morimoto, 2015).

sHSPs kompletně postrádají ATPasovou aktivitu. Jsou složeny ze 150-250 AMK a mají poměrně malou molekulovou hmotnost (Muranova *et al.*, 2019).

2.4.4 Kochaperony

Kochaperon CHIP (C-terminus of HSP70-interacting protein) je schopen cílit na substráty chaperonů, usnadňuje jejich polyubikvitinaci, a tím je předurčuje pro degradaci proteazomem. CHIP obsahuje doménu TPR (tetraatricopeptide repeat) a U-box doménu. U-box má E3 Ub ligasovou aktivitu. TPR doména váže C-konec některých chaperonů (HSP70, HSP90). Díky E3 Ub ligasové aktivitě je schopen připojit polyubikvitinový postranní řetězec k C-konci U-box domény (Voellmy and Boellmann, 2007).

Při normálních podmínkách dochází k dynamické rovnováze mezi proteinovou ochranou závislou na chaperonech, a proteozomální degradací chaperony řízenou. Tato rovnováha vyjadřuje přísnost PQC. Obsah CHIP v buňce určuje, zda chaperonový substrát dosáhne své konečné konformace, nebo bude polyubikvitinací označen k degradaci. K vybalancované PQC přispívá aktivace HSF1, následná HSR vyvolaná zvýšenou hladinou CHIP (Dai *et al.*, 2003).

Transkripční mechanismus, který určuje hladinu CHIP je tkáňově specifická exprese mRNA (Voellmy and Boellmann, 2007).

2.5 Protinádorová terapie

Rakovina je nádorové onemocnění, které je charakteristické abnormálním růstem a neomezeným dělením buněk, doprovázenou mutagenezí a angiogenezí (Hoeller and Dikic, 2009).

Genomické změny mohou nádorové buňky přimět k větší závislosti na proteostáze. Díky tomuto zjištění je v klinické praxi využíváno proteozomálních inhibitorů. Více než 90 % lidských nádorových buněk obsahuje více než dvě kopie jednoho či většího množství chromozomů. Tyto přebývající chromozomy jsou exprimovány a proteinová syntéza je v takovýchto aneuploidních rakovinných buňkách v nerovnováze. Proteiny ve velké míře nejsou stabilní a neudrží stabilní konformace, tudíž jsou degradovány UPS. Rakovinné buňky jsou tedy závislé na PQC, UPS a mitofágii (Desdhaies, 2014).

Jelikož p97 hraje důležitou roli v PQC a v určitých typech rakovin je zmutovaný, zmnožený, nadexprimovaný, a je tedy vhodným cílem protinádorové terapie. Po vyčerpání enzymatické aktivity p97 buňky rychle aktivují kaspasy a podléhají buněčné smrti (Desdhaies, 2014).

2.5.1 Proteotoxický stres rakovinných buněk

Nádory neustále podléhají onkogenním mutacím, jako je amplifikace genu, ztráta funkce nádorového supresoru, či mutace způsobená nově získanou funkcí. Určité stresové „fenotypy“ znemožňují prosperitu v mikroprostředí nádoru. Mezi tyto stresové fenotypy patří: replikační/DNA poškozující stres, proteotoxický stres, oxidativní stres a metabolický stres (Vekaria *et al.*, 2016).

Znakem mnoha rakovinových linií je výše zmíněný proteotoxický stres způsobený hojností špatně složených proteinů. Hromadění špatně složených proteinů a eskalace proteotoxického stresu je známá metoda cílení na rakovinné buňky.

Bohužel, rakovinné buňky dokážou překonat tento selektivní tlak a vyvinout si rezistenci, například zvýšením exprese proteozomálních podjednotek a chaperonů (hlavně chaperonu HSP 90 (heat shock protein 90), který podporuje skládání proteinů a jejich maturaci), což proteotoxický stres sníží (Stach and Freemont, 2017).

2.6 Dithiokarbamáty

Dithiokarbamáty (DTC) jsou chemické organosírové sloučeniny. Existují dva typy dithiokarbamatů: mono- a dialkyldithiokarbamáty (Kaila *et al.*, 2012).

Dithiokarbamáty mají široké spektrum využití – jako fungicidy, pesticidy, v biologii, medicíně, při organické syntéze, syntéze fotostabilních polymerů, také slouží jako chránící prvky proti záření (Odularu and Ajibade, 2019), dále slouží jako antioxidanty (Jayaraju *et al.*, 2015).

Jednou z důležitých charakteristik dithiokarbamatů je jejich schopnost přeměny z amfifilních, lipofilních až po hydrofilních, podle navázaných skupin (Obrázek 11) (Viola-Rhenals *et al.*, 2018). Kovy s dithiokarbamáty tvoří koordinační sloučeniny (Cvek, 2011).

2.6.1 Disulfiram

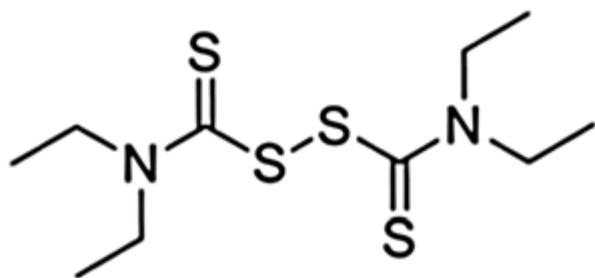
Disulfiram (DSF), Antabus, neboli tetraethylthiuram disulfid (TETDS) je disulfidickým derivátem DTC (diethyldithiokarbamat) (Obr. 13) (Viola-Rhenals *et al.*, 2018).

Jedná se o lék využívaný po více než 60 let jako doplněk léčby alkoholově závislých (Cvek, 2011), pojem „repurposing“ zahrnuje využití léků, u kterých je známá jejich farmakokinetika, dávkování, nežádoucí účinky, stejně jako i výzkum efektů daného léku mimo cílenou sloučeninu. Tedy Antabus jako lék inhibující aldehyd dehydrogenasu, která pak není schopna metabolizovat acetaldehyd na acetát při metabolismu alkoholu

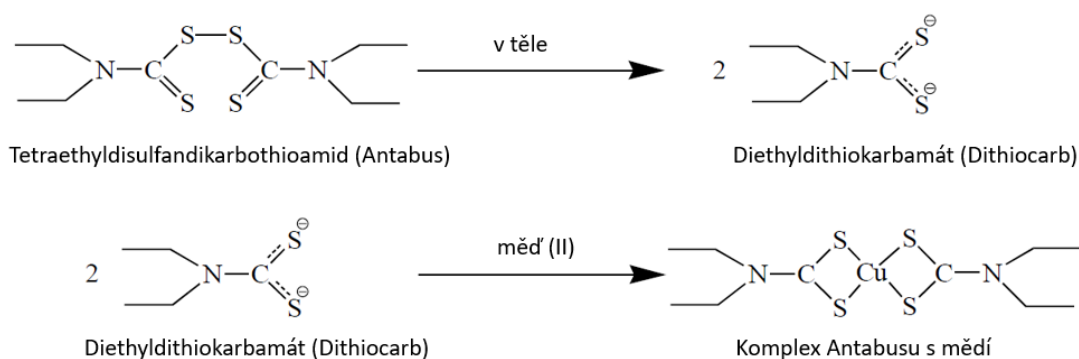
(primární cíl), tedy léčba alkoholismu (Petersen, 1992) a prokázání jeho protirakovinných účinků (tedy efekt mimo primární cíl). Jedním z hlavních důvodů pro zkoumání již využívaných léků je mimo snížení ceny urychlení celého procesu uvedení na trh (díky již výše zmíněné znalosti farmakokinetiky, atd.) (Cvek, 2012).

V těle je DSF metabolizován na DTC a další metabolity, které ireverzibilně inhibují jaterní aldehyd dehydrogenasu, která poté není schopna metabolizovat acetaldehyd na acetát při zpracování alkoholu (Cvek, 2011).

V žaludku (působením kyselého prostředí) nebo v krevním řečišti (glutathion reduktasovým systémem erytrocytů) je DSF rychle přeměněn (Skrott *et al.*, 2012) na dvě molekuly svého redukovaného aktivního metabolitu DTC, který dále chelatuje Cu za tvorby CuET (Obr. 14).



Obrázek 12: Chemická struktura DSF (Lewis *et al.*, 2014).



Obrázek 13: Schéma metabolismu disulfiramů na dithiokarbamát v těle a následná komplexace diethylthiokarbamátu s přídatkem dvojmocné mědi (Skrott *et al.*, 2012).

2.6.2 Protirakovinné účinky DTC a DSF

U aktivního metabolitu DSF, CuET, byla prokázána jeho protirakovinná aktivita. Jeho toxicita byla zaznamenána zejména v rakovině prsu (Cvek *et al.*, 2008). Díky jeho výše zmíněným prokázaným protirakovinným účinkům je DSF vhodným lékem pro nové využití již známých farmaceutik (Cvek, 2011).

Dle dat z Dánského národního demografického registru, která odrážejí riziko úmrtí na rakovinu s užíváním DSF a bez užívání DSF, byla u rakoviny tenkého střeva, prostaty a prsu zaznamenána snížená úmrtnost pacientů, kteří dříve užívali DSF, a to i u pacientů s metastázujícím onemocněním (Skrott *et al.*, 2017).

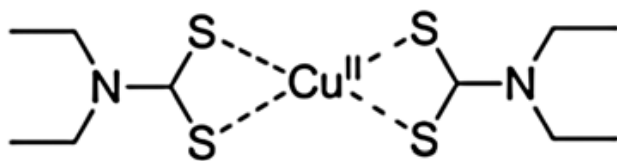
V nádorové tkáni je oproti normální tkáni výrazně zvýšená hladina ionů Cu^+ (Zhang *et al.*, 2016), která ovlivňuje angiogenezi, metastázování nádoru (Xiao *et al.*, 2010), růst a invazivnost nádoru (Chen *et al.*, 2005). Bylo prokázáno, že určité látky s navázaným ionem Cu se chovají jako inhibitory proteazomu (Chen *et al.*, 2006).

DTC je schopen vázat Cu^+ a jeho proteozomální inhibiční aktivita a účinek vyvolávající apoptózu u rakovinných buněk byly také prokázány, u zdravých buněk komplex tyto účinky nemá (Chen *et al.*, 2006). Antabus znatelně zvyšuje vnitrobuněčný obsah mědi v primárních askocytech a melanomových buňkách (Skrott *et al.*, 2012).

Antabus je potenciálním inhibitorem NF- κ B (nuclear factor- κ B), který kontroluje matrix metaloproteinas a TNF- α (Cvek, 2011). Inhibice proteazomu podporuje účinnost určitých chemoterapeutik snížením exprese antiapoptotického proteinu TNF- α a zvýšením hladiny proapoptotického proteinu Noxa (Li *et al.*, 2020).

2.6.3 Komplex CuET

DTC tvoří stabilní koordinační komplexy s přechodnými kovy, hlavně s Cu^{+2} (Obr. 15). DTC a měďnaté iony jsou velmi reaktivní sloučeniny s pleiotropním efektem na buněčný metabolismus a přežití. Dokážou rozrušit buněčnou redoxní rovnováhu. Samy o sobě projevují silnou oxidační aktivitu, což naznačuje, že jsou potenciální inhibitory důležitého antioxidantního enzymu SOD1 (CuZn superoxide dismutase) (Marikovský *et al.*, 2002). Inhibice SOD1 způsobuje poškození mitochondriálních membrán volnými radikály, vypuštění cytochromu c a apoptózu nádorových buněk (Skrott *et al.*, 2012)



Obrázek 14: Vzorec komplexu DSF s Cu (II) (Lewis *et al.*, 2014).

DTC je schopný dočasně vyvázat měďnaté ionty z aktivních míst superoxid dismutasy (SOD) a zformovat tak komplex CuET. Jelikož CuET je lipofilní a velmi stabilní sloučenina, je to nejlépe absorbovatelná forma DSF (Johannson and Stankiewicz, 1985), která snadno prochází buněčnými membránami (Viola-Rhenals *et al.*, 2018).

Mechanismus CuET

CuET vyvolává podobné reakce jako inhibitory proteazomu, MG132 či bortezomib. Hromadí polyUb proteiny a akumuluje ubikvitinované proteiny v cytoplazmě. CuET neinhibuje aktivitu 26S proteazomu, ale patrně stabilizuje ubikvitinované proteiny blokováním předešlého kroku v proteazomální degradaci, tedy dráhu zpracování polyUb proteinů dráhou p97. Poškozená p97 vede k fenotypu podobnému chybné funkci proteazomu (Skrott *et al.*, 2017).

Bylo prokázáno, že se po ošetření buněk CuET snížila rychlost difuze, tedy mobilita nahromaděných polyUb proteinů. V buňkách ošetřených CuET zůstává určitá část akumulovaných polyUb proteinů zůstává nepohyblivá, pravděpodobně ukotvena v buněčných strukturách. Zhoršená funkce p97 segregasy je spojována s UPR, která byla potvrzena po působení CuET. Předpokládá se, že inhibice p97 by se mohla stát alternativní léčbou pro myelomové pacienty, kterým se nemoc vrátila po léčbě BTZ (Skrott *et al.*, 2017).

Terapie DSF v komplexaci s mědí by se mohla stát novou terapeutickou volbou pro relapsovou pacienty a pacienty rezistentní k BTZ s mnohočetným myelomem (Skrott *et al.*, 2017).

Imobilizace a vazba NPL4 pomocí CuET

CuET je přednostně akumulováno v nádorech. Poté, co CuET vstoupí do buňky, váže se na NPL4. Pro přímý vliv CuET na NPL4 hraje velmi důležitou roli zinková doména NPL4. Navázané CuET na NPL4 vede k rychlé tvorbě agregátů NPL4, blokuje vitální

p97-NPL4-UFD1 dráhu a iniciuje komplexní buněčný fenotyp (například indukce HSR (heat shock response)), který vede k buněčné smrti (Skrott et al., 2017).

CuET nemá vliv na ATPasovou aktivitu p97 (Skrott *et al.*, 2017).

Mezi nepřímé účinky agregace Npl4 patří HSR. CuET indukované NPL4 agregáty obsahují proteiny, které jsou spojeny s proteotoxickým stresem (HSP70, SUMO2/3 (small ubiquitin-like modifier), polyUb řetězce a TDP-43). Shluk NPL4 také obsahuje ATR kinasu, která je velmi důležitá pro správnou buněčnou odpověď na replikační stres (Majera *et al.*, 2020).

3. Experimentální část

3.1 Materiál

- 1,5 ml mikrozkušavky (Eppendorf)
- 2 ml mikrozkušavky (Eppendorf)
- 15 ml centrifugační zkušavky (GenFollower)
- Kultivační láhev s filtrem (Techno Plastic Products)
- Kultivační destičky, 96 jamkové (Techno Plastic Products)
- Kultivační destičky, 12 jamkové (Techno Plastic Products)
- Sada špiček na pipety

3.1.1 Biologický materiál

Pro experimenty byla použita adherentní rekombinantní buněčná linie U2OS, lidská buněčná linie odvozená z osteosarkomu epiteliálních buněk. Buňky byly získány od společnosti ATCC (American Tissue Culture Collection). Pro experimenty byly dříve zkonstruovány buněčné linie U-2 OS stabilně exprimující NPL4-GFP, která byla popsána v publikaci Skrott *et al.*, 2017.

3.1.2 Použité soupravy a chemikálie

- 4',6-diamindin-2-fenylindol (DAPI)
- CuET, bis(-diethyldithiokarbamát)-měďnatý komplex (Sigma Aldrich)
- Chlorid měďnatý (Sigma Aldrich)
- Dibenzylidithiokarbamát (TCI Chemicals)
- Dimethyldihtiokarbamát (sigma Aldrich)
- Dimethyl sulfoxid (DMSO) (Pancreac Quimica S.L.U.)
- Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) high glucose liquid with Sodium Pyruvate with Stable Sglutamine, sterile filtered, 500 ml (Biosera)
- Ethanol 70%
- Formaldehyd 4%

- Fosfátový pufr (PBS) 10× zásobní roztok, 1 litr (pH 7,4): NaCl 80,1 g, KCl 2 g, Na₂HPO₄ 14,4 g, KH₂PO₄ 2,7 g, HCl pro stanovení pH, deionizovaná voda; 1× pracovní roztok = rozředění zásobního roztoku 10:1
- Hovězí sérový albumin (FBS, Fetal Bovine Serum), tepelně inaktivovaný, sterilní, vhodný pro buněčné linie (Sigma-Aldrich)
- Penicilin/Streptomycin (100×), P11-010 PAA (The Cell Culture Company)
- Pyrrolidindithiokarbamát (Sigma Aldrich)
- Triton X-100 (Tx-100; 0,2 % v PBS)
- Trypsin (1×), TrypLEtm Express 12605-028 (Gibco)
- Voda deionizovaná (pomocí přístroje Aqua osmotic)
- XTT aktivátor (elektron-vázající reagent fenazin methosulfát), zásobní roztok 50× v dH₂O (Applichem)
- XTT reagent
[2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolinum-5-karboxanilid],
v koncentraci 0,9 mg/ml v RPMI médiu (Applichem)

3.1.3 Seznam použitých přístrojů

- Analyzátor buněčné viability Vi-Cell XR (Beckman Coulter, USA)
- Mrazicí box (-86 °C) (New Brunswick Scientific Innova U725)
- Centrifuga LabogeneScanspeed 1236R
- Inkubátor s příslušenstvím HERACELL 150i (Thermo Scientific, USA)
- Laboratorní váhy SBC 21 (Scaltec, USA)
- Laminární box (Thermo Scientific, USA)
- mikroskop Zeiss Axioimger Z.1 vybavený LSM780 modulem se softwarem Zeiss Zen 11
- Sada pipet
- Spektrofotometr (program I-control) (Tecan, Švýcarsko)

- Třepačka VORTEX 3 (IKA)
- Vodní lázeň Memmert

3.2 Metodika

3.2.1 Kultivace buněčné linie

Buňky byly kultivovány v DMEM médiu doplněném 10% fetálním bovinním sérem (FBS) a 1% antibiotiky penicilin a streptomycin, a byly udržovány ve vlhkém prostředí inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂.

3.2.2 Pasážování a počítání buněk

Dvakrát týdně byly buňky pasážovány v laminárním boxu za sterilních podmínek. Během pasážování bylo médium z kultivační nádoby odsáto, buňky byly propláchnuty 1×PBS a poté byl do kultivační lahve přidán trypsin. Buňky s trypsinem byly uloženy do inkubátoru, aby došlo k jejich uvolnění ze dna kultivační lahve. Po jejich uvolnění bylo k buňkám přidáno nové médium a po řádném propipetování byla nechána v lahvi pouze násada buněk tak, aby bylo množství buněk zredukováno na desetinu. K násadě bylo doplněno čisté médium a buňky byly vloženy zpět do inkubátoru.

Počítání buněk bylo prováděno na přístroji Vi-CELL XR Cell Viability Analyzer, kdy do speciální zkumavky určené pro tento přístroj bylo napipetováno 500 µl buněčné suspenze a přístroj následně spočítal živé buňky, z jejichž počtu vycházely další experimenty.

3.2.3 Zamrazování a rozmrazování buněčné linie

Při zmrazování buněk byla buněčná kultura nejprve zcentrifugována (200 RCF, 5 minut), retentát byl odsát a pelet byl rozsuspendován v roztoku mrazícího média (roztok FBS a DMSO 9:1). Směs byla po jednom mililitru odpipetována do kryozkumavek, a ty byly uskladněny v mrazáku (-80 °C).

Při rozmražení byly kryozkumavky rozmrazeny ve vodní lázni a jejich obsah byl poté smíchán s 9 ml DMEM média a centrifugován (200 RFC, 5minut), médium bylo následně odsáto a pelet rozmíchán v 1 ml DMEM, nakonec byly buňky přepipetovány do kultivační lahve, do které bylo přidáno 9 ml DMEM. Před další prací byly buňky umístěny v inkubátoru (37 °C, 5% koncentrace CO₂).

3.3 Určení vlivu zkoumaných látek na viabilitu buněk

3.3.1 Příprava komplexů

Deriváty dithiokarbamátů (dibenzylidithiokarbamát, dimethyldithiokarbamát, pyrrolidindithiokarbamát) byly nejdříve namíchány jako zásobní roztoky v koncentraci $250 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Dále byl připraven zásobní roztok chloridu měďnatého (CuCl_2) v koncentraci $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Při sloučení mědi s dithiokarbamáty vznikají komplexní sloučeniny. U těchto komplexů je třeba dvojnásobného množství ligandu kvůli počtu Cu^{+2} vazeb. Komplexy byly tedy tvořeny $20 \mu\text{l}$ dithiokarbamátu, $2,5 \mu\text{l}$ CuCl_2 a $980 \mu\text{l}$ DMSO. Dále byly takto připravené komplexy přidány k buněčné suspenzi. Prášek bis(-diethyldithiokarbamát)-měďnatého komplexu ($1,8 \text{ mg}$) byl rozsuspendován ve 2 ml DMSO, pro tvorbu zásobního roztoku s konečnou koncentrací $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro kontrolu vlivu rozpouštědla bylo použito DMSO naředěné DMEM médiem stejně jako ve vzorcích s testovanými látkami.

Při zjišťování vlivu testovaných látek na životnost a dělení buněk byla použita cytotoxická analýza pomocí testu tvorby tetrazoliové soli 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid (XTT) a dále byla provedena fluorescenční analýza.

3.3.2 XTT

Při cytotoxické analýze XTT byly buněčné suspenze vysazeny na 96 jamkové kultivační destičky ($100 \mu\text{l}$ do každé jamky). V okrajových jamkách bylo pouze DMEM médium. Při experimentu bylo používáno 5 000 U2OS-NPL4-GFP buněk na jamku.

K suspenzím byly přidávány rozpuštěné a naředěné látky: CuET, CuP, CuMT a CuBZ v šesti požadovaných koncentracích: $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $500 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $250 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $125 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $63 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Každá koncentrace byla použita v triplikátu. V první řadě buněčné suspenze byl mock, tzn. Žádná ze studovaných látek, pouze DMSO pro negativní kontrolu.

Po kultivaci v inkubátoru (48 hodin) byly buněčné kultury na destičkách zkontrolovány mikroskopicky a pak bylo provedeno samotné XTT.

XTT se používá pro spektroskopické měření viability buněk. Je to relativně rychlá a citlivá metoda, při které je žlutá tetrazoliová sůl přeměněna pomocí sukcinátetrazolium reduktázy (ta je lokalizována v mitochondriích metabolicky aktivních buněk)

na oranžový formazan. Formazan je detekován spektrometricky při 450-490 nm (Roehm *et al.*, 1991).

XTT reagent byl smíšen s aktivátorem fenozin methosulfátem (na 1 ml reagentu 20 μ l), a následně bylo přidáno 50 μ l do jamek s buňkami a studovanými látkami. Poté byly destičky inkubovány přibližně 60-90 min. Když XTT změnilo barvu (tvorba formazanu), na spektrofotometru Tecan (program I-contron) byl změřena absorbance buněk a kontrolních jamek při hodnotách 630 nm a 475 nm. Vlnová délka 630 nm byla použita pro eliminaci rušivé absorbance pozadí (475 nm je specifická absorbance formazanu).

3.3.3 Fluorescenční mikroskopie

Pro fluorescenční analýzu byly buňky vysazeny na plastové inserty. Do 12 jamkové kultivační destičky byly vysazeny buňky. Do každé jamky bylo přidáno 2 ml suspenze buněk (50 000 buněk do jedné jamky). Proběhla kultivace v kultivátoru (cca 24 hodin).

Po nárůstu kultury byla do každé jamky přidána suspenze studované látky (2 ml) v požadovaných koncentracích ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, jedna jamka jako kontrola, tedy bez ošetření buněk).

Po další kultivaci v inkubátoru (3 hodiny) byly promyty PBS ($1\times$). Buňky byly posléze zafixovány formaldehydem (4%, 4 °C, 15 min při pokojové teplotě) a následně znovu promyty $1\times$ PBS. Dále byly buňky permeabilizovány pomocí Triton-X 100 (0,2% ve vodě, 5 min) a znovu promyty v PBS. Buněčná jádra byla vizualizována barvením DAPI (roztok $1 \mu\text{g/ml}$ ve vodě, 2 min při pokojové teplotě). Po působení DAPI byly buňky opláchnuty destilovanou vodou a osušeny.

Na podložní sklíčko byl položen insert s fluorescenčně obarvenou buněčnou kulturou., na kulturu byly kápnuto Vectashield mounting médium. Sklíčko s kulturou bylo k podložnímu sklíčku přiděleno bezbarvým lakem. Takto připravené preparáty byly nasnímány.

3.4 Zpracování výsledků

U fluorescenční mikroskopie byly inserty nasnímány mikroskopem Zeiss Axioimager Z.1 vybaveným LSM780 modulem se softwarem Zeiss Zen 11. Vyhodnocení těchto výsledků bylo provedeno v programu MS Office Excel, grafické zpracování v programu ImageJ.

U XTT byla odečtena absorbance pozadí a průměr z absorbance média. Pro životnost buněk při různých koncentracích studovaných látek byla vypočtena, aritmetický průměr

i směrodatná odchylka, to vše i grafické zpracování bylo provedeno v programu MS Office Excel.

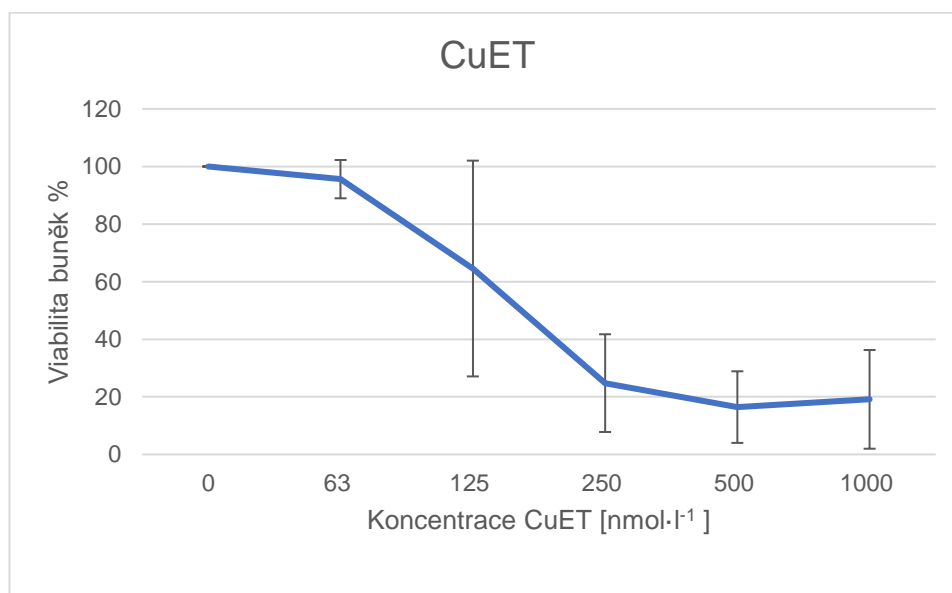
4. Výsledky

4.1 XTT

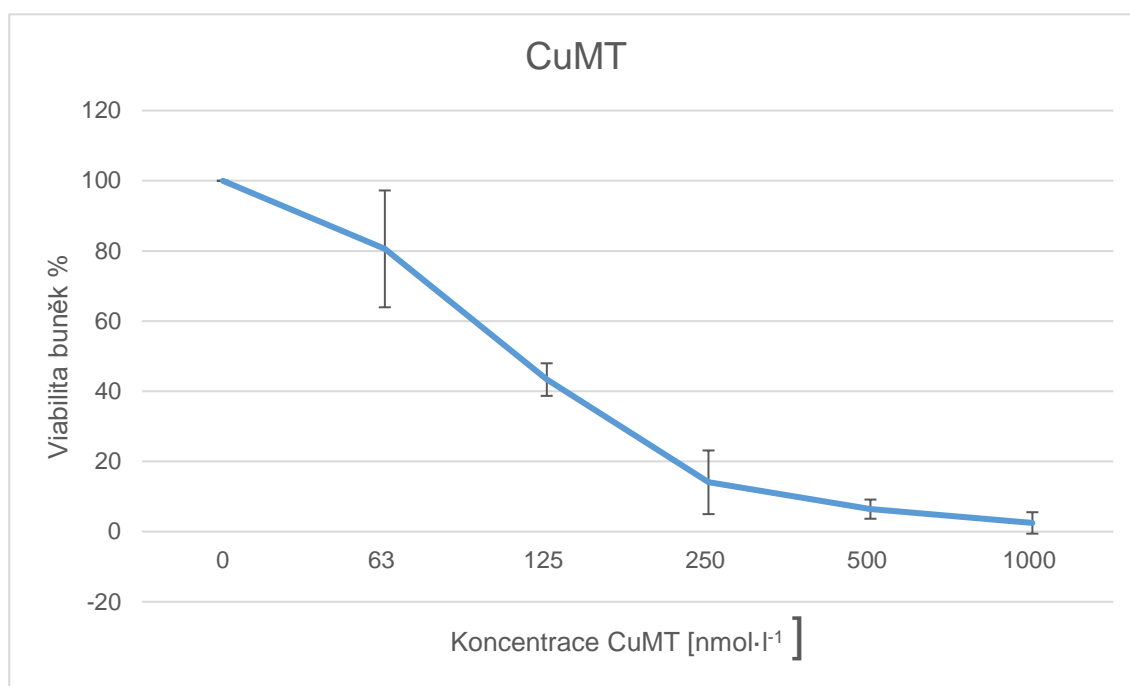
Při cytotoxické analýze pomocí XTT měly dvě ze zkoumaných látek (CuMT a CuP) podobné chemické vlastnosti jako CuET. Poslední zkoumaná látka (CuBZ) neprojevovala následující cytotoxické vlastnosti.

Na grafu vitality po ošetření buněk CuET (Obr. 15) lze pozorovat pokles životaschopných (vitálních) buněk ve všech koncentracích, byť při koncentraci $63 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ není pokles signifikantní. CuET bylo použito jako kontrolní látka.

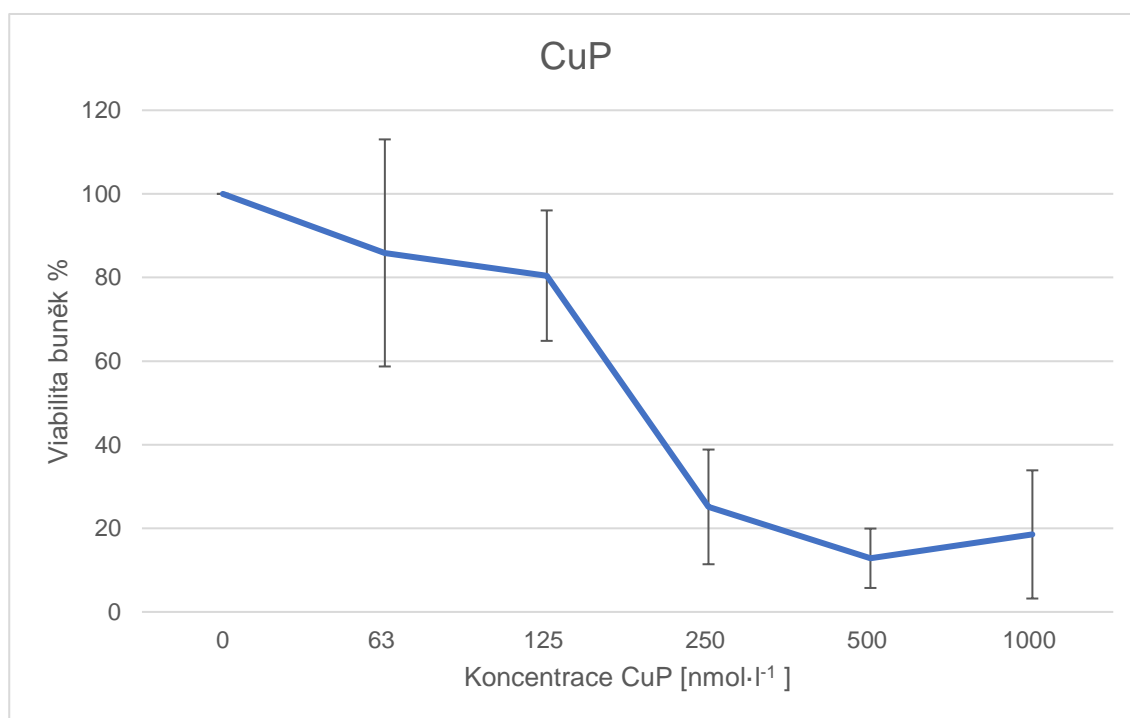
K signifikantnímu poklesu vitality buněk dochází u CuET a CuMT při koncentraci $125 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Zatímco u CuP k poklesu dochází až při $250 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$, což značí nižší aktivitu. CuBZ je bez významnější aktivity (Obr. 18).



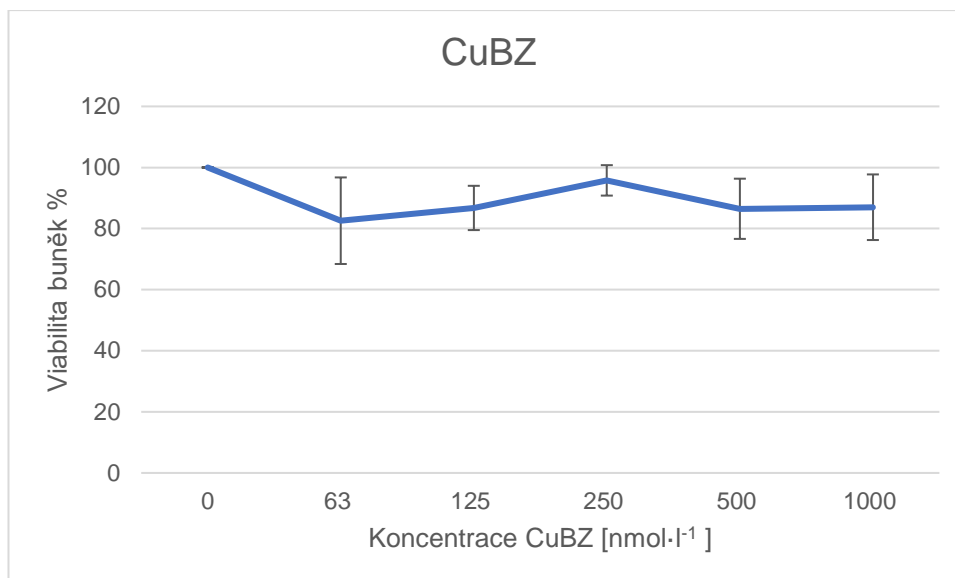
Obrázek 15: Křivka přežití buněčné linie U2OS po působení různých koncentrací CuET. Křivka ukazuje průměr hodnot relativní viability buněk ze tří opakování experimentu a směrodatné odchylky těchto hodnot.



Obrázek 16: Křivka přežití buněčné linie U2OS po působení různých koncentrací CuMT. Křivka ukazuje průměr hodnot relativní viability buněk ze tří opakování experimentu a směrodatné odchylky těchto hodnot.



Obrázek 17: Křivka přežití buněčné linie U2OS po působení různých koncentrací CuP. Křivka ukazuje průměr hodnot relativní viability buněk ze tří opakování experimentu a směrodatné odchylky těchto hodnot.

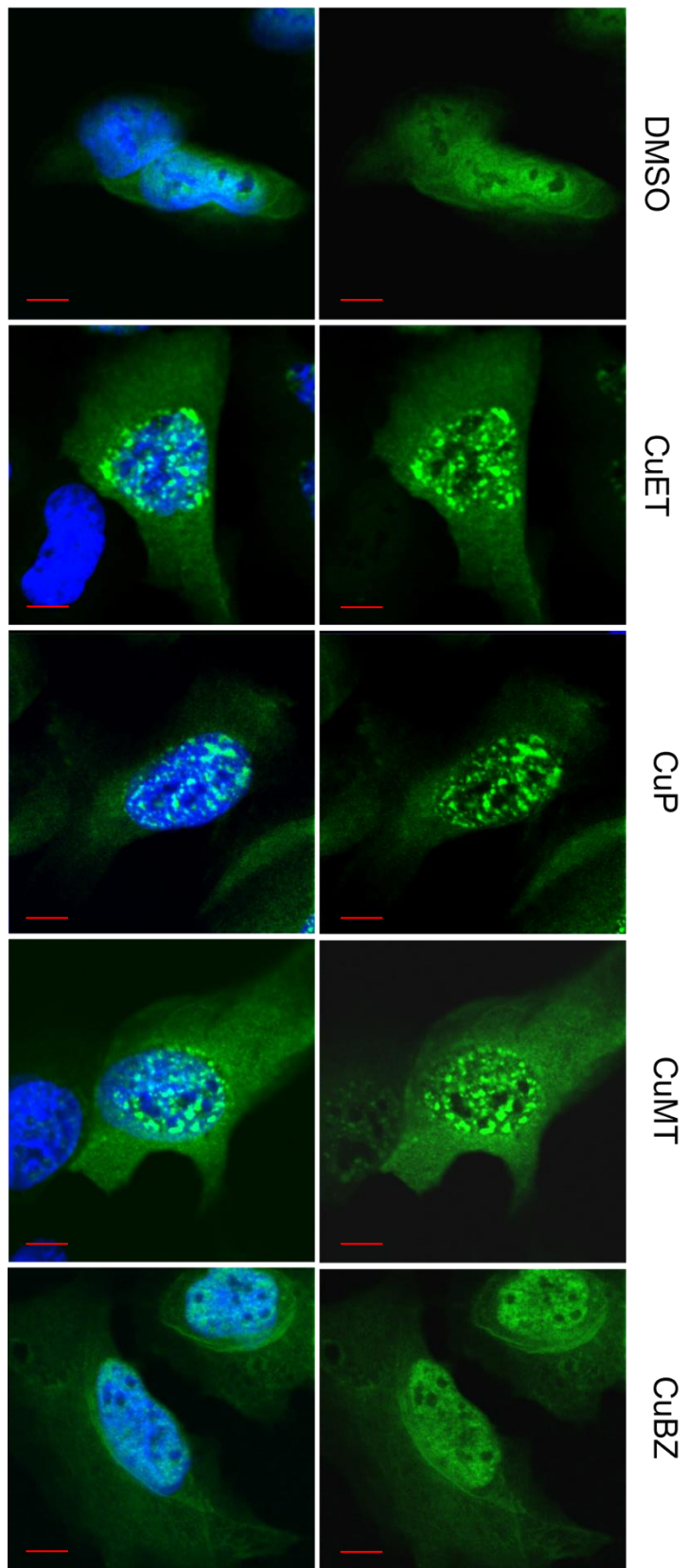


Obrázek18: Křivka přežití buněčné linie U2OS po působení různých koncentrací CuBZ. Křivka ukazuje průměr hodnot relativní viability buněk ze tří opakování experimentu a směrodatné odchytky těchto hodnot.

4.2 Fluorescenční analýza NPL4-GFP

Při fluorescenční analýze byl sledován vliv látek na agregaci NPL4-GFP proteinu v jádru buňky. Díky rekombinantní průbě zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) bylo možno pozorovat pod fluorescenčním mikroskopem NPL4 v buněčné linii U2OS. Jádra buněk byla zvýrazněna barvivem DAPI.

Na obrázku 19 na kontrole (tedy buňky ošetřeny pouze DMSO) nelze pozorovat žádné klastry, protein NPL4-GFP je tedy volně difundovaný v cytoplasmě i jádru. Další v sérii je vizualizace buněk ošetřených CuET, kde lze pozorovat agregaci v oblasti jader. Podobnou agregační aktivitu vykazují i buňky ošetřeny CuMT a CuP, tedy u látek, jež vykazovaly cytotoxickou aktivitu (což je sekundární reakce na shlukování NPL4). U buněk ošetřených CuBZ nelze pozorovat žádné shluky, snímek je porovnatelný s kontrolou a látka tedy nevykazuje žádnou agregační aktivitu (což koreluje i s takřka žádnou cytotoxicitou).



Obrázek 19: Vliv různých komplexů derivátů dithiokarbamatů s mědí na komplex NPL4-GFP v buněčné linii U2OS, měřítko 10 μm.

5. Diskuze

Tato bakalářská práce byla zaměřena na ověření cytotoxicity derivátů dithiokarbamátů (diethyldithiokarbamát, pyrrolidindithiokarbamát, dibenzylidithiokarbamát, dimethyldithiokarbamát) v komplexu s dvojmocnou mědí na rakovinné buňky buněčné linie U2OS a jejich agregační aktivity na protein NPL4. Díky podobné chemické struktuře by měly mít všechny látky podobné chemické vlastnosti, což bylo třeba otestovat. Tento teoretický předpoklad byl při experimentech vyvrácen, jelikož ne všechny látky měly protirakovinné účinky.

Vývoj a optimalizace proteotoxických léčiv, tedy medikací, které narušují odbourávání bílkovin a tím indukují proteotoxický stres má velký potenciál pro protirakovinnou terapii (Vekaria *et al.*, 2016). Rakovina navzdory veškerému medicínskému pokroku zůstává jednou z hlavních příčin úmrtí ve světě (skoro 10 miliónů úmrtí za rok 2020) (Ferlay *et al.*, 2020).

Ve výzkumu je využíváno skutečnosti, že rakovinné buňky nadprodukuje organely a jiné buněčné prvky složené z proteinů, což potřebují k rychlému dělení buněk. Cílení na NPL4 protein následně ovlivňuje dráhu p97-Ufd1-NPL4, což zasahuje do správné funkce UPS, a tedy znemožňuje správné odbourání proteinů ústící v proteotoxický stres. Toto cílení má potenciál překonat nedostatečnou selektivitu a často vznikající rezistenci při užívání proteozomálních inhibitorů, které se navíc potýkají s nedostatečnou aktivitou v pevných nádorech (Vekaria *et al.*, 2016).

Již dříve byla prokázána cytotoxická aktivita dithiokarbamátů (Tsai *et al.*, 1996), diethyldithiokarbamátu, dimethyldithiokarbamátu (Ujjani *et al.*, 1990) a pyrrolidin dithiokarbamátu (Chen *et al.*, 2000), bylo třeba otestovat, zda se tyto látky podílí na proteotoxickém stresu cílením na protein NPL4, čímž jsou sekundárně cytotoxické.

Přestože jsou dithiokarbamáty schopny chelatovat různé kovy (za tvorby lipofilního komplexu DTC-kov (Thorn and Ludwig, 1962)), bylo prokázáno, že jiné kovy než Cu^{2+} nezesilují cytotoxický efekt dithiokarbamátů (Chen *et al.*, 2000).

I když byla prokázána cytotoxická aktivita látek CuP a CuMT, bylo potřeba prokázat, zda tyto látky způsobují buněčnou smrt skrze agregaci proteinu NPL4, dále tedy sekundárním narušením dráhy p97-NPL4 tak indukují buněčné fenotypové rysy sdílené s inhibitory proteazomu (např.: Bortezomib), včetně hromadění polyubikvitinových proteinů a akumulaci ubikvitinových proteinů v cytoplazmě, což bylo dle výsledků

experimentů potvrzeno. Zatímco u komplexů CuMT a CuP byla prokázána cytotoxická aktivita a schopnost agregace NPL4, následné rozrušení dráhy p97-Ufd1-NPL4 vedoucí k iniciaci apoptózy, tato teze byla u látky CuBZ vyvrácena. Komplex nevykazoval téměř žádné cytotoxické, protirakovinné ani agregační účinky.

Do budoucna je třeba provést řadu klinických testů k ověření stability komplexů CuP a CuMT *in vivo*, s ohledem zejména na jejich poločas rozpadu v krevním oběhu pacienta. Dalším krokem ve výzkumu by bylo třeba zvážit Cu jako významného polutanta životního prostředí, jeho příjem z okolí a vliv na léčbu.

Pokud by vyhlídky měly nabýt příznivého charakteru, mohlo by se jednat o rychleji vyvinutou (díky „repurposing“), jednodušší a dostupnější terapii rakoviny s méně vedlejších účinků i u relapsovaných pacientů.

6. Závěr

Teoretickou část bakalářské práce tvoří literární rešerše, která se snaží shrnout dosavadní poznatky ohledně UPS a jeho jednotlivých součástí. Hlavně je popsána segregasa p97, její kofaktory Ufd1-NPL4 a jejich funkce při kontrole kvality proteinů. Následně jsou popsány role segregasy p97 jako molekulárního chaperonu a funkce při buněčných

odpovědích UPR a HSR. Dále jsou zmíněny inhibitory proteazomu a jejich použití při léčbě rakoviny, kdy je využíváno rozrušení proteostázy. Hlavní pozornost je věnována dithiokarbamátům, primárně účinné látce léku pro alkoholově závislé Antabusu diethyldithiokarbamátu, kde se ukázalo, že se tato látka váže na protein NPL4 pomocí ZF-NPL4, čímž indukuje jeho agregaci, která sekundárně rozrušuje dráhu p97-Ufd1-NPL4 a indukuje buněčný fenotyp vedoucí k buněčné smrti a vykazuje tedy protirakovinné vlastnosti. Tato látka je v krvi komplexována s dvojmocnou mědí za tvorby bis-(diethyldithiokarbamát)-měďnatého komplexu. Látka zatím kvůli nízké stabilitě není využitelná pro klinické využití. Bakalářská práce se dále zaměřuje na deriváty dithiokarbamátů, konkrétně se jedná o dimethyldithiokarbamát, dibenzylthiokarbamát a pyrrolidindithiokarbamát, a jejich potenciální protirakovinné účinky využitelné v protinádorové terapii.

V experimentální části bakalářské práce jsou výsledky cytotoxických experimentů provedených s výše zmíněnými komplexy dithiokarbamátů, CuET jako kontrolou a neošetřenými buňkami jako kontrolou viability. XTT experimenty byly provedeny ve třech opakováních na buněčné linii lidské rakoviny osteosarkomu U2OS. Byla potvrzena cytotoxicita CuMT a CuP. V porovnání s cytotoxickou kontrolou CuET byl komplex CuMT účinnější a CuP na podobné úrovni cytotoxicity. CuBZ oproti ostatním testovaným dithiokarbamátům nevykazoval téměř žádnou cytotoxickou aktivitu, jeho výsledky byly porovnatelné s neošetřenými buňkami.

Další data v experimentální části bakalářské práce zaznamenávají agregační aktivitu testovaných látek na protein NPL4 a následné rozrušení vitální dráhy p97-Ufd1-NPL4, způsobující shlukování proteinů indukující proteotoxický stres a následnou iniciaci apoptózy.

7. Seznam použité literatury

ÅKERFELT, Malin, Richard I. MORIMOTO a Lea SISTONEN. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2010, 11(8), 545-555 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:10.1038/nrm2938

ANDERSON, Daniel J., Ronan LE MOIGNE, Stevan DJAKOVIC, et al. Targeting the AAA ATPase p97 as an Approach to Treat Cancer through Disruption of Protein Homeostasis. *Cancer Cell* [online]. 2015, **28**(5), 653-665 [cit. 2022-04-18]. ISSN 15356108. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccell.2015.10.002

BALA, Veenu, Gopal GUPTA a Vishnu SHARMA. Chemical and Medicinal Versatility of Dithiocarbamates: An Overview. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* [online]. 2014, **14**(12), 1021-1032 [cit. 2022-04-18]. ISSN 13895575. Dostupné z: doi:10.2174/1389557514666141106130146

BALCHIN, David, Manajit HAYER-HARTL a F. Ulrich HARTL. In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science*[online]. 2016, **353**(6294) [cit. 2022-04-18]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.aac4354

BARZ, Bogdan a Brigita URBANC. Minimal Model of Self-Assembly: Emergence of Diversity and Complexity. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2014, **118**(14), 3761-3770 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1520-6106. Dostupné z: doi:10.1021/jp412819j

BAUMEISTER, Wolfgang, Jochen WALZ, Frank ZÜHL a Erika SEEMÜLLER. The Proteasome: Paradigm of a Self-Compartmentalizing Protease. *Cell* [online]. 1998, **92**(3), 367-380 [cit. 2022-04-18]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(00)80929-0

BODNAR, Nicholas O., Kelly H. KIM, Zhejian JI, et al. Structure of the Cdc48 ATPase with its ubiquitin-binding cofactor Ufd1–Npl4. *Nature Structural & Molecular Biology* [online]. 2018, **25**(7), 616-622 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1545-9993. Dostupné z: doi:10.1038/s41594-018-0085-x

BODNAR, Nicholas a Tom RAPOPORT. Toward an understanding of the Cdc48/p97 ATPase. *F1000Research* [online]. 2017, **6**[cit. 2022-04-18]. ISSN 2046-1402. Dostupné z: doi:10.12688/f1000research.11683.1

BODNAR, Nicholas O. a Tom A. RAPOPORT. Molecular Mechanism of Substrate Processing by the Cdc48 ATPase Complex. *Cell*[online]. 2017, **169**(4), 722-735.e9 [cit. 2022-04-18]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2017.04.020

BOTTA, Annalisa, Caterina TANDOI, Grazia FINI, Giuseppe CALABRESE, Bruno DALLAPICCOLA a Giuseppe NOVELLI. Cloning and characterization of the gene encoding human NPL4, a protein interacting with the ubiquitin fusion-degradation protein (UFD1L). *Gene* [online]. 2001, **275**(1), 39-46 [cit. 2022-04-18]. ISSN 03781119. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-1119(01)00649-7

BORZOVA, Vera A., Kira A. MARKOSSIAN, Dmitriy A. KARA a Boris KURGANOV. Kinetic regime of dithiothreitol-induced aggregation of bovine serum albumin. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2015, **80**, 130-138 [cit. 2022-04-18]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.06.040

BRUDERER, Roland M., Catherine BRASSEUR a Hemmo H. MEYER. The AAA ATPase p97/VCP Interacts with Its Alternative Co-factors, Ufd1-Npl4 and p47, through a Common Bipartite Binding Mechanism. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2004, **279**(48), 49609-49616 [cit. 2022-04-18]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M408695200

BUCHBERGER, Alexander, Hermann SCHINDELIN a Petra HÄNZELMANN. Control of p97 function by cofactor binding. *FEBS Letters* [online]. 2015, **589**(19PartA), 2578-2589 [cit. 2022-04-18]. ISSN 00145793. Dostupné z: doi:10.1016/j.febslet.2015.08.028

CIECHANOVER, Aaron. Tracing the history of the ubiquitin proteolytic system: The pioneering article. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2009, **387**(1), 1-10 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2009.06.065

COLLINS, Galen Andrew a Alfred L. GOLDBERG. The Logic of the 26S Proteasome. *Cell* [online]. 2017, **169**(5), 792-806 [cit. 2022-04-18]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2017.04.023

COUX, Olivier, Keiji TANAKA a Alfred L. GOLDBERG. STRUCTURE AND FUNCTIONS OF THE 20S AND 26S PROTEASOMES. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 1996, **65**(1), 801-847 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.bi.65.070196.004101

CVEK, B. Targeting Malignancies with Disulfiram (Antabuse): Multidrug Resistance, Angiogenesis, and Proteasome. *Current Cancer Drug Targets* [online]. 2011, **11**(3), 332-337 [cit. 2022-04-18]. ISSN 15680096. Dostupné z: doi:10.2174/156800911794519806

CVEK, Boris. Nonprofit drugs as the salvation of the world's healthcare systems: the case of Antabuse (disulfiram). *Drug Discovery Today* [online]. 2012, **17**(9-10), 409-412 [cit. 2022-04-18]. ISSN 13596446. Dostupné z: doi:10.1016/j.drudis.2011.12.010

CVEK, Boris, Vesna MILACIC, Jan TARABA a Q. Ping DOU. Ni(II), Cu(II), and Zn(II) Diethyldithiocarbamate Complexes Show Various Activities Against the Proteasome in Breast Cancer Cells. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2008, **51**(20), 6256-6258 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm8007807

DAI, Ren Ming a Chou-Chi H. LI. Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin–proteasome degradation. *Nature Cell Biology* [online]. 2001, **3**(8), 740-744 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1465-7392. Dostupné z: doi:10.1038/35087056

DAI, Q. CHIP activates HSF1 and confers protection against apoptosis and cellular stress. *The EMBO Journal* [online]. 2003, **22**(20), 5446-5458 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1460-2075. Dostupné z: doi:10.1093/emboj/cdg529

DEMARTINO, George N. a Thomas G. GILLETTE. Proteasomes: Machines for All Reasons. *Cell* [online]. 2007, **129**(4), 659-662 [cit. 2022-04-18]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2007.05.007

DESHAIES, Raymond J. a Claudio A.P. JOAZEIRO. RING Domain E3 Ubiquitin Ligases. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 2009, **78**(1), 399-434 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.biochem.78.101807.093809

DESHAIES, Raymond J. Proteotoxic crisis, the ubiquitin-proteasome system, and cancer therapy. *BMC Biology* [online]. 2014, **12**(1) [cit. 2022-04-18]. ISSN 1741-7007. Dostupné z: doi:10.1186/s12915-014-0094-0

JIAO, Yang, Bethany N. HANNAFON a Wei-Qun DING. Disulfiram's Anticancer Activity: Evidence and Mechanisms. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* [online]. 2016, **16**(11), 1378-1384 [cit. 2022-04-18]. ISSN 18715206. Dostupné z: doi:10.2174/1871520615666160504095040

DIKIC, Ivan. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 2017, **86**(1), 193-224 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-biochem-061516-044908

DOKLADNY, Karol, Orrin B MYERS a Pope L MOSELEY. Heat shock response and autophagy—cooperation and control. *Autophagy* [online]. 2015, **11**(2), 200-213 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1554-8627. Dostupné z: doi:10.1080/15548627.2015.1009776

FAROOQ, Muhammad Asim, Md AQUIB, Daulat Haleem KHAN, et al. Recent advances in the delivery of disulfiram: a critical analysis of promising approaches to improve its pharmacokinetic profile and anticancer efficacy. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2019, **27**(2), 853-862 [cit. 2022-04-18]. ISSN 2008-2231. Dostupné z: doi:10.1007/s40199-019-00308-w

FERLAY J., Ervik M., Lam F., Colombet M., Mery L., Piñeros M. *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 2020, Dostupné na: <https://gco.iarc.fr/today>

FINLEY, Daniel. Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 2009, **78**(1), 477-513 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.biochem.78.081507.101607

FREEMONT, Paul S., Isabel M. HANSON a John TROWSDALE. A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell* [online]. 1991, **64**(3), 483-484 [cit. 2022-04-18]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(91)90229-R

FUNAKOSHI, Minoru, Xia LI, Irina VELICHUTINA, Mark HOCHSTRASSER a Hideki KOBAYASHI. Sem1, the yeast ortholog of a human BRCA2-binding protein, is a component of the proteasome regulatory particle that enhances proteasome stability. *Journal of Cell Science* [online]. 2004, **117**(26), 6447-6454 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1477-9137. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.01575

GALAN, Jean-Marc a Matthias PETER. Ubiquitin-dependent degradation of multiple F-box proteins by an autocatalytic mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1999, **96**(16), 9124-9129 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.96.16.9124

GRABBE, Caroline, Koraljka HUSNJAK a Ivan DIKIC. The spatial and temporal organization of ubiquitin networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2011, **12**(5), 295-307 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:10.1038/nrm3099

HAINES, D. S. P97-Containing Complexes in Proliferation Control and Cancer: Emerging Culprits or Guilt by Association?. *Genes & Cancer* [online]. 2010, **1**(7), 753-763 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1947-6019. Dostupné z: doi:10.1177/1947601910381381

HÄNZELMANN, Petra, Alexander BUCHBERGER a Hermann SCHINDELIN. Hierarchical Binding of Cofactors to the AAA ATPase p97. *Structure* [online]. 2011, **19**(6), 833-843 [cit. 2022-04-18]. ISSN 09692126. Dostupné z: doi:10.1016/j.str.2011.03.018

HARTL, F. Ulrich. Protein Misfolding Diseases. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 2017, **86**(1), 21-26 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-biochem-061516-044518

HARTMANN-PETERSEN, Rasmus a Colin GORDON. Integral UBL domain proteins: a family of proteasome interacting proteins. *Seminars in Cell & Developmental Biology* [online]. 2004, **15**(2), 247-259 [cit. 2022-04-18]. ISSN 10849521. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcdb.2003.12.006

HIPP, Mark S., Sae-Hun PARK a F. Ulrich HARTL. Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. *Trends in Cell Biology* [online]. 2014, **24**(9), 506-514 [cit. 2022-04-18]. ISSN 09628924. Dostupné z: doi:10.1016/j.tcb.2014.05.003

HURYN DM, K DJP, W P (2020): p97: An Emerging Target for Cancer, Neurodegenerative Diseases, and Viral Infections. *J Med Chem.* 63(5):1892-1907. doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b01318.

HUSNJAK, Koraljka, Suzanne ELSASSER, Naixia ZHANG, et al. Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature*[online]. 2008, **453**(7194), 481-488 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature06926

CHAPMAN, Eli, Nick MAKSIM, Fabian DE LA CRUZ a James LA CLAIR. Inhibitors of the AAA+ Chaperone p97. *Molecules* [online]. 2015, **20**(2), 3027-3049 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules20023027

CHAZOTTE, Brad. Labeling Nuclear DNA Using DAPI. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2011, **2011**(1) [cit. 2022-04-18]. ISSN 1940-3402. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.prot5556

CHEN, Di, Qiuzhi Cindy CUI, Huanjie YANG a Q. Ping DOU. 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* [online]. 2006, **66**(21), 10425-10433 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2126

CHEN, Di,. Inhibition of prostate cancer cellular proteasome activity by a pyrrolidine dithiocarbamate-copper complex is associated with suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Frontiers in Bioscience* [online]. 2005, **10**(1-3) [cit. 2022-04-18]. ISSN 10939946. Dostupné z: doi:10.2741/1749

CHEN, Li a Kiran MADURA. Rad23 Promotes the Targeting of Proteolytic Substrates to the Proteasome. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 2002, **22**(13), 4902-4913 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0270-7306. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.22.13.4902-4913.2002

CHEN, S H, S H LIU, Y C LIANG J K LIN a S Y LIN-SHIAU: Death signaling pathway induced by pyrrolidine dithiocarbamate-Cu(2+) complex in the cultured rat cortical astrocytes. *Glia* [online]. 2000, **31**(3), 9 [cit. 2022-05-06]. Dostupné z: doi:10.1002/1098-1136(200009)31:3<249::aid-glia60>3.0.co;2-1

CHITI, Fabrizio a Christopher M. DOBSON. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annual Review of*

Biochemistry [online]. 2017, **86**(1), 27-68 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-biochem-061516-045115

CHOU, Tsui-Fen, Kelin LI, Kevin J. FRANKOWSKI, Frank J. SCHOENEN a Raymond J. DESHAIES. Structure–Activity Relationship Study Reveals ML240 and ML241 as Potent and Selective Inhibitors of p97 ATPase. *ChemMedChem* [online]. 2013, **8**(2), 297-312 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1860-7179. Dostupné z: doi:10.1002/cmdc.201200520

ISAACSON, Rivka L., Valerie E. PYE, Peter SIMPSON, Hemmo H. MEYER, Xiaodong ZHANG, Paul S. FREEMONT a Steve MATTHEWS. Detailed Structural Insights into the p97-Npl4-Ufd1 Interface. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2007, **282**(29), 21361-21369 [cit. 2022-04-18]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M610069200

JACOB, Pierre, Heribert HIRT a Abdelhafid BENDAHMANE. The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. *Plant Biotechnology Journal* [online]. 2017, **15**(4), 405-414 [cit. 2022-04-18]. ISSN 14677644. Dostupné z: doi:10.1111/pbi.12659

JENTSCH, Stefan a Sebastian RUMPF. Cdc48 (p97): a ‘molecular gearbox’ in the ubiquitin pathway?. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 2007, **32**(1), 6-11 [cit. 2022-04-18]. ISSN 09680004. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibs.2006.11.005

JOHANSSON, Benny a Zdzislaw STANKIEWICZ. Bis-(diethyldithiocarbamate) copper complex: a new metabolite of disulfiram?. *Biochemical Pharmacology* [online]. 1985, **34**(16), 2989-2991 [cit. 2022-04-18]. ISSN 00062952. Dostupné z: doi:10.1016/0006-2952(85)90026-7

JOHNSTON, Jennifer A., Cristina L. WARD a Ron R. KOPITO. Aggresomes: A Cellular Response to Misfolded Proteins. *Journal of Cell Biology* [online]. 1998, **143**(7), 1883-1898 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0021-9525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.143.7.1883

KAMADURAI, Hari B, Yu QIU, Alan DENG, *et al.* Mechanism of ubiquitin ligation and lysine prioritization by a HECT E3. *ELife*[online]. 2013, **2** [cit. 2022-04-18]. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.00828

KAILA S.B. , M. R. Kumar, and A. Thakur, “Synthesis and physico-chemical investigations on some bis(Carbodi- thioato)Nitrosyl complexes of cobalt(I),” *IOSR Journal of Applied Chemistry*, vol. 1, no. 3, pp. 1–9, 2012.

KIESE, Sylvia, Astrid PAPPENBERGER, Wolfgang FRIESS a Hanns-Christian MAHLER. Equilibrium studies of protein aggregates and homogeneous nucleation in protein formulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2010, **99**(2), 632-644 [cit. 2022-04-18]. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.21858

KIM, Nayoung, Richard L. REMMELE, Dingjiang LIU, Vladimir I. RAZINKOV, Erik J. FERNANDEZ a Christopher J. ROBERTS. Aggregation of anti-streptavidin immunoglobulin gamma-1 involves Fab unfolding and competing growth pathways mediated by pH and salt concentration. *Biophysical Chemistry* [online]. 2013, **172**, 26-36 [cit. 2022-04-18]. ISSN 03014622. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpc.2012.12.004

KIM, Yujin E., Mark S. HIPPEL, Andreas BRACHER, Manajit HAYER-HARTL a F. ULRICH HARTL. Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 2013, **82**(1), 323-355 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-biochem-060208-092442

KIRKIN, Vladimir, David G. MCEWAN, Ivana NOVAK a Ivan DIKIC. A Role for Ubiquitin in Selective Autophagy. *Molecular Cell* [online]. 2009, **34**(3), 259-269 [cit. 2022-04-18]. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2009.04.026

KLOETZEL, Peter M. Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nature Immunology* [online]. 2004, **5**(7), 661-669 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1529-2908. Dostupné z: doi:10.1038/ni1090

KOTHE, Michael, Yihong YE, Jessica S. WAGNER, Heidi E. DE LUCA, Eli KERN, Tom A. RAPOPORT a Wayne I. LENCER. Role of p97 AAA-ATPase in the Retrotranslocation of the Cholera Toxin A1 Chain, a Non-ubiquitinated Substrate. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2005, **280**(30), 28127-28132 [cit. 2022-04-18]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M503138200

LABBADIA, Johnathan a Richard I MORIMOTO. The Biology of Proteostasis in Aging and Disease. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 2015, **84**(1), 435-464 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-biochem-060614-033955

LEE, Cheolju, Michael P SCHWARTZ, Sumit PRAKASH, Masahiro IWAKURA a Andreas MATOUSCHEK. ATP-Dependent Proteases Degrade Their Substrates by Processively Unraveling Them from the Degradation Signal. *Molecular Cell* [online]. 2001, **7**(3), 627-637 [cit. 2022-04-18]. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/S1097-2765(01)00209-X

LEWIS, David J., Parikshit DESHMUKH, Aleksander A. TEDSTONE, Floriana TUNA a Paul O'BRIEN. On the interaction of copper(ii) with disulfiram. *Chem. Commun* [online]. 2014, **50**(87), 13334-13337 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1359-7345. Dostupné z: doi:10.1039/C4CC04767B

LI, Hong, Jingyu WANG, Chunfu WU, Lihui WANG, Zhe-Sheng CHEN a Wei CUI. The combination of disulfiram and copper for cancer treatment. *Drug Discovery Today* [online].

2020, **25**(6), 1099-1108 [cit. 2022-04-18]. ISSN 13596446. Dostupné z: doi:10.1016/j.drudis.2020.04.003

LUKAS, Jiri a Jiri BARTEK. Watching the DNA Repair Ensemble Dance. *Cell* [online]. 2004, **118**(6), 666-668 [cit. 2022-04-18]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2004.09.006

HOELLER, Daniela a Ivan DIKIC. Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature* [online]. 2009, **458**(7237), 438-444 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature07960

LYNCH, James J., Terry R. VAN VLEET, Scott W. MITTELSTADT a Eric A.G. BLOMME. Potential functional and pathological side effects related to off-target pharmacological activity. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* [online]. 2017, **87**, 108-126 [cit. 2022-04-18]. ISSN 10568719. Dostupné z: doi:10.1016/j.vascn.2017.02.020

MAJERA, Dusana, Zdenek SKROTT, Katarina CHROMA, Joanna Maria MERCHUT-MAYA, Martin MISTRİK a Jiri BARTEK. Targeting the NPL4 Adaptor of p97/VCP Segregase by Disulfiram as an Emerging Cancer Vulnerability Evokes Replication Stress and DNA Damage while Silencing the ATR Pathway. *Cells* [online]. 2020, **9**(2) [cit. 2022-04-18]. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells9020469

MEERANG, Mayura, Danilo RITZ, Shreya PALIWAL, et al. The ubiquitin-selective segregase VCP/p97 orchestrates the response to DNA double-strand breaks. *Nature Cell Biology* [online]. 2011, **13**(11), 1376-1382 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1465-7392. Dostupné z: doi:10.1038/ncb2367

MASPERO, Elena, Eleonora VALENTINI, Sara MARI, Valentina CECATIELLO, Paolo SOFFIENTINI, Sebastiano PASQUALATO a Simona POLO. Structure of a ubiquitin-loaded HECT ligase reveals the molecular basis for catalytic priming. *Nature Structural & Molecular Biology* [online]. 2013, **20**(6), 696-701 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1545-9993. Dostupné z: doi:10.1038/nsmb.2566

MEERANG, Mayura, Danilo RITZ, Shreya PALIWAL, et al. The ubiquitin-selective segregase VCP/p97 orchestrates the response to DNA double-strand breaks. *Nature Cell Biology* [online]. 2011, **13**(11), 1376-1382 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1465-7392. Dostupné z: doi:10.1038/ncb2367

METZGER, Meredith B, Jessica L SCALES, Mitchell F DUNKLEBARGER, Jadranka LONCAREK a Allan M WEISSMAN. A protein quality control pathway at the mitochondrial outer membrane. *ELife* [online]. 2020, **9** [cit. 2022-04-18]. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.51065

MEYER, Hemmo, Monika BUG a Sebastian BREMER. Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nature Cell Biology* [online]. 2012, **14**(2), 117-123 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1465-7392. Dostupné z: doi:10.1038/ncb2407

MEYER, H. H. Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1-Npl4. *The EMBO Journal* [online]. **21**(21), 5645-5652 [cit. 2022-04-18]. ISSN 14602075. Dostupné z: doi:10.1093/emboj/cdf579

MEYER, Hemmo H, James G SHORTER, Joachim SEEMANN, Darryl PAPPIN a Graham WARREN. A complex of mammalian Ufd1 and Npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways. *The EMBO Journal* [online]. 2000, **19**(10), 2181-2192 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0261-4189. Dostupné z: doi:10.1093/emboj/19.10.2181

MOGK, Axel, Bernd BUKAU a Harm H. KAMPINGA. Cellular Handling of Protein Aggregates by Disaggregation Machines. *Molecular Cell* [online]. 2018, **69**(2), 214-226 [cit. 2022-04-18]. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2018.01.004

MURANOVA, L. K., A. S. RYZHAVSKAYA, M. V. SUDNITSYNA, V. M. SHATOV a N. B. GUSEV. Small Heat Shock Proteins and Human Neurodegenerative Diseases. *Biochemistry (Moscow)* [online]. 2019, **84**(11), 1256-1267 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0006-2979. Dostupné z: doi:10.1134/S000629791911004X

MURATA, Shigeo, Hideki YASHIRODA a Keiji TANAKA. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2009, **10**(2), 104-115 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:10.1038/nrm2630

NEUBER, Oliver, Ernst JAROSCH, Corinna VOLKWEIN, Jan WALTER a Thomas SOMMER. Ubx2 links the Cdc48 complex to ER-associated protein degradation. *Nature Cell Biology* [online]. 2005, **7**(10), 993-998 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1465-7392. Dostupné z: doi:10.1038/ncb1298

ODULARU, Ayodele T. a Peter A. AJIBADE. Dithiocarbamates: Challenges, Control, and Approaches to Excellent Yield, Characterization, and Their Biological Applications. *Bioinorganic Chemistry and Applications* [online]. 2019, **2019**, 1-15 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1565-3633. Dostupné z: doi:10.1155/2019/8260496

PETERSEN, E. N. The pharmacology and toxicology of disulfiram and its metabolites. *Acta Psychiatrica Scandinavica* [online]. 1992, **86**(S369), 7-13 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0001-690X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0447.1992.tb03309.x

PICKART, Cecile M. Mechanisms Underlying Ubiquitination. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 2001, **70**(1), 503-533 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.biochem.70.1.503

PIRKKALA, LILA, PÄIVI NYKÄNEN a LEA SISTONEN. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *The FASEB Journal* [online]. 2001, **15**(7), 1118-1131 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fj00-0294rev

POWERS, Evan T., Richard I. MORIMOTO, Andrew DILLIN, Jeffery W. KELLY a William E. BALCH. Biological and Chemical Approaches to Diseases of Proteostasis Deficiency. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 2009, **78**(1), 959-991 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.biochem.052308.114844

PRAKASH, Sumit, Lin TIAN, Kevin S RATLIFF, Rebecca E LEHOTZKY a Andreas MATOUSCHEK. An unstructured initiation site is required for efficient proteasome-mediated degradation. *Nature Structural & Molecular Biology* [online]. 2004, **11**(9), 830-837 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1545-9993. Dostupné z: doi:10.1038/nsmb814

PRAKASH, Sumit, Tomonao INOBE, Ace Joseph HATCH a Andreas MATOUSCHEK. Substrate selection by the proteasome during degradation of protein complexes. *Nature Chemical Biology* [online]. 2009, **5**(1), 29-36 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1552-4450. Dostupné z: doi:10.1038/nchembio.130

PYE, Valerie E., Fabienne BEURON, Catherine A. KEETCH, Ciaran MCKEOWN, Carol V. ROBINSON, Hemmo H. MEYER, Xiaodong ZHANG a Paul S. FREEMONT. Structural insights into the p97-Ufd1-Npl4 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2007, **104**(2), 467-472 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0603408104

ROEHM, Neal W., George H. RODGERS, Stephen M. HATFIELD a Andrew L. GLASEBROOK. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of Immunological Methods* [online]. 1991, **142**(2), 257-265 [cit. 2022-04-18]. ISSN 00221759. Dostupné z: doi:10.1016/0022-1759(91)90114-U

ROTIN, Daniela a Sharad KUMAR. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2009, **10**(6), 398-409 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:10.1038/nrm2690

STACH, Lasse a Paul S. FREEMONT. The AAA+ ATPase p97, a cellular multitool. *Biochemical Journal* [online]. 2017, **474**(17), 2953-2976 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/BCJ20160783

STEWART, Mikaela D, Tobias RITTERHOFF, Rachel E KLEVIT a Peter S BRZOVIC. E2 enzymes: more than just middle men. *Cell Research* [online]. 2016, **26**(4), 423-440 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1001-0602. Dostupné z: doi:10.1038/cr.2016.35

ROSENZWEIG, Rina, Pawel A OSMULSKI, Maria GACZYNSKA a Michael H GLICKMAN. The central unit within the 19S regulatory particle of the proteasome. *Nature Structural & Molecular Biology* [online]. 2008, **15**(6), 573-580 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1545-9993. Dostupné z: doi:10.1038/nsmb.1427

SALUJA, Atul, Vikram SADINENI, Amol MUNGIKAR, Vishal NASHINE, Andrew KROETSCH, Charles DAHLHEIM a Venkatramana M. RAO. Significance of Unfolding Thermodynamics for Predicting Aggregation Kinetics: A Case Study on High Concentration Solutions of a Multi-Domain Protein. *Pharmaceutical Research* [online]. 2014, **31**(6), 1575-1587 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0724-8741. Dostupné z: doi:10.1007/s11095-013-1263-5

SAMI, Neha, Safikur RAHMAN, Vijay KUMAR, Sobia ZAIDI, Asimul ISLAM, Sher ALI, Faizan AHMAD a Md. Imtaiyaz HASSAN. Protein aggregation, misfolding and consequential human neurodegenerative diseases. *International Journal of Neuroscience*[online]. 2017, **127**(11), 1047-1057 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0020-7454. Dostupné z: doi:10.1080/00207454.2017.1286339

SATO, Yusuke, Hiroaki FUJITA, Azusa YOSHIKAWA, Masami YAMASHITA, Atsushi YAMAGATA, Stephen E. KAISER, Kazuhiro IWAI a Shuya FUKAI. Specific recognition of linear ubiquitin chains by the Npl4 zinc finger (NZF) domain of the HOIL-1L subunit of the linear ubiquitin chain assembly complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2011, **108**(51), 20520-20525 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1109088108

SATO, Yusuke, Hikaru TSUCHIYA, Atsushi YAMAGATA, Kei OKATSU, Keiji TANAKA, Yasushi SAEKI a Shuya FUKAI. Structural insights into ubiquitin recognition and Ufd1 interaction of Npl4. *Nature Communications* [online]. 2019, **10**(1) [cit. 2022-04-18]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-019-13697-y

SHEN, Min, Sara SCHMITT, Daniela BUAC a Q Ping DOU. Targeting the ubiquitin–proteasome system for cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* [online]. 2013, **17**(9), 1091-1108 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1472-8222. Dostupné z: doi:10.1517/14728222.2013.815728

SCHMIDT, Marion, John HANNA, Suzanne ELSASSER a Daniel FINLEY. Proteasome-associated proteins: regulation of a proteolytic machine. *Biological Chemistry* [online]. 2005, **386**(8) [cit. 2022-04-18]. ISSN 1431-6730. Dostupné z: doi:10.1515/BC.2005.085

SONTAG, Emily Mitchell, Rahul S. SAMANT a Judith FRYDMAN. Mechanisms and Functions of Spatial Protein Quality Control. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 2017, **86**(1), 97-122 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014616

SKROTT, Zdenek a Boris CVEK. Diethyldithiocarbamate complex with copper: the mechanism of action in cancer cells. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* [online]. 2012, **12**(12), 1184-1192 [cit. 2022-04-18]. ISSN 13895575. Dostupné z: doi:10.2174/138955712802762068

SKROTT, Zdenek, Martin MISTRİK, Klaus Kaae ANDERSEN, et al. Alcohol-abuse drug disulfiram targets cancer via p97 segregase adaptor NPL4. *Nature* [online]. 2017, **552**(7684), 194-199 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature25016

STACH, Lasse a Paul S. FREEMONT. The AAA+ ATPase p97, a cellular multitool. *Biochemical Journal* [online]. 2017, **474**(17), 2953-2976 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/BCJ20160783

SUN, Xiaonan a Hongyu QIU. Valosin-Containing Protein, a Calcium-Associated ATPase Protein, in Endoplasmic Reticulum and Mitochondrial Function and Its Implications for Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(11) [cit. 2022-04-18]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21113842

SWATEK, Kirby N a David KOMANDER. Ubiquitin modifications. *Cell Research* [online]. 2016, **26**(4), 399-422 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1001-0602. Dostupné z: doi:10.1038/cr.2016.39

TANAKA, Keiji. The proteasome: Overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* [online]. 2009, **85**(1), 12-36 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0386-2208. Dostupné z: doi:10.2183/pjab.85.12

THORN, G D a R A LUDWIG. *The Dithiocarbamates and Related Compounds*. Elsevier Monographs. Amsterdam: Elsevier, 1962. ISBN 249032235.

TSAI, Jer-Chia, Mukesh JAIN, Chung-Ming HSIEH et al. Induction of Apoptosis by Pyrrolidinedithiocarbamate and N-Acetylcysteine in Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1996, **271**(7), 4 [cit. 2022-05-06]. Dostupné z: doi:doi.org/10.1074/jbc.271.7.3667

TWOMEY, Edward C., Zhejian JI, Thomas E. WALES, Nicholas O. BODNAR, Scott B. FICARRO, Jarrod A. MARTO, John R. ENGEN a Tom A. RAPOPORT. Substrate processing by the Cdc48 ATPase complex is initiated by ubiquitin unfolding. *Science* [online]. 2019, **365**(6452) [cit. 2022-04-18]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.aax1033

UJJANI, B, S LYMAN, D WINKELMANN, W ANTHOLINE, D H PETERING a M M JONES. Enhancement of cytotoxicity of bleomycin by dithiocarbamates: formation of bis(dithiocarbamate) cu(II). *Inorg. Biochem.* 1990, **38**(1), 81-93. Dostupné z: doi:10.1016/0162-0134(90)85009-1

VALLE, Christopher W., Taehong MIN, Manish BODAS, Steven MAZUR, Shahnaz BEGUM, Danni TANG, Neeraj VIJ a Sumitra DEB. Critical Role of VCP/p97 in the Pathogenesis and Progression of Non-Small Cell Lung Carcinoma. *PLoS ONE* [online]. 2011, **6**(12) [cit. 2022-04-18]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0029073

VEKARIA, Pratikkumar Harsukhbhai, Trisha HOME, Scott WEIR, Frank J. SCHOENEN a Rekha RAO. Targeting p97 to Disrupt Protein Homeostasis in Cancer. *Frontiers in Oncology* [online]. 2016, **6** [cit. 2022-04-18]. ISSN 2234-943X. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2016.00181

VIOLA-RHENALS, Maricela, Kush R. PATEL, Laura JAIMES-SANTAMARIA, Guojun WU, Jinbao LIU a Q. Ping DOU. Recent Advances in Antabuse (Disulfiram): The Importance of its Metal-binding Ability to its Anticancer Activity. *Current Medicinal Chemistry* [online]. 2018, **25**(4), 506-524 [cit. 2022-04-18]. ISSN 09298673. Dostupné z: doi:10.2174/0929867324666171023161121

VOELLMY, Richard a Frank BOELLMANN. Chaperone Regulation of the Heat Shock Protein Response. CSERMELY, Peter a László VÍGH, ed. *Molecular Aspects of the Stress Response: Chaperones, Membranes and Networks* [online]. New York, NY: Springer New York, 2007, s. 89-99 [cit. 2022-04-18]. Advances in Experimental Medicine and Biology. ISBN 978-0-387-39974-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-0-387-39975-1_9

WÓJCIK, Cezary a George N. DEMARTINO. Intracellular localization of proteasomes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [online]. 2003, **35**(5), 579-589 [cit. 2022-04-18]. ISSN 13572725. Dostupné z: doi:10.1016/S1357-2725(02)00380-1

WU, Jianming, Tuoen LIU, Zechary RIOS, Qibing MEI, Xiukun LIN a Shousong CAO. Heat Shock Proteins and Cancer. *Trends in Pharmacological Sciences* [online]. 2017, **38**(3), 226-256 [cit. 2022-04-18]. ISSN 01656147. Dostupné z: doi:10.1016/j.tips.2016.11.009

DOU. Molecular study on copper-mediated tumor proteasome inhibition and cell death. *International Journal of Oncology*[online]. 2010, **37**(1) [cit. 2022-04-18]. ISSN 10196439. Dostupné z: doi:10.3892/ijo_00000655

YANG, Peizhen, Hongyong FU, Joseph WALKER, Charles M. PAPA, Jan SMALLE, Yu-Ming JU a Richard D. VIERSTRA. Purification of the Arabidopsis 26 S Proteasome. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2004, **279**(8), 6401-6413 [cit. 2022-04-18]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M311977200

YE, Yihong, Hemmo H. MEYER a Tom A. RAPOPORT. Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol. *Journal of Cell Biology* [online]. 2003, **162**(1), 71-84 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1540-8140. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.200302169

YU, Houqing a Andreas MATOUSCHEK. Recognition of Client Proteins by the Proteasome. *Annual Review of Biophysics*[online]. 2017, **46**(1), 149-173 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1936-122X. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-biophys-070816-033719

ZHANG, Zhen, Huiyun WANG, Maocai YAN, Huannan WANG a Chunyan ZHANG. Novel copper complexes as potential proteasome inhibitors for cancer treatment. *Molecular Medicine Reports* [online]. 2017, **15**(1), 3-11 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1791-2997. Dostupné z: doi:10.3892/mmr.2016.6022

ZHANG, Zhe, Li ZHOU, Na XIE, Edouard C. NICE, Tao ZHANG, Yongping CUI a Canhua HUANG. Overcoming cancer therapeutic bottleneck by drug repurposing. *Signal Transduction and Targeted Therapy* [online]. 2020, **5**(1) [cit. 2022-04-18]. ISSN 2059-3635. Dostupné z: doi:10.1038/s41392-020-00213-8

ZHENG, Ning a Nitzan SHABEK. Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation. *Annual Review of Biochemistry*[online]. 2017, **86**(1), 129-157 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014922

8. Seznam zkratk

3D struktura	Třírozměrná struktura
53BP1	Tumor Supressor p53 Binding Protein 1
AAA proteiny.	ATPases associated with diverse cellular activities ;ATPasy asociované s různými buněčnými funkcemi
AD	Alzheimer disease; Alzheimerova choroba
AMK	Aminokyselina
ALP	Autophagy-lysosome pathway
ATP	Adenosin trifosfát
B-buňky	Lymfocyty produkující protilátky
BRCA1	Breast Cancer type 1 susceptibility protein
Ca ²⁺	Vápenaté ionty
CAD	Chromatin-Associated Degradation; degradace spojená s chromatinem
CB-5084	1-[4-(benzylamino)-5H, 7H, 8H-pyrano[4,3-d]pyrimidin-2-yl]2-methyl-1H-indol-4-karboxamid
CDC48.	Homolog p97 u <i>Archea</i>
C-konec	Karboxylový konec
CP	Core particle; jádrová částice
CTD	C-terminus Domain; C-koncová doména
Cu ⁺	Měďné ionty
Cu ⁺²	Měďnaté ionty
CuBZ	Bis-(dibenzylthiokarbamát)-měďnatý komplex
CuET	Bis-(diethylthiokarbamát)-měďnatý komplex
CuMT	Bis-(dimethylthiokarbamát)-měďnatý komplex

CuP	Bis-(pyrrolidindithiokarbamát)-měďnatý komplex
D1	Globulární doména ATP
D2	Hydrolytická doména ATP
DAPI	4',6'-diamindin-2-fenylindol
DBeQ	N ² N ⁴ -dibenzyl chinazolin-2,4-diamin
Ddi1	DNA-Damage-Inducible protein1
dH ₂ O	Destilovaná voda
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DSB	Double Strand Break; dvouvláknový zlom DNA
DSF	Disulfiram; antabus; tetraethylthiuram disulfid
Dsk2	Dominant supressor of Karl 2
DTC	Diethyldithiokarbamát / Ditiokarb
DUB	Deubikvitinační enzym
E1	Ubikvitin aktivující enzym
E2	Ubikvitin konjugační enzym
E3	Ubikvitin ligasa
EerI	Eeyarestatin I
ER	Endoplazmatické retikulum
ERAD	Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation; Degradace spojená s endoplazmatickým retikulem
DTC	Diethyldithiokarbamát
fALS	familial Amyotrophic Lateral Sclerosis
FBS	Fetální bovinní sérum

G ₀ /G ₁	Kontrolní fáze buněčného cyklu
GFP	Green Fluorescent Protein; Zelený fluorescenční protein
Gp78	Glycoprotein 78
HD	Huntington disease; Huntingtonova choroba
HECT	Homologous to the E6AP carboxyl terminus
HSE	Heat shock elements; element tepelného šoku
HSF1	Heat shock factor 1; faktor tepelného šoku 1
HSP 27	Heat shock protein 27,... ; skupina proteinů tepelného šoku
HSR	Heat shock respons; reakce na tepelný šok
CHIP	C-terminus of HSP70-interacting protein
IκB	Inhibitor of NF κB
IBMFPD	Inclusion Body Myopathy with Paget's disease of the bone and Frontotemporal Dementia
JAMM	JAB1/MPN/MOV34 metaloenzym
JUNQ	Juxt nukleární kompartment pro kontrolu kvality
LBD	Lewy body disease
MAMs	Mitochondria-associated ER membranes; Membrány ER spojované s mitochondrií
MDa	Megadalton
MG132	Bortezomib
MPN	Mpr1/Pad1 N-terminus Domain; Mpr1/Pad1 N-koncová doména
NF-κB	Nuclear factor Kappa B; jaderný faktor Kappa B
N-konec	Aminový konec
Noxa	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1
NPL4	Nuclear protein localization protein 4

NSCLC	Non-small cell lung carcinoma
NZF	NPL4-Zinc finger domain; Zinková doména NPL4 zodpovědná za rozpoznání ubiquitinu
P97	Valosin containing protein
PBS	Fosfátový pufr
PD	Parkinson disease; Parkinsonova choroba
PN	Proteostasis network; proteostázní síť
polyUb	Polyubikvitinace
PQC	Protein quality control; kontrola kvality proteinů
Pru	Pleckstrin-like receptor fro ubiquitin domain
Rad 23, ...	Radiation sensitive protein 23; skupina opravných proteinů
RING	Really Interesting New Gene
RP	Regulatory particle (s); regulační část(i) proteazomu
Rpn1, ...	Regulatory particle of Non-ATPase subunits; Jednotka regulační částice proteazomu bez ATPasové aktivity
Rpt1, ...	Regulatory Particle of Triple-ATPase subunits; Jednotka regulační částice proteazomu s ATPasovou aktivitou
SCAIII	Spinocerebellar ataxia type III
sHSPs	Small heat-shock proteins
SNP	Single nucleotide polymorphism
SOD	Superoxid dismutase
SOD1	CuZn superoxide dismutase
SUMO 2/3	Small ubiquitin-like modifier
SVIP	Small VCP/p97-interacting protein
T-buňky	Lymfocyty zodpovědné za rozpoznání antigenu

TDP-43	TAR DNA-binding protein 43
TNF- α	Transcription Nuclear Factor α
TPR	Tetratricopeptide repeat
Tx-100	Triton-X 100
Ub	Ubiquitin
UBA	Ubiquitin-Associated Domain; Doména spojená s ubikvitinem
UBD	Ubiquitin-Binding Domain; Doména vázající ubikvitin
UBL	Ubiquitin-Like Domain; Doména podobná ubikvitinu
UBX	Ubiquitin-X Domain
UBXL	UBX-Like Domain
Ufd1	Ubiquitin-Fusion-Degradation Protein 1
Uch37	Ubiquitin-Carboxy-Terminal Hydrolase 37
UIM	Ubiquitin-Interacting Motif; Motiv interagující s ubikvitinem
UN	Ufd1-NPL4 komplex
UPR	Unfolded Protein Response; buněčná odpověď na rozvinuté proteiny
UPS	Ubiquitin.Proteasome System; Ubikvitin-Proteazomový Systém
Usp14	Ubiquitin-Specific Protease 14
VIMP	Sialoprotein S
XTT	2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid
YOD1	Ubiquitin Thioesterase OTU1