

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

DIPLOMOVÁ PRÁCE

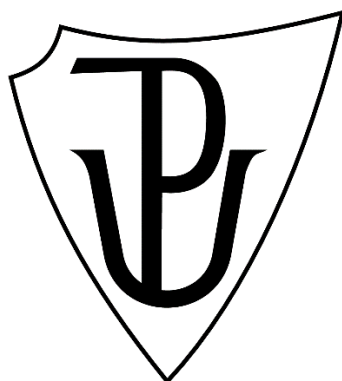
Olomouc 2020

Kateřina Lónová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra organické chemie



**Mechanismus účinku vybraného ligandu A3
adenosinového receptoru**

Bc. Kateřina LÓNOVÁ

Diplomová práce

Studijní program:

Studijní obor:

Typ studia:

Vedoucí práce:

Chemie

Bioorganická chemie a chemická
biologie

Navazující prezenční

Mgr. Jana Kotulová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Jany Kotulové, s uvedením všech použitých informačních zdrojů a literatury. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci

V Olomouci, dne

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala především svojí školitelce Mgr. Janě Kotulové za její čas, ochotu a trpělivost. Ráda bych jí zároveň vyjádřila dík za podporu a cenné rady, kterých se mi dostávalo během celé doby, kdy jsem pod jejím vedením vypracovávala diplomovou práci.

Můj dík také patří MUDr. Petru Džubákovi, Ph.D. za umožnění vypracování závěrečné práce na ÚMTM. Ráda bych zároveň poděkovala celému kolektivu pracovníků z ÚMTM, kteří mi poskytli příjemné a přátelské pracovní prostředí a cenné rady při zpracování diplomové práce, zejména pak paní Bc. Renatě Burianové.

V neposlední řadě bych ráda vyjádřila svůj vděk svým přátelům a rodině, za jejich podporu během mého studia na PřF Univerzity Palackého v Olomouci.

Bibliografická identifikace:**Jméno a příjmení autorky:** Bc. Kateřina Lónová**Název práce:** Mechanismus účinku vybraného ligandu A₃ adenosinového receptoru**Typ práce:** diplomová práce**Pracoviště:** ÚMTM, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci**Školitelka:** Mgr. Jana Kotulová**Rok obhajoby práce:** 2020**Abstrakt:**

Předložená diplomová práce si klade za cíl shrnutí teoretických poznatků o úloze adenosinových receptorů v buňce za fyziologických a patologických podmínek. Teoretická část práce je věnována klasifikaci a popisu funkcí všech podtypů adenosinových receptorů, především pak podtypu A₃AR a jeho roli při tumorigenezi. Rešerše je rovněž zaměřena na signální dráhy aktivované A₃AR, konkrétně Hedgehog, Wnt a MAPK signální dráhu. Kromě protinádorové aktivity A₃AR se další část práce zabývá rolí A₃AR při vzniku vícečetné lékové rezistence ve spojení s expresí glykoproteinu P. V neposlední řadě se teoretická část věnuje selektivním agonistům A₃AR a jejich modifikacím, se zaměřením na látku CI-IB-MECA a její antiproliferační aktivitu.

Experimentální část práce popisuje identifikaci mechanismů účinků CI-IB-MECA, selektivního agonisty A₃ receptoru na vybraných buněčných nádorových liniích: čtyři linie s vysokou expresí A₃AR (HCT 116, MDA-MB-231, Jopaca-1, HEP-3B) a jedna linie s nízkou expresí A₃AR (BT-549). Pilotními experimenty jsou analýzy antiproliferačních účinků CI-IB-MECA pomocí MTS testu a změn na buněčném cyklu po stimulaci CI-IB-MECA pomocí průtokové cytometrie. Metodou Western Blot jsou poté stanoveny změny exprese proteinů signálních drah spojených s aktivací A₃ receptoru: Hedgehog, Wnt a MAPK. Spolu s tím je určena exprese glykoproteinu P po stimulaci CI-IB-MECA a role CI-IB-MECA při omezení vícečetné lékové rezistence.

V souladu s poznatky dalších autorů jsme pozorovali anti-proliferační účinky CI-IB-MECA v koncentrační závislosti napříč buněčnými liniemi (bez ohledu na expresi A₃AR). Výsledky dále ukázaly, že CI-IB-MECA působí nejen specificky jako agonista A₃AR, ale ovlivňuje i další procesy u nádorových buněk *in vitro*, což jen zdůrazňuje důležitost znalosti mechanismů účinků dané látky pro její zavádění do klinické praxe. Současně bylo zjištěno, že CI-IB-MECA negativně ovlivňovala expresi glykoproteinu P u buněčných linií s vysokou expresí A₃AR. CI-IB-MECA zároveň působila jako substrát glykoproteinu P a nepřímo tak obnovovala senzitivitu na cytostatika u buněk s rezistentním fenotypem.

Klíčová slova: adenosinové receptory, A₃AR, CI-IB-MECA, nádorová onemocnění, vícečetná léková rezistence**Počet stran:** 82**Jazyk:** čeština

Bibliographical identification:**Author's first name and surname:** Bc. Kateřina Lónová**Title:** Mechanism of action of ligand specific for A₃ adenosine receptor subtype**Type of thesis:** master**Department:** IMTM, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University in Olomouc**Supervisor:** Mgr. Jana Kotulová**The year of presentation:** 2020**Abstract:**

This master thesis summarizes current knowledge about the role of adenosine receptors and their role under physiological and pathophysiological conditions. Theoretical part is focused on classification of all subtypes of adenosine receptors, especially A₃ adenosine subtype and its involvement during tumorigenesis. Next chapter describes signalling pathways activated by A₃AR, namely Hedgehog, Wnt and MAPK pathways. Thesis also underline the importance of A₃AR during the occurrence of multiple drug resistance in cancer cells and the relationship of A₃AR and multiple drug resistance protein expression with special focus on glycoprotein P. Theoretical part also presents selective synthetic A₃AR agonists and their modifications. Special emphasis is put on the substance CI-IB-MECA, which exerts cytostatic activity.

Experimental part is focused on identifying the mechanism of action of A₃AR selective agonist CI-IB-MECA, which was studied on five cell lines: four with high A₃AR expression (HCT 116, MDA-MB-231, Jopaca-1, HEP-3B) a one line with low A₃AR expression (BT-549). Pilot experiments determined antiproliferative effects of CI-IB-MECA by MTS assay and alterations in cell cycle by flow cytometry. Changes in expression of proteins involved in Hedgehog, Wnt and MAPK signalling pathways activated by A₃AR stimulation were assessed by Western Blot. In addition to this, expression of glycoprotein P and its influence on multidrug resistance after CI-IB-MECA treatment were analysed by flow cytometry.

In concordance with other authors, our data proved dose-dependent anti-proliferative effects of CI-IB-MECA independently on A₃ expression. The results also showed, that CI-IB-MECA exerts agonistic effect on A₃ receptor and induces alterations in protein expression in tumour cells *in vitro* dependently and/or independently on A₃ receptor. This enhances the importance of establishing the mechanisms of action for A₃AR selective agonists so they could be successfully introduced to clinical practice. Finally, our research proved negative changes in glycoprotein P expression after CI-IB-MECA treatment, and thus indirectly restoring the sensitivity in tumour cells with resistant phenotype.

Keywords: adenosine receptors, A₃AR, CI-IB-MECA, cancer, multiple drug resistance**Number of pages:** 82**Language:** Czech

Obsah

Abstrakt	5
Abstract	6
Seznam zkratek	9
Cíle práce.....	11
1 Úvod.....	12
2 Teoretická část.....	13
2.1 Adenosin.....	13
2.2 Adenosinové receptory.....	13
2.2.1 Podtypy AdoRs.....	15
2.3 Signální dráhy A ₃ receptoru	18
2.3.1 Hedgehog dráha (HH dráha)	18
2.3.2 Wnt dráha	22
2.3.3 MAPK/Erk dráha.....	26
2.3.4 Vícečetná léková rezistence a A ₃ AR.....	31
2.4 Agonisté A ₃ receptoru.....	33
2.4.1 Adenosinové deriváty	33
2.4.2 Klinicky relevantní agonisté A ₃ AR.....	35
3 Materiály a metody.....	38
3.1 Materiály	38
3.1.1 Chemikálie.....	38
3.1.2 Média.....	39
3.1.3 Protilátky	39
3.1.4 Pufry	40
3.1.5 Kity	40
3.1.6 Biologický materiál	40
3.1.7 Přístrojové vybavení.....	41
3.1.8 Software.....	42
3.2 Metodika.....	42

3.2.1	Kultivace buněčných linií.....	42
3.2.2	Stanovení cytotoxicity pomocí MTS testu	42
3.2.3	Analýza buněčného cyklu a buněčné smrti	43
3.2.4	Analýza fosforylace histonu H3	44
3.2.5	Stanovení exprese PgP	45
3.2.6	Analýza exprese proteinů	46
3.2.7	Funkční test pro MDR proteiny.....	48
4	Výsledky.....	50
4.1	Vliv CI-IB-MECA na proliferaci a buněčný cyklus.....	50
4.1.1	MTS test	50
4.1.2	Regulace buněčného cyklu.....	51
4.1.3	Buněčná smrt.....	55
4.2	Vliv CI-IB-MECA na vybrané signální dráhy.....	56
4.3	Vliv CI-IB-MECA na MDR	61
4.3.1	Stanovení exprese PgP průtokovou cytometrií.....	61
4.3.2	Funkční test s daunorubicinem.....	63
5	Diskuze.....	65
6	Závěr.....	72
7	Citovaná literatura	74

Seznam zkratek

ABC proteins	ATP-binding cassette proteins	DTT	Dithiothreitol
A₁AR	A ₁ receptor	Dvl	Dishevelled
A_{2A}AR	A _{2A} receptor	EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
A_{2B}AR	A _{2B} receptor	Erk	Extracellular signal-regulated kinases
A₃AR	A ₃ receptor	EtOH	Ethanol
AC	Adenylate cyclase	FCSI	Foetal calf serum inactivated
Ado	Adenosine	FITC	Fluorescein isothiocyanate
AdoRs	Adenosine receptors	Fz	Frizzled
ADP	Adenosine diphosphate	GDP	Guanosine diphosphate
Akt	Protein kinase B	Gli	Glioma-associated oncogene
AMP	Adenosine monophosphate	GPCRs	G-protein coupled receptors
APC	Adenomatosis polyposis coli	GSK-3β	Glycogen synthase-kinase 3 β
APS	Ammonium persulphate	GTP	Guanosine triphosphate
ATP	Adenosine triphosphate	HCC	Hepatocellular carcinoma
BSA	Bovine serum albumin	HDAC	Histone deacetylase
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate	HH	Hedgehog pathway
cDNA	Complementary DNA	HHAT	Hedgehog acetyltransferase
CK1	Casein kinase 1	HIF1α	Hypoxia inducible factor 1 α
CDK	Cyclin-dependent kinases	IB-	N ⁶ -(3-iodobenzyl)-adenosine-5'-N-
		MECA	methyluronamide
CI-IB-MECA	2-chloro-N ⁶ -(3-iodobenzyl)-adenosine-5'-N-methyluronamide	IC₅₀	Half maximal inhibitory concentration
CNS	Central nervous system	IMQ	Imiquimod
CRD	Cysteine rich domain	IP3	Inositol triphosphate
CREB	cAMP response element binding protein	JNK	c-JUN N-terminal kinase
CyA	Cyclosporine A	LRP5/6	Low-density lipoprotein receptor-related protein
DHH	Desert hedgehog	MAPK	Mitogen-activated protein kinases
dH₂O	Deionized water	MDR	Multidrug resistance
DMSO	Dimethyl sulfoxide	MEK	MAPK/Erk kinase
DNC	Daunorubicin	MeOH	Methanol
DNA	Deoxyribonucleic acid	mRNA	Messenger RNA
DVD	Domain for versatile docking	MRP1	Multidrug resistance-related protein 1

MRS1220	N-[9-chloro-2-(2-furanyl)[1,2,4]-triazolo[1,5-c]quinazolin-5-yl]benzene acetamide	PLD	Phospholipase D
MTS	(3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2(4-sulfonyl)-2H-tetrazolium	PP2A	Protein phosphatase 2
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Raf	Rapidly accelerated fibro blastoma
NECA	5'-N-ethylcarboxamideadenosine	Ras	Rat sarcoma
NES	Nuclear export signal	RB	Rinsing buffer
NF-κB	Nuclear factor κ B	RTK	Receptor tyrosine kinases
NTs	Nucleoside transporters	SHH	Sonic hedgehog
PARP	Poly-(ADP-ribose) polymerase	Smo	Silencing RNA
PBS	Phosphate buffer solution	SDS	Sodium dodecylsulphate
PgP	Glycoprotein P	SSD	Sterol sensitive domain
PI	Propidium iodide	SUFU	Supressor of fused
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase	Tax	Taxol
PKA	Protein kinase A	TBS	Tris buffer solution
PMSF	Phenylmethylsulphonyl fluoride	TCF/LEF	T-cell factor/lymphoid enhancer factor
PLC	Phospholipase C	TEMED	Tetramethylethylenediamine
		TGS	Tris-glycine solution
		TLR	Toll-like receptor
		TNF-α	Tumor necrotic factor α
		Wnt	Wingless interaction

Cíle práce

1. Vypracovat literární rešerši shrnující současné poznatky o úloze A3 adenosinového receptoru v rozvoji nádorového onemocnění a o účincích vybraných ligandů adenosinového receptoru A3, zejména ve vztahu k nádorovému onemocnění.
2. Optimalizace podmínek pro kultivaci a testování vybraných buněčných linií: MDA-MB-231, BT 549, HCT 116 parental, HEP-3B a Jopaca-1.
3. Identifikace a charakterizace mechanismů účinků selektivního agonisty A3 adenosinového receptoru, adenosinového derivátu Cl-IB-MECA, pomocí biochemických a molekulárně biologických metod *in vitro*, a to na zmíněných nádorových buněčných liniích.

1 Úvod

Nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí v moderní společnosti. Jejich rozšíření v lidské populaci je kromě genetických predispozic podmíněno mnoha faktory, jako jsou například stravovací návyky, životní styl, ale i kulturní zázemí. Není tedy překvapením, že snaha najít účinnou léčbu bez závažných vedlejších efektů je neutuchající a stále aktuální. V dnešní době je nejčastější volbou terapie nádorových onemocnění kombinovaná léčba pomocí operačního zákroku, radiace a chemoterapie. Tato nespecifická systémová terapie je však spojena s mnoha vedlejšími efekty a je navíc často doprovázena vznikem lékové rezistence, čímž je efektivita léčby výrazně snížena. V současné době je moderní medicína a buněčná biologie na takové úrovni, kdy je možné odhalit konkrétní mechanismy spojované s přeměnou somatických buněk na maligní. Díky tomu je často možné na tyto mechanismy přesně zacílit a pro pacienta navrhnout specifickou léčbu, která je citlivější, ale zároveň stejně účinná, jako systémová terapie.

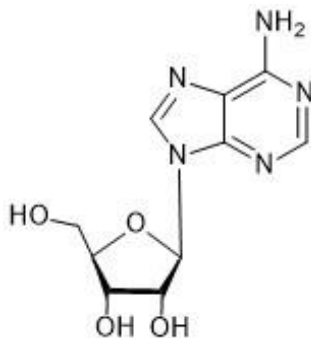
Jednou z molekul, která byla v nedávné době navržena jako potenciální cíl pro cytostatickou léčbu, byl A_3 adenosinový receptor. Jedná se o podtyp receptoru ze skupiny receptorů spřažených s G-proteinem, jehož zvýšená exprese je charakteristická pro mnoho typů nádorů a díky tomu může být považován za významný marker tumorigeneze. U netumorigenních buněk je naopak exprese A_3 receptoru velice nízká, což z něj zároveň dělá atraktivní protein pro cílenou léčbu nádorových onemocnění. K aktivaci A_3 receptoru dochází především při metabolicky nevýhodných podmínkách, kdy dochází k rozpadu ATP a vzrůstá extracelulární koncentrace adenosinu. A_3 receptor tak hraje významnou roli při imunitní odpovědi organismu, při produkci protizánětlivých molekul cytokinů a jeho aktivaci dochází ke spouštění nebo inhibici celé řady signálních drah v buňce.

Při experimentech, kdy docházelo k ovlivnění buněk látkami s agonistickým efektem vůči A_3AR bylo zjištěno, že u většiny nádorových linií mají tyto molekuly inhibiční účinky na jejich proliferaci a zároveň způsobují apoptózu. Z těchto látek měly největší význam zástupci adenosinových derivátů se substitucí v C2 poloze, N⁶ poloze na adeninu a v pozici 5' na molekule ribózy. Nejvyšší afinita a selektivita vůči A_3 podtypu byla pozorována u látek IB-MECA a Cl-IB-MECA, které *in vitro* i *in vivo* vykazovaly antiproliferační účinky a byly dokonce úspěšně testovány v klinických studiích u pacientů s revmatoidní artritidou, chronickou hepatitidou a hepatokarcinomem.

2 Teoretická část

2.1 Adenosin

Adenosin (Ado) je purinový nukleosid tvořící základní kostru adenosintrifosfátu (ATP), který je zdrojem energie pro celý organismus. Jeho struktura se sestává z molekuly adeninu připojené β -N-glykosidovou vazbou na ribózu (obr. 1). Ado se v nanomolárních koncentracích nachází v celém těle, v intracelulárním i v extracelulárním prostředí. Moduluje mnoho důležitých fyziologických procesů a jeho koncentrace osciluje jako odpověď na patologické a abnormální stavy organismu (1).



Obr. 1: Strukturální vzorec molekuly adenosinu (ChemDraw).

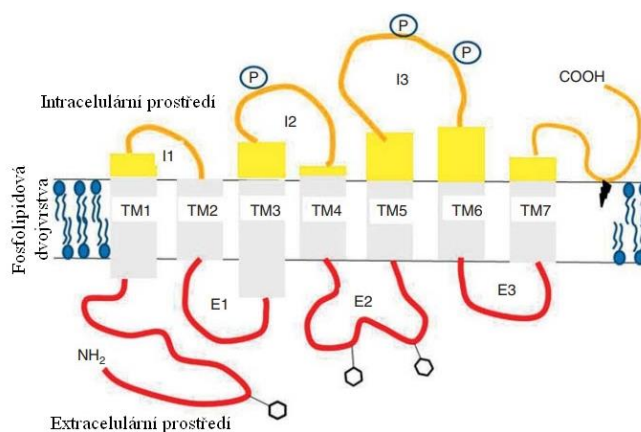
Efekty Ado mohou být zprostředkovány dvěma způsoby, a to přímo prostřednictvím receptorů nebo nezávisle na receptorech. (2) První způsob je uskutečňován prostřednictvím 4 podtypů adenosinových receptorů spojených s G-proteinem, které jsou aktivovány nasednutím Ado, který je endogenním agonistou těchto receptorů. Druhý mechanismus probíhá prostřednictvím obousměrných nukleosidových transportérů (NTs), které regulují hladinu intracelulárního Ado. NTs jsou integrální membránové proteiny odpovídající za udržování nukleosidové homeostázy v buňce. Za fyziologických podmínek NTs slouží k vyrovnávání koncentrační rovnováhy Ado a jejich funkce je úzce spjatá s funkcí adenosinových receptorů, kdy při snížení extracelulární koncentrace Ado mohou dokonce zastavit signální dráhy závislé na adenosinových receptorech. (2)

Hlavní role Ado spočívá v udržování homeostázy a ochraně organismu. Má rovněž funkci jako neuromodulátor a regulátor průtoku krve, kdy způsobuje vasodilataci a tím nepřímo zlepšuje prokrvení. (1) S tím je spojena jeho úloha při stimulaci angiogeneze. Kromě toho se Ado podílí na regulaci buněčné proliferace, buněčného růstu a buněčné smrti.

2.2 Adenosinové receptory

Účinky Ado jsou zprostředkovávány díky podskupině proteinů ze superrodiny receptorů spřažených s G-proteinem (GPCRs). (3) Adenosinové receptory jsou rozdělovány na 4 podtypy – A_1 , A_{2A} , A_{2B} a A_3 (AdoRs). Každý z těchto podtypů je unikátní pro svoji fyziologickou roli, afinitu k navázání ligandu a lokalizaci v těle. (4) Navzdory tomu, všechny podtypy receptorů mají velmi podobnou molekulární

strukturu, která sestává z α -helixu, který sedmkrát prostupuje cytoplazmatickou membránou s extracelulárním N-koncem a intracelulárním C-koncem (obr. 2). (3) (5) Na N-terminální doméně se vyskytují místa pro glykosylaci, která ovlivňují translokaci receptoru do plazmatické membrány. (4) C-terminální doména oproti tomu obsahuje serinová a threoninová rezidua, na kterých probíhá fosforylace proteinových kináz, jež zapříčiňují snížení citlivosti receptoru. C-konec, společně se třetí intracelulární smyčkou G-proteinu, rovněž umožňuje navázání receptoru na G-protein. (6) Zároveň se jedná o jednu z nejvíce variabilních součástí G-proteinu, podmiňující jeho specifitu k rozdílným receptorům. (7) Struktura A_1 , A_{2A} a A_{2B} je vysoce homologní (80-95% podobnost) a evolučně konzervovaná ve všech organismech. A_3 je oproti tomu mezidruhově variabilní. (8) Navzdory strukturální podobnosti, geny pro jednotlivé AdoRs jsou lokalizované na různých chromozomech (tab. 1). Každý z podtypů AdoRs byl pak také popsán pomocí molekulárního klonování, profilováním agonistické i antagonistické aktivity a afinitou ke G-proteinu.



Obr. 2: Obecná struktura adenosinového receptoru sestávající z α -helixu se sedmi transmembránovými doménami, extracelulárním N-koncem a intracelulárním C-koncem. Převzato a upraveno dle (9).

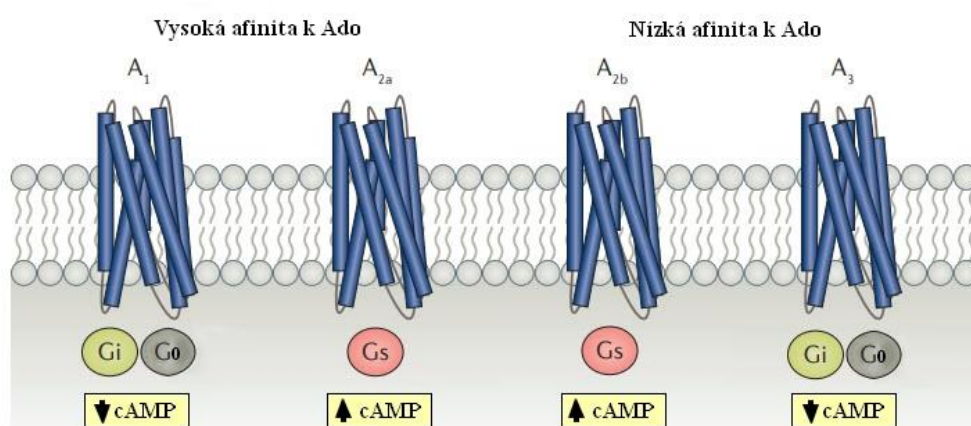
Tab. 1: Lokalizace genů pro jednotlivé podtypy AdoRs na chromozomech (10).

podtyp	lokalizace
A_1 AR	1q32.1
A_{2A} AR	22q11.23
A_{2B} AR	17p12
A_3 AR	1p13.2

Jednotlivé podtypy lidských AdoRs se vzájemně liší rozdílnou afinitou k jejich přirozenému agonistovi, Ado. A_1 a A_{2A} jsou charakteristické jejich vysokou afinitou; jejich aktivace byla pozorována i při velmi nízkých koncentracích Ado (u A_1 již při 0,3–3nM, u A_{2A} při 1–20nM). (1) A_{2B} a A_3 oproti tomu pro svoji aktivaci vyžadují koncentraci Ado podstatně vyšší (více než 1 μ M). (11) (12) Za fyziologických podmínek, kdy je koncentrace extracelulárního Ado v rozmezí 0,3–1nM tedy dochází k aktivaci především podtypů A_1 a A_{2A} . (11) Vlivem metabolického stresu (např. hladovění, hypoxie,

ischemie, růstu nádoru) však může docházet k rozkladu ATP a ke zvýšení extracelulární koncentrace Ado a tak ke stimulaci A_{2B} a A_3 . (13)

AdoRs jsou rozdělovány podle jejich účinků na adenylát cyklázu (AC), která ovlivňuje hladinu cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). (3) Aktivace podtypů A_1 a A_3 vede k deaktivaci AC, a tedy ke snížení hladiny cAMP, zatímco stimulace podtypů A_{2A} a A_{2B} zvyšuje produkci intracelulární cAMP (obr. 3). (3) (12) Tento duální efekt je zapříčiněn rozdílnými typy G-proteinu, se kterým jsou AdoRs spřažené. V případě podtypů A_1 a A_3 jsou spojeny s typy G_i a G_o , které vykazují inhibiční efekt a receptory A_{2A} a A_{2B} jsou spřaženy se stimulační formou G-proteinu, G_s . (14)



Obr. 3: Extracelulární Ado se váže na 4 podtypy AdoRs, které inhibují/aktivují formaci intracelulárního cAMP. Typy A_1 a A_3 jsou spřažené s G-proteinem s inhibiční funkcí a jejich aktivace vede k poklesu koncentrace intracelulární cAMP a tím k zastavení některých signálních drah. Stimulace A_{2A} a A_{2B} , spojených se stimulační isoformou G-proteinu oproti tomu tvorbu cAMP podporuje, čímž dané signální dráhy aktivuje. (8) Převzato a upraveno dle (12).

2.2.1 Podtypy AdoRs

AdoRs zastávají mnoho funkcí jako regulátory fyziologických i patologických procesů. Exprese AdoRs v organismu je velmi variabilní – jednotlivé podtypy AdoRs jsou v tělních tkáních nerovnoměrně rozšířené. (12) Indukce transkripce genů pro AdoRs je řízena různými metabolicky nepříznivými stimuly, především oxidačním stresem, vznikem zánětu a hypoxií. (15) Takto zvýšená exprese AdoRs z nich dělá atraktivní cíle při léčbě široké škály onemocnění spojených s nadměrnou produkcí Ado, mezi které patří mimo jiné neurodegenerativní onemocnění, epilepsie, artritida, záněty a nádorová onemocnění. (16) (17) (18) (11) AdoRs se mohou podílet také na kardioprotekci, kdy jsou odpovědné za otevírání ATP-dependentních kanálků v buňkách myokardu. Tento proces vede k aktivaci proteinkináz napomáhajících při ochraně buněk před poškozením vzniklým ischemií. (19) (20)

Signální kaskády, na kterých se AdoRs podílí, jsou velmi komplexní. Jejich aktivací dochází ke stimulaci některých klasických signálních drah závislých na G-proteinu, které hrají roli při kontrole buněčného cyklu, proliferaci a apoptóze. (21)

2.2.1.1 A₁ receptor

Exprese A₁ je obecně nejvyšší ze všech podtypů AdoRs; tento podtyp je hojně rozšířen v CNS, především v neokortexu, mozečku, hipokampu a v míšni oblasti. Vysoký výskyt A₁AR byl rovněž detekován v srdeční svalovině, varlatech, žaludku, játrech a v neutrofilech. (22) (23) Nízká exprese byla naopak zjištěna v ledvinách, plicích a kolorektálním traktu. (24) (23)

A₁ se účastní signálních drah, prostřednictvím kterých se podílí na uvolňování neurotransmiterů a tím na neuroprotekcii. (23) Důležitou roli hraje i v kardioprotekcii, kdy působí proti adrenergní stimulaci sympatiku a tím zpomaluje srdeční aktivitu. (24)

2.2.1.2 A_{2A} receptor

Vysoká hladina podtypu A_{2A} byla identifikována v mozku, brzlíku, slezině, leukocytech a v krevních destičkách. Jeho exprese byla rovněž pozorována v srdci, plicích a ve stěnách cév. Stimulace A_{2A} receptoru aktivuje AC a zvyšuje tím hladinu intracelulárního cAMP, prostřednictvím kterého dochází ke stimulaci signálních drah spojených s proteinkinázou A (PKA). (25) (26) Tyto signální dráhy v nervových buňkách ovlivňují, podobně jako podtyp A₁, produkci neurotransmiterů a regulují tak motorickou aktivitu, spánkový cyklus, psychologické chování a funkci neuronů. V periferních tkáních se podílejí na vzniku zánětů, angiogenezi, modulaci krevního tlaku, ale i na nádorové transformaci. (26) Exprese A_{2A} podtypu byla také pozorována u monocytů, žírných buněk, neutrofilů a dalších buněk účastnících se řízení imunitního systému. Tyto poznatky naznačují, že se A_{2A}AR podílí na regulaci imunitní odpovědi a zároveň působí jako supresory vzniků zánětu. (27)

2.2.1.3 A_{2B} receptor

Navzdory tomu, že je podtyp A_{2B} rozšířen téměř ve všech orgánech, jeho exprese v buňkách není příliš vysoká. (23) Podobně jako v případě A_{2A}, jeho stimulace zapříčiňuje aktivaci AC a zvýšení hladiny cAMP, což může vést ke spuštění MAPK signální dráhy. Ze všech čtyř podtypů AdoRs vykazuje rovněž nejnižší citlivost vůči Ado. Pro jeho aktivaci je třeba dosáhnout mikromolární koncentrace extracelulárního Ado, což je za fyziologického stavu jen těžko dosažitelné; k jeho stimulaci dochází většinou v případě metabolicky nevýhodných podmínek, při kterých koncentrace extracelulárního Ado vzrůstá (např. již zmíněné hypoxie, ischemie, záněť). Jeho konkrétní role v organismu není zatím příliš objasněna, především kvůli malému počtu selektivních agonistů a antagonistů. (23)

2.2.1.4 A₃ receptor

A₃AR byl ze všech AdoRs identifikován nejpozději. V 90. letech minulého století byl z krysích varlat izolován gen *R226*, který je dnes spojován s expresí A₃AR. (28) Mimo varlata byla mRNA pro A₃AR nalezena také v plicích, ledvinách, srdci a některých částech CNS. (13) V porovnání s ostatními podtypy je však A₃AR v tkáních méně distribuován. Izolace lidské cDNA pro A₃AR umožnila analýzu jeho

distribuce napříč tkáněmi, kdy byl detekován vysoký výskyt mRNA pro A₃AR v plicích a játrech. Středně vysoký výskyt A₃AR byl pozorován i v mozku a v aortě. (28) Nízká exprese byla rovněž zjištěna v buňkách varlat a koronárních arteriích. (13) Přítomnost A₃AR oproti tomu nebyla vůbec detekována v lidských buňkách CNS, ledvinných tkáních a ve slezině. (28)

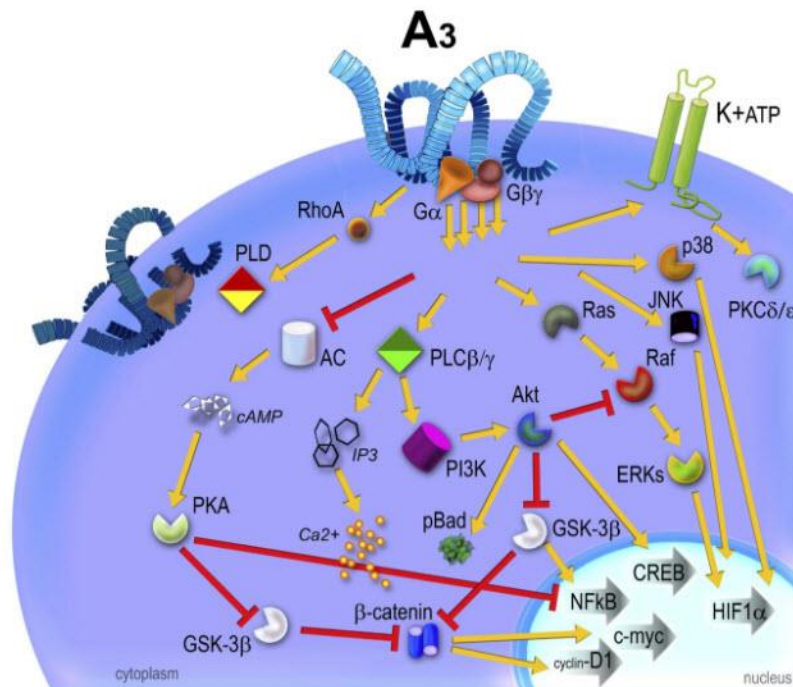
Při metabolicky nevýhodných podmínkách, jako jsou například záněty, koncentrace A₃AR vzrůstá. Jeho role při aktivaci imunitní odpovědi v makrofázích, neutrofilech a eozinofilech spočívá především v indukcii jejich degranulace a v produkci protizánětlivých cytokinů. (13) (29) (30) V buňkách bazofilů vede aktivace receptoru ke spouštění prozánětlivých efektů vedoucích ke vzniku astmatu a bronchospasmu. (29) Alergické reakce vyvolané degranulací žírných buněk jsou taktéž zprostředkovány A₃AR. (31)

Při orálním podání agonisty A₃AR bylo zjištěno, že má inhibiční účinky na růst nádorů u modelových zvířat. Zajímavý však byl fakt, že při jeho použití na netumorigenní myši buňky kostní dřene nastal opačný efekt než u nádorové tkáně a u myeloidních somatických buněk docházelo ke zvýšení proliferace. (32) Na základě tohoto jevu vznikla hypotéza, že netumorigenní a nádorové buňky vykazují rozdílnou míru exprese A₃AR, která tento dvojí efekt zapříčiňuje. Vysoká exprese A₃AR byla následně pozorována u celé řady nádorových linií odvozených od karcinomu prsu, kolorekta, jater, prostaty, ale i u buněk leukemických. (33) (34) (35) (36) (37) Díky tomuto fenoménu by bylo možné lépe zacílit léčbu nádorových onemocnění tak, aby působila pouze na rakovinné buňky a somatické buňky ovlivňovala co nejméně. Vysoká produkce A₃AR v tumorigenních tkáních pak může být rovněž významná jakožto role potenciálního markeru při predikci nádorových onemocnění. (38)

Aktivace A₃AR spouští nebo inhibuje celou plejádu G-protein dependentních signálních drah. Jeho stimulací dochází k inhibici AC, což má za následek pokles celkové koncentrace druhotného posla, cAMP. (39) Jedněmi z molekul, jejichž exprese je determinována přítomností cAMP, jsou tetramerní PKA a proteinkináza B (Akt), které hrají roli při modulaci široké škály extracelulárních signálů. (13) (40) Některé signální dráhy spouštěné stimulací A₃AR však mohou probíhat nezávisle na G-proteinu; patří mezi ně například aktivace proteinu Ras-homolog family member A (RhoA), jež stimuluje aktivitu fosfolipázy D (PLD). PLD má anti-ischemické účinky a bylo pozorováno, že podporuje kardioprotekci u kardiomyocytů. (41) Ochrana srdečních buněk může však být také zprostředkována A₃AR dependentním otevíráním draselných K_{ATP} kanálů, které buňky chrání před ischemickým/reperfučním poškozením. (13) Počet G-protein dependentních signálních drah však signifikantně převyšuje množství drah nezávislých na G-proteinu. Těmto drahám se bude blíže věnovat kapitola č. 2.3.

2.3 Signální dráhy A₃ receptoru

Jedny z hlavních drah, které jsou ovlivňovány A₃AR je Wnt dráha, MAPK dráha, Hedgehog dráha a PI3K/Akt dráha (obr. 4). (13)



Obr. 4: A₃AR signalizace. A₃AR se účastní řady drah. Aktivací receptoru spřaženého s G_i proteinem dochází ke změně konformace guanosindifosfátu (GDP) na α podjednotce proteinu je nahrazeno guanosintrifosfátem (GTP). Po navázání GTP je α podjednotka odštěpena od β/γ podjednotek a inhibuje cílový protein; v případě A₃AR je to AC. To způsobuje, že koncentrace sekundárního posla cAMP klesá, což zapříčiňuje pokles produkce PKA. Protein PKA ovlivňuje aktivitu glykogen-syntházy kinázy 3β (GSK-3β), klíčového proteinu Wnt dráhy, a ovlivňuje aktivitu β-kateninu a tím nepřímo genovou transkripci proteinů nezbytných pro správný průběh buněčného cyklu – c-myc a cyklinu D1. Aktivací fosfolipázy C (PLC) pak dochází buď k fosforylaci fosfatidylinositol-3 kinázy (PI3K) a následné aktivaci Akt nebo k uvolnění vápenatých iontů působením inositoltrifosfátu (IP3). Další proteiny podílející se na A₃AR signalizaci jsou zástupci rodiny mitogen-activated protein kinase MAPK (ERKs, JNK, p38), které aktivují transkripční faktory CREB a hypoxia-induced factor 1α (HIF1α). A₃AR se rovněž podílí na stimulaci PLD a proteinu RhoA. Převzato a upraveno dle (13).

2.3.1 Hedgehog dráha (HH dráha)

Signální dráha Hedgehog je evolučně konzervovaná dráha, která patří mezi klíčové regulátory při embryonálním vývoji organismu. K jejímu objevu došlo v roce 1980, kdy bylo izolováno 15 mutovaných genů u octomilky rodu *Drosophila melanogaster*, které ovlivňují segmentaci osy jejich těla. (42) Takto mutovaný fenotyp se vyznačuje abnormálně tvarovanými embryi, která jsou charakteristická přítomností krátkých výběžků na povrchu těla. Vzhled těchto embryí připomínal ježka, anglicky *Hedgehog*, z čehož byl následně odvozen název intracelulárních signálních polypeptidů Hedgehog, které se váží na receptory a aktivují tak signální dráhu. (43)

V pozdějších letech byla dráha HH prokázána i u dalších živočichů, včetně člověka. (44) Uplatnění nachází především v embryonální fázi vývoje jedince, kdy se podílí na řadě významných procesů, jako je např. správná diferenciacce kmenových buněk a formace orgánů. (45) (46) U dospělých jedinců je

aktivita HH dráhy zachována a podílí se na regulaci homeostázy, formování populací kmenových buněk a obnovování a opravě již diferencovaných tkání. (45) (47) Zvýšená aktivita HH však může být u některých orgánů příčinou vzniku nádorů, především pak pankreatu, prostaty, trávicího traktu a kůže. (47) (46) I kvůli tomu se stala HH atraktivním cílem při nádorové terapii. Inhibitory cílící na některé z proteinů účastnících se HH dráhy dokázaly zamezit proliferaci a mají vysokou úspěšnost léčby u nádorů bazálních buněk. (48) (49)

2.3.1.1 Jednotlivé komponenty HH dráhy

Signální dráha HH je aktivována vazbou polypeptidového ligandu Hedgehog polypeptide (Hh) na receptor. K dnešnímu dni jsou v savčích buňkách známy tři homology genů, které kódují polypeptidy Hh, a to Desert Hedgehog (DHH) a Indian Hedgehog (IHH) a Sonic Hedgehog (SHH). (46) Všechny Hh polypeptidy jsou složeny ze dvou podjednotek: N-terminální, pojmenované „Hedge“ a C-terminální, nazývané „Hog“. Hedge doména odpovídá za signalizační aktivitu proteinu, zatímco Hog doména způsobuje rozštěpení polypeptidu, na který je následně navázán cholesterol a palmitát. Takto upravený hydrofobní polypeptid může být poté translokován a koncentrován u povrchu buněčných membrán. (50)

První z homologů, DHH, je svojí strukturou nejvíce podobný Hh genu vyskytujícímu se právě v *Drosophila melanogaster*. (43) Je exprimován ve Schwannových buňkách a hraje roli při vývoji periferních nervů. (51) Vyskytuje se rovněž v Sertoliho buňkách vyvíjejících se varlat a jeho mutace mohou vést ke gonadálním dysgenezím. (52) IHH, druhý homolog, je lokálně produkovanou signální molekulou nezbytnou pro vývoj endochondrálního skeletu. Poslední homolog, SHH, je doposud nejvíce prostudovaným z genů. (50) Hraje klíčovou roli při myogenezi a kontrole proliferace. (53)

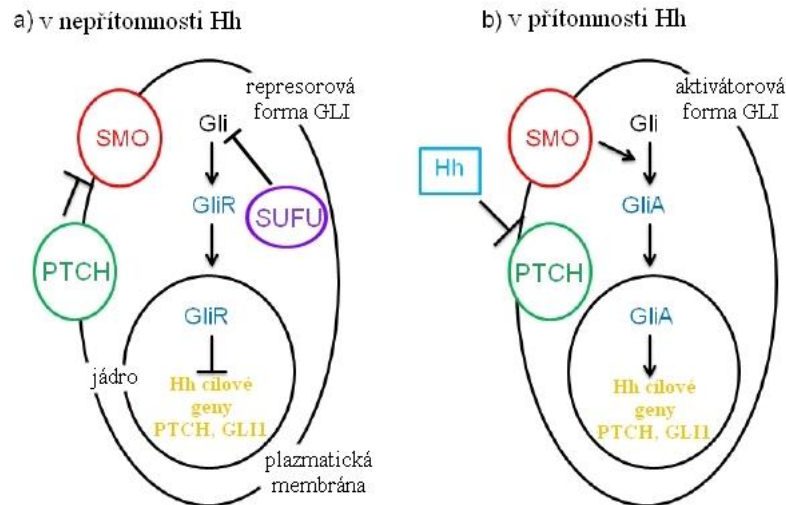
Pro správný přenos signálu na receptor je nutná lipidace polypeptidu. Ta je zprostředkována enzymem Hedgehog acyltransferázou (HHAT), která na sebe váže GTP a upevňuje palmitát na N-konec SHH. (54) Zároveň je na C-konec navázán cholesterol. (55)

Polypeptidy Hh se následně po lipidaci váží na transmembránový receptor Patched (Ptch). U obratlovců se vyskytují dvě formy receptoru: Patched 1 (Ptch1) a Patched 2 (Ptch2). (50) Oba podtypy mají specifická vazebná místa pro všechny tři Hh polypeptidy a vyskytuje se u nich sterol-senzitivní doména (SSD), na kterou se váže Hh ligand modifikovaný cholesterolem. (55) V případě navázání ligandu pak dochází k aktivaci signální dráhy. (50) Pokud je Hh ligand nepřítomen, Ptch není aktivován, čímž dochází k degradaci pomocného receptoru Smoothed (Smo) v proteazomu a dráha je zastavena (obr. 5).

2.3.1.2 Průběh signální dráhy

HH dráha je aktivní především v embryonálním vývoji a u dospělého jedince je za fyziologických podmínek až na pár výjimek inhibována, netvoří se tedy ani jeden ligand Hh. (45) U nádorových buněk její aktivita významně vzrůstá, což má za následek spuštění kaskády, na jejímž konci je indukována

transkripce a dochází tak k expresi cílových genů, včetně Ptch1/2, Glioma-associated onkoproteinů (Gli) a anti-apoptického proteinu Bcl-2. (48)



Obr. 5: HH dráha v aktivním stavu v přítomnosti Hh ligandu. Dochází k aktivaci Gli transkripčních faktorů a k transkripci Hh cílových genů. V případě nepřítomnosti Hh ligandu je dráha neaktivní a transkripce neprobíhá. Převzato a upraveno dle (56).

2.3.1.2.1 Dráha v nepřítomnosti ligandu

V případě, že není přítomen Hh ligand, nedochází k aktivaci membránového receptoru Ptch. Protein Smo je lokalizován v intracelulárních endosomálních váčcích a inhibován a degradován v proteozomu, což vede ke snížení jeho koncentrace v buňce. (57) V tomto případě dochází rovněž k formaci proteinového komplexu sestávajícího z GSK3β a Suppressor of Fused (SUFU). Gli2/3 jsou fosforylovány pomocí PKA, GSK-3β a kasein kinázy I (CKI) a transformovány v proteozomu na jejich represorovou formu, Gli_R, která nevstupuje do jádra. Dochází tedy k umlčení transkripční aktivity cílových genů HH. (57)

2.3.1.2.2 Dráha v přítomnosti ligandu

Přístupující ligand Hh je zpracován na dva fragmenty: N-koncový protein N-Hh a C-koncový protein C-Hh. (58) K N-Hh je následně pomocí HHAT připojena molekula palmitátu a C-Hh, pracující jako cholesterol transferáza, připojuje k N-Hh molekulu cholesterolu. (54) Díky lipidaci se poté ligand může navázat na transmembránový receptor Ptch1/2 cílové buňky.

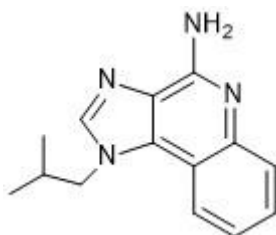
Poté, co dojde k navázání Hh ligandu, protein Smo je translokován z intracelulárního prostoru do cilia a způsobuje odštěpení Gli z multiproteinového inhibičního komplexu. (59) To vede k jejich aktivaci a ke vzniku aktivátorové formy, Gli_A. Rovnováha aktivátorové formy a represorové formy Gli podmiňuje to, zda bude docházet k transkripci cílových genů, či nikoliv.

2.3.1.3 HH dráha a AdoR

HH signální dráha je mimo jiné regulována Gli transkripčními faktory. Pokud není přítomný Hh ligand, dráha je neaktivní, Gli zůstávají v represorové formě a nedochází k expresi genů. Represorová forma Gli je charakteristická tím, že dlouhé proteiny Gli podstupují proteolytické štěpení iniciované fosforylací na C-konci pomocí PKA. (60) (61) Lze tedy říct, že PKA funguje jako negativní regulátor HH. (60)

Abnormální aktivace HH je příčinou mnoha nádorových onemocnění a jedním z nich je karcinom bazálních buněk. Pro jeho léčbu byl v roce 2004 schválen topický preparát Imiquimod (IMQ), syntetický nukleosid ze třídy 1H-imidazo-[4,5-c]chinolonů (obr. 6). (62) Jeho účinek je zprostředkováván aktivací Toll-Like receptorů 7 a 8 (TLR7, TLR8), transmembránových proteinů, které jsou exprimovány především v makrofázích a dendritických buňkách. (63) Podílejí se na signální dráze, která vede k aktivaci nukleárního faktoru κ B (NF- κ B). Tento proteinový komplex ovlivňuje mimo jiné transkripci mnoha genů odpovědných za expresi enzymů, cytokinů a molekul regulujících buněčný cyklus, což vede k následné sekreci chemokinů a dalších mediátorů podílejících se na imunitní odpovědi organismu. (63) Signální proteiny poté aktivují cytotoxické T buňky, které napadají nádor. Kromě toho, u IMQ byla prokázána schopnost indukovat apoptózu prostřednictvím mitochondriální dráhy. (62) (64)

IMQ má rovněž vliv na inhibici transkripčních faktorů Gli. Používání IMQ stimuluje fosforylací Gli pomocí PKA a následnou formaci represorových forem Gli, čímž je inhibována exprese cílových genů. (60) Tato aktivita však probíhá nezávisle na TLR7/8. Bylo zjištěno, že IMQ v tomto případě hraje roli jakožto antagonist adenosinových receptorů, s nimiž interaguje s mikromolární afinitou. (65) Nejvyšší afinitu vykazoval pro A_{2A} ($K_I = 2,94\mu\text{M}$) a A_1 ($K_I = 2,16\mu\text{M}$), slabší interakce tvořil i s A_3 ($K_I = 14,6\mu\text{M}$). (60) (65)

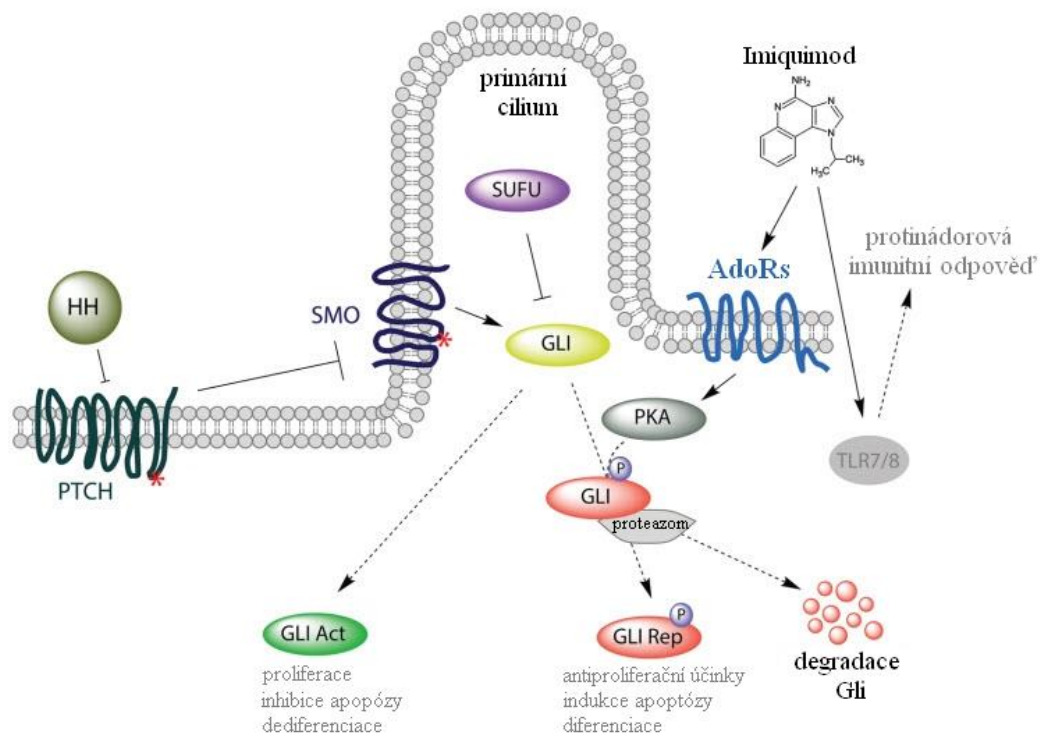


Obr. 6: Struktura antagonisty AdoRs Imiquimodu (ChemDraw).

V případě, že se IMQ váže na podtypy receptoru A_1 a A_3 , dochází k jejich aktivaci, čímž je inhibována AC. Snížením koncentrace druhotného posla cAMP dochází ke zvýšení exprese prozánětlivých faktorů, především cytokinů. (65) Tento mechanismus může být vysvětlením, proč při topickém používání IMQ vzniká silná zánětlivá reakce. (66). Studie provedená Schön et al. (2006) však ukazuje, že aktivita IMQ může být umožněna i nezávisle na AdoRs a jen zesiluje efekt zprostředkovaný receptorem. (65)

Navzdory této studii, Gruber et al. (2014) tvrdí, že IMQ působí na AdoRs jako agonista. Po nasednutí IMQ na A_{2A} AR dochází k aktivaci AC a k následné formaci PKA, což vede k fosforylací Gli1 a jeho

následné inaktivaci. Neaktivní forma Gli je poté degradována v proteozomu. Nedochází tak k transkripci cílových genů potřebných pro správný průběh proliferace a buněčný cyklus je zastaven (obr. 7). V návaznosti na tyto výsledky dále autoři spekulovali, zda budou mít strukturně příbuzné deriváty IMQ podobné účinky při inhibici HH signální dráhy. (67) Podobná studie pak byla provedena na kmenových buňkách prsního karcinomu MCF-7 a MDA-MB-231. Ovlivnění buněk CI-IB-MECA, selektivním agonistou A₃AR, způsobovalo inhibici proliferace a zároveň vedlo ke snížení klíčových komponent HH dráhy, proteinů Smo a Gli. Výsledek tohoto experimentu vede k názoru, že inhibice HH dráhy prostřednictvím AdoRs hraje důležitou roli při navození apoptózy a zamezení proliferace (33)



Obr. 7: Mechanismus působení IMQ: IMQ se váže na AdoRs, čímž dochází k jejichablokování a následné inaktivaci AC a snížení koncentrace cAMP. Tento efekt je zesílen inhibicí cAMP nezávislou na AdoRs. IMQ pak rovněž zapříčiňuje indukci apoptózy prostřednictvím mitochondriální dráhy. Převzato a upraveno dle (67).

2.3.2 Wnt dráha

Wnt signální kaskáda je řazena, stejně jako HH, mezi evolučně konzervované dráhy. Její jméno je odvozeno ze spojení názvů pro gen u *Drosophila* „wingless“ a názvu pro jeho homolog u obratlovců, „integrated“, nebo „int-1“. V buňce má mnoho regulačních funkcí a ovlivňuje široké spektrum procesů, mezi které patří například řízení buněčné migrace a proliferace, regulace organogeneze během embryonálního vývoje, udržování homeostázy, diferenciace kmenových buněk a navození apoptózy. Při mutaci této dráhy proto dochází k vývojovým defektům embrya a ke vzniku některých nádorových onemocnění, nejčastěji prsu, kůže a kolorekta anebo poruchám skeletárního vývoje. (68) (69)

Signální dráha Wnt může probíhat několika kaskádami: klasicky (kanonicky, kdy je aktivita dráhy závislá na kumulaci/degradaci β -kateninu) a neklasicky (nekanonicky, kdy dráha reguluje především buněčnou polaritu a koncentraci Ca^{2+} v cytoplazmě). (70)

2.3.2.1 Jednotlivé komponenty Wnt

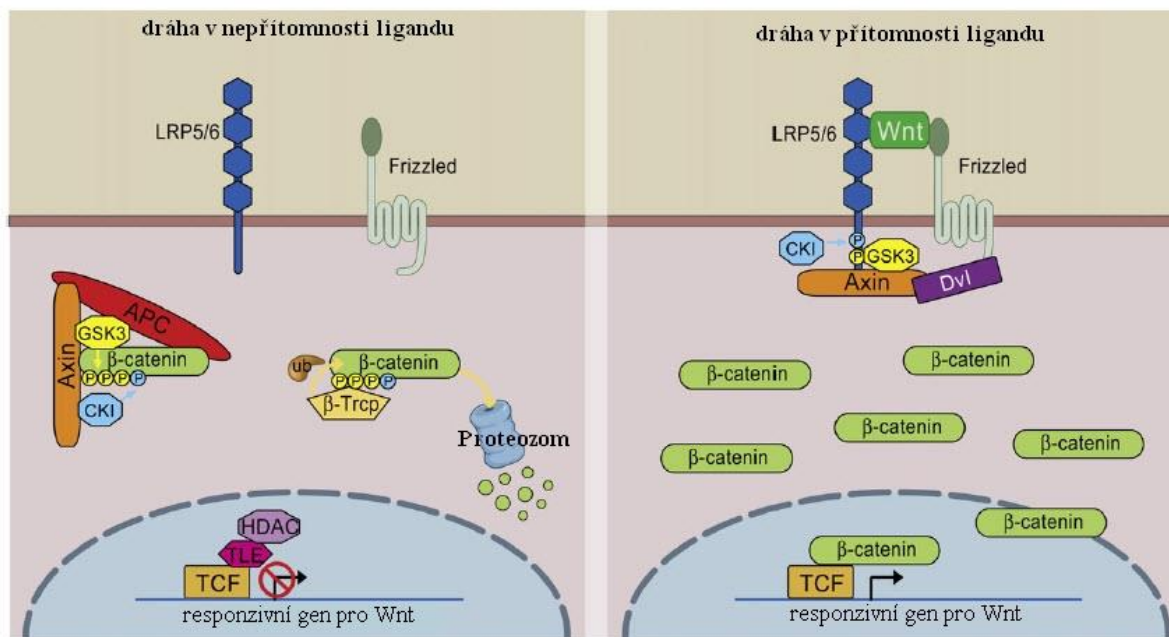
Wnt glykoprotein nasedá na receptor a aktivuje celou kaskádu reakcí. Wnt proteiny spadají do velké skupiny signálních molekul, které ovlivňují proliferaci, podílejí se na kontrole buněčného cyklu a uplatňují se při vývojových procesech, jako je gastrulace a formování končetin a mozku. (70) (71) Vyskytují se v různých počtech téměř u všech mnohobuněčných organismů; konkrétně u myši a člověka existuje 19 homologů pro geny kódující Wnt glykoproteiny.

Při interakci se Wnt ligand váže na heterodimerický komplex receptoru Frizzled (Fz) a koreceptoru low-density lipoproteinu 5 a 6 (LRP5/6). (70) Fz jsou receptory spřažené s G proteinem, které sedmkrát prostupují plazmatickou membránou. Savčí genom obsahuje 10 homologů genů kódujících proteiny Fz. (70) Receptory obsahují na N-konci doménu bohatou na cystein (CRD), jejíž prostřednictvím dochází k navázání ligandu Wnt na receptor. (72) (73) Na CRD se poté nachází několik vazebných míst obsahujících hydrofobní smyčku, se kterou interaguje lipid navázaný na Wnt ligandu. (73) C-konec receptoru, který se nachází uvnitř buňky, pak odpovídá za přenos signálu v cytoplazmě. Pro úspěšný přenos signálu je nutné, aby Fz vytvořil komplex s transmembránovým koreceptorem, proteinem LRP5/6.

LRP5/6 má silně konzervovanou strukturu. Obsahuje dvě domény – velkou extracelulární obsahující vazebná místa pro ligandy a malou intracelulární. Intracelulární doména obsahuje cca 200 aminokyselin a vyskytuje se v ní 5 od sebe oddělených oblastí s opakujícím se strukturním motivem PPP(S/T)Px(S/T) (P – prolin, S – serin, T – threonin). (74) Tyto motivy jsou fosforylovány GSK-3 β nebo MAPK. (75) Bylo prokázáno, že fosforylace těchto oblastí podmiňuje transdukcí signálu Wnt. (70) Fosforylace a agregace LRP5/6 pomocí kináz je podporována vazbou proteinů Dishevelled (Dvl). Ty jsou pro správnou funkci kanonické i nekanonické dráhy nezbytné. (76)

2.3.2.2 Průběh signální dráhy

Kanonická neboli Wnt/ β -kateninová signální dráha, je spojená s kumulací či degradací cytosolického proteinu β -kateninu. V případě nepřítomnosti ligandu je β -katenin navázaný na heterodimerický destrukční komplex a následně degradován, pokud však dojde k nasednutí Wnt proteinu na Fz, dochází ke kumulaci β -kateninu, signál je transdukován a je zahájena transkripce (obr. 8).



Obr. 8: V případě, že je nepřítomný Wnt ligand, dochází k formaci multiproteinového komplexu sestávajícího z Axinu, *adenomatous polyposis coli* (APC), kasein kinázy 1 α (CK1 α), GSK-3 β a β -kateninu. Ten je selektivně fosforylován pomocí kináz a následně rozpoznán E3-ubikvitinovou ligázou β -TrCP, která ho označí pro degradaci v proteozomu. β -katenin není translokován do jádra a nedochází k transkripci Wnt cílových genů, které jsou potlačovány inhibičním komplexem TCF-TLE (T-cell factor/lymphoid enhancer factor)/Groucho a histon deacetylázou (HDAC).

V přítomnosti Wnt ligandu dochází k nasednutí molekuly na Fz, který tvoří heterotrimerní komplex Fz/LRP/Wnt. Dvl způsobuje fosforylaci LRP5/6 a následně nasednutí Axinu, což vede k inaktivaci destruktivního komplexu. Koncentrace β -kateninu v cytoplazmě narůstá a dochází k jeho translokaci do jádra, kde zastává funkci jako koaktivátor transkripčních faktorů účastnících se transkripce cílových Wnt genů. Převzato a upraveno dle (82).

2.3.2.2.1 Dráha v nepřítomnosti ligandu

V případě, že v extracelulárním prostředí není přítomný Wnt ligand, dochází k formaci multiproteinového destruktivního komplexu, skládajícího se z proteinu Axinu, tumor supresorového proteinu APC, GSK-3 β , CK1 α , proteinové fosfatázy 2A (PP2A) a E3-ubikvitinové ligázy β -TrCP. Axin poté selektivně koordinuje fosforylaci jednotlivých aminokyselin na β -kateninu pomocí CK1 α a GSK-3 β . Takto hyperfosforylovaný β -katenin je poté rozeznáván β -TrCP ligázou, která ho ubikvitinuje. Následně dochází k jeho degradaci v proteozomu. Hladina β -kateninu v cytoplazmě je tedy snížena, nedochází k jeho translokaci do jádra a transkripční aktivita je pozastavena.

2.3.2.3 Dráha v přítomnosti ligandu

Pokud se v extracelulárním prostředí vyskytuje Wnt protein, nasedá na receptor Fz a dochází k jeho spojení s koreceptorem LRP5/6. Vzniká tak trimerický komplex Wnt/LRP/Fz. Proteiny Dvl jsou translokovány ke komplexu na vnitřní straně membrány a následně jsou fosforylovány na intracelulární doméně Fz. Shluky Dvl poté interagují s Axinem. Společně s Axinem k membráně migrují kinázy CK1 α a GSK-3, což vede k inhibici destruktivního komplexu a k následné fosforylaci LRP5/6.

Poté, co se rozpadá destrukční komplex, β -katenin nemůže být fosforylován a následně degradován. Dochází tedy ke kumulaci jeho hypofosforylované formy v cytoplasmě a po dosažení hraniční koncentrace je β -katenin translokován do jádra, kde nahrazuje inhibiční komplex Groucho/TLE-1 s HDAC. Tímto dochází k indukci transkripce Wnt kontrolovaných genů.

2.3.2.4 Wnt dráha a AdoRs

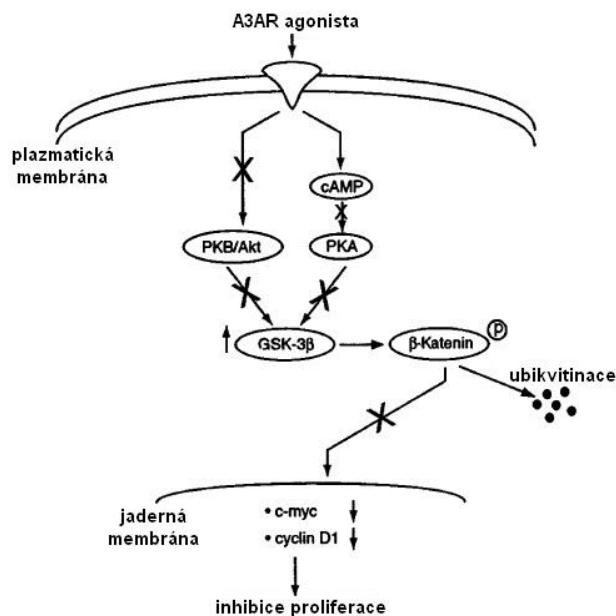
Jedním z případů, kdy docházelo ke snížení intramolekulární koncentrace cAMP a dalších komponent účastnících se Wnt signální dráhy, bylo ovlivnění nádorové linie odvozené od hepatocelulárního karcinomu selektivním agonistou A_3AR , IB-MECA. Zde docházelo kromě poklesu koncentrace PKA i ke snížení exprese proteinů Akt, PI3K ale i transkripčních faktorů NF- κ B. (40) Tento efekt byl pozorován i u dalších nádorových linií odvozených od karcinomu kolorekta, prostaty a melanomu. (77) (36) (34)

V případě, kdy nedochází ke stimulaci A_3AR , vzrůstá množství intracelulární cAMP. Na 4 molekuly cAMP se následně váže efektorová molekula PKA. Dochází ke změně její konformace a k uvolnění dvou podjednotek PKAc s enzymatickou aktivitou, které fosforylují Ser/Thr rezidua na GSK-3 β , která je jednou z klíčových komponent Wnt dráhy. (78) Tímto způsobem je GSK-3 β inaktivována. Při migraci multiproteinového destrukčního komplexu s β -kateninem k membráně pak GSK-3 β ztrácí schopnost fosforylovat β -katenin, který se kumuluje v cytoplasmě a následně dochází k jeho importu do jádra, kde interaguje s transkripčními faktory LEF/TCF (T-cell factor/lymphoid enhancer factor) a způsobuje transkripci cílových genů.

S ohledem na tuto teorii byl vysloven názor, že při aktivaci A_3AR jeho agonistou by měl být pozorován opačný efekt. Při stimulaci receptoru by tak docházelo k inhibici AC, snížení koncentrace cAMP a hypofosforylaci PKA, což by zároveň způsobilo snížení koncentrace fosforylované formy GSK-3 β . (77) Hypofosforylovaná forma GSK-3 β navázaná v destrukčním komplexu by následně způsobila inhibici β -kateninu a jeho následnou degradaci v proteazomu. Nedocházelo by k translokaci β -kateninu do jádra a neprobíhala by transkripce genů, což by vedlo k poklesu koncentrace cílových proteinů ovlivňujících mimo jiné progres buněčného cyklu. (40)

Tato domněnka bylo potvrzena u buněčné linie B16-F10 odvozené od melanomu, kdy při stimulaci selektivním agonistou A_3AR , IB-MECA, docházelo k poklesu celkové koncentrace cAMP, což zamezilo aktivaci PKA (obr. 9). Zároveň byl pozorován i dramatický úbytek fosforylované formy Akt, zatímco u jeho nefosforylované formy nedocházelo k výraznějším změnám v expresi. U nefosforylované formy GSK-3 β bylo po ovlivnění IB-MECA detekováno zvýšení její koncentrace. K opačnému trendu docházelo u fosforylované formy GSK-3 β . Zároveň byl sledován drastický pokles substrátu pro GSK-3 β , β -kateninu. Tento efekt byl pravděpodobně způsoben rychlou ubikvitinací prostřednictvím nefosforylované GSK-3 β , jejíž hladina je v buňkách ovlivněných IB-MECA zvýšená. (77) Z důvodu odbourání β -kateninu není možný jeho import do jádra, kde nedochází k interakci

s LEF/TCF transkripčními faktory a tvorba cílových proteinů Wnt dráhy je omezená. Z tohoto důvodu byl pozorován pokles exprese c-myc a cyklinu D1. (77)



Obr. 9: Při aktivaci A₃AR nedochází k tvorbě cAMP a fosforylaci PKA a Akt, což má za následek hypofosforylaci GSK-3β, která způsobuje aktivaci destrukčního komplexu a následnou proteolýzu β-kateninu. Není tedy zahájena transkripce cílových genů a je zamezeno tvorbě cyklinu D1, který odpovídá za progresi buněčného cyklu a k tvorbě regulačního proteinu c-myc. Inhibice tvorby těchto proteinů poté způsobuje zastavení buněčného cyklu a následnou apoptózu. Převzato a upraveno dle (77).

2.3.3 MAPK/Erk dráha

MAPK/Erk dráha je konzervovaná signální kaskáda přítomná ve všech eukaryotických buňkách. (79) MAPK je jednou z nejlépe charakterizovaných signálních drah podílejících se na regulaci buněčných funkcí, mezi které je řazena regulace proliferace, diferenciace a navození buněčné smrti. (79) (80) Signál přiváděný do buňky z extracelulárního prostředí je zpracován a přenášen do jádra pomocí proteinkináz a proteinů z rodiny Ras, které tvoří základ celé kaskády. (80) Buněčná odpověď je následně zprostředkována aktivací enzymu extracellular regulated kinase (Erk), který působí na řadu substrátů, jako jsou transkripční faktory a další proteinkinázy. (79)

Signalizace MAPK/Erk je přísně regulovaným procesem vedoucím ke kontrolované genové expresi v jádře buňky. V případě, že je mutována některá z komponent dráhy, dochází k deregulaci buněčného cyklu, nadměrné proliferaci a formaci nádoru. (80)

2.3.3.1 Komponenty MAPK/Erk dráhy

Jedněmi z hlavních efektorů MAPK/Erk dráhy jsou GTPázové proteiny z rodiny Ras (z angl. *rat sarcoma*). Právě změnou konformace těchto proteinů dochází k aktivaci celé kaskády. Ras proteiny jsou skupina vysoce konzervovaných polypeptidů, přítomných ve všech eukaryotických organismech. (81) Jejich molekulová hmotnost je přibližně 21 kDa a jsou lokalizovány na vnitřní straně plazmatické

membrány. Zde jsou schopné vázat guaninové nukleosidy, čímž zprostředkovávají transdukcii signálu z extracelulárního prostředí do vnitřního prostředí buňky. (81) V lidském organismu byly identifikovány tři isoformy genů kódujících Ras proteiny, a to K-Ras, H-Ras a N-Ras. (82) Jejich úloha při regulaci proliferace, diferenciaci a apoptózy z nich dělá atraktivní cíl pro vývoj selektivních inhibitorů.

Ras proteiny fungují jako molekulární spínače, jež jsou, v případě, kdy je na ně navázán GDP, neaktivní. V případě, kdy dochází k extracelulární stimulaci, je GDP nahrazen GTP a Ras je tím aktivován. (82) Jedním z nejdůležitějších efektorů Ras proteinů je signalizační kaskáda Raf-MEK-Erk. (82) Počátečním substrátem je zde enzym Rapidly Accelerated Fibrosarcoma (Raf). K němu se Ras protein váže s vysokou afinitou.

Raf je serin/threoninová kináza, vyskytující se u savců ve třech isoformách: A-Raf, B-Raf a C-Raf. (83) V rámci jejich N-domény se vyskytují vazebná místa pro Ras, jejichž navázáním dochází ke konformační změně na Raf a tím k její aktivaci. Konformační změna rovněž způsobuje odkrytí aktivního místa pro efektor Raf proteinu, enzymy MAP kinase or Erk kinase (MEK). (84) Ty jsou pomocí Raf enzymu fosforylovány.

Kinázy MEK jsou hlavními aktivátory Erk1/2. (85) V lidském organismu byly identifikovány dvě isoformy MEK: MEK1 a MEK2; obě formy enzymu sdílí 80 % aminokyselinovou podobnost. (86) MEK kinázy obsahují několik domén: N-terminální, C-terminální a nejdelší proteinázovou, která má katalytickou funkci. (87) V oblasti N-konce enzymu se vyskytuje vazebná doména pro Erk, která odpovídá za translokaci MEK kináz z jádra buňky do cytoplazmy. (87) V oblasti C-konce se vyskytuje oblast bohatá na prolin a byla zde rovněž identifikována konzervovaná dokovací sekvence (DVD), umožňující mimo jiné vazbu Raf na enzym (obr. 10). (88)



Obr. 10: MEK kináza sestává z domény pro vazbu Erk, lokalizační sekvence nuclear export signal (NES), negativní regulační oblasti, proteinázové katalytické oblasti, na níž dochází k fosforylaci, sekvence bohaté na prolin a sekvence DVD.

Erk1/2 jsou hlavními výkonnými činiteli celé kaskády Ras-Raf-MEK-Erk. Jedná se o serin/threoninové kinázy, které jsou aktivovány prostřednictvím fosforylace pomocí MEK kinázy. (89) Ačkoliv aktivátory kaskády Ras-Raf-MEK-Erk předcházející molekule Erk (Raf, MEK) mají velmi omezenou substrátovou specifitu, Erk1/2 katalyzuje fosforylaci celé plejády substrátů, včetně široké škály transkripčních faktorů. (89) Lidské Erk 1 a Erk 2 zastávají mnoho společných funkcí; jejich struktura je z 84 % identická. (90)

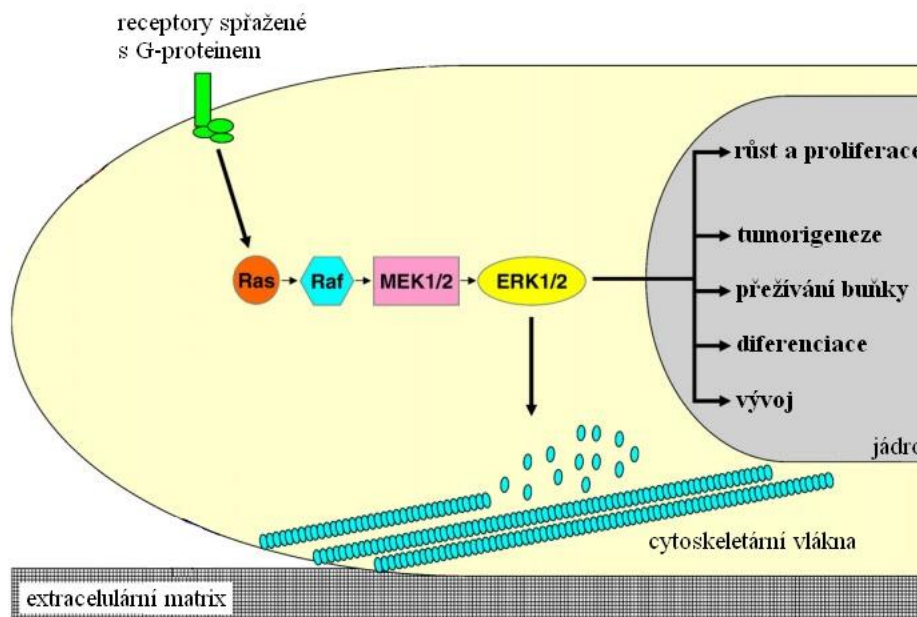
Nejdůležitějším strukturním prvkem Erk1/2 je smyčka obsahující sekvenci Thr-Glu-Tyr, ve které jsou aminokyseliny Thr173 a Tyr185, respektive Thr202 a Tyr204, fosforylovány. (91) (89) Mimo tato rezidua Erk1/2 dále obsahuje doménu bohatou na glycin, na kterou se váže ATP. (89) Na vazbě Erk

s MEK kinázou se poté podílí několik vazebných míst, mezi která patří především sekvence na C-konci, na které se váží jak substráty, tak i aktivátory. Tato sekvence je konzervovaná u všech MAPK. (92) Další vazebné místo je lokalizováno na N-konci, kde se na vazbě podílí aminokyselinová rezidua 19-25. (93) Erk1/2 jsou aktivátory mnoha substrátů, z nichž se mnoho účastní fyziologických procesů, které ovlivňují buněčnou proliferaci, diferenciaci i smrt. Mezi tyto substráty patří mimo jiné transkripční faktory CREB, NF- κ B a c-myc. (91)

2.3.3.2 Průběh signální dráhy

Aktivace kaskády Ras-Raf-MEK-Erk je zahájena nasednutím extracelulárního ligandu na receptor. Mezi nejdůležitější receptory zprostředkovávající přenos signálu z extracelulárního prostředí do cytoplazmy patří GPCRs, receptory s vnitřní tyrosin-kinázovou aktivitou (RTK) a integriny. (94) (95)

V případě aktivace kaskády prostřednictvím GPCRs, se aktivovaný Ras-GTP váže do aktivního místa na Raf proteinu. Ten katalyzuje fosforylaci kináz MEK1/2, které poté fosforylují Erk1/2 za současné tvorby jejich dimeru. (94) Takto dimerizovaný protein je buď translokován do jádra, kde fosforyluje transkripční faktory (např. c-myc a c-Fos), nebo zůstává v cytosolu a fosforyluje cytoskeletární proteiny (neurofilamenta) a membránové proteiny (calnexin, Syk) (obr. 11). (94) (96)

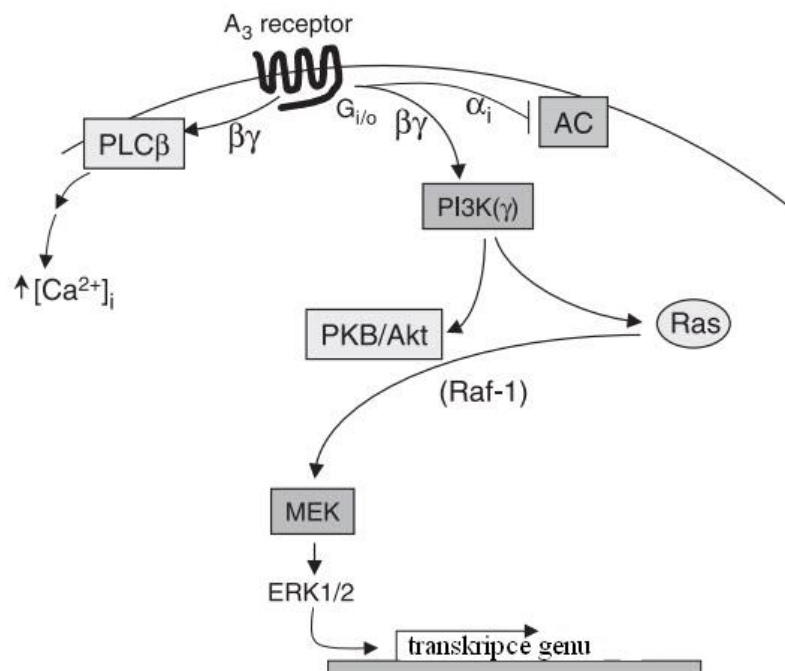


Obr. 11: Dráha MAPK/Erk může být aktivována několika způsoby, které zapříčiňují aktivaci Ras proteinu. Takto aktivovaný protein fosforyluje Raf protein, prostřednictvím kterého jsou poté fosforylovány kinázy MEK1/2 a následně i Erk1/2. Erk1/2 poté aktivuje transkripční faktory odpovědné za buněčnou proliferaci, diferenciaci a buněčnou smrt. Převzato a upraveno dle (94).

2.3.3.3 MAPK/Erk dráha a AdoRs

Buněčná signalizace prostřednictvím aktivace adenosinových receptorů může jak zvýšit, tak inhibovat schopnost proliferace. (95) Výsledek stimulace receptoru je však vždy podmíněn podtypem jednotlivého AdoR (nebo kombinací AdoRs). S ohledem na široké spektrum signalizačních kaskád aktivovaných AdoRs je pravděpodobné, že budou, stejně jako jiné receptory spřažené s G-proteinem, aktivovat některou z MAPK kaskád. (97) Na základě této hypotézy bylo potvrzeno, že každý AdoRs aktivuje alespoň jednu podrodinu MAPKs pozitivně či negativně ovlivňujících proliferaci. (95) Konkrétním příkladem může být podtyp A_3AR , jehož stimulace vede k aktivaci MAPK podrodiny Erk1/2.

U buněčných linií stimulovaných různými A_3AR agonisty byla sledována zvýšená fosforylace Erk1/2 kináz, klíčových komponent MAPK/Erk dráhy. (98) (99) (100) U mnoha GPCRs je tato fosforylace zapříčiněna aktivací proteinu PI3K a stejný efekt byl pozorován i u A_3AR (obr. 12). (101) Při inhibici aktivity PI3K jejím selektivním antagonistou byla fosforylace Erk1/2 zprostředkovaná A_3AR agonistou zablokována, z čehož lze usuzovat, že A_3AR -dependentní fosforylace Erk1/2 je závislá na přímé aktivaci PI3K. Tato domněnka byla potvrzena analýzou míry Akt, jejíž efektoem je právě PI3K. Pro tento experiment byl použit neselektivní agonista pro všechny AdoRs, NECA. (102) Stimulace A_3AR NECA zapříčinila nárůst aktivity PI3K a tím i fosforylace Akt. (101)



Obr. 12: Stimulace A_3AR jeho neselektivním agonistou NECA způsobilo aktivaci PI3K, jež je efektorovou molekulou fosforylující protein Ras, účastníci se kaskády Ras-Raf-MEK-Erk. Zároveň byla pozorována zvýšená fosforylace Akt, na které se podílela aktivovaná PI3K. β a γ podjednotky G-proteinu rovněž způsobují aktivaci PLC, vedoucí k mobilizaci intracelulárních Ca^{2+} iontů. Převzato a upraveno dle (101).

Zajímavé je, že při použití selektivního agonisty A_3AR CI-IB-MECA byl tento efekt opačný. U buněčné linie A375 odvozené od melanomu kůže byla fosforylace Erk1/2 po ovlivnění CI-IB-MECA

inhibována. (103) Antagonisté A₃AR oproti tomu přispívali k aktivaci MEK kináz, a tedy k aktivaci celé MAPK/Erk kaskády. (103) Stejně výsledky byly prokázány i u dalších linií kožního melanomu, což vypovídá o tom, že A₃AR zastává dvojí roli, jako stimulant, ale i inhibitor MAPK/Erk signální dráhy. (100)

Bylo zjištěno, že signální dráhy MAPK/Erk a PI3K/Akt jsou vzájemně provázané a aktivace či inhibice jedné dráhy může ovlivňovat aktivitu druhé. Konkrétně protein PI3K je synergista dráhy MAPK/Erk, který zesiluje její aktivitu. Ze studie Vicanco et al. (2002) dokonce vyplývá, že exprese PI3K je pro MAPK/Erk dráhu nezbytná. (104) Exprese PI3K i Erk1/2 hraje roli při buněčné proliferaci a bylo zjištěno, že u mnoha nádorových linií je hladina obou proteinů zvýšená. (104) Na základě této skutečnosti byla vyslovena hypotéza, zda regulace buněčného cyklu zprostředkovaná A₃AR probíhá přímo prostřednictvím Erk1/2 anebo Akt, molekuly, jejíž aktivita je usměrňována právě PI3K. (100) Aktivace A₃AR pomocí Cl-IB-MECA zapříčinila fosforylaci proteinu Akt, který dále fosforyloval Raf na jeho inhibičním místě, čímž docházelo k jeho deaktivaci. Následkem toho vznikl deficit fosforylované formy Erk1/2. (100) Tato hypotéza byla podpořena experimentem, kdy byl A₃AR stimulován a zároveň byla inhibována aktivita PI3K, což vedlo ke zvýšení fosforylace Erk1/2. Tento fakt poukazuje na to, že jak dráha MAPK/Erk, tak dráha PI3K jsou navzájem propojeny a mohou být inhibovány selektivní aktivací podtypu A₃AR. (100)

Tato aktivace může mít dále za důsledek snížení exprese některých transkripčních faktorů regulovaných A₃AR. Klasickým případem je fenomén pozorovaný u mononukleárních krevních buněk pacientů s hepatocelulárním karcinomem (HCC). (40) V běžných nádorových buňkách HCC dochází k nadměrné produkci NF-κB. Ta je často spojována s širokou škálou onemocnění, včetně AIDS, diabetu, Alzheimerovy choroby a nádorových onemocnění a její exprese může být ovlivňována právě fosforylací Akt, molekulou regulovanou prostřednictvím PI3K. (40) (105) V experimentu provedeném na mononukleárních krevních buňkách HCC pacientů bylo pozorováno, že po ovlivnění Cl-IB-MECA dochází ke snížení exprese NF-κB. Zároveň byla snížena i produkce tumor nekrotického faktoru α (TNF-α), PI3K i fosforylované formy Akt, které jsou molekulami nadřazenými NF-κB. (40) Tento efekt následně ovlivnil i expresi samotného A₃AR, kdy rovněž docházelo k jeho snížení.

Další z transkripčních faktorů, které jsou ovlivňovány MAPK/Erk a PI3K/Akt dráhami je proto-onkogen c-myc. Tento protein se jako efektor účastní mnoha signálních drah regulujících buněčný růst, proliferaci, apoptózu, metabolismus a zároveň se podílí na biosyntéze řady molekul. (106) V netumorigenních diferencovaných tkáních je jeho exprese velmi nízká, avšak u nádorových buněk byl pozorován signifikantní nárůst exprese c-myc následkem zvýšené aktivity signálních drah s ním spojených. Samotný c-myc reguluje transkripci mnoha molekul podílejících se na buněčném dělení a apoptóze, jako jsou například cyklin D, cyklin E, proapoptotický protein Bax a antiapoptotický protein Bcl-2. (106) Během experimentů na pokusných zvířatech, kterým byla podávána Cl-IB-MECA (100 μg/kg), bylo pozorováno, že u jaterních buněk dochází k výraznému snížení exprese c-myc. (40)

Podobné výsledky byly detekovány u linie A549 odvozené od plicního karcinomu při ovlivnění analogem CI-IB-MECA se substitucí na ribózovém kruhu (Thio-CI-IB-MECA), kdy exprese c-myc klesala v závislosti na použité koncentraci Thio-CI-IB-MECA.

PI3K/Akt dráhou je rovněž ovlivňována i exprese tumor-supresorového proteinu p53. (107) Jedná se o regulační protein, který je transkripčním faktorem pro mnoho genů, jejichž produkty způsobují apoptózu, opravu poškozené DNA, kontrolují buněčný cyklus a kontrolují proliferaci. Za fyziologických podmínek je protein p53 velmi málo aktivní, pokud jsou však buňky vystaveny stresovým situacím (poškození DNA, hypoxie, aktivace onkogenů) protein p53 je aktivován a zahajuje transkripci. (108) Jednou z molekul, jejíž produkce je regulována právě p53 je inhibitor cyklin-dependentních kináz (CDK), protein p21. (109) p21 se při nefyziologických podmínkách váže na komplexy cyklin-CDK a zapříčiňuje blok v G1/S kontrolní fázi, čímž zastavuje buněčný cyklus. Dalším genem, jehož transkripce je ovlivněna p53 je mouse double minute 2 homolog (MDM2). Tento onkoprotein zastává funkci jakožto negativní regulátor p53 a způsobuje ubikvitinaci p53 a jeho následnou degradaci v proteazomu. MDM2 a p53 jsou tedy navzájem regulovány svojí aktivitou. (108)

2.3.4 Vícečetná léková rezistence a A₃AR

Termín vícečetná léková rezistence (MDR) je používán ve spojitosti se schopností buněk projevat rezistenci na velký počet strukturně a funkčně nepříbuzných chemoterapeutických látek. Během minulých let byla popsána celá řada mechanismů podílejících se na vzniku MDR v savčích nádorových buňkách a bylo určeno několik rozdělení těchto mechanismů. Nejčastější klasifikace MDR je na mechanismy klasické a neklasické. Zatímco klasická MDR je spojována s nadměrnou expresí efluxních proteinů, které čerpají xenobiotika z intracelulárního prostoru proti koncentračnímu gradientu za spotřeby ATP, neklasická MDR je zprostředkována mechanismy nezávislými na membránových proteinech, které snižují cytotoxicitu nezávisle na intracelulární koncentraci léčiva. (110) Vznik neklasické MDR je pak nejčastěji spojován se změnami farmakokinetiky a cytokinetiky a strukturními a funkčními změnami v buňce. (111)

2.3.4.1 Klasická MDR

V případě klasické MDR dochází k nadměrné expresi membránových transportních proteinů. Tyto transportéry jsou zástupci superrodiny ATP-binding cassette proteinů (ABC proteinů). Superrodina ABC proteinů sestává ze sedmi podrodin (ABC-A – ABC-G). (112) Nejrozšířenější podskupinou proteinů odpovídajících za MDR je podrodina ABCB, do které je mimo jiné řazen i glykoprotein P (ABCB1, PgP). Jeho aktivita je řízena zejména Wnt signální dráhou, která hraje centrální roli při regulaci exprese PgP. (113) Při nasednutí ligandu Wnt na komplex Frizzled receptoru a LRP5/6 proteinů dochází k hypofosforylaci GSK-3 β , což umožňuje uvolnění β -kateninu z destruktčního komplexu a jeho translokaci do jádra. V jádře se poté β -katenin váže na TCF/LEF a indukuje transkripci cílových genů, včetně genu *mdr1*, který kóduje PgP protein. (114) Bylo zjištěno, že narušení Wnt dráhy způsobuje

snížení exprese PgP. Tento fenomén byl pozorován například u buněk hematoencefalitické bariéry. (114)

Další podskupina z ABC superrodiny podílející se na vzniku klasické MDR je rodina multidrug resistance-associated proteinů (ABCC, MRP). MRP rodina sestává ze 13 zástupců, přičemž proteiny MRP1 – MRP9 jsou hlavními transportéry způsobujícími eflux xenobiotik z buňky. (115) Typickým zástupcem podrodiny ABCC je protein MRP1, který je, společně s PgP, nejrozšířenějším proteinem spojovaným se vznikem MDR. (112) O dráze, která přímo odpovídá za expresi MRP1 není dosud známo příliš mnoho informací. Byly však provedeny experimenty, kdy docházelo k inhibici Raf proteinu a MEK proteinů, komponent MAPK dráhy, což mělo za následek snížení exprese jak MRP1, tak MRP3. (116) To vede k domněnce, že nadměrná aktivace MAPK dráhy, častá u nádorových onemocnění, odpovídá za nadměrnou expresi MRP1 proteinu.

2.3.4.2 MDR proteiny a A₃AR

MAPK dráha je jednou z mnoha drah spojovaných s aktivací A₃AR a je rovněž jednou z možných drah ovlivňujících expresi MRP1. Některé studie naznačují, že by exprese MRP1 transportéru mohla být kontrolována adenosinovou signální kaskádou. (117)

Jednou z hlavních studií dokazujících závislost exprese MRP na A₃AR byl experiment provedený na glioblastomových buňkách U87MG, které vykazovaly vysokou rezistenci na široké spektrum cytostatických léčiv. (117) Analýzou buněčných linií T98G a G44, které jsou také zástupci buněčných linií odvozených od glioblastomu, bylo zjištěno, že rezistence je zapříčiněna nadměrnou produkcí MRP1, který zde figuroval jako dominantní protein způsobující MDR. Zároveň bylo prokázáno, že u linie U87MG je vysoká exprese A₃AR a dochází zde k velké kumulaci extracelulárního adenosinu. Byl proto hodnocen vztah mezi A₃AR a MRP1, kdy bylo zjištěno, že díky inhibici A₃AR antagonistou MRS1220 dochází ke snížení počtu buněk produkujících MRP1. Stejný výsledek byl sledován i při detekci MRP1 metodou Western Blot, kdy při ovlivnění buněk A₃AR antagonistou MRS1220 docházelo až ke 45% snížení exprese MRP1. Tento trend byl poté potvrzen umlčením genu pro A₃AR, kdy bylo zjištěno, že došlo k omezení produkce MRP1, což vyústilo ve snížení aktivního efluxu xenobiotika z buňky. Pro bližší určení signální dráhy odpovědné za zmíněný efekt, byly detekovány proteiny účastníci se signálních drah MAPK a s ní související PI3K/Akt. V případě ovlivnění buněk selektivními antagonisty pro MAPK a PI3K docházelo ke snížení exprese fosforylované formy Akt i Erk1/2 a následně i MRP1. Inhibice A₃AR pomocí MRS1220 vykazovala totožný efekt. Z těchto výsledků vyplývá, že A₃AR signalizace ovlivňuje signální dráhy MAPK i PI3K/Akt, které poté způsobují změny v expresi proteinu MRP1. (117)

Expresí PgP je, na rozdíl od MRP1, řízena aktivací Wnt dráhy. (112) U nádorových buněk kolorekta (SW480) byla prokázána vyšší aktivace Wnt dráhy než u nenádorových linií, z čehož autoři usuzovali, že je zde vyšší pravděpodobnost exprese PgP než u nenádorových buněk. (118) Pro ověření této teorie

byl proveden experiment, kdy byl pomocí siRNA zablokován gen pro expresi β -catenin. Výsledkem byl pokles exprese β -catenin o 90 % a rovněž signifikantní snížení produkce PgP. Zároveň došlo k navýšení chemosenzitivity k vybraným cytostatikům. Z těchto výsledků vyplývá fakt, že Wnt signalizace alespoň částečně reguluje expresi PgP v nádorových buňkách linií odvozených od karcinomu kolorekta. (118) Vzhledem k tomu, že je Wnt signální dráha provázaná s A_3AR , nabízí se zde otázka, zda by exprese PgP mohla být ovlivňována právě aktivací A_3AR .

Mimo tyto efekty bylo také pozorováno, že PgP způsobuje eflux látek s agonistickou aktivitou vůči A_3AR . Při srovnání nádorových linií K562 a K562/Dox s MDR fenotypem bylo detekováno, že linie K562/Dox vykazuje značně vyšší rezistenci vůči Cl-IB-MECA než její mateřská forma. Tento efekt byl s vysokou pravděpodobností zapříčiněn právě nadměrnou expresí PgP. (119)

2.4 Agonisté A_3 receptoru

A_3AR hraje jednu z hlavních rolí při regulaci některých fyziologických i patofyziologických procesů. Jeho aktivace vede ke spuštění ochranných mechanismů při metabolicky nevýhodných podmínkách, jako je vznik zánětů nebo ischemie, které mohou vést k některým neurodegenerativním a autoimunitním onemocněním. (13) Vzhledem k tomu, že za fyziologických podmínek je přítomnost A_3AR nízká, jeho zvýšená exprese zapříčiněná nepříznivými podmínkami z něj dělá atraktivní molekulu při cílené léčbě těchto indikací. (120) (121) Z tohoto důvodu byla navržena řada syntetických agonistů selektivních pro A_3AR , kteří vykazují protizánětlivé a protinádorové účinky. (121) Některé z těchto molekul byly zařazeny do klinického testování, kde poté zprostředkovaly zajímavé účinky, zejména při léčbě hepatocelulárních karcinomů a autoimunitních onemocnění, jako je revmatoidní artritida, lupénka, psoriáza a dry-eye syndrom. (121) (122)

Při počátečním screeningu adenosinových derivátů bylo identifikováno vazebné místo na A_3AR , se kterým ligandy interagují. (121) Na základě této studie byla syntetizována celá řada derivátů, které působí konkrétně na A_3AR a které byly odvozené od jeho přirozeného agonisty adenosinu. Během syntézy bylo zjištěno, že zatímco na adeninovém skeletu může docházet k substituci, která vede ke změně jeho konstituce, molekula cukerné složky zůstává intaktní. Baraldi et al. (2000) ve svém výzkumu vyvozují, že přítomnost pětičlenného cukerného kruhu je nezbytná pro selektivní interakci s A_3AR . (123) Navzdory této teorii však byly syntetizovány thio-analoga adenosinu (např. thio-Cl-IB-MECA), kde byl atom kyslíku v ribóze nahrazen atomem síry a které vykazují vyšší afinitu vůči A_3AR než deriváty obsahující ribózu. (124)

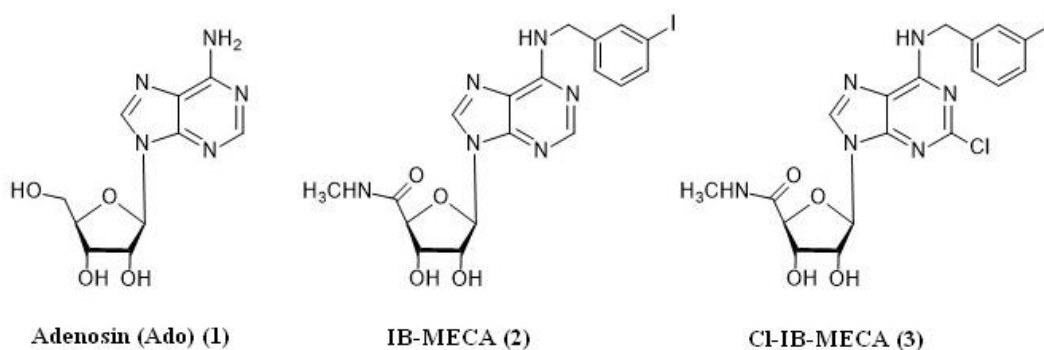
2.4.1 Adenosinové deriváty

Typičtí agonisté A_3AR jsou deriváty přirozeného ligandu, adenosinu (**1**). (121) Hlavní kostru těchto molekul tvoří purinová báze adenin, která je N-glykosidovou vazbou připojena k molekule ribózy.

Molekula adenosinu je neselektivním endogenním agonistou všech AdoRs, modifikace molekuly v poloze N⁶ na adeninu a v poloze 5' na molekule ribózy však ovlivňuje selektivitu a vede ke zvýšení afinity pro podtyp A₃AR. (121) Příkladem zvýšení afinity k A₃AR pomocí substituce na purinovém skeletu může být molekula 5'-N-ethylkarboxamidoadenosinu (NECA), která je účinným agonistou AdoRs, není však selektivní pro A₃AR. (123) Pro zvýšení účinku molekuly byly provedeny modifikace v poloze N⁶, kdy byl zaveden stericky náročný substituent (např. 3-jodobenzyl), což zapříčinilo zlepšení selektivity pro A₃AR. Výrazné zvýšení afinity k A₃AR bylo pozorováno i u substituce v pozici 5' na molekule ribózy, kam byla zavedena methyluronamidová skupina. (125) Spojením těchto modifikací byl položen základ pro syntézy prvních, vysoce selektivních ligandů pro A₃AR. (125)

Jedním z prvních synteticky připravených radioligandů A₃AR, byla látka [¹²⁵I]-N⁶-(4-amino-3-jodobenzyl)-adenosin-5'-N-methyluronamid ([¹²⁵I]-AB-MECA). Tato látka vykazovala značnou afinitu k A₃AR, nicméně její selektivita nebyla příliš vysoká. (123) Na základě struktury této látky byly pak navrženy modifikace v poloze C2 na molekule purinu, kam byl zaveden stericky nenáročný substituent, např. atom halogenu, methylamino skupina a thiomethyl. (obr. 13) (123)

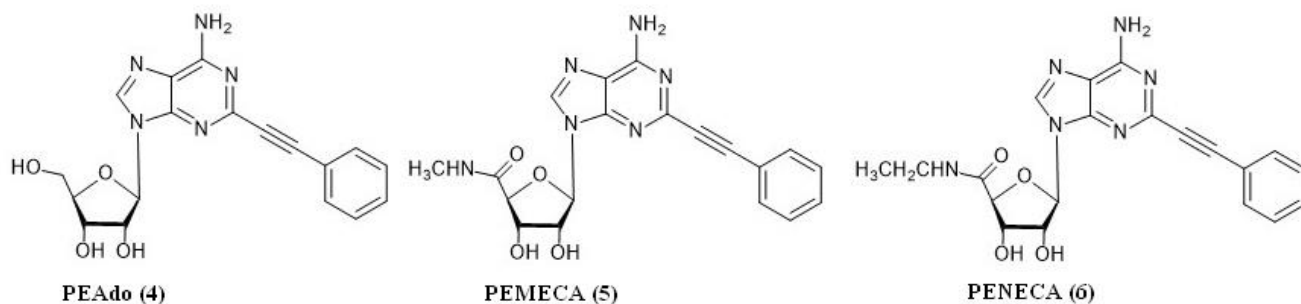
Jedněmi z nejúčinnějších látek s modifikacemi adeninu v C2 poloze, N⁶ poloze a v pozici 5' na molekule ribózy jsou látky N⁶-(3-jodobenzyl)-adenosin-5'-N-methyluronamid (**2**; IB-MECA, CF101) a 2-chloro-N⁶-(3-jodobenzyl)-adenosin-5'-N-methyluronamid (**3**; Cl-IB-MECA, CF102), která byla odvozena z IB-MECA substitucí na C2, kdy byl do molekuly zaveden atom chloru (obr. 13). Obě tyto látky vykazovaly vysokou afinitu a selektivitu k A₃AR. (123) Látka Cl-IB-MECA byla poté modifikována substitucí kyslíku v poloze 4' na molekule ribózy, čímž vznikl její thio-analog, 2-chloro-N⁶-(3-jodobenzyl)-4'-thioadenosin-5'-N-methyluronamid (thio-Cl-IB-MECA), u které byla pozorována 3× vyšší afinita k A₃AR oproti Cl-IB-MECA. (124)



Obr. 13: Struktury přirozeného endogenního agonisty Ado a jeho synteticky připravených derivátů, IB-MECA a Cl-IB-MECA (ChemDraw).

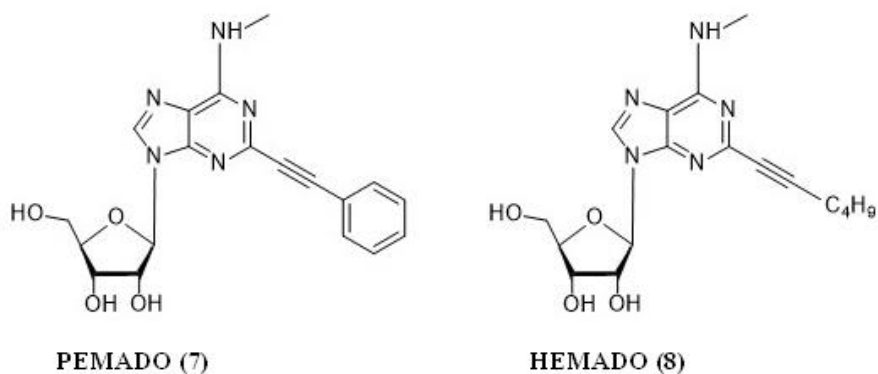
Zajímavé deriváty byly rovněž vytvořeny modifikací v poloze C2 na molekule adeninu, kdy docházelo k substituci arylalkynylovými skupinami. V kombinaci se záměnou funkční skupiny v poloze 5' na molekule ribózy a se substitucí v poloze C2 na adeninu, kdy byla zavedena stericky nenáročná

skupina, vzniklo mnoho sloučenin selektivně působících na A_3AR . (126) Mezi tyto deriváty patří především látky odvozené od látky 2-fenylethynyladenosinu (**4**; PEAdo), které vykazaly vysokou selektivitu a afinitu k A_3AR ; sloučeniny 5'-N-methylkarboxamidoadenosin (**5**; PEMECA) a 5'-N-ethylkarboxamidoadenosin (**6**; PENECA) a působily na A_3AR již v nanomolárních koncentracích (obr. 14). (126)



Obr. 14: Modifikované struktury Ado, kdy dochází k substituci arylalkynylovou skupinou v poloze 2 na adeninu. Změnou funkční skupiny na ribóze dochází ke zvýšení selektivity vůči A_3AR . (ChemDraw).

Od této třídy derivátů jsou odvozená jejich analoga, která jsou substituovaná v poloze C2 alkynylovým řetězcem. Sloučenina 2-fenylethynyl-N⁶-methyladenosin (**7**; PEMADO) je velmi podobná derivátu **4**, jediným rozdílem je methyl připojený k aminoskupině na adeninu. Tato látka vykazala nanomolární afinitu k A_3AR , která byla 3x vyšší než u Cl-IB-MECA. (13) Molekula 2-hexyn-1-yl-N⁶-methyladenosinu (**8**; HEMADO) rovněž působila na A_3AR v nanomolární koncentraci. Tato látka se liší od **7** substitucí na alkynylovém řetězci, kdy došlo k nahrazení fenylu butylovou skupinou (obr. 15). (13)



Obr. 15: Deriváty HEMADO a PEMADO substituované methylem na aminoskupině na adeninu a na alkynylovém řetězci v poloze C2 vykazující nanomolární afinitu k A_3AR . (ChemDraw).

2.4.2 Klinicky relevantní agonisté A_3AR

Aktivita vybraných agonistů A_3AR byla zkoumána *in vitro* i *in vivo*. (13) Bylo zjištěno, že tyto orálně biodostupné molekuly mají široký terapeutický potenciál a u některých derivátů byly pozorovány dobré výsledky při léčbě zánětlivých a autoimunitních onemocnění, jako je lupénka, revmatoidní artritida,

hepatitida typu B nebo hepatocelulární karcinom. Mezi zástupce agonistů A_3AR , kteří vykazovali zajímavé výsledky v klinickém testování patří především deriváty IB-MECA a CI-IB-MECA. (122)

Látka **3**, 2-chloro- N^6 -(3-jodobenzyl)-adenosin-5'- N -methyluronamid, neboli **CI-IB-MECA** byla syntetizována trojí modifikací Ado: v N^6 poloze, kdy byl na aminoskupinu adeninu zaveden 3-jodobenzylový substituent, v poloze C2, kdy byl zaveden atom chloru a na ribóze, kde došlo k substituci v poloze 5' methyluronamidovou skupinou. Tyto změny zapříčinily významné zvýšení selektivity a afinity k A_3AR . Bylo zjištěno, že CI-IB-MECA je 157-, 3829- a 7143× selektivnější pro A_3AR , než je pro A_1AR , $A_{2A}AR$ a $A_{2B}AR$. Efekty CI-IB-MECA byly zkoumány v mnoha experimentech, *in vitro* a *in vivo*. Díky slibným účinkům, které zde vykazovaly, byla poté CI-IB-MECA zařazena do klinických testů na celou řadu onemocnění. (122)

Regrese buněčného dělení spojená s aktivací A_3AR je velmi často spojovaná se zastavením buněčného cyklu. Antiproliferační účinky CI-IB-MECA byly při *in vitro* experimentech pozorovány u několika buněčných linií, včetně kultury odvozené od lidského melanomu. V případě linie A375 bylo zjištěno, že ovlivnění CI-IB-MECA zapříčinilo zastavení buněčného dělení a blok v G_0/G_1 fázi buněčného cyklu. (100) Tento efekt byl způsoben fosforylací Akt, který způsobil hypofosforylací kináz odpovídajících za přežití buňky Erk1/2, a tím zastavení proliferace. (100) Podobné efekty byly sledovány v případě glioblastomové linie, A172. Při stimulaci CI-IB-MECA docházelo ke snížení viability buněk a zároveň bylo zjištěno, že byla snížena fosforylace Akt a Erk1/2. Vzhledem k tomu, že nadměrná aktivita Akt i Erk1/2 hraje důležitou roli v proliferaci nádorových buněk, jejich inhibice zapříčinila zastavení buněčného cyklu a způsobila zastavení růstu nádoru. (127) Inhibice proliferace byla rovněž pozorována v případě buněčné linie CHO odvozené od vaječníků čínského křečička (*Cricetulus griseus*), která byla transfekována genem pro A_3AR . Při použití CI-IB-MECA docházelo k aktivaci fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K), která zapříčinila fosforylací Akt, která inhibovala fosforylací Erk1/2 a tím byl zastaven buněčný cyklus. (128) Další buněčnou kulturou, u které byl detekován blok v proliferaci, byla linie odvozená od hepatocelulárního karcinomu, HEP-3B. Při stimulaci CI-IB-MECA byl sledován antiproliferační efekt zprostředkovaný deregulací PI3K a NF- κ B, který ovlivňuje expresi tumor-nekrotického faktoru α (TNF- α). Nadměrná exprese TNF- α může způsobovat zvýšenou proliferaci a vznik zánětů. (129) Ovlivnění CI-IB-MECA způsobilo pokles exprese NF- κ B i TNF- α ; vykazovala tedy nejen antiproliferační, ale i protizánětlivé účinky. V neposlední řadě byly účinky CI-IB-MECA testovány i na buněčných liniích odvozených od nádoru štítné žlázy, kdy bylo zjištěno, že dochází k bloku buněčného cyklu v G_1 fázi. Tento efekt byl rovněž spojen se sníženou produkcí cyklinů D1 a E2 a defosforylací Erk1/2, což způsobilo zastavení proliferace. (130)

Na základě těchto experimentů byla CI-IB-MECA zařazena do 1. fáze klinického testování jako látka s potenciálními protinádorovými účinky. Při této studii bylo testováno 18 pacientů s pokročilou formou hepatocelulárního karcinomu, kterým bylo orálně podáváno léčivo ve třech různých koncentracích.

Na základě výsledků byla stanovena bezpečnost, farmakokinetika a farmakodynamika. Rovněž bylo zjištěno, že léčivo nezpůsobuje závažné vedlejší účinky a nepoškozuje játra. Pacienti k němu mají dobrou toleranci a byly dokonce pozorovány pozitivní efekty v podobě regrese metastazování nádoru. (128) Tyto výsledky naznačují, že CI-IB-MECA je potenciální kandidát při léčbě různých patologií jater.

Bylo zjištěno, že při stimulaci buněk vysokou koncentrací CI-IB-MECA dochází k apoptóze. V případě krysí buněčné linie N1S1 odvozené od hepatocelulárního karcinomu při ovlivnění CI-IB-MECA docházelo ke snížení aktivity NF- κ B a tím ke snížení exprese A₃AR a TNF- α . Zároveň docházelo ke zvýšení hladiny hypofosforylované formy GSK-3 β , klíčové komponenty Wnt signální dráhy, která byla tímto způsobem deregulována a zapříčinila tím zastavení buněčného cyklu. Kromě toho byla pozorována zvýšená produkce proteinů Bax a Bad a kaspázy-3, které v buňce navozují apoptózu. (40) Podobné výsledky byly zjištěny u buněčné linie HEP-3B, kde při stimulaci buněk CI-IB-MECA docházelo k poklesu fosforylované formy GSK-3 β a ke snížení exprese TNF- α . Byla rovněž popsána zvýšená exprese proapoptotických proteinů Bax, Bad, cytochromu C a kaspáz 8 a 3. (131) Další linií, u které docházelo k apoptóze po ovlivnění CI-IB-MECA, byla linie A172 odvozená od glioblastomu. Po stimulaci docházelo k poklesu exprese kináz Erk a Akt zajišťujících přežití buňky a k aktivaci kaspázy-3. S tímto efektem byla spojena degradace prokaspázy-3, která byla detekována po ovlivnění CI-IB-MECA. (127) Další linie, u kterých stimulace vyvolala apoptózu, byly buněčné kultury odvozené od nádorů prsu, MCF-7 a MDA-MB-231. V případě ovlivnění buněk CI-IB-MECA byl pozorován nárůst pro-apoptotického proteinu Bax a pokles anti-apoptotického proteinu Bcl-2 a nárůst aktivity kaspázy-6. Zároveň docházelo ke snížení exprese proteinů účastnících se Hh signální dráhy, Smo a Gli1, které způsobily inhibici její aktivity a zastavení proliferace. (33)

3 Materiály a metody

3.1 Materiály

3.1.1 Chemikálie

Název	Kat. číslo	Výrobce
10× TGS (tris-glycine-SDS)	1610772	BioRad
Amonium persulfát (APS)	A3678	Sigma Aldrich
Aktinomycin D		Merck
Bovinní sérum albumin (BSA)	A7906	Sigma Aldrich
Bromfenolová modř		
Cell Wash	349524	BD Biosciences
Cl-IB-MECA	1104	TOCRIS
cOmplete Ultra tablets, mini, protease inhibitor (inhibitory proteáz)	05892970001	Roche
Cyklosporin A	poskytla LEM ÚMTM	
Daunorubicin	poskytla LEM ÚMTM	TEVA
Deionizovaná H ₂ O		
Dekahydrát difosforečnanu tetrasodného (Na ₄ P ₂ O ₇ · 10 H ₂ O)	S6422	Sigma Aldrich
Dihydrát hydrogenfosforečnanu disodného (Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O)	30388APO	LECH-NER
Dihydrogenfosforečnan draselný (KH ₂ PO ₄)	APO-30016	LECH-NER
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D8414	Sigma Aldrich
Dithiotreitol (DTT)	DTT - Roche	Sigma Aldrich
Dodecylsírán sodný (SDS)	71729	Sigma Aldrich
EDTA	E-6511	Sigma Aldrich
Ethanol	437433T	VWR
FC Saturační Reagent	5200-01	BioTech
Fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF)	20203	USB
Inaktivované fetální bovinní sérum (FCSI)	10270	Gibco
Fluorid sodný (NaF)	1504	Sigma Aldrich
Glycerol	G5516	Sigma Aldrich
Chlorid draselný (KCl)	APO-30076	Sigma Aldrich
Chlorid sodný (NaCl)	A131428	Mikrochem
Luminata Forte Western HRP Substrate	WBLUF0100	Sigma Aldrich
Methanol	10202LP-20-10000	Mikrochem
Mitomycin C		Nordic Pharma
MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2(4-sulfonyl)-2Htetrazolium, reakční pudr	G1111	Promega
MRS1220	1217	Tocris
Nonidet P-40	74385	Sigma Aldrich
Odtučněné sušené mléko		Laktino
Orthovanadičnan sodný (Na ₃ VO ₄)	S6508	Sigma Aldrich
Permeabilizační roztok (10×)	340973	BD Biosciences
PhosSTOP Inhibitor Cocktail (inhibitory fosfatáz)	04906845001	Sigma Aldrich
Propidium jodid	P4864	Sigma Aldrich
Receptor Saturation Reagent	5200-01	Southern Biotech
Ribonukleáza A	R5503	Sigma Aldrich
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	26634	Thermo Fischer

Tetramethylethyldiamin (TEMED)	15524-010	Invitrogen
Tris-base	37180.04	Serva
Tris-HCl	T3253	Sigma Aldrich
Triton X-100	T8787	Sigma Aldrich
Tryple	12604	Gibco
Tween-20	P-2287	Sigma Aldrich

3.1.2 Média

Název	Kat. číslo	Výrobce
RPMI	R8758	Sigma Aldrich
McCoy's Medium	M8403	Sigma Aldrich
Iscove's Modified Dulbecco Medium (IMDM)	BE12-722F	Lonza
Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)	M4655	Sigma Aldrich

3.1.3 Protilátky

Název	Kat. číslo	Výrobce	původ
Stanovení PgP průtokovou cytometrií			
Monoclonal Anti-P-glycoprotein Antibody	P7965	Sigma Aldrich	myš
Anti-Mouse IgG (whole molecule), fragment-FITC antibody	F2883	Sigma Aldrich	ovce
IgG1 Isotype control	M5284	Sigma Aldrich	myš

WB – primární protilátky			
Anti Adenosine A3-receptor Antibody	Ab203298	abcam	králík
Anti c-myc Antibody	Ab32072	abcam	králík
Anti Cyclin D1 Antibody	2978	Cell Signalling	králík
Anti Gli-1 Antibody	Ab134906	abcam	králík
Anti GSK-3 β Antibody	9315	Cell Signalling	králík
Anti MAPK Antibody	9102	Cell Signalling	Králík
Anti MDM2 Antibody	Ab16895	abcam	myš
Anti NF- κ B Antibody	Ab16502	abcam	králík
Anti p21 Antibody	2947	Cell Signalling	králík
Anti p53 Antibody	Ab1101	abcam	králík
Anti Patched1 Antibody	Ab53715	abcam	králík
Anti PgP Antibody	P7965	Sigma Aldrich	myš
Anti phosphoAkt3 + phosphoAkt2 + phosphoAkt1 Antibody	Ab192623	abcam	králík
Anti phosphoGSK-3 β Antibody	9336	Cell Signalling	králík
Anti phosphoMAPK Antibody	4376	Cell Signalling	králík
Anti β -aktin Antibody	A2228	Sigma Aldrich	myš
Anti β -catenin Antibody	Ab32572	abcam	králík

WB – sekundární protilátky			
Secondary Antibody Anti-Mouse IgG HRP conjug.	A9917	Sigma Aldrich	koza
Secondary Antibody Anti-Rabbit IgG HRP conjug.	A0545	Sigma Aldrich	koza

3.1.4 Pufry

Pufr	Složení
10× PBS	40 g NaCl, 1 g KCl, 7,2 g Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O, 1 g KH ₂ PO ₄ rozpustit v 1000 ml dH ₂ O, pH 6.8
PBS s inhibitory	2,24 g Na ₄ P ₂ O ₇ · 10 H ₂ O, 184 mg Na ₃ VO ₄ , 210 mg NaF, 174 mg PMSF (rozpustit v 1 ml MeOH), rozpustit ve 1000 ml 1x PBS, pH 7.4
1× TGS pufr	100 ml 10× TGS, 900 ml dH ₂ O, pH = 8,3
10× TBS pufr	24,2 g Tris-base, 80 g NaCl, rozpustit ve 1000 ml dH ₂ O, pH 7.6
TBS-T pufr	100 ml 10× TBS, 900 ml dH ₂ O, 1 ml Tween-20, pH 7.4
Blokující pufr	0,5 g BSA rozpustit v 10 ml TBS-T, pH 7.2–7.4
TNN lyzační pufr	157,6 mg Tris-HCl (pH 7.5), 292,2 mg NaCl, 37,23 mg EDTA, 100 µl NP-40, 3 mg DTT rozpustit v 20 ml dH ₂ O
Laemmlí nanášecí pufr	4,8 ml Tris-HCl (pH 6.8), 0,3 g SDS, 3 ml glycerol, 600 µl bromfenolová modř, 300 mM DTT
Permeabilizační pufr	1 ml 10× permeabilizačního roztoku, 10 ml dH ₂ O
Promývací pufr pro PgP (RB)	100 mg BSA, 20 µl NP-40 rozpustit v 20 ml Cell Wash
Blokovací pufr pro PgP	500 mg BSA rozpustit v 100 ml Cell Wash
Roztok FC saturačního činidla	10 µl FC saturačního reagentu rozpustit smísit s 30 µl blokovacího pufru pro PgP

3.1.5 Kity

Název	Kat. číslo	Výrobce
Pierce BSA Protein Assay Kit	23225	ThermoFischer
TGX FastCast Acrylamide Starter Kit, 12%	1610174	BioRad
TransBlot Turbo RTA Mini PVDF Transfer Kit	1704272	BioRad

3.1.6 Biologický materiál

Pro experimenty odhalující vliv CI-IB-MECA na A₃AR bylo vybráno 5 buněčných linií, které byly udržovány v kultuře a pravidelně pasážovány. Linie MDA-MB-231, HEP-3B, HCT 116 parental a Jopaca-1 vykazovaly vysokou expresi A₃AR, zatímco u linie BT-549 nedocházelo téměř k žádné expresi A₃AR.

Název linie	Původ	Typ nádorové linie	Kultivační médium
MDA-MB-231	ATCC 2013	Lidské, karcinom prsní žlázy, odvozeno od metastáze	RPMI + 10 % FCSI
BT-549	ATCC 2017	Lidské, karcinom prsní žlázy	RPMI + 10 % FCSI +
HCT 116 parental	Horizon 2011	Lidské, kolorektální karcinom	McCoy's + 10 % FCSI
HEP-3B	DSMZ 2015	Lidské, karcinom jater	EMEM + 10 % FCSI
Jopaca-1	DSMZ 2015	Lidské, karcinom pankreatu	Iscove's + 20 % FCSI
MRC-5	ATCC 2014	Lidské, plicní parenchym, nenádorová linie	EMEM + 10 % FCSI
K562/Tax	LEM	Lidské, chronická myeloidní leukemie, rezistentní na Taxol	IMDM + 10 % FCSI

3.1.7 Přístrojové vybavení

Analytické váhy (Scaltech)

Analyzátor počtu buněk a jejich viability Vi-Cell XR (Beckman Coulter)

Biotek EL406 Washer Dispenser (BioTek Instruments)

Centrifuga 5810 R (Eppendorf)

Centrifuga Mini Spin (Eppendorf)

CO₂ inkubátor Heracell 150i (Thermo Fischer Scientific)

Echo 550 (LabCyte)

EnVision Multimode Plate Reader (Perkin Elmer)

Inverzní světelný mikroskop 1x51 (Olympus)

Laminární box HeraSafe (ther)

Laminární box Mars Safety Class 2 (Labogene)

Laminární box MSC Advantage (Thermo Fischer Scientific)

Magnetická míchačka MSH3 (Biosan)

pH metr (P-Lab)

Průtokový cytometr FACS Calibur (BD Biosciences)

Temperovaná vodní lázeň (Mettler)

Termostat Bio TDB-100 (Biosan)

Transferový systém TransBlot Turbo (Bio-Rad)

TundraStore Automated Low Temperature Freezer (HighResBiosolutions)

Vortex (Labnet)

Zobrazovací systém Odyssey FC (Li-Cor)

3.1.8 Software

Cell Quest Flow Cytometry Software

ClarisWorks 5.0

ChemDraw

GraphPad Prism 7

ImageLab

Image StudioLite 5.2

ImageJ

Li-Cor Software

Microsoft Excel 2016

Microsoft Word 2016

3.2 Metodika

3.2.1 Kultivace buněčných linií

Všechny *in vitro* experimenty probíhaly na vybraných buněčných liniích odvozených od několika typů lidských karcinomů. Buňky byly kultivovány v doporučených kultivačních médiích obohacených o 10 %, nebo 20 % inaktivovaného fetálního séra (FCSI), bez přítomnosti antibiotik (viz podkapitola 3.1.6.). Kultivace probíhala v inkubátorech při teplotě 37 °C, 5 % CO₂ atmosféře a 95% vlhkosti v plastových kultivačních lahvích o růstové ploše 150 cm². Buňky byly pasážovány dle potřeby 2-3 týdně. Po odsátí starého média s odumřelými buňkami byla vrstva buněk byla dvakrát opláchnuta roztokem 1× PBS. Buňky byly poté uvolněny z povrchu lahve roztokem trypsinu. Koncentrace uvolněných buněk v médiu potřebných pro další experimenty a jejich viabilita byly určeny pomocí přístroje Vi-Cell.

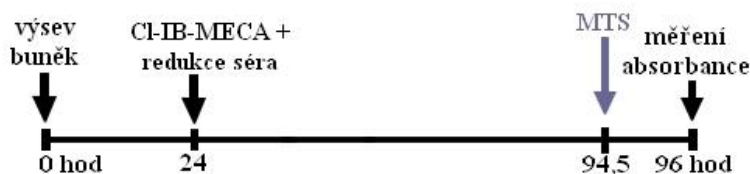
Pro další experimenty byly buňky kultivovány v šestijamkových jamkových panelech nebo v kultivačních miskách o růstové ploše 60,1 cm². Vyseté buňky byly uchovávány v médiu s 10 %, popřípadě 20 % FCSI s přidavkem antibiotik (penicilin 100 000 U/l, streptomycin 100 mg/l). Buňky byly při experimentech kultivovány 24 hodin tak, aby konfluence při ovlivnění CI-IB-MECA byla asi 70 %. Pro minimalizaci možné interference jednotlivých složek séra s efekty zprostředkovanými CI-IB-MECA byla koncentrace FCSI snížena na polovinu (5 %, resp. 10 %).

3.2.2 Stanovení cytotoxicity pomocí MTS testu

MTS kolorimetrický test slouží pro citlivou kvantifikaci životnosti buněk. Může být použitý pro stanovení buněčné proliferace, viability a pro stanovení cytotoxicity. Princip testu je založen na transformaci nerozpustné žluté tetrazoliové soli na fialový formazan, který je rozpustný v kultivačním médiu. Tato konverze je způsobena NADPH-dependentními mitochondriálními

dehydrogenázami, které se vyskytují v živých, metabolicky aktivních buňkách. Množství fialového formazanu je tedy přímo úměrné počtu živých buněk. Formazanové barvivo je následně kvantifikováno spektrofotometricky, kdy je měřena absorbance při 490-500 nm. Z těchto údajů je následně určena hodnota střední inhibiční konstanty IC_{50} , která určuje koncentraci látky, která je nutná k inhibici proliferace u 50 % buněčné populace. Jako pozitivní kontroly (látky s maximálním signálem) byla zvolena cytostatika Aktinomycin D v koncentraci 2,6nM a Mitomycin C v koncentraci 100 μ M. Jako negativní kontrola (látky s nejnižším signálem) byl zvolený DMSO.

Pro účely experimentu byla suspenze buněk o známé koncentraci rovnoměrně pipetována do 384-jamkové destičky SpectraPlate pomocí přístroje MultiDrop™ Combi Reagent Dispenser. Buňky byly poté 24 hodin ponechány v inkubátoru v přítomnosti média s 10 % FCSI a antibiotiky (obr. 16). Poté bylo FCSI zredukováno na poloviční koncentraci a zároveň byly buňky ovlivněny CI-IB-MECA v 8 koncentracích v rozmezí 50–0,4 μ M. Pro tyto účely byl využit přístroj Echo 550 Liquid Handler. Buňky byly s CI-IB-MECA inkubovány 72 hodin. Poté byly do všech jamek přidány 4 μ l roztoku MTS a panel byl vložen přibližně na 90 minut do inkubátoru. Po vyjmutí panelu byla změřena absorbance na přístroji EnVision Multimode Plate Reader při vlnové délce $\lambda = 490$ nm. Výsledky absorbance byly exportovány do programu MS Office Excel 2007 a zpracovány v programu GraphPad Prism 8, kde byla získána hodnota IC_{50} .



Obr. 16: Nárůst buněk ve 384-jamkové destičce probíhal 24 hodin. Následně byl zredukovaný obsah FCSI v médiu a buňky byly ovlivněny CI-IB-MECA v rozmezí koncentrací 50–0,4 μ M po dobu 72 hodin. Takto ovlivněné buňky byly následně obarveny MTS a inkubovány 90 minut, po kterých následovala kvantifikace změny absorbance.

3.2.3 Analýza buněčného cyklu a buněčné smrti

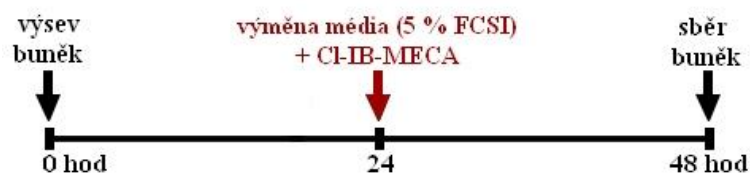
Analýza buněčného cyklu byla provedena metodou průtokové cytometrie. Pro tyto účely byly sesbírány frakce plovoucích i přisedlých buněk, které byly poté zafixovány ve fosfátovém pufru (PBS) s ethanolem (EtOH). Takto připravené buňky byly obarveny fluorescenčním barvivem obsahujícím propidium jodid (PI), který interkaluje do molekuly DNA a umožňuje tak stanovení celkového obsahu DNA v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Zároveň byla stanovena subdiploidní populace subG1, charakteristická pro probíhající buněčnou smrt.

Nárůst buněk vysetých do šestijamkových panelů probíhal 24 hodin v kultivačním médiu s 10 % fetálního bovinního séra (FCSI). Buňky byly poté ovlivněny CI-IB-MECA v koncentracích 20nM a 20 μ M (obr. 17). Jako kontrola bylo použito DMSO do finální koncentrace 20 μ M. Zároveň došlo k redukci FCSI v médiu na konečnou hodnotu 5 %. Ovlivnění probíhalo 24 hodin, poté byly buňky

dvakrát promyty PBS, uvolněny pomocí tryplu a sesbírány. Suspenze buněk byla centrifugována, promyta PBS a zafixována ve směsi PBS a 70% ethanolu. Takto připravené buňky byly uloženy přes noc v mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Zafixované buňky byly centrifugovány (300 g, 5 minut, RT); toto nastavení bylo ponecháno po celou dobu experimentu), promyty PBS s 1 % FCSI, opět stočeny a peleta byla rozsuspendována v PBS s 0,25 % Tritonu X-100. Suspenze byla poté ponechána inkubována na ledu po dobu 15 minut, kdy docházelo k disociaci membrán. Poté byly buňky opět promyty PBS s 1 % FCSI. Následně byla peleta rozsuspendována v roztoku PI a byla inkubována ve tmě po dobu 30 minut při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Buněčný cyklus vzorků byl poté ihned měřen na průtokovém cytometru FACS Calibur za použití argonového laseru ($\lambda = 488\text{ nm}$) a programu CellQuest. Pro každý vzorek bylo měřeno 10 000 buněk splňujících dané parametry. K analýze a zpracování výsledků byl použitý program CellQuest. Výsledky byly poté vyexportovány v programu ClarisWorks. Výsledky měření a statistická analýza byly zpracovány v programu Excel (Microsoft Office 2016).



Obr. 17: Nárůst buněk v šestijamkových panelech probíhal 24 hodin, poté došlo k redukcí obsahu FCSI v médiu a buňky byly zároveň ovlivněny CI-IB-MECA do koncentrací 20nM a 20 μM . Ovlivnění probíhalo 24 hodin a bylo následováno fixací do EtOH.

3.2.4 Analýza fosforylace histonu H3

Fosforylace histonu H3 je charakteristická pro probíhající mitózu a může být stanovena průtokovou cytometrií. Sesbírané frakce plovoucích i přisedlých buněk byly zafixovány do PBS s EtOH. Takto připravené vzorky byly inkubovány s protilátkou pro fosforylovanou formu histonu H3. Na ni se poté navázalo fluorescenční barvivo Alexa Fluor 488, jehož emisní maximum je 519 nm. Intenzita fluorescence byla kvantifikována na průtokovém cytometru pomocí argonového laseru ($\lambda = 488\text{ nm}$).

Příprava vzorků pro analýzu fosforylace histonu H3 probíhala stejným způsobem, jako pro analýzu buněčného cyklu. Pro experiment byly buňky vysety do šestijamkového panelu a ovlivněny CI-IB-MECA po dobu 24 hodin v koncentracích 20nM a 20 μM . Sesbírané buňky byly zafixovány do směsi PBS a 70% EtOH a uloženy přes noc do mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Postup přípravy vzorků probíhal stejně, jako při analýze buněčného cyklu. Zafixované buňky byly centrifugovány (300 g, 5 minut, RT), 2 \times promyty PBS s 1 % FCSI a inkubovány 15 minut na ledu v PBS s 0,25 % Tritonu-X. Následně byly buňky promyty PBS s 1 % FCSI a stočeny. K peletám byla přidána primární protilátka Anti-phospho Histone H3 a vzorky byly ponechány inkubovány 60 minut ve tmě při pokojové teplotě. Vzorky byly poté promyty PBS + 1 % FCSI a k peletkám byla přidána fluorescenční sekundární protilátka Alexa Fluor 488. Inkubace s protilátkou probíhala 30 minut ve tmě

při pokojové teplotě. Nakonec byly buňky promyty PBS + 1 % FCSI a intenzita fluorescence byla ihned měřena na průtokovém cytometru FACS Calibur za použití argonového laseru ($\lambda = 488 \text{ nm}$) a programu CellQuest. Pro každý vzorek bylo analyzováno 10 000 buněk splňujících dané parametry. K analýze a zpracování výsledků byl použitý program CellQuest. Výsledky byly poté exportovány do programu ClarisWorks. Výsledky měření a statistická analýza byly zpracovány v programu Excel (Microsoft Office 2016).

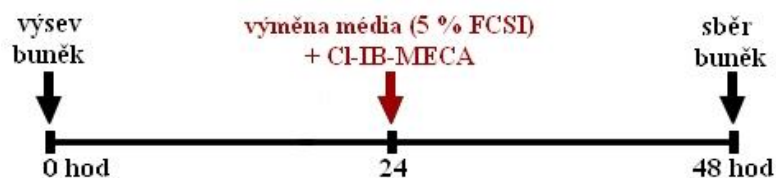
3.2.5 Stanovení exprese PgP

Exprese PgP proteinů byla stanovena metodou průtokové cytometrie. Pro účely měření byly sesbírány frakce plovoucích i přisedlých buněk, které byly zafixovány v methanolu. K takto připraveným vzorkům byly přidány protilátky proti PgP, které umožňovaly stanovit míru jeho exprese u jednotlivých buněčných linií. U stanovení exprese PgP byla vždy provedena izotypová kontrola, kdy byl měřen signál pozadí způsoben nespecificky navázanými primárními protilátkami. Jako pozitivní kontrola byly použity buňky s vysokou expresí MDR proteinů K562/Tax a jako negativní kontrola byly použité buňky CEM, které nevykazují expresi PgP.

Buňky vyšetě do kultivační misky byly ponechány růst 24 hodin v kultivačním médiu s 10 % FCSI. Následně byl obsah séra redukován na 5 % a buňky byly ovlivněny Cl-IB-MECA v koncentraci $50 \mu\text{M}$ (obr. 18). Jako kontrola bylo použito DMSO v koncentraci $50 \mu\text{M}$. Ovlivnění probíhalo 24 hodin. Médium bylo následně sesbíráno, buňky byly dvakrát opláchnuty PBS a sesbírány pomocí tryplu. Suspenze byla centrifugována (180 g, 5 minut, $4 \text{ }^\circ\text{C}$), promyta PBS a zafixována ve 100% methanolu. Takto připravené buňky byly uloženy do mrazáku při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ přes noc.

Připravené vzorky byly centrifugovány (300 g, 5 minut, RT) a propláchnuty promývacím puřem (RB). K buňkám bylo přidáno permeabilizační činidlo sloužící pro disociaci plazmatické membrány a směs byla inkubována 10 minut při pokojové teplotě, centrifugována a propláchnuta RB. Ke vzorkům byl poté přidán saturační reagent blokující FC receptory, které mohou nespecificky vázat protilátky pro PgP. Po desetiminutové inkubaci byl vzorek opět centrifugován, promyt RB a rozdělen do dvou setů. Jeden set sloužil jako izotypová kontrola, k druhému setu byla přidána primární protilátka pro PgP. Oba sety byly 30 minut inkubovány ve tmě, centrifugovány a promyty RB. Následně byla přidána sekundární protilátka konjugovaná s fluorescein isothiokyanátem (FITC), která byla po 30 minutách vymyta RB a pelety buněk byly rozsuspendovány v blokovacím roztoku. Vzorky byly na 15 minut umístěny do lednice do $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Intenzita fluorescence navázaného FITC byla poté analyzována na průtokovém cytometru pomocí argonového laseru ($\lambda = 488 \text{ nm}$). K analýze a zpracování výsledků byl použitý program CellQuest. Výsledky byly poté exportovány v programu ClarisWorks.

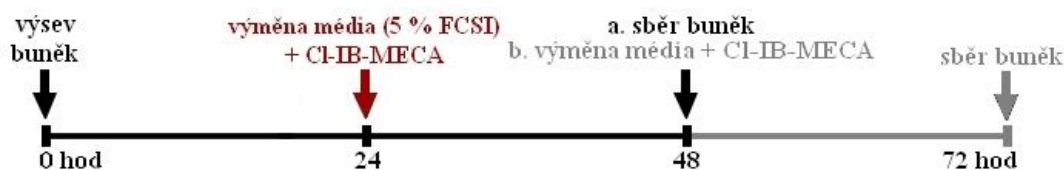
Naměřená data byla interpretována ve formě poměru mediánů fluorescenční intenzity (MFI) izotypové kontroly a analyzovaného vzorku. Následně byly srovnány poměry MFI kontrolního vzorku a vzorku ovlivněného Cl-IB-MECA.



Obr. 18: Buňky byly ovlivněny CI-IB-MECA v koncentraci 50 μ M. Ovlivnění probíhalo 24 hodin a bylo následováno fixací do MeOH.

3.2.6 Analýza exprese proteinů

Analýza exprese proteinů charakteristických pro dané signální dráhy byla provedena metodou Western Blot. Buňky pro přípravu proteinových lyzátů byly vysety do kultivačních misek a byly ponechány růst 24 hodin v kultivačním médiu s 10 % FCSI. Následně bylo sérum zredukováno na 5 % obsahu a buňky byly ovlivněny CI-IB-MECA v koncentraci 20 μ M. Ovlivnění DMSO proběhlo do koncentrace 20 μ M a sloužilo jako negativní kontrola. Po 24 hodinách byly sesbírány frakce přisedlých i plovoucích buněčných populací. V případě buněk ovlivněných po dobu 48 hodin došlo po 24 hodinách pouze k výměně média a ovlivnění čerstvou CI-IB-MECA. Sběr pak probíhal po dalších 24 hodinách (obr. 19).



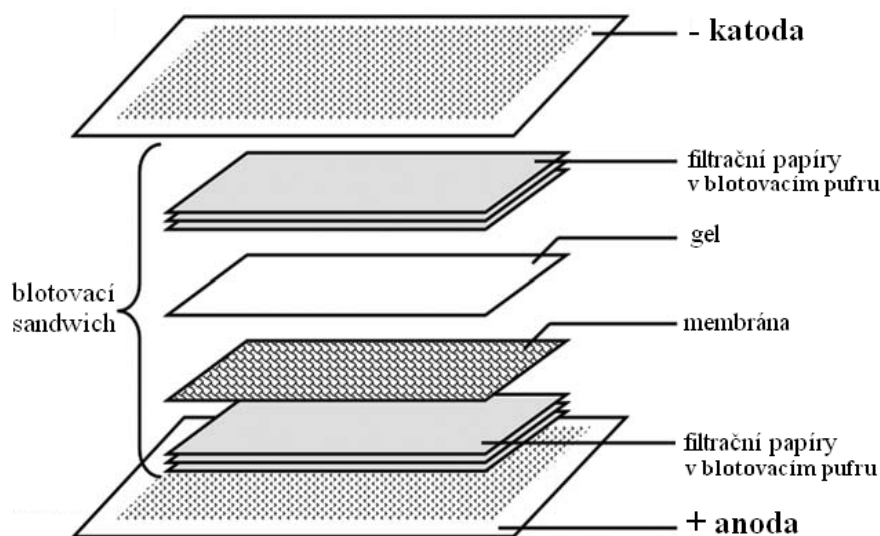
Obr. 19: Buňky byly ovlivněny CI-IB-MECA do koncentrace 20nM a 20 μ M. Ovlivnění probíhalo 24 hodin a poté došlo ke sběru buněk, nebo k výměně média a přidání čerstvé CI-IB-MECA po dobu dalších 24 hodin.

Po sesbírání média byly přisedlé buňky dvakrát promyty PBS a uvolněny použitím tryplu. Peleta obsahující 2 \times 10⁶ buněk byla rozsuspendována ve vychlazeném PBS s inhibitory a centrifugována (13 000 g, 5 minut, 4 °C). Po odsátí supernatantu byl tento krok zopakován, supernatant byl odsán a suchá peleta byla poté umístěna do mrazáku při -80 °C pro další použití.

Suché pelety byly vyjmuty z mrazáku, okamžitě umístěny na led a rozsuspendovány v lyzačním pufru s přidavkem inhibitorů proteáz (Easypack Protease Inhibitor Cocktail) a fosfatáz (PhosSTOP). Vzorky byly poté lyzovány 60 minut při 4 °C na třepače a následně byly pomocí ručního ultrazvukového sonikátoru homogenizovány (amplituda 10 %, pulsní program on 1,5 s/off 0,5 s, po dobu 1 minuty). Takto připravené vzorky byly centrifugovány (13 000 g, 5 minut, 4 °C) a supernatant byl přenesen do nových mikrozkušavek. Pomocí komerčního BCA Protein Assay Kitu byla kvantifikována koncentrace proteinů přítomných ve vzorcích. Podle množství proteinů byly vzorky naředěny lyzačním pufrům na stejnou koncentraci a následně smíseny s Laemmli pufrům v poměru 2:1. Vzorky byly poté hodinu inkubovány v termobloku při 37 °C, popřípadě 10 minut při 95 °C.

Vzorky obsahující známou koncentraci proteinů byly společně se standardem (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder) nanoseny na 12% polyakrylamidový gel (Stain-free FastCast Acrylamide gel kit). Proteiny byly následně rozděleny na základě jejich molekulové hmotnosti pomocí gelové elektroforézy (SDS-PAGE) při počátečním napětí 80 V, které bylo průběžně zvyšováno až na 120 V, dokud vzorky neprošly celým gelem.

Rozdělené proteiny byly z gelu přeneseny na membránu za použití semi-dry blotovacího transferového systému. Pro přenos byl sestaven blotovací sandwich z filtračních papírů, PVDF membrány a gelu (obr. 20). Blotování pak probíhalo při proudu 1 A a napětí 25 V po dobu 15 minut.



Obr. 20: Sestavený blotovací sandwich sestávající z filtračních papírů namočených do blotovacího pufru, membrány a gelu.

Po přenosu proteinů byla membrána 60 minut blokována v 5% BSA v promývacím pufru a následně inkubována při 4 °C přes noc s primární protilátkou (tab. 2). Primární protilátky byly naředěny dle instrukcí výrobce do roztoku 5% BSA v promývacím TBS-T pufru.

Po inkubaci byly membrány 3× propláchnuty TBS-T pufrům po dobu 5 minut a následně byly hodinu inkubovány při pokojové teplotě se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou. Sekundární protilátka byla naředěna v 5% odtučněném mléku v TBS-T. Membrána byla následně 4× propláchnuta v TBS-T. Vizualizace proběhla pomocí substrátu Luminata Forte Western HRP, se kterým byla membrána 5 minut ve tmě inkubována. Chemiluminiscenční signál proteinů byl detekován pomocí systému Li-COR Odyssey Fc (program: Chemi/600/700 – 10/2/2 min.). Pro kontrolu přenesení proteinů a normalizaci vzorků byl detekován kontrolní protein β -aktin. Density jednotlivých bandů byly kvantifikovány pomocí programu ImageJ Studio. Pro lepší přehlednost nejsou jednotlivé numerické hodnoty denzit v diplomové práci uvedeny.

V druhé fázi testování byla analýza provedena po kombinovaném ovlivnění specifickým antagonistou A_3AR , MRS1220 a agonistou CI-IB-MECA. Proteiny, u kterých nebyla provedena analýza kombinovaným ovlivněním s MRS1220 jsou označeny N/A.

Tab. 2: Ředění primárních protilátek

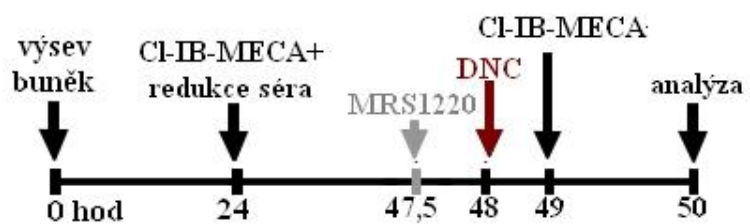
Protein	MW	Původ	Primární protilátka	Sekundární protilátka
A ₃ AR	50	králík	1:400	1:5000
β-catenin	90	králík	1:2500	1:5000
c-myc	57	králík	1:1000	1:5000
Cyklin D1	36	králík	1:500	1:3000
Erk1/2	42	králík	1:1000	1:5000
Gli	160	králík	1:500	1:5000
GSK-3β	46	králík	1:1000	1:5000
MDM2	90	myš	1:1000	1:5000
NF-κB	65	králík	1:1000	1:5000
p53	50	myš	1:1000	1:5000
p21	21	králík	1:1000	1:5000
pAkt	60	králík	1:1000	1:5000
PgP	150	myš	1:500	1:3000
Phospho Erk1/2	42	králík	1:1000	1:5000
Phospho GSK-3β	47	králík	1:1000	1:5000
Ptch1	160	králík	1:1000	1:5000

3.2.7 Funkční test pro MDR proteiny

Dalším experimentem byl funkční test s fluorescenčním substrátem daunorubicinem (DNC). Při ovlivnění DNC proniká do intracelulárního prostoru a u buněk s MDR fenotypem je pumpován zpět do extracelulárního prostoru prostřednictvím PgP. V případě aplikace jeho inhibitoru dochází ke kumulaci DNC uvnitř buněk. Inhibiční efekt použitého inhibitoru MDR je následně kvantifikován průtokovou cytometrií, kdy je analyzována změna intenzity fluorescenčního signálu, která je přímo úměrná množství DNC vyloučeného z buněk. Pro účely tohoto experimentu byly použity buněčné linie se zvýšenou expresí PgP, K562/Tax rezistentní na Taxol. Jako pozitivní kontrola inhibice efluxu PgP byl použitý roztok 20μM cyklosporinu A (CyA).

Buňky byly vysety do šestijamkového panelu a byly ponechány 24 hodin růst v kultivačním médiu s 10 % FCSI. Po 24 hodinách došlo k redukci séra v médiu na 5 % obsahu a k ovlivnění buněk CI-IB-MECA v 5 koncentracích: 100, 50; 12,5; 3,125; 0,781μM. Zároveň byl k ovlivněným buňkám přidán DNC v koncentraci 1μM a panel byl inkubován 60 minut ve tmě při 37 °C. Následně bylo médium odsáto a buňky byly dvakrát opláchnuty médiem bez DNC a CI-IB-MECA. K buňkám bylo poté přidáno čerstvé médium s CI-IB-MECA ve stejných koncentracích, jako při prvním ovlivnění a buňky byly inkubovány 60 minut při 37 °C. Poté byly buňky sesbírány na ledu škrabkou a přemístěny do cytometrických zkumavek (obr. 21). Intenzita fluorescence vyloučeného DNC byla poté okamžitě měřena na průtokovém cytometru pomocí argonového laseru ($\lambda = 488 \text{ nm}$). V druhé fázi byl funkční test proveden po kombinovaném ovlivnění specifickým antagonistou MRS1220 a agonistou CI-IB-MECA (obr. 21).

Naměřená data byla interpretována ve formě mediánů fluorescenční intenzity (MFI) pro vzorky ovlivněné samotnou CI-IB-MECA a v kombinaci s MRS1220. Následně byly mediány obou vzorků srovnány.



Obr. 21: Schéma funkčního testu provedeného s kombinovaným ovlivněním 0,1 μ M MRS1220 a CI-IB-MECA

4 Výsledky

Mnoho autorů popsal cytotoxické a antiproliferační efekty Cl-IB-MECA na široké škále nádorových linií. (35) (40) (122) (127) (131) Jedním z cílů diplomové práce tyto teorie ověřit na zvolených buněčných liniích a popsat změny, které Cl-IB-MECA vyvolala v buněčném cyklu a vybraných signálních drahách.

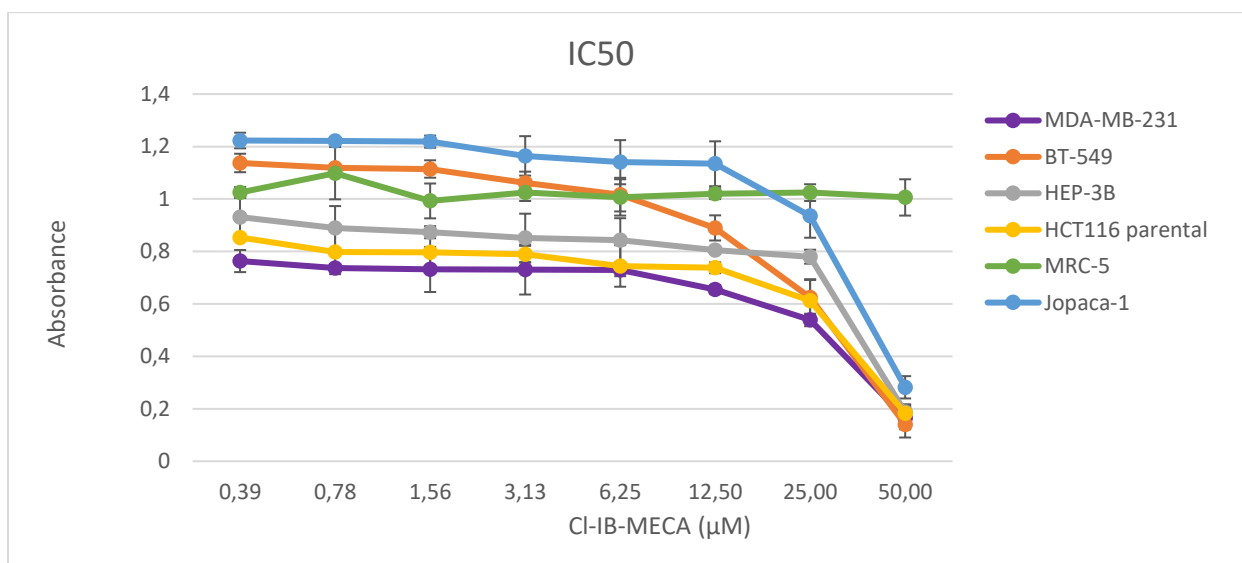
4.1 Vliv Cl-IB-MECA na proliferaci a buněčný cyklus

Cl-IB-MECA byla u všech buněčných linií nejprve testována z hlediska cytotoxicity. Sledovanými parametry byla proliferace buněk, změny v buněčném cyklu, buněčná smrt a fosforylace histonu H3, jakožto markeru probíhající mitózy.

4.1.1 MTS test

Pro správné vyhodnocení cytotoxického efektu Cl-IB-MECA byly pro jednotlivé buněčné linie stanoveny střední inhibiční konstanty IC_{50} udávající koncentraci, při které dochází k inhibici proliferace u 50 % populace. Hodnoty IC_{50} byly stanoveny prostřednictvím MTS testu využívajícího konverzi MTS pomocí mitochondriálních dehydrogenáz v metabolicky aktivních buňkách na formazan. Tato přeměna byla kvantifikována spektrofotometricky a výsledné hodnoty byly zpracovány a vyhodnoceny v programu GraphPad Prism 8.

Antiproliferační účinky byly studovány u pěti nádorových linií (MDA-MB-231, BT-549, HCT116 parental, HEP-3B, Jopaca-1) a jedné nenádorové linie (MRC-5). Z výsledků vyplývá, že při ovlivnění nádorových linií Cl-IB-MECA docházelo k inhibici proliferace v závislosti na použité koncentraci látky. Zatímco u nádorových linií se u absorbance projevuje zřetelně klesající trend, u nenádorové linie MRC-5 se tento trend neprojevuje a hodnoty absorbance jsou konstantní (graf 1).



Graf 1: Antiproliferační efekt Cl-IB-MECA. Buňky byly ovlivněny Cl-IB-MECA v koncentrační škále 0,39–50 µM po dobu 72 hodin a následně obarveny MTS. Změna zabarvení byla kvantifikována spektrofotometricky a z naměřených hodnot byly určeny hodnoty IC_{50} .

Nejvýraznější efekt byl sledován u linie Jopaca-1, která vykazuje vysokou expresi A₃AR. U ostatních nádorových linií s vysokou expresí A₃AR docházelo k inhibici proliferace přibližně okolo koncentrace 20 μM (tab. 3). U linie BT-549, která žádnou expresi A₃AR nevykazuje, byl pozorován silný antiproliferační efekt CI-IB-MECA a výsledná hodnota IC₅₀ byla dokonce nižší než u ostatních linií.

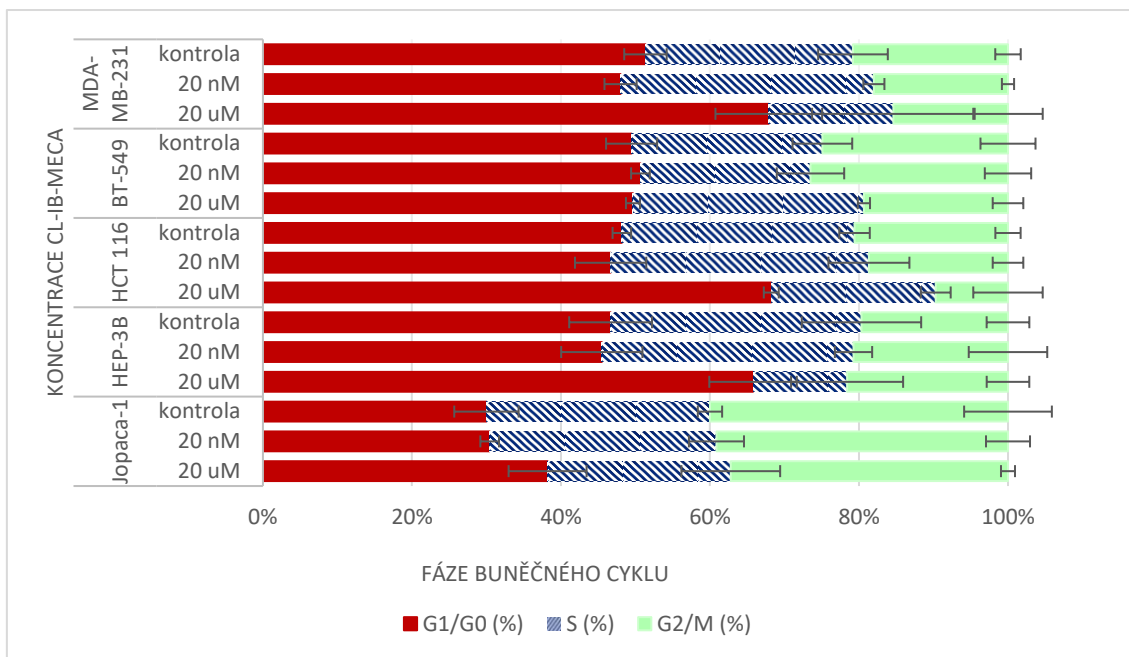
Vyšší koncentrace CI-IB-MECA byly už příliš toxické, proto pro většinu dalších experimentů byly zvoleny koncentrace rovné, nebo menší hodnotě 20 μM.

Tab. 3: Hodnoty IC₅₀ a jejich směrodatné odchylky pro jednotlivé buněčné linie. Uvedené hodnoty jsou průměrem dvou nezávislých opakování.

Buněčná linie	IC ₅₀ (μM)	Směrodatná odchylka
MDA-MB-231	23,89	4,14
BT-549	12,48	0,67
HCT116	23,48	5,06
HEP-3B	20	6,02
Jopaca-1	13,93	0,14
MRC-5	>50	-

4.1.2 Regulace buněčného cyklu

Vliv CI-IB-MECA na průběh buněčného cyklu byl stanoven metodou průtokové cytometrie. U všech linií s vysokou expresí A₃AR nastal blok v G1 fázi buněčného cyklu. Konkrétně u linií MDA-MB-231, HCT116 a HEP-3B byl počet buněk vyskytujících se v G1 fázi po ovlivnění 20 μM CI-IB-MECA zvýšen téměř o 20 % (graf 2, tab. 3). S tím pak souvisel i úbytek buněk vyskytujících se v S a G2/M fázi. U linie Jopaca-1 byl rovněž pozorován blok v G1 fázi, ve srovnání s ostatními liniemi byl však nárůst o pouhých 8 %. Linie BT-549, která u které není přítomný A₃AR nevykazovala žádnou významnou změnu (obr. 22).

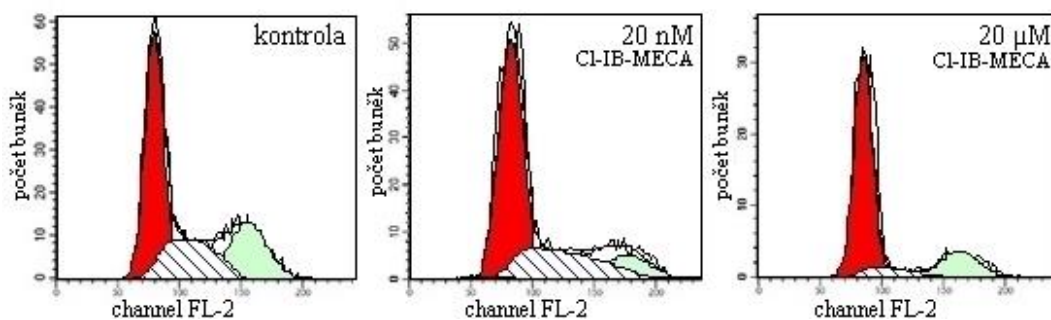


Graf 2: Grafické znázornění změn v buněčném cyklu po ovlivnění CI-IB-MECA s jejich směrodatnými odchylkami. Buňky byly ovlivněny CI-IB-MECA či jen rozpouštědlem po dobu 24. Následně byl analyzován jejich buněčný cyklus metodou průtokové cytometrie. Výsledné hodnoty jsou aritmetickými průměry tří nezávislých replikátů.

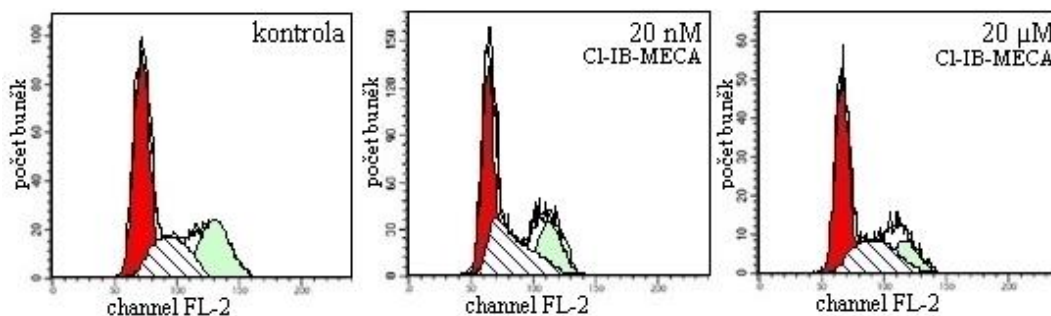
Tab. 3: Tabulka popisující aritmetické průměry procentuálního zastoupení jednotlivých fází buněčného cyklu a jejich směrodatné odchylky pro jednotlivé buněčné linie.

Buněčná linie	CI-IB-MECA	G1/G0 (%)	SD	S (%)	SD	G2/M (%)	SD
MDA-MB-231	kontrola	51	2,8	28	4,6	21	1,7
	20nM	48	2,1	34	1,4	18	0,8
	20μM	68	7,1	17	10,8	15	4,6
BT-549	kontrola	49	3,3	26	3,9	24	3,6
	20nM	50	1,2	23	4,5	27	3
	20μM	50	0,9	31	0,8	19	2
HCT 116	kontrola	48	1,2	31	2	21	1,7
	20nM	47	4,8	35	5,4	18	2
	20μM	68	1	22	2	10	4,6
HEP-3B	kontrola	47	5,6	34	8	19	2,8
	20nM	45	5,4	34	2,5	21	5,2
	20μM	66	5,9	13	7,5	21	2,9
Jopaca-1	kontrola	30	4,3	30	1,6	40	5,9
	20nM	30	1,2	31	3,7	39	2,9
	20μM	38	5,2	25	6,7	37	0,9

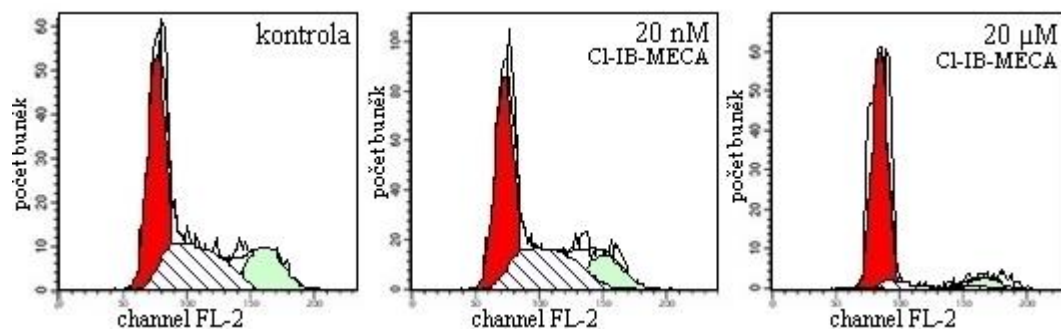
a) MDA-MB-231



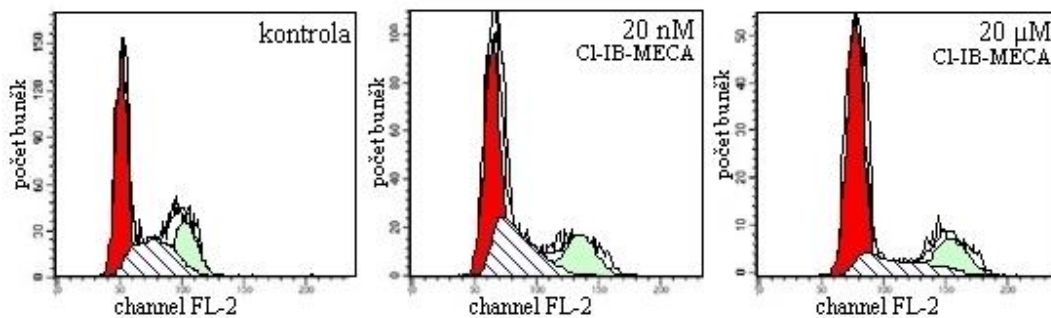
b) BT-549



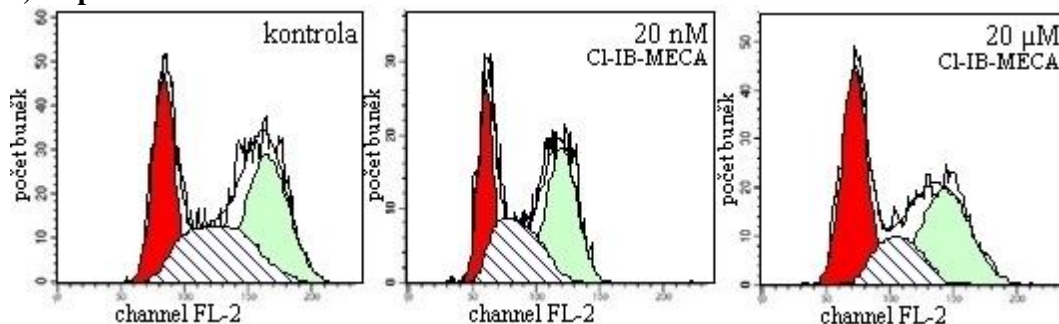
c) HCT116 parental



d) HEP-3B

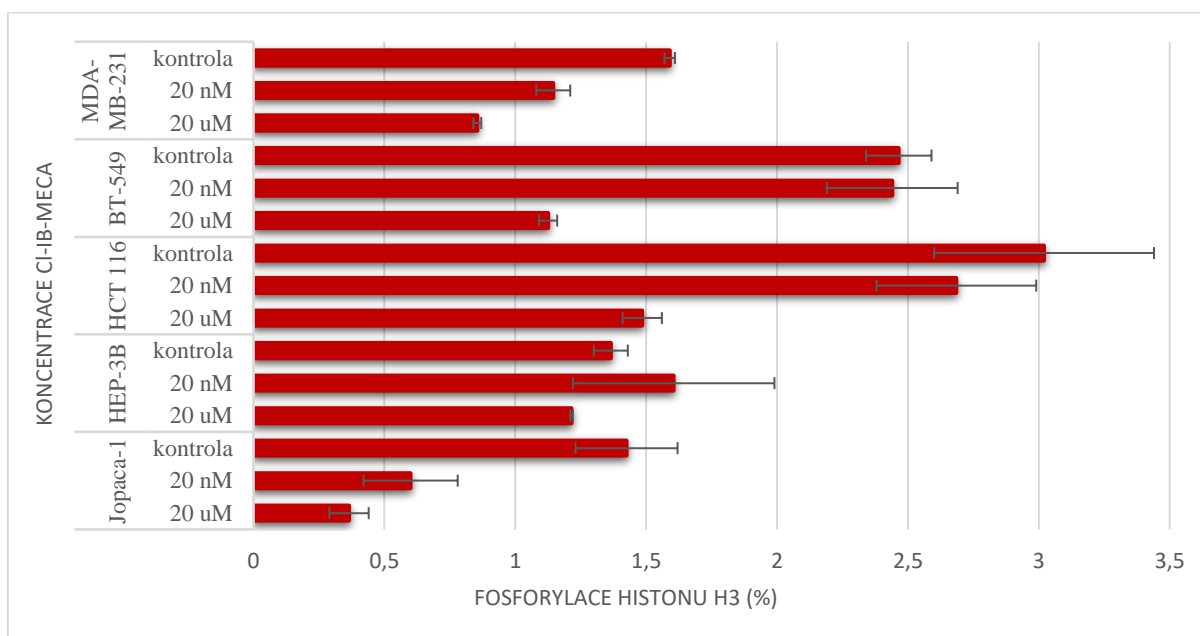


e) Jopaca-1



Obř. 22: Analýza buněčného cyklu po působení CI-IB-MECA. Červeně je znázorněna populace buněk vyskytující se v G1 fázi, zeleně v G2/M fázi. Pruhovaná oblast vyobrazuje populace v S fázi. Změny na buněčném cyklu byly kvantifikovány pomocí průtokové cytometrie. Uvedené histogramy jsou reprezentativními vzorky ze tří nezávislých opakování.

Dalším sledovaným parametrem byla probíhající mitóza, pro kterou je charakteristická fosforylace serinu (Ser-10) na histonu H3. Podmínky kultivace a koncentrace při ovlivnění CI-IB-MECA byly totožné jako při analýze buněčného cyklu. U všech linií s vysokou expresí A₃AR docházelo k bloku v G1 fázi, s čímž souvisel i pokles buněk nacházejících se v G2/M fázi; u všech těchto linií byl zároveň pozorován i pokles fosforylace histonu H3 (graf 3, tab. 4). Nejvýraznější pokles je projevil u linie HCT116 parental, kde došlo k úbytku o více než 1,5 %. Zajímavé je, že u linie BT-549 docházelo rovněž k výraznému snížení fosforylace histonu H3, navzdory tomu, že nevykazuje žádnou expresi A₃AR.



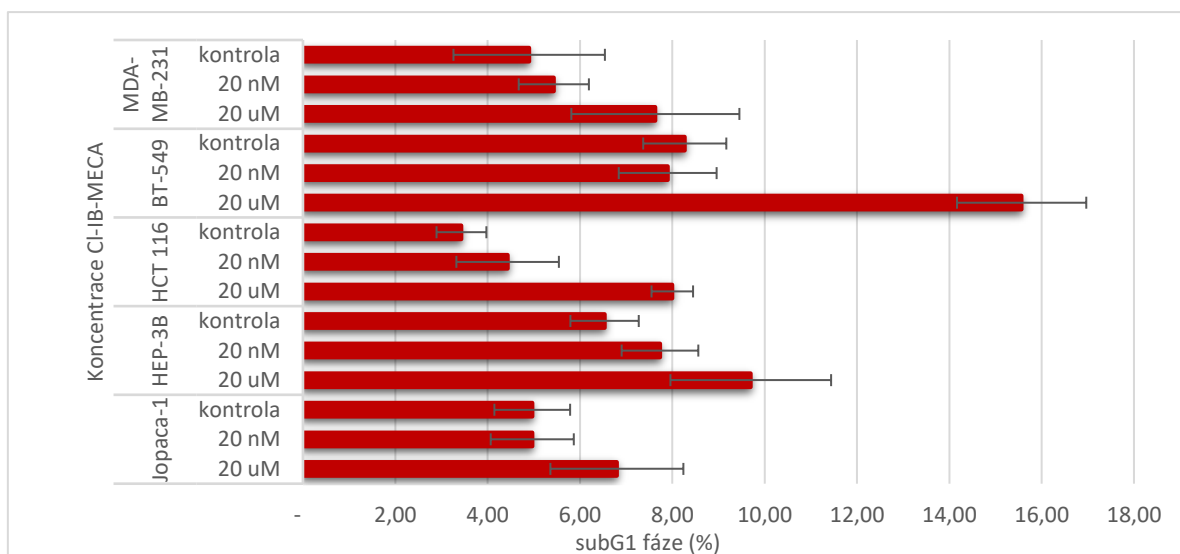
Graf 3: Změny fosforylace histonu H3 po ovlivnění CI-IB-MECA. Buňky byly ovlivněny CI-IB-MECA. Fosforylace histonu H3, jakožto markeru probíhající mitózy, byla kvantifikována průtokovou cytometrií. Výsledné hodnoty jsou aritmetickými průměry tří nezávislých opakování.

Tab. 4: Tabulka udávající aritmetické průměry procentuálního zastoupení buněk s probíhající mitózou a jejich směrodatné odchylky pro jednotlivé buněčné linie.

Buněčná linie	CI-IB-MECA	Fosforylace histonu (%)	
		Průměr	SD
MDA-MB-231	kontrola	1,6	0,02
	20nM	1,15	0,07
	20μM	0,86	0,02
BT-549	kontrola	2,47	0,12
	20nM	2,44	0,25
	20μM	1,13	0,04
HCT 116	kontrola	3,0	0,42
	20nM	2,69	0,30
	20μM	1,49	0,08
HEP-3B	kontrola	1,37	0,07
	20nM	1,60	0,39
	20μM	1,20	0,01
Jopaca-1	kontrola	1,4	0,20
	20nM	0,6	0,18
	20μM	0,4	0,08

4.1.3 Buněčná smrt

Cytostatický vliv CI-IB-MECA byl analyzován v koncentrační závislosti pomocí průtokové cytometrie, kdy byla stanovena subdiploidní populace subG1, která je charakteristická pro probíhající buněčnou smrt. U všech linií docházelo při ovlivnění 20nM koncentrací k mírnému zvýšení procentuálního zastoupení subG1 populace (graf 4, tab. 5). Při ovlivnění 20μM CI-IB-MECA byl nárůst již výraznější, především u linie BT-549, kde byl nárůst o více než 7 %. Nejmenší rozdíl mezi kontrolou a ovlivněním 20μM CI-IB-MECA byl pozorovaný u linie Jopaca-1, kde rozdíl činil 1,8 %.



Graf 4: Grafické znázornění procentuálního zastoupení buněk, u kterých docházelo k buněčné smrti, s jejich směrodatnými odchylkami. Výsledné hodnoty jsou aritmetickými průměry tří nezávislých opakování.

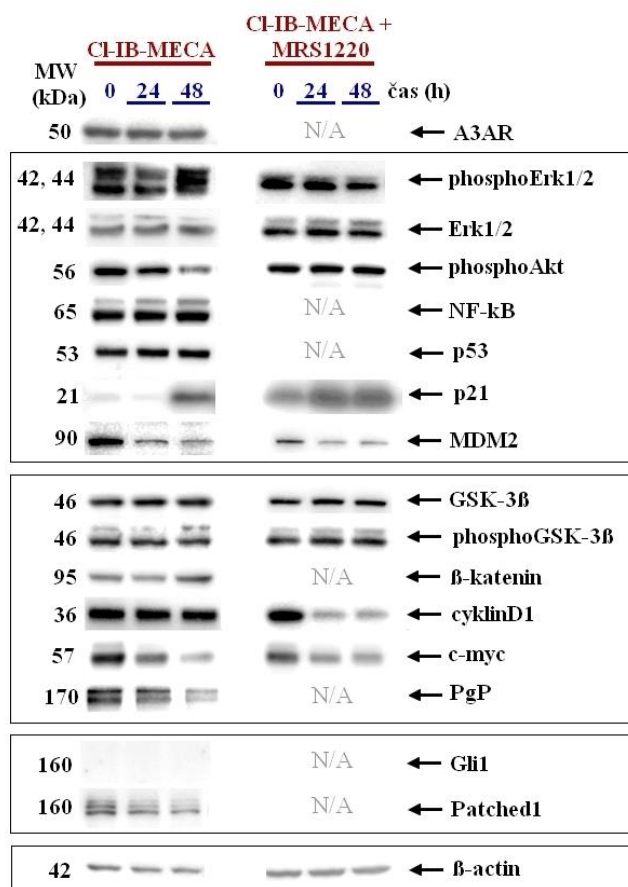
Tab. 5: Tabulka udávající aritmetické průměry procentuálního zastoupení buněk subG1 populace a jejich směrodatné odchylky pro jednotlivé buněčné linie.

Buněčná linie	Koncentrace CI-IB-MECA	Sub G1 populace (%)	
		Průměr	SD
MDA-MB-231	kontrola	4,9	1,6
	20nM	5,4	0,8
	20μM	7,6	1,8
BT-549	kontrola	8,3	0,9
	20nM	7,9	1
	20μM	15,6	1,4
HCT 116	kontrola	3,4	0,5
	20nM	4,4	1,1
	20μM	8,0	0,4
HEP-3B	kontrola	6,5	0,7
	20nM	7,7	0,8
	20μM	9,7	1,7
Jopaca-1	kontrola	5	0,8
	20nM	5	0,9
	20μM	6,8	1,4

4.2 Vliv CI-IB-MECA na vybrané signální dráhy

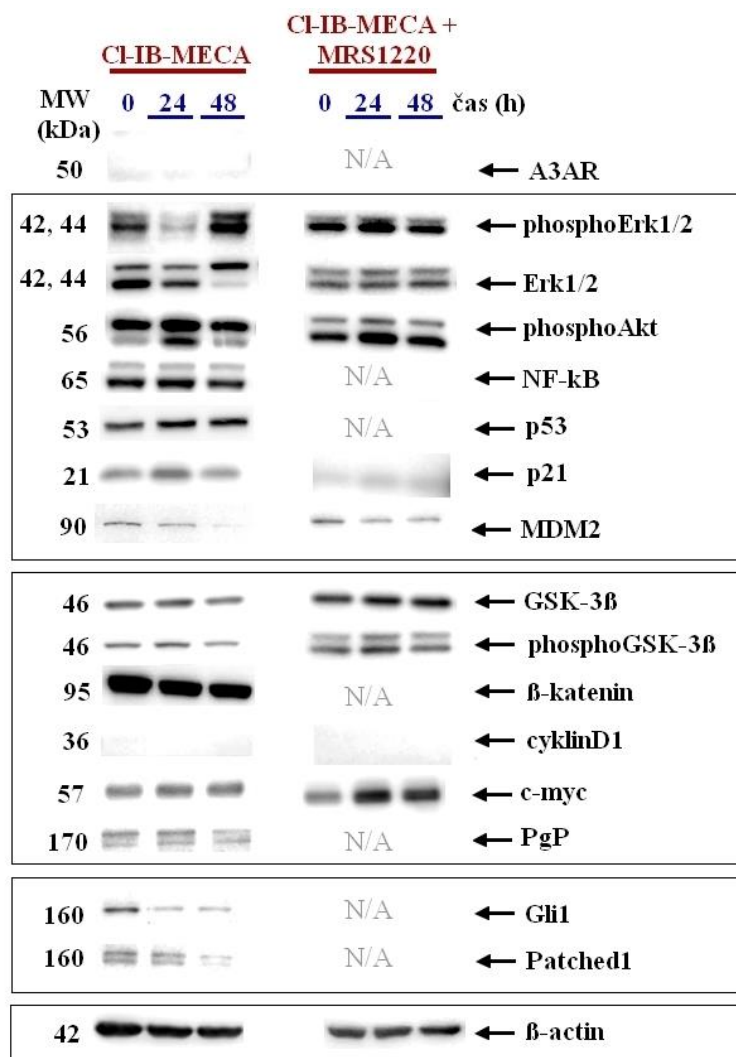
Stimulace A₃AR CI-IB-MECA způsobuje změny v expresi proteinů, které jsou zapojeny do některých signálních drah. Pro vyhodnocení těchto změn byla použita metoda Western Blot, kdy použitím specifických protilátek došlo k vizualizaci vybraných proteinů a následné kvantifikaci jejich exprese. Pro analýzu byly zvoleny vybrané proteiny tří signálních drah: MAPK dráhy, HH dráhy a Wnt dráhy.

V případě buněčné linie MDA-MB-231 (obr. 23) byly při ovlivnění CI-IB-MECA zřetelné změny především u proteinu c-myc, kdy jeho exprese po 24 hodinách ovlivnění klesla o 42 % a po 48 hodinách téměř o 70 %. Při kombinovaném ovlivnění s MRS1220 došlo také ke snížení exprese c-myc, změna však nebyla tak výrazná. CI-IB-MECA také modulovala fosforylaci proteinu Akt, která po 48 hodinách poklesla téměř o 50 %. Tento efekt při současném ovlivnění s MRS1220 pozorovaný nebyl. U proteinu MDM2 již po 24 hodinách docházelo ke snížení koncentrace o více než 60 % a klesající trend zůstal neměnný i po 48 hodinách ovlivnění. Velice podobný efekt byl u MDM2 pozorován i v případě ovlivnění s přídatkem MRS1220. Naopak v případě proteinu p21 po 48 hodinách ovlivnění docházelo k nárůstu jeho koncentrace o více než 85 %, zatímco jeho hladina při kombinovaném ovlivnění zůstala konstatní. Zajímavý fenomén byl také sledován v případě cyklinu D1, kdy při samotné stimulaci CI-IB-MECA nedocházelo k žádné změně v expresi, ale při kombinovaném ovlivnění poklesla hladina cyklinu D1 o 75 %. V neposlední řadě byl rovněž zřetelný úbytek PgP, který po 24 hodinách činil 28 % a po 48 hodinách dokonce 70 %.



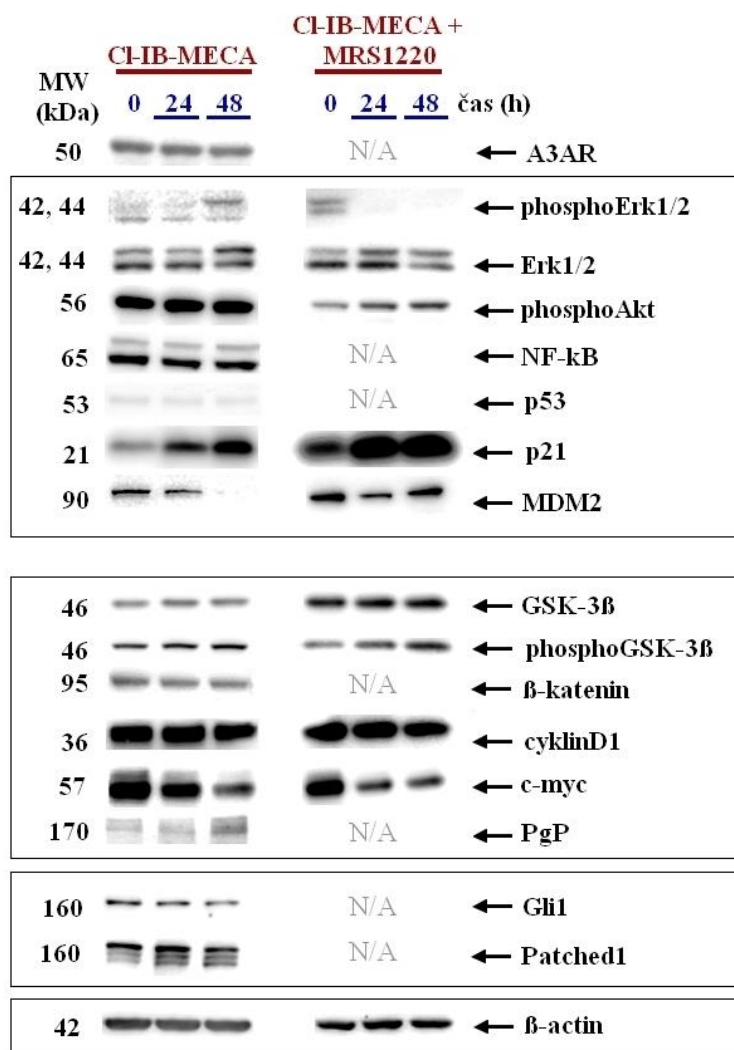
Obr. 23: Změny exprese vybraných proteinů u linie MDA-MB-231. Buňky byly ovlivněny 20μM CI-IB-MECA či jen rozpouštědlem po dobu 24 a 48 hodin. Obrázky membrán jsou reprezentativními vzorky ze dvou opakování.

Buněčná linie BT-549 (obr. 24) vykazovala zřetelnou změnu exprese v případě fosforylované formy proteinu Erk1/2. Po 24 hodinách docházelo k poklesu jeho koncentrace téměř o 60 %, zatímco po 48 hodinách došlo k dodatečnému nárůstu hladiny fosforylované formy. S tímto trendem korelovala změna exprese nefosforylované formy, kdy po 24 hodinách došlo k jejímu nárůstu o 25 % a po 48 hodinách klesla o 60 %. Zajímavý fenomén byl pozorován u proteinu c-myc, jehož koncentrace při ovlivnění CI-IB-MECA zůstávala konstantní, ale při kombinovaném ovlivnění s MRS1220 docházelo k nárůstu hladiny téměř o 50 %. Snížená exprese byla rovněž sledována u proteinu MDM2, kdy po 24 hodinách došlo k poklesu o 25 % a po 48 hodinách dokonce o 80 %. Nižší koncentrace MDM2 byla detekována i při ovlivnění společně s MRS1220, zde však byl úbytek menší a činil po 48 hodinách jen 45 %. V případě linie BT-549 byly také zřejmé změny u proteinů účastnících se HH dráhy, kdy pokles hladiny proteinu Pth1 činil po 48 hodinách 82 % a proteinu Gli téměř 75 %.



Obr. 24: Změny exprese vybraných proteinů u linie BT-549. Buňky byly ovlivněny 20 μ M CI-IB-MECA či jen rozpouštědlem po dobu 24 a 48 hodin. Obrázky membrán jsou reprezentativními vzorky ze dvou opakování.

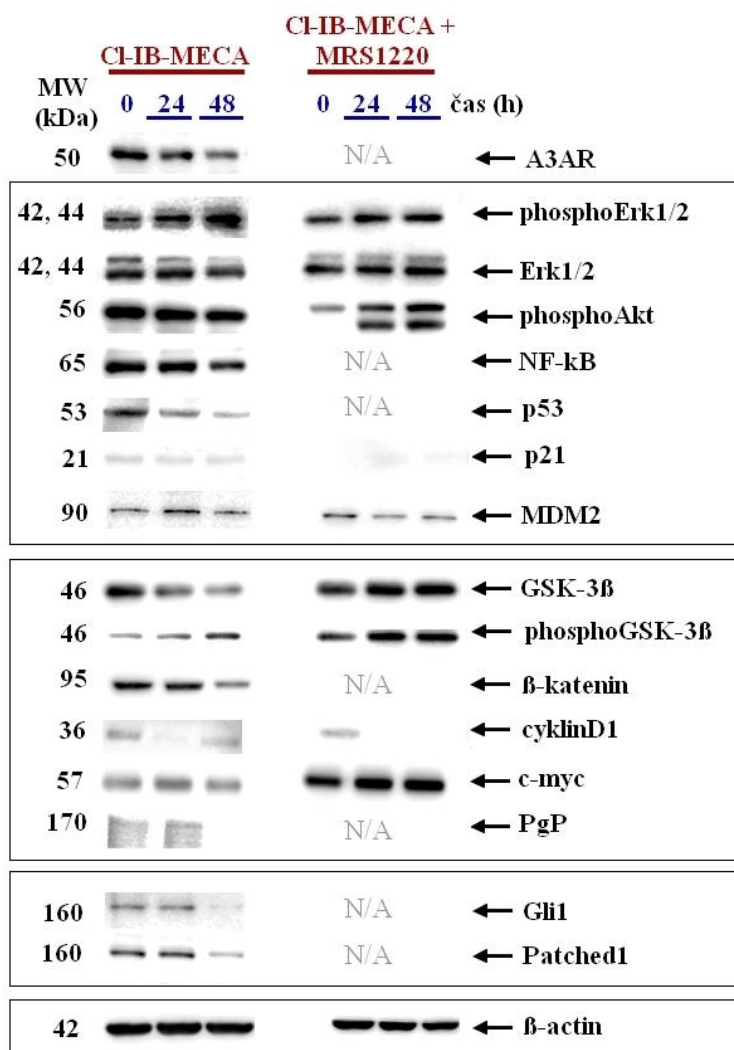
Linie HCT116 (obr. 25) se vyznačovala především změnami v expresi proteinů účastnících se MAPK dráhy, které byly velmi podobné změnám pozorovaným u linie BT-549. Hladina nefosforylované formy Erk1/2 se po 24 hodinách ovlivnění CI-IB-MECA snížila o 37 %, avšak po 48 hodinách se zvýšila 30 % oproti kontrolnímu vzorku. Naopak, při kombinovaném ovlivnění CI-IB-MECA a MRS1220 byla fosforylace Erk1/2 úplně potlačena. Významný trend byl také zřetelný u proteinu c-myc, kdy byla pozorovaná závislost míry exprese na době expozice s CI-IB-MECA. Po 24 hodinách ovlivnění docházelo ke snížení hladiny c-myc o 25 %, po 48 hodinách byl pokles již téměř o 60 %. Stejný efekt byl pozorovaný při současném ovlivnění s MRS1220, kdy opět docházelo k poklesu exprese c-myc (55 %), avšak v tomto případě nebyla natolik zřetelná závislost na době vystavení CI-IB-MECA. Zvýšení exprese bylo znatelné také u proteinu p21, kdy se během 24 hodin ovlivnění jeho hladina zvýšila o 52 % a po 48 hodinách dokonce o 63 %. Tento efekt byl stejný při kombinovaném ovlivnění, kdy hladina p21 vzrostla o 42 %. Zároveň docházelo ke snížení produkce MDM2, kdy po 24 hodinách jeho hladina klesla o 37 % a po 48 hodinách dokonce o 90 %.



Obr. 25: Změny exprese vybraných proteinů u linie HCT116. Buňky byly ovlivněny 20μM CI-IB-MECA nebo rozpouštědlem po dobu 24 a 48 hodin. Obrázky membrán jsou reprezentativními vzorky ze dvou opakování.

U buněčné linie HEP-3B (obr. 26) byly nejvýraznější změny pozorované v případě proteinů účastnících se HH dráhy. Hladina proteinu Ptch1 vykazovala po 48 hodinách ovlivnění CI-IB-MECA úbytek o 70 %, což velmi dobře korelovalo s expresí transkripčního faktoru Gli1, jehož koncentrace se po 48 hodinách rovněž snížila o 70 %. Zároveň byly zřetelné změny na molekulách účastnících se MAPK dráhy, kdy docházelo k silnější fosforylaci proteinu Erk1/2, která byla po 24 hodinách ovlivnění CI-IB-MECA vyšší o 24 % a po 48 hodinách dokonce o 47 %. Opačný trend byl pozorován v případě fosforylace Akt, kdy po 48 hodinách došlo k poklesu téměř o 30 %. V případě nefosforylované formy proteinu GSK-3β byl zřetelný pokles již po 24 hodinách, kdy jeho hladina klesla o 42 % a po 48 hodinách dokonce o 63 %. S tím opět koreluje exprese fosforylované formy GSK-3β, která byla po 48 hodinách ovlivnění CI-IB-MECA 2x vyšší než v kontrolním vzorku. S tímto trendem souvisel pokles β-kateninu, jehož úbytek po 24 hodinách ovlivnění činil 15 % a po 48 hodinách téměř 62 %. Zajímavý byl rovněž efekt pozorovaný u cyklinu D1, kdy při ovlivnění pouze CI-IB-MECA docházelo po 24 hodinách k 55 % úbytku jeho koncentrace, zatímco po 48 hodinách byla jeho exprese úplně obnovena.

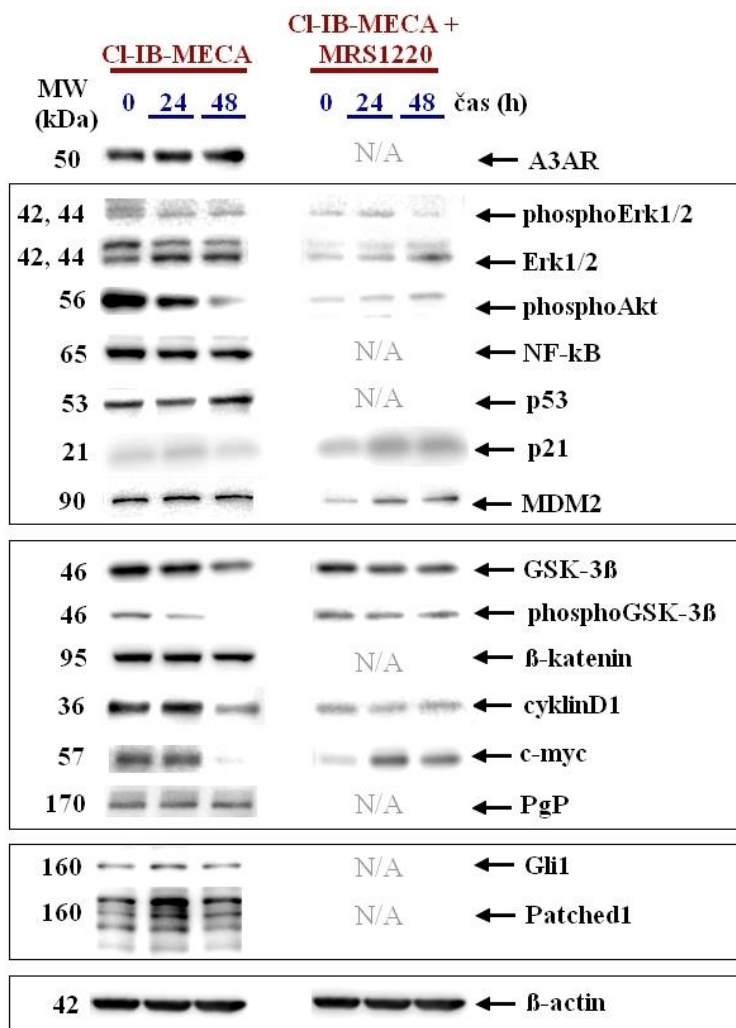
V případě současného ovlivnění CI-IB-MECA a MRS1220 však docházelo k úplné inhibici exprese cyklinu D1. Mimo jiné také docházelo u linie HEP-3B po 48 hodinách ovlivnění CI-IB-MECA k poklesu exprese PgP (obr. 26).



Obr. 26: Změny exprese vybraných proteinů u linie HEP-3B. Buňky byly ovlivněny 20μM CI-IB-MECA nebo rozpouštědlem po dobu 24 a 48 hodin. Obrázky membrán jsou reprezentativními vzorky ze dvou opakování.

V případě buněčné linie Jopaca-1 (obr. 27) byly nejvýraznější změny sledovány u fosforylace Akt. Po 24 hodinách ovlivnění CI-IB-MECA byla exprese phosphoAkt o 30 % menší a po 48 hodinách dokonce o 80 % nižší oproti kontrole. Tento efekt byl při ovlivnění společně s MRS1220 úplně inhibován. Dalším proteinem, jehož exprese byla významně snížena, byl c-myc. Zde koncentrace po 24 hodinách ovlivnění klesla o pouhých 12 %, avšak po 48 hodinách byl úbytek již 88 %. Zajímavé je, že při použití MRS1220 byl trend opačný a hladina c-myc naopak vzrostla o 75 %. Významné změny byly rovněž pozorovány u proteinů účastnících se Wnt signální dráhy, kdy u nefosforylované formy GSK-3β docházelo po 48 hodinách ovlivnění CI-IB-MECA ke 46 % úbytku. Ještě více byl tento efekt zjevný u fosforylované formy GSK-3β, kde byl již po 24 hodinách zřejmý úbytek o více než 55 % a po 48 hodinách nebyla fosforylovaná GSK-3β produkována vůbec. Oba tyto efekty byly při současném

použití Cl-IB-MECA a MRS1220 potlačeny. Nižší exprese po byla po 48 hodinách zřetelná i v případě cyklinu D1, kdy došlo k poklesu jeho hladiny o 52 % oproti kontrolnímu vzorku.



Obr. 27: Změny exprese vybraných proteinů u linie Jopaca-1. Buňky byly ovlivněny 20μM Cl-IB-MECA nebo rozpouštědlem po dobu 24 a 48 hodin. Obrázky membrán jsou reprezentativními vzorky ze dvou opakování.

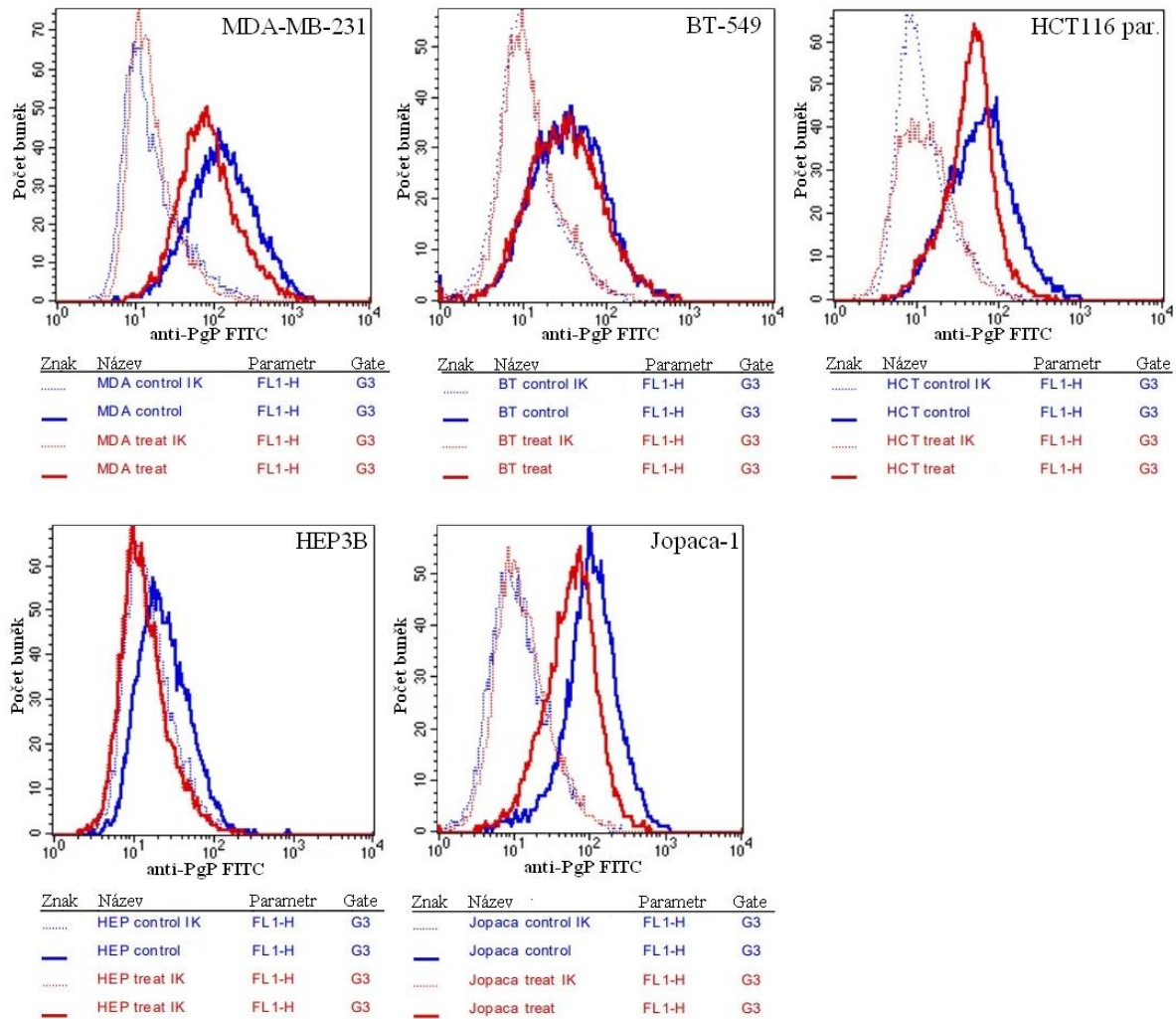
4.3 Vliv Cl-IB-MECA na MDR

Změna exprese PgP po ovlivnění Cl-IB-MECA byla detekována metodou Western Blot. Pro specifičtější popis těchto efektů byla provedena analýza jeho exprese po ovlivnění Cl-IB-MECA metodou průtokové cytometrie. Dalším experimentem bylo vyhodnocení inhibičního efektu Cl-IB-MECA na PgP pomocí funkčního testu s DNC, kdy po ovlivnění agonistou docházelo k inhibici efluxu DNC z buňky.

4.3.1 Stanovení exprese PgP průtokovou cytometrií

Výsledky metody WB ukázaly, že ovlivněním Cl-IB-MECA dochází u některých linií ke snížení exprese PgP. Pro ověření této teorie byla jejich exprese stanovena i průtokovou cytometrií použitím specifické protilátky vázající se na PgP. Po ovlivnění Cl-IB-MECA byl u všech buněčných linií

pozorován posun mediánu fluorescenční intenzity (MFI) indikující změnu exprese PgP (obr. 28). Nejvýznamnější byl posun u linie MDA-MB-231, kdy byl poměr mediánů kontroly 1,6× vyšší, než poměr mediánů u ovlivnění CI-IB-MECA. Významný posun byl rovněž u linie Jopaca-1, kdy byl poměr mediánu kontroly 2× vyšší než u ovlivnění (tab. 6).



Obr. 28: Změna exprese PgP. Metodou průtokové cytometrie byla měřena míra exprese PgP. Tečkovanou čarou jsou vyznačeny izotypové kontroly, plnou čarou jsou označeny vzorky detekující expresi PgP. Modrou barvou jsou pak znázorněny kontrolní vzorky ovlivněné pouze rozpouštědlem, zatímco červeně jsou vyobrazeny vzorky po ovlivnění CI-IB-MECA. Výsledné hodnoty mediánů fluorescenční intenzity jsou aritmetickým průměrem ze dvou nezávislých opakování. Uvedené histogramy jsou reprezentativním vzorkem.

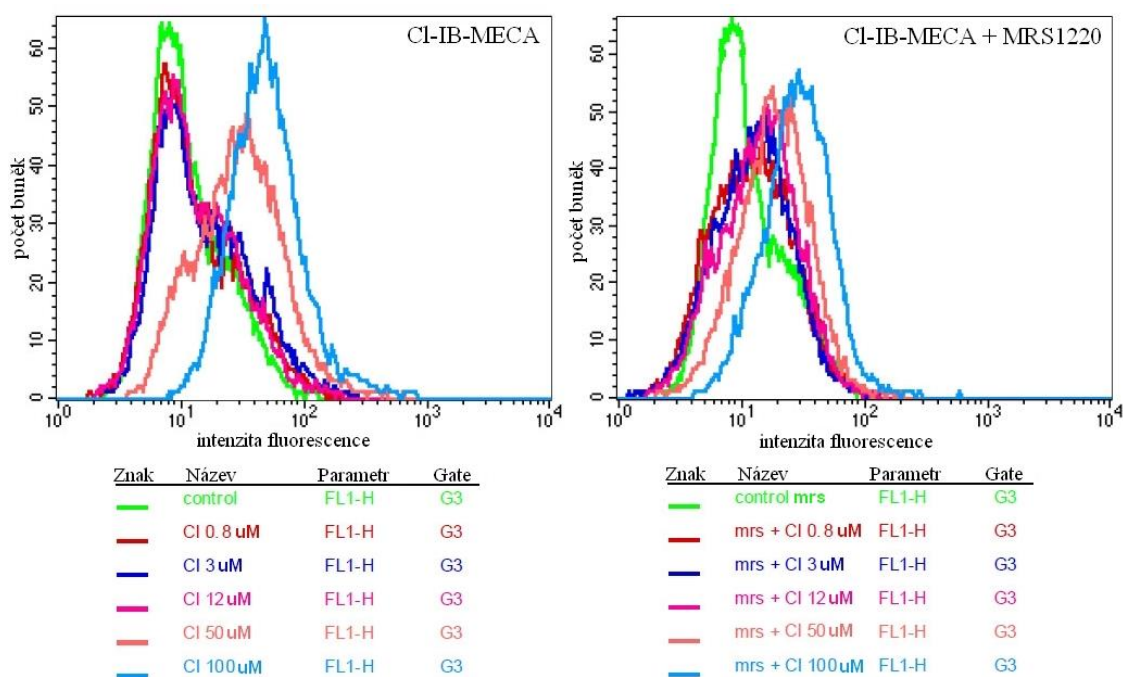
Tab. 6: Poměry MFI pro kontrolní vzorky a pro vzorky po ovlivnění 50 μ M CI-IB-MECA.

linie	IK kontrola	kontrola	Poměr vzorek/IK			
K562/Tax	11,76	102,74	8,7			
CEM	11,86	17,15	1,4			
	IK kontrola	kontrola	Poměr vzorek/IK	IK CI-IB-MECA	CI-IB-MECA	Poměr vzorek/IK
MDA-MB-231	10,86	117,57	10,8	10,95	75,67	6,9
BT-549	10	33,38	3,3	10,8	29,96	2,8
HCT116	10,27	57,25	5,6	10,24	44,11	4,3
HEP-3B	10,14	21,10	2	11,86	17,62	1,5
Jopaca-1	10,46	99,10	9,5	11,55	54,74	4,7

4.3.2 Funkční test s daunorubicinem

Inhibiční efekt CI-IB-MECA byl detekován metodou průtokové cytometrie na buněčné linii s MDR fenotypem K562/Tax, kdy byl zřetelná závislost střední hodnoty intenzity fluorescence na použité koncentraci CI-IB-MECA. Při ovlivnění buněk CI-IB-MECA o dobu 60 minut v koncentracích 0,781, 3,125 a 12,5 μ M nebyla zřetelná žádná změna střední hodnoty intenzity fluorescence, u koncentrace 50 μ M a výše byl již zřejmý posun píku (obr. 29, tab. 7). Významná změna signálu pak byla zaznamenána u koncentrace 100 μ M, kdy došlo k posunu píku téměř o půlku řádu oproti kontrolnímu vzorku.

Při kombinovaném ovlivnění CI-IB-MECA a 0,1 μ M MRS1220 byl trend podobný, jako při ovlivnění pouze CI-IB-MECA, tedy i zde byla zřejmá závislost míry intenzity fluorescence na použité koncentraci. Posun MFI zde však nebyl tak velký, jako při působení samotného agonisty.



Obr. 29: Posun MFI po ovlivnění koncentrační řadou CI-IB-MECA a kombinovaném ovlivnění s MRS1220.

Tab. 7: Změny MFI po ovlivnění CI-IB-MECA a kombinovaném ovlivnění s MRS1220.

	MFI	
kontrola	9,91	
MRS1220	12,63	
CyA	20,91	
Koncentrace CI-IB-MECA (μM)	MFI CI-IB-MECA	MFI MRS1220 + CI-IB-MECA
0,781	10,55	11,65
3,125	12,52	12,30
12,5	10,94	13,95
50	28,64	18,11
100	45,73	27,63

5 Diskuze

V předložené diplomové práci jsem se zabývala vlivem selektivního agonisty A₃AR na vybrané nádorové linie. Strukturní motiv a funkce A₃AR byly v minulosti intenzivně zkoumány několika výzkumnými skupinami a jejich znalost částečně odhalila mechanismy, kterými receptor působí na širokou škálu signálních drah. Nicméně, tyto výsledky se mnohdy odlišují v závislosti na použitých látkách s agonistickou aktivitou vůči A₃AR a stanovených podmínkách u experimentů. Pro stanovení uceleného mechanismu účinku je nutné charakterizovat efekty u specifického agonisty na různých buněčných modelech a tyto výsledky porovnat s již provedenými experimenty. Předchozí výzkumy na Ústavu Molekulární a Translační medicíny v Olomouci (ÚMTM) byly věnovány vysokokapacitními screeningu látek s potenciální aktivitou vůči všem typům adenosinových receptorů, včetně podtypu A₃. S ohledem na výsledky těchto výzkumů a jejich porovnání s již zveřejněnými články byla pro účely této diplomové práce vybrána látka N⁶-(3-jodobenzyl)-adenosin-5'-N-methyluronamid (Cl-IB-MECA), která působí jako agonista A₃AR. Tato látka při experimentech vykazovala vysokou afinitu vůči A₃AR (K_i = 0,33nM) a zároveň byla vysoce selektivní pro tento podtyp. Dalším důvodem pro volbu této látky je její použití v klinických testech jako potenciálního léčiva proti hepatocelulárnímu karcinomu a chronické hepatitidě typu C. (122)

V experimentální části diplomové práce bylo pro studium efektů Cl-IB-MECA vybráno 5 buněčných linií. V minulých letech byl na ÚMTM proveden výzkum na 35 nádorových i nenádorových liniích určující expresi A₃AR. Na základě této studie byly pro účely diplomové práce zvoleny linie MDA-MB-231, HCT 116 parental, HEP-3B a Jopaca-1 s vysokou expresí A₃AR a BT-549, které vykazovaly velmi nízkou, až nulovou expresi. Většina těchto linií byla zároveň v minulosti zahrnuta v literatuře věnující se efektům různých agonistů působících na adenosinové receptory. (33) (131) (132) Tyto studie deklarovaly u testovaných linií inhibici proliferace a navození apoptózy při použití agonistů selektivních na A₃AR. Zároveň byly popsány změny exprese vybraných proteinů účastnících se Wnt, MAPK a Hedgehog signálních drah. (33) (40) I z tohoto důvodu byly tyto dráhy a změny v jejich průběhu po ovlivnění Cl-IB-MECA podrobněji analyzovány v předložené diplomové práci. Důraz byl při experimentech věnován studiu exprese nadřazených efektorů fosforylujících stěžejní transkripční faktory daných drah.

Pro stanovení cytotoxického efektu Cl-IB-MECA byla provedena série experimentů, které se zaměřovaly především na změny v buněčném cyklu a apoptóze. Pilotním testem stanovujícím inhibiční konstanty IC₅₀, byl MTS test, který je na ÚMTM běžně využíván při velkokapacitním screeningu nových chemických derivátů. Mnoho studií používalo při ovlivnění buněk Cl-IB-MECA kultivační médium s redukováným, či nulovým obsahem fetálního séra, proto jsme se k tomuto kroku rozhodli přistoupit i v této práci a při MTS testu i při dalších experimentech byla použita poloviční koncentrace séra než při kultivaci.

Linie HCT116 parental je na ÚMTM součástí skupiny buněčných linií standardně určených pro primární screening nových chemických derivátů. U ostatních linií musely být optimalizovány podmínky pro experiment a poté bylo provedeno samotné měření. U všech linií s vysokou expresí A₃AR se hodnota IC₅₀ pohybovala v rozmezí 13–24 μM. Zajímavým úkazem byly výsledky u linie BT-549, která vykazuje nulovou přítomnost A₃AR, nicméně u ní byla naměřena ještě nižší hodnota IC₅₀ (12,48 μM), než u linií s vysokou expresí A₃AR. To znamená, že na tuto linii působila Cl-IB-MECA nejefektivněji a způsobovala nejintenzivnější inhibici proliferace. Jedním z možných vysvětlení tohoto fenoménu by mohla být přítomnost NTs. Podobný fenomén byl pozorovaný u buněčné linie NPA odvozené od karcinomu štítné žlázy. V tomto případě byly před ovlivněním buněk Cl-IB-MECA použity selektivní antagonisté všech podtypů adenosinových receptorů. Po ovlivnění bylo zjištěno, že cytostatický efekt Cl-IB-MECA zůstal beze změny. Byla proto testována hypotéza, že je Cl-IB-MECA transportována do buňky pomocí NT, které byly pro účely experimentu také zablokovány. Opět však nebyla zřejmá významná změna. Na základě těchto výsledků bylo navrženo, že by cytostatický efekt mohl být způsoben neznámým intracelulárním mechanismem, ve kterém Cl-IB-MECA hraje roli jako druhotný posel v signalizační kaskádě nezávislé na NT a AdoRs. (130) Podobné výsledky byly pozorovány i u leukemických buněk HL-60. Navzdory zablokování A₃AR jeho antagonistou docházelo u buněk po ovlivnění Cl-IB-MECA k zastavení proliferace a k aktivaci kaspázy 3, poly(ADP-riboza)-polymerázy (PARP) a Fas, které jsou markery probíhající apoptózy. Toto zjištění vedlo k teorii, že cytostatický efekt probíhá jiným mechanismem než prostřednictvím AdoRs. (133) Podobný efekt, jako jsme pozorovali u linie BT-549, byl pak detekován na buňkách prsního karcinomu MCF-7, které vykazují velice nízkou expresi A₃AR. (134) Při ovlivnění MCF-7 selektivním agonistou IB-MECA byly pozorovány antiproliferační efekty. Z toho vyplývá, že dráha spouštěná A₃AR není primárním mechanismem, který u této linie způsobuje zastavení buněčného dělení.

Výše uvedená data ukazují, že při MTS testu hodnota IC₅₀ pro Cl-IB-MECA oscilovala okolo hodnoty 20 μM. Pro zjednodušení jsme tuto hodnotu zvolili jako výchozí koncentraci pro všechny buněčné linie při dalších experimentech. Jako druhá koncentrace byla zvolena koncentrace 20 nM Cl-IB-MECA. Při cytometrické analýze jsme pozorovali, zda při ovlivnění Cl-IB-MECA dochází k významným změnám na buněčném cyklu, apoptóze a míře mitózy. Literatura uvádí, že u některých buněčných linií byla při použití Cl-IB-MECA zřetelná kumulace buněk v G1 fázi a redukováná exprese cyklinu D1, což by indikovalo zastavení buněčného cyklu v G1/S kontrolním bodě. (130) Podobné výsledky, kdy docházelo k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi byly popsány u dalších selektivních agonistů pro podtyp A₃, IB-MECA a thio-Cl-IB-MECA. (135) (136) Naše výsledky ukázaly, že při 24hodinovém ovlivnění 20 μM Cl-IB-MECA dochází u všech buněčných linií s vysokou expresí A₃AR k nárůstu počtu buněk v G1 fázi, což odpovídá i výsledkům popsaným autory Morello et al. (2008). (130) U linie BT-549, která nevykazuje expresi A₃AR nedocházelo k žádným výrazným změnám v jednotlivých fázích cyklu. V případě ovlivnění buněk 20 nM Cl-IB-MECA nedocházelo

k významným změnám u buněčného cyklu. Lze tedy konstatovat, že cytostatický efekt CI-IB-MECA zesiluje v koncentrační závislosti.

Společně se změnami na buněčném cyklu jsme analyzovali i míru buněčné smrti a inhibici mitózy. Při našem experimentu jsme zároveň chtěli otestovat teorii od Abbraccio et al. (2001), jejichž výzkum vykazoval opačné efekty při ovlivnění nanomolární (podpora proliferace) a mikromolární koncentrací CI-IB-MECA (navození apoptózy). (137) Z literatury je známo, že CI-IB-MECA v mikromolárních koncentracích způsobuje kondenzaci chromatinu a fragmentaci DNA, která je spojována s apoptózou. (119) Zároveň je popisována zvýšená exprese pro-apoptotického proteinu kaspázy 3. (138) (139) Při ovlivnění 20nM CI-IB-MECA naše výsledky neukazovaly žádný zásadní rozdíl počtu buněk v subG1 fázi oproti kontrolním vzorkům. Při mikromolárním ovlivnění byl však pozorován nárůst buněk v subG1 fázi indikující buněčnou smrt. Tento nárůst byl u linií s vysokou expresí A₃AR průměrně 3 %, nejednalo se tedy o žádnou významnou změnu. U linie BT-549 oproti tomu bylo detekováno více než dvojnásobné zvýšení apoptotických buněk. Jak však bylo uvedeno v případě MTS testu, CI-IB-MECA může působit i nezávisle na receptoru a vykazovat antiproliferační efekty i u linií s nulovou expresí A₃AR. (130) (134) Zvyšující se míra apoptózy souvisela i s klesající fosforylací histonu H3, která indikuje mitózu. Ani zde však nebyl u 20nM koncentrace významný rozdíl. Naopak, s narůstající koncentrací CI-IB-MECA byla fosforylace histonu H3 omezována a v průměru docházelo téměř u všech buněčných linií v polovičním poklesu počtu buněk, u kterých probíhala mitóza. (140) Lze tedy shrnout, že CI-IB-MECA vyazuje antiproliferační a cytotoxické efekty a při mikromolárních množstvích podporuje apoptózu u nádorových linií v koncentrační závislosti. Naše výsledky rovněž nebyly v souladu s výzkumem Abbraccio et al. (2001), kdy při ovlivnění 20nM nedocházelo ke zvýšené fosforylaci histonu H3 a k podpoře mitózy.

Mnoho autorů popsalo vliv CI-IB-MECA na průběh signálních drah a expresi jejich příslušných proteinů. (40) (127) (130) (131) V této práci jsme se zaměřili především na proteiny účastnící se Wnt dráhy, MAPK dráhy a Hedgehog signální dráhy. Zatímco změny exprese proteinů Wnt a MAPK drah po působení CI-IB-MECA byly v literatuře popsány dost podrobně, Hedgehog dráze je věnováno jen velice málo studií. Naše výsledky ukazovaly zajímavé změny v expresi proteinů všech tří zmiňovaných drah. U linie MDA-MB-231 byl v minulosti proveden výzkum, kdy bylo zjištěno, že po ovlivnění CI-IB-MECA dochází ke snížení exprese Erk1/2 a proteinů HH dráhy, Ptch a Smo. (33) Naše výsledky však udávají, že nejvýraznějšími efekty byly pokles fosforylace Akt, snížení exprese c-myc a zvýšení produkce p21 proteinu. V minulosti byl v literatuře popsán vliv c-myc na buněčný cyklus, kdy autoři navrhovali, že c-myc podněcuje zahájení exprese pozitivních regulátorů buněčného cyklu. (141) Zároveň vyslovili teorii, že inaktivace nebo deregulace c-myc způsobuje omezení produkce proteinů nezbytných pro progresi buněčného cyklu a dochází tak k jeho zastavení. Mezi tyto proteiny patří například cykliny A, B, E a D nebo transkripční faktory E2F, rovněž regulující buněčný cyklus. Další autoři zmiňují, že při snížení exprese c-myc dochází u některých buněčných linií k bloku buněčného cyklu v G₀/G₁ fázi. (142) Tento efekt podporuje teorie od Claassen et al. (2000) kteří uvedli, že

při snížení exprese c-myc dochází ke zvyšování hladiny negativního regulátoru buněčného cyklu, proteinu p21. (143) Naše naměřená data se shodují se všemi teoriemi zmíněných autorů, proto lze předpokládat, že kumulace buněk v G1 fázi je zapříčiněna právě sníženou hladinou c-myc a následnou sníženou expresí proteinů nutných pro přechod mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu. Autoři také zmiňují pokles koncentrace cyklinu D1, která byla v našem případě pozorována pouze při kombinovaném ovlivnění s MRS1220, kdežto při ovlivnění pouze CI-IB-MECA zůstává hladina cyklinu D1 beze změny. Vzhledem k tomu, že docházelo k zablokování A₃AR jeho antagonistou je pravděpodobné, že vliv na expresi cyklinu D1 byl nezávislý na receptoru a ke snížení jeho hladiny docházelo jiným způsobem, než prostřednictvím c-myc. Otázkou rovněž i zůstává, která signální dráha je primární pro deregulaci hladiny c-myc. V literatuře je uvedeno, že snížená hladina c-myc může být ovlivněna deregulací PI3K/Akt signální dráhy, kdy nízká koncentrace c-myc v kombinaci se sérovou deprivací způsobili inaktivaci PI3K, což mělo za následek snížení fosforylace Akt. (144) Lze tedy předpokládat, že u linie MDA-MB-231 vlivem CI-IB-MECA dochází k inhibici PI3K/Akt dráhy, což má za následek snížení fosforylace Akt a redukci c-myc, která vede k zastavení buněčného cyklu. Toto tvrzení je však v rozporu s výzkumem Jafari et al. (2017). (33) Lze spekulovat, že rozdílné výsledky mohly být způsobeny vyšší koncentrací CI-IB-MECA, než použili autoři, a proto efekty v našem výzkumu mohly být zprostředkovány odlišným mechanismem.

Vzhledem k tomu, že linie BT-549 neexprimuje A₃AR, nebyl dosud publikován žádný článek týkající se vlivu CI-IB-MECA na danou linii. Při ovlivnění zde však byly zřejmé změny exprese proteinů HH dráhy, tedy Ptch1 a Gli. Literatura uvádí změny v HH dráze po použití CI-IB-MECA u jiných buněčných linií odvozených od prsního karcinomu, MDA-MB-231 a MCF-7. (33) Linie MCF-7, stejně jako BT-549, vykazuje velice nízkou expresi A₃AR. Přesto u ní po ovlivnění CI-IB-MECA docházelo ke snížení hladiny proteinů Smo a Gli1, stejně jako fosforylované formy proteinu Erk1/2. (33) Tato data se shodují s našimi výsledky, kdy po 24 hodinách docházelo k poklesu Gli a Ptch1 a zároveň byla zřejmá snížená fosforylace Erk1/2. Jak bylo pozorováno dříve, efekt CI-IB-MECA může být zprostředkován nezávisle na A₃AR, takže lze usuzovat, že snížení proteinů účastnících se HH dráhy je rovněž způsobeno jiným mechanismem. Zajímavý je však fakt, že po 48 hodinách ovlivnění docházelo k ustálení hladiny fosforylované formy Erk1/2, zatímco exprese Gli a Ptch1 ještě více klesla.

V případě linie HCT116 byly efekty vyvolané CI-IB-MECA velmi podobné těm, které byly pozorované v případě linie MDA-MB-231. I zde byl zřetelný pokles koncentrace proteinu c-myc, která souvisí se zvýšenou hladinou p21. U této linie však nebyla pozorovaná žádná změna na fosforylaci Akt, je tedy pravděpodobné, že mechanismus úbytku c-myc probíhá rozdílným mechanismem. Ačkoliv efekty CI-IB-MECA prozatím nebyly na linii HCT116 popsány, Gesii et al. (2007) provedli výzkum na buněčných liniích odvozených od karcinomu kolorekta, DLD-1, HT-29 a Caco-1. Jejich data ukázala, že po aplikaci CI-IB-MECA docházelo ke zvýšené fosforylaci Erk1/2. Tato změna byla velmi rychlá a již po hodině se hladina Erk1/2 ustálila téměř na původní, kontrolní hodnotě. (145) I toto může být jeden z důvodů, proč není zvýšená fosforylace Erk1/2 v našem případě tak jednoznačná. Z tohoto

výzkumu lze předpokládat, že by u linie HCT116 mohla být při stimulaci A₃AR zapojena MAPK dráha. Co je však v rozporu s touto teorií, je nízká exprese c-myc. V případě, že by CI-IB-MECA u linie HCT116 působila na MAPK dráhu, zároveň s redukcí c-myc by docházelo i ke snížení fosforylace právě Erk1/2. Zajímavé je, že ačkoliv pozorovaný efekt není znatelný u ovlivnění samotnou CI-IB-MECA, v případě kombinovaného ovlivnění s MRS1220 není fosforylovaná forma Erk1/2 produkována vůbec. Vedle zvýšené hodnoty p21 byl u HCT116 zřejmý pokles proteinu MDM2. Tento fenomén popsali autoři Zhang et al. (2004), kdy v jejich výzkumu uvedli, že nadměrná exprese MDM2 způsobovala degradaci p21 nezávislou na p53 a ubikvitinaci. (146) Vzhledem k tomu, že u linie HCT116 nebyla pozorovaná žádná změna exprese p53 proteinu, dá se předpovídat, že by tento mechanismus mohl být u HCT uplatňován. Stejným mechanismem by rovněž zvýšená exprese p21 mohla ovlivňovat hladinu MDM2 u předchozí linie, MDA-MB-231.

CI-IB-MECA byla zahrnuta do klinického testování díky jejím slibným účinkům při léčbě hepatocelulárního karcinomu. (122) Efektům na HEP-3B nádorových buňkách uměle aplikovaných modelovým myším se věnoval výzkum od Cohen et al. (2011). Jejich výsledky ukázaly, že při ovlivnění myši CI-IB-MECA dochází ke snížení koncentrace NF-κB a k omezení průběhu signální dráhy PI3K/Akt. Při analýze mechanismu apoptózy naopak odhalili zvýšenou expresi pro-apoptotického proteinu kaspázy-3. V našem případě buňky HEP-3B vykazovaly zajímavé efekty u proteinů účastnících se vícera drah, lze tedy polemizovat, že v případě této linie dosahuje CI-IB-MECA jejích efektů několika způsobů. Jedním z efektů bylo výrazné snížení exprese proteinů HH dráhy, Gli a Ptch. Autoři Jafari et al. (2017) popsali, že při ovlivnění buněčných linií odvozených od prsního karcinomu dochází ke snížení exprese Smo a Gli1. (33) Naše výsledky ukazují, že u linie HEP-3B lze po ovlivnění CI-IB-MECA pozorovat pokles transkripčního faktoru Gli1. S tím souvisí i snížení exprese Ptch, který je cílovým genem pro Gli. (147) Dalšími proteiny, jejichž hladina pod vlivem CI-IB-MECA klesá, byly β-katenin a hladina celkové GSK-3β. S tímto byla spojována i rostoucí fosforylace GSK-3β. Zároveň s β-kateninem klesala i koncentrace cyklinu D1. Tyto výsledky napovídají, že při ovlivnění docházelo k inhibici Wnt signální dráhy. Zvyšující se fosforylace GSK-3β však tomuto tvrzení odporuje. Zajímavý je jev, že při kombinovaném ovlivnění CI-IB-MECA dochází k úplnému zastavení exprese cyklinu D1, aniž by docházelo ke změnám na obou formách GSK-3β. Za zmínku rovněž stojí fakt, že pod vlivem CI-IB-MECA také dochází ke zvýšené fosforylaci Erk1/2.

U poslední linie, Jopaca-1, nebyl dosud publikován žádný výzkum zaměřující se na vliv agonisty A₃AR na její signální dráhy. Vzhledem k tomu, že se u linie vyskytuje velmi vysoká exprese A₃AR, bylo by určitě užitečné zaměřit se na efekty zprostředkované různými adenosinovými deriváty. V našem případě byly u Jopaca-1 pozorované velice podobné efekty, jako u linií MDA-MB-231 a HCT116. I zde při ovlivnění CI-IB-MECA byl znatelný pokles c-myc doprovázený sníženou fosforylací Akt. Jak již bylo popsáno u předchozích linií, klesající exprese c-myc může být zprostředkována deregulací PI3K/Akt dráhy, kdy je PI3K inaktivována, což vede ke snížení fosforylace Akt a tím ke snížení c-myc. (144) Tento efekt byl u linie Jopaca-1 úplně potlačen při kombinovaném ovlivnění s MRS1220

a docházelo zde dokonce k vyšší produkci c-myc než u kontrolního vzorku. Můžeme tedy předpokládat, že deregulace PI3K/Akt dráhy probíhající u Jopaca-1 je závislá na přítomnosti A₃AR. Další vysvětlení, které by mohlo objasnit klesající fosforylaci Akt a sníženou expresi c-myc, je uvedeno ve článku od Fishman et. al (2002). Autoři zde udávají, že v buňkách melanomu docházelo po ovlivnění IB-MECA ke snížené fosforylaci PKA a Akt. Tento fenomén měl za následek snížení fosforylované formy GSK-3 β , zatímco jeho nefosforylovaná forma naopak narůstala. PKA a GSK-3 β jsou jedněmi z hlavních nadřazených proteinů Wnt signální dráhy, autoři tedy předpokládali, že při ovlivnění IB-MECA je tato dráha inaktivována. Inhibice PKA a fosforylace GSK-3 β poté způsobovala pokles cyklinu D1 a c-myc. (77) Podobných výsledků dosáhli i autoři Lee et al. (2005), kteří pozorovali při ovlivnění buněčné linie HL-60 odvozené od promyelocytické leukemie snížení fosforylace Akt a GSK-3 β . V tomto případě byl použit analog Cl-IB-MECA se substitucí na ribózovém kruhu, thio-Cl-IB-MECA. (124) Ačkoliv se tato data netýkají přímo Cl-IB-MECA, jsou v souladu s našimi výsledky. U linie Jopaca-1 byl zřetelný již zmiňovaný pokles phosphoAkt a zároveň i pokles fosforylace GSK-3 β . Zároveň docházelo i ke snížení exprese cílových proteinů Wnt dráhy, c-myc a cyklinu D1. U kombinovaného ovlivnění s MRS1220 se tyto jevy vůbec nevyskytovaly. Lze tedy shrnout, že efekty projevující se po ovlivnění Jopaca-1 pomocí Cl-IB-MECA jsou závislé na A₃AR a projevují se inhibicí PI3K/Akt dráhy společně s Wnt signální dráhou.

V další fázi výzkumu jsme se věnovali identifikaci vlivu Cl-IB-MECA na expresi PgP a na obnovení senzitivity u buněčné linie se získanou vícečetnou rezistencí na Taxol. Literatura popisuje efekty Cl-IB-MECA na buněčnou linii K562/Dox, rezistentní na Doxorubicin. Výzkum ukázal, že u parentální linie K562 je cytotoxický vliv Cl-IB-MECA významně vyšší než u její rezistentní formy, ačkoliv obě linie vykazovaly vysokou hladinu A₃AR. Tento jev naznačuje, že u rezistentní formy linie K562 probíhá eflux Cl-IB-MECA z buňky a slouží tedy jako substrát pro PgP. (119) Podobnou teorii, že někteří agonisté pro A₃AR mohou modulovat aktivitu PgP podpořil článek od Biebele et al. (2019), kdy některé sloučeniny interagovaly s PgP a dokonce omezily eflux cytostatik z buňky. (148) Další studie navíc odhalily, že aktivita PgP je řízena především Wnt signální dráhou, jejíž aktivace hraje hlavní roli při regulaci exprese PgP. (113) Literatura uvádí, že Cl-IB-MECA je významným regulátorem Wnt signální dráhy a její narušení způsobuje snížení hladiny PgP. (40) Zaměřili jsme se tedy na vliv Cl-IB-MECA na expresi PgP. Naše výsledky ukázaly, že ovlivnění 50 μ M Cl-IB-MECA po dobu 24 hodin vede téměř u všech buněčných linií ke snížení hladiny PgP. Nejvýraznější posun mediánu fluorescenční aktivity byl zřetelný u buněčné linie MDA-MB-231, kdy byl poměr mediánů kontroly 0,6 \times vyšší, než poměr mediánů u ovlivnění Cl-IB-MECA. Tento jev podpořily předchozí výsledky Western Blotu, kdy byl po 48 hodinách ovlivnění pozorován 70% úbytek hladiny PgP. Poměr mediánů fluorescenční aktivity u linie Jopaca-1 byl rovněž 0,5 \times vyšší u kontroly než u ovlivnění. Vzhledem k tomu, že u obou linií zároveň dochází k poklesu fosforylované formy Akt a snížení hladiny c-myc a PgP, lze vyvozovat, že u obou linií bude působit podobný mechanismus účinku. V literatuře byla popsána role c-myc jakožto regulátoru exprese *mdr1* genu pro PgP. Výzkum od He et al. (2000) ukázal,

že se u buněk s MDR fenotypem vyskytuje jak zvýšená hladina c-myc, tak i PgP. Při zvrácení rezistence však docházelo k výraznému poklesu jak c-myc, tak i samotného PgP. (149) Z tohoto efektu lze vyvodit, že mezi aktivitou c-myc a PgP existuje spojitost a při působení na signální dráhu ovlivňující expresi c-myc dochází zároveň i k modulaci aktivity PgP. Zajímavé však je, že u linie HCT116 byl také pozorován pokles hladiny c-myc po ovlivnění CI-IB-MECA, k žádné významné redukci PgP však nedocházelo.

Literatura uvádí, že léčba metastazujícího melanomu vykazujícího vysokou chemorezistenci měla vyšší efekt při kombinovaném užití taxolu a CI-IB-MECA než v případě samotného taxolu. Kombinovaná léčba zabraňovala buněčné proliferaci a migraci a tvorbě metastáz. (150) Podobný výzkum jsme provedli formou funkčního testu, kdy jsme analyzovali vliv CI-IB-MECA na eflux daunorubicinu z buněk vykazujících MDR fenotyp, a nepřímo tak na obnovení senzitivity na léčivo. Při ovlivnění linie K562/Tax docházelo u koncentrací 50 μ M a 100 μ M ke zvýšení citlivosti k daunorubicinu, jak bylo zřetelné na posunu mediánu fluorescenční intenzity. Vzhledem k našim datům z průtokového cytometru, které popisují snížení exprese PgP po ovlivnění CI-IB-MECA lze předpokládat, že také u linie K562/Tax docházelo k tomuto efektu. Zajímavé však je, že tento trend byl téměř totožný i při kombinovaném ovlivnění buněk A₃AR antagonistou MRS1220. Jedním z možných vysvětlení je, že efekt není zprostředkován přímo receptorem a vstup CI-IB-MECA do buňky je nezávislý na A₃AR. Uvnitř buňky poté CI-IB-MECA interaguje s PgP, kdy zablokuje jeho vazebné místo pro transport léčiv a tím brání jejich efluxu ven z buňky. Tato teorie je podpořena již zmiňovaným výzkumem od Biebele et al. (2019), kteří prokázali, že některá analoga adenosinu účinně blokují vazebné místo na PgP. (148) Podobný fenomén byl rovněž pozorován u podtypu A_{2A}AR, kdy bylo zjištěno, že jeho agonista Lexiscan účinně zabránil efluxu léčiva prostřednictvím PgP a snížil jeho expresi v závislosti na čase a koncentraci. V tomto případě autoři navrhli hypotézu, že aktivace AdoRs obecně může regulovat expresi a funkci PgP různými mechanismy. Jako příklad zmínili podtyp A_{2A}AR, kde předpokládali, že docházelo k rozštěpení PgP a k jeho uvolnění do extracelulárního prostoru, čímž byla jeho funkce inhibována. (151) Na základě našich naměřených výsledků můžeme tedy konstatovat, že CI-IB-MECA působí, stejně jako Lexiscan, na funkci a expresi PgP, kdy při dlouhodobějším ovlivnění způsobuje pokles jeho exprese a při krátkodobém ovlivnění nasedá na jeho vazebné místo a blokuje jeho funkci.

6 Závěr

V předložené diplomové práci byl zkoumán vliv selektivního agonisty CI-IB-MECA na čtyřech vybraných buněčných liniích s vysokou expresí A₃AR a na jedné linii s nízkou expresí A₃AR. Provedené experimenty zahrnovaly testování antiproliferačního efektu CI-IB-MECA a stanovení hodnoty IC₅₀ pomocí MTS testu a stanovení změn v buněčném cyklu, míře mitózy a apoptózy pomocí cytometrické analýzy. Dále byly metodou Western Blot stanoveny změny v expresi proteinů tří vybraných signálních drah po ovlivnění pouze CI-IB-MECA a následně po kombinovaném ovlivnění s A₃AR antagonistou MRS1220. V neposlední řadě byl analyzován vliv CI-IB-MECA na funkci a expresi PgP, kdy byla pomocí cytometrické analýzy měřena exprese PgP po 24hodinovém ovlivnění. Následně byla tato data rozšířena o vliv CI-IB-MECA na funkci PgP při krátkodobém ovlivnění. Z časových důvodů nebyly zopakovány všechny experimenty s MRS1220 pro ověření zapojení A₃AR. Tohle, společně s analýzou exprese dalších proteinů účastnících se signálních drah aktivovaných A₃AR se nabízí jako pokračování v tomto projektu a mohlo by vést k prohloubení znalostí mechanismů účinku tohoto receptoru.

Závěry práce lze shrnout do následujících bodů:

1. CI-IB-MECA působí antiproliferačně a cytotoxicky nezávisle na expresi A₃ receptoru v závislosti na použité koncentraci.
2. CI-IB-MECA nevykazuje cytotoxický efekt na nenádorové buněčné linie (MRC-5).
3. U buněk s vysokou expresí A₃AR dochází po ovlivnění CI-IB-MECA k zastavení buněčného cyklu v G1/S fázi a zároveň CI-IB-MECA způsobuje pokles mitózy a zvýšenou míru buněčné smrti nezávisle na expresi A₃ receptoru.
4. Bylo potvrzeno, že CI-IB-MECA může u vybraných buněčných linií ovlivňovat aktivitu signálních drah Hedgehog, Wnt a MAPK závisle i nezávisle na expresi A₃ receptoru. Nejvýraznějším pozorovaným efektem bylo snížení hladiny regulačního protoonkogenu c-myc, jehož deregulace byla pozorována nezávisle na interakci s A₃ receptorem. Změny exprese, rovněž nezávislé na A₃ receptoru, vykazoval také regulátor buněčného cyklu p21 a protein MDM2. Naopak, regulační molekuly Akt a Erk byly defosforylovány po přímé stimulaci A₃ receptoru. Dle pozorovaných změn v expresi proteinů byly zároveň stanoveny dominantně aktivované signální dráhy u jednotlivých linií po ovlivnění CI-IB-MECA:

Buněčná linie	Dominantně aktivované dráhy
MDA-MB-231	MAPK, PI3K/Akt
BT-549	Hedgehog
HCT116 par.	MAPK, PI3K/Akt
HEP-3B	Hedgehog, Wnt
Jopaca-1	MAPK, PI3K/Akt

5. U buněk s vysokou expresí A₃AR Cl-IB-MECA negativně ovlivňuje expresi PgP a zároveň působí jako substrát pro PgP, kdy zvyšuje senzitivitu buněk s MDR fenotypem a zabraňuje efluxu xenobiotik do extracelulárního prostoru.

Z těchto závěrů vyplývá, že efekty Cl-IB-MECA mohou být způsobeny prostřednictvím A₃AR i nezávisle na receptoru a oba tyto mechanismy účinky mohou být synergistické i u jedné buněčné linie.

7 Citovaná literatura

1. **Sachdeva, S a Gupta, M.** Adenosine and its receptors as therapeutic targets: An overview. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013, 21, stránky 245–253.
2. **Virtanen, S.S a Kukkonen-Macchi, A.** Adenosine Inhibits Tumor Cell Invasion via Receptor-Independent Mechanisms. *Molecular Cancer Research*. 2014, 12, stránky 1863-1874.
3. **Sheth, S a Brito, R.** Adenosine Receptors: Expression, Function and Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014, 15, stránky 2024–2052.
4. **Piirainen, H a Ashok, Y.** Structural features of adenosine receptors: From crystal to function. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011, 1808, stránky 1233–1244.
5. **Rosenbaum, D.M. a Rasmussen, S.G.F.** The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2009, 459, stránky 356–363.
6. **Baldwin, J.M.** Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Current opinions in Cell Biology*. 1994, 6, stránky 180-190.
7. **Kobilka, B.K.** G Protein Coupled Receptor Structure and Activation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007, 1768, stránky 794–807.
8. **Antonioli, L a Blandizzi, C.** Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nature Reviews Cancer*. 2013.
9. **Agarwal, R a Agarwal, P.** Newer targets for modulation of intraocular pressure: focus on adenosine receptor signalling pathways. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2014, 18, stránky 527-539.
10. **Bioinformatics:, Research Collaboratory for Structural.** Protein Data Bank. *RCSB Protein Data Bank*. [Online] <http://www.rcsb.org/pdb/>.
11. **Cieślak, M a Komoszyński, M.** Adenosine A2A receptors in Parkinson's disease treatment. *Purinergic Signalling*. 2008, 4, stránky 305–312.
12. **Cronstein, B.N. a Sitkovsky, M.** Adenosine and adenosine receptors in the pathogenesis and treatment of rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology*. 2016, 13, stránky 41-51.
13. **Borea, P.A. a Varani, K.** The A3 Adenosine Receptor: History and Perspectives. *PHARMACOLOGICAL REVIEWS*. 2014, 67, stránky 74–102.
14. **Klinger, M a Freissmuth, M.** Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins. *Cellular Signalling*. 2002, 14, stránky 99-108.
15. **Hilaire, C.S. a S.H., Carroll.** Mechanisms of induction of adenosine receptor genes and its functional significance. *Journal of Cell Physiology*. 2009, 218, stránky 35–44.
16. **Varani, K a Padovan, M.** The role of adenosine receptors in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews*. 2010, 10, stránky 61-64.
17. **Borea, P.A. a Gessi, S.** Adenosine as a Multi-Signalling Guardian Angel in Human Diseases: When, Where and How Does it Exert its Protective Effects? *Trends in Pharmacological sciences*. 2016, 37, stránky 419-434.
18. **Gomes, C.V. a Kaster, M.P.** Adenosine receptors and brain diseases: Neuroprotection and neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011, 1808, stránky 1380–1399.

19. **Lee, J.E. a Bokoch, G.** A novel cardioprotective role of RhoA: new signaling mechanism for adenosine. *FASEB Journal*. 2001, 11, stránky 1886-1894.
20. **Wan, T.C. a Ge, Z.D.** The A3 adenosine receptor agonist CP-532,903 [N6-(2,5-dichlorobenzyl)-3'-aminoadenosine-5'-N-methylcarboxamide] protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via the sarcolemmal ATP-sensitive potassium channel. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2008, 324, stránky 234-243.
21. **Merighi, S a Mirandola, P.** A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy. *Pharmacology & Therapeutics*. 2003, 100, stránky 31 – 48.
22. **Townsend-Nicholson, A a Baker, E.** Localization of the adenosine A1 receptor subtype gene (ADORA1) to chromosome 1q32.1. *Genomics*. 1995, 26, stránky 423–425.
23. **Trincavelli, M.L. a Daniele, S.** Adenosine Receptors: What We Know and What We are Learning. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2010, 10, stránky 860-877.
24. **Palmer, T.M. a Stiles, G.L.** Adenosine receptors. *Neuropharmacology*. 1995, 37, stránky 683-694.
25. **Fredholm, B.B. a Ijzerman, A.P.** International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological Reviews*. 2001, 53, stránky 527-552.
26. **Chen, J a Eltzschig, H.K.** Adenosine receptors as drug targets — what are the challenges? *Nature Reviews Drug Discovery*. 2013, 12, stránky 265–286.
27. **animals, A2A receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic.** Haskó, G; Pacher, P. *Journal of Leukocyte Biology*. 2008, 83, stránky 447–455.
28. **Salvatore, C.A. a Jacobson, M.A.** Molecular cloning and characterization of the human A3 adenosine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993, 90, stránky 10365–10369.
29. **Fishman, P a Bar-Yehuda, S.** Pharmacology and Therapeutic Applications of A3 Receptor Subtype. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2004, 3.
30. **Barletta, K.E a Ley, K.** Regulation of neutrophil function by adenosine. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2012, 32, stránky 856–864.
31. **Jin, X a Shepherd, R.K.** Inosine Binds to A3 Adenosine Receptors and Stimulates Mast Cell Degranulation. *Journal of Clinical Investigation*. 1997, 11, stránky 2849–2857.
32. **Ohana, G a Bar-Yehuda, S.** Differential effect of adenosine on tumor and normal cell growth: Focus on the A3 adenosine receptor. *Journal of Cellular Physiology*. 2000, 186, stránky 19-23.
33. **Jafari, S.M. a Panjehpour, M.** A3 Adenosine Receptor Agonist Inhibited Survival of Breast Cancer Stem Cells via GLI-1 and ERK1/2 Pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2017, 118, stránky 2909-2920.
34. **Ohana, G a Bar-Yehuda, S.** Inhibition of primary colon carcinoma growth and liver metastasis by the A3 adenosine receptor agonist CF101. *British Journal of Cancer*. 2003, 89, stránky 1552-1558.
35. **Stemmer, S.M. a Benjaminov, O.** CF102 for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma: A Phase I/II, Open-Label, Dose-Escalation Study. *Oncologist*. 2013, 18, stránky 25–26.
36. **Fishman, P a Bar-Yehuda, S.** Targeting the A3 adenosine receptor for cancer therapy: inhibition of prostate carcinoma cell growth by A3AR agonist. *Anticancer research*. 2003, 23, stránky 2077-2083.

37. **Gessi, S a Varani, K.** A3 Adenosine Receptors in Human Neutrophils and Promyelocytic HL60 Cells: A Pharmacological and Biochemical Study. *MOLECULAR PHARMACOLOGY*. 2002, 61, stránky 415–424.
38. **Silverman, M.H. a Strand, V.** Clinical evidence for utilization of the A3 adenosine receptor as a target to treat rheumatoid arthritis: data from a phase II clinical trial. *The Journal of Rheumatology*. 2008, 35, stránky 41-48.
39. **Zhao, Z a Makaritsis, K.** A role for the A3 adenosine receptor in determining tissue levels of cAMP and blood pressure: studies in knock-out mice. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000, 3, stránky 280-290.
40. **Bar-Yehuda, S a Stemmer, S.M.** The A3 adenosine receptor agonist CF102 induces apoptosis of hepatocellular carcinoma via de-regulation of the Wnt and NF- κ B signal transduction pathways. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY*. 2008, 33, stránky 287-295.
41. **Mozzicato, S a Bhalchandra, V.** Role of direct RhoA-phospholipase D1 interaction in mediating adenosine-induced protection from cardiac ischemia. *The FASEB Journal* . 2004, 18, stránky 406-408.
42. **Nüsslein-Volhard, Ch a Wieschaus, E.** Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. 1980, 287, stránky 795–801.
43. **Ingham, P.W a McMahon, A.P.** Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *GENES & DEVELOPMENT*. 2001, 15, stránky 3059–3087.
44. **Ingham, P.W.** Hedgehog signalling. *Current biology*. 2008, 18, stránky 238-241.
45. **Gupta, S. a Takebe, N.** Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 2010, 2.
46. **Magliano, M.P. a Hebrok, M.** Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nature*. 2003, 3, stránky 903-911.
47. **Hooper, J.E. a Scott, M.P.** Communicating with Hedgehogs. *Nature*. 2005, 6, stránky 306-317.
48. **Didiasova, M a Schaefer, L.** Targeting GLI Transcription Factors in Cancer. *Molecules*. 2018, 1003.
49. **Katoh, Y a M., Katoh.** Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Current Molecular Medicine*. 2009, 9, stránky 873-886.
50. **Zhao, Z a Ingham, P.W.** Hedgehog signalling. *Development at glance*. 2016, 143, stránky 367-372.
51. **Jung, J a Frump, D.** Desert hedgehog is a mediator of demyelination in compression neuropathies. *Experimental Neurology*. 2015, 271, stránky 84-94.
52. **Werner, R a Merz, H.** 46,XY Gonadal Dysgenesis due to a Homozygous Mutation in Desert Hedgehog (DHH) Identified by Exome Sequencing. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015, 100, stránky 1022–1029.
53. **Teixeira, J.D. a Rosa, I.** Sonic Hedgehog signaling and Gli-1 during embryonic chick myogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018.
54. **Chamoun, Z a Mann, R.K.** Skinny hedgehog, an acyltransferase required for palmitoylation and activity of the hedgehog signal. *Science*. 2001, 293, stránky 2080-2084.

55. **Choudhry, Z a Rikani, A.A.** Sonic hedgehog signalling pathway: a complex network. *ANNALS OF NEUROSCIENCES*. 2014, 21.
56. **Szkandera, J. Kiesslich, T.** Hedgehog Signaling Pathway in Ovarian Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2013, 14, stránky 1179-1196.
57. **Rubin, L.L. a Sauvage, F.** Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2006, 5, stránky 1026–1033.
58. **Porter, J.A. a von Kessler, D.P.** The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling. *Nature*. 1995, 23, stránky 363-366.
59. **Hui, M a Cazet, A.** The Hedgehog signalling pathway in breast development, carcinogenesis and cancer therapy. *Breast cancer research*. 2013, 15.
60. **Wolff, F a Gruber, W.** Imiquimod directly inhibits Hedgehog signalling by stimulating adenosine receptor/protein kinase A-mediated GLI phosphorylation. *Oncogene*. 2013, 32, stránky 5574-5581.
61. **Pan, Y a Wang, Ch.** Phosphorylation of Gli2 by protein kinase A is required for Gli2 processing and degradation and the Sonic Hedgehog-regulated mouse development. *Developmental Biology*. 2009, 326, stránky 177-189.
62. **Schön, M.P. a Schön, M.** Imiquimod: mode of action. *British Journal of Dermatology*. 2007, 157, stránky 8–13.
63. **Kaisho, T a Akira, S.** Toll-like receptor function and signaling. *Molecular mechanisms in allergy and clinical immunology*. 2006, stránky 979-986.
64. **Schön, M a Bong, A.B.** Tumor-selective induction of apoptosis and the small-molecule immune response modifier imiquimod. *Journal of National Cancer Institute*. 2003, 95, stránky 1138-1149.
65. **Schön, M.P. a Schön, M.** The Small Antitumoral Immune Response Modifier Imiquimod Interacts with Adenosine Receptor Signaling in a TLR7- and TLR8-Independent Fashion. *Journal of Investigative Dermatology*. 2006, 126, stránky 1338–1347.
66. **Beutner, K.R., Geisse, J. K.** Therapeutic response of basal cell carcinoma to the immune response modifier imiquimod 5% cream. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1999, 41, stránky 1002-1007.
67. **Gruber, W a Frischauf, A.** An old friend with new skills: Imiquimod as a novel inhibitor of Hedgehog signalling in basal cell carcinoma. *Oncoscience*. 2014, 9, stránky 567-573.
68. **Morin, P a Sparks, A.** Activation of B-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in B-catenin or APC. *Science*. 1997, stránky 1787-1790.
69. **Komiya, Y a Habas, R.** Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*. 2008, 4, stránky 68-75.
70. **Clevers, H a Nusse, R.** Wnt/B-Catenin Signaling and Disease. *Cell*. 2012, 149.
71. **Willert, K a Nusse, R.** Wnt Proteins. *Cold Spring Harbour Perspectives in Biology*. 2012, 4.
72. **Bhanot, P a Brink, M.** A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature*. 1996, 382, stránky 225–230.
73. **Janda, C.Y. a Waghray, D.** Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science*. 2012, 337, stránky 59-64.

74. **Davidson, G a Niehrs, C.** Emerging links between CDK cell cycle regulators and Wnt signaling. *Trends in cell biology*. 2010, 20, stránky 453-460.
75. **Červenka, I a Wolf, J.** Mitogen-Activated Protein Kinases Promote WNT/B-Catenin Signaling via Phosphorylation of LRP6. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*. 2011, 31, stránky 179–189.
76. **Bilic, J a Huang, Y.** Wnt Induces LRP6 Signalosomes and Promotes Dishevelled-Dependent LRP6 Phosphorylation. *Science*. 2007, 316, stránky 1619-1622.
77. **Fishman, P a Madi, L.** Evidence for involvement of Wnt signaling pathway in IB-MECA mediated suppression of melanoma cells. *Oncogene*. 2002, 21, stránky 4060 - 4064.
78. **Skålhegg, B.S. a Tasken, K.** Specificity in the cAMP/PKA signalling pathway, differential expression, regulation and subcellular localization of subunits of PKA. *Frontiers in Bioscience*. 2000, 5, stránky 678-693.
79. **Liu, F a Yang, X.** Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2018, 8, stránky 552-562.
80. **Chappell, W.H. a Steelman, L.S.** Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget*. 2011, 2, stránky 135-164.
81. **Santos, E a Nebreda, A.R.** Structural and functional properties of ras proteins. *FASEB journal*. 1989, 3, stránky 2151-2163.
82. **Woo Han, Ch a Suk Jeong, M.** Structure, signaling and the drug discovery of the Ras oncogene protein. *BMB Reports*. 2017, 50, stránky 355-360.
83. **Leicht, D.T. a Balan, V.** Raf Kinases: Function, Regulation and Role in Human Cancer. *Biochimica Biophysica Acta*. 2007, 8, stránky 1196–1212.
84. **Terai, K a Matsuda, M.** Ras binding opens c-Raf to expose the docking site for mitogen-activated protein kinase kinase. *EMBO Reports*. 2005, 6, stránky 251-255.
85. **Payne, D.M. a Rossomando, A.J.** Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO Journal*. 1991, 10, stránky 885-892.
86. **Zheng, C.F. a Guan, K.L.** Cloning and characterization of two distinct human extracellular signal-regulated kinase activator kinases, MEK1 and MEK2. *Journal of biological chemistry*. 1993, 25, stránky 11435-11439.
87. **Fischmann, T.O. a Smith, C.K.** Crystal Structures of MEK1 Binary and Ternary Complexes with Nucleotides and Inhibitors. *Biochemistry*. 2009, 48, stránky 2661–2674.
88. **Takekawa, M a Tatebayashi, K.** Conserved Docking Site Is Essential for Activation of Mammalian MAP Kinase Kinases by Specific MAP Kinase Kinase Kinases. *Molecular Cell*. 2005, 18, stránky 295–306.
89. **Roskoski, R.** ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*. 2012, 66, stránky 105–143.
90. **Lloyd, A.C.** Distinct functions for ERKs? . *Journal of Biology*. 2006, 5.
91. **Feifei, L a Yang, X.** Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2018, 8, stránky 552-562.

92. **Tanoue, T a Adachi, M.** A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nature cell biology*. 2000, 2, stránky 110-116.
93. **Eblen, S.T. a Catling, A.D.** Biochemical and biological functions of the N-terminal, noncatalytic domain of extracellular signal-regulated kinase 2. *Molecular and cellular biology*. 2001, 21, stránky 249-259.
94. **Brown, M.D. a Sacks, D.B.** Protein scaffolds in MAP kinase signalling. *Cellular Signalling*. 2009, 21, stránky 462–469.
95. **Schulte, G a Fredholm, B.B.** Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cellular Signalling*. 2003, 15, stránky 813 – 827.
96. **Roux, P.P. a Blenis, J.** ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2004, 68, stránky 320–344.
97. **Gutkind, J.S.** The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998, 273, stránky 1839-1842.
98. **Shi, Ch a Szczesniak, A.** A3 adenosine and CB1 receptors activate a PKC-sensitive Cl⁻ current in human nonpigmented ciliary epithelial cells via a Gβγ-coupled MAPK signaling pathway. *British Journal of Pharmacology*. 2003, 139, stránky 475–486.
99. **Neary, J.T. a McCarty, M.** Mitogenic signaling from P1 and P2 purinergic receptors to mitogen-activated protein kinase in human fetal astrocyte cultures. *Neuroscience Letters*. 1998, 242, stránky 159-162.
100. **Merighi, S a Benini, A.** A3 adenosine receptor activation inhibits cell proliferation via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent inhibition of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in A375 human melanoma cells. *The Journal of biological chemistry*. 2005, 280, stránky 19516-19526.
101. **Schulte, G a Fredholm, B.B.** Signaling Pathway from the Human Adenosine A3 Receptor Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells to the Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2. *MOLECULAR PHARMACOLOGY*. 2002, 62, stránky 1137–1146.
102. **Germack, R a Dickenson, J.M.** Characterization of ERK1/2 signalling pathways induced by adenosine receptor subtypes in newborn rat cardiomyocytes. *British Journal of Pharmacology*. 2004, 141, stránky 329–339.
103. **Meringhi, S a Mirandola, P.** Adenosine Receptors as Mediators of Both Cell Proliferation and Cell Death of Cultured Human Melanoma Cells. *The Society for Investigative Dermatology*. 2002, 119, stránky 923-933.
104. **Vivanco, I a Sawyers, Ch. L.** The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2002, 2, stránky 489–501.
105. **Serasanambati, M. a Chilakapati, S.** Function of Nuclear Factor Kappa B (NF-κB) in human diseases- A Review. *South Indian Journal of Biological Sciences*. 2016, 368.
106. **Kress, T.R. a Sabo, A.** MYC: connecting selective transcriptional control to global RNA production. *Nature*. 2015, 15, stránky 593-607.
107. **Abraham, A.G. a O'Neill, E.** PI3K/Akt-mediated regulation of p53 in cancer. *Biochemical society transactions*. 2014, 42, stránky 798-803.

108. **Shi, D. a Gu, W.** Dual Roles of MDM2 in the Regulation of p53: Ubiquitination Dependent and Ubiquitination Independent Mechanisms of MDM2 Repression of p53 Activity. *Genes and cancer*. 2012, 3, stránky 240-248.
109. **Adimoolam, S. a Lin, C.X.** The p53-regulated cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 (cip1, waf1, sdi1), is not required for global genomic and transcription-coupled nucleotide excision repair of UV-induced DNA photoproducts. *The journal of biological chemistry*. 2001, 276, stránky 25813-25822.
110. **Krishna, R a Mayer, L.D.** Multidrug resistance (MDR) in cancer: Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2000, 11, stránky 265–283.
111. **Nosková, V a Hajdúch, M.** MECHANIZMY MNOHOČETNÉ LÉKOVÉ REZISTENCE A JEJICH VÝZNAM PRO KLINICKOU PRAXI: I. TYPICKÁ MDR. *KLINICKÁ ONKOLOGIE*. 2000, 2.
112. **Sodani, K a Patel, A.** Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chinese Journal of Cancer Research*. 2012, 31, stránky 58–72.
113. **Lim, J.C. a Kania, K.D.** Activation of beta-catenin signalling by GSK-3 inhibition increases p-glycoprotein expression in brain endothelial cells. *Journal of neurochemistry*. 2008, 106, stránky 1855-1865.
114. **Pinzon-Daza, M.L. a Salaroglio, I.C.** The cross-talk between canonical and non-canonical Wnt-dependent pathways regulates P-glycoprotein expression in human blood–brain barrier cells. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2014, 34, stránky 1258–1269.
115. **Dean, M a Allikmets, R.** Complete characterization of the human ABC gene family. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2001, 33, stránky 475-479.
116. **Lin, S a Hoffman, K.** MEK inhibition induced downregulation of MRP1 and MRP3 expression in experimental hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell International*. 2013, 13.
117. **Torres, A a Vargas, Y.** Adenosine A3 receptor elicits chemoresistance mediated by multiple resistance-associated protein-1 in human glioblastoma stem-like cells. *Oncotarget*. 2016, 7, stránky 67373-67386.
118. **Chikazawa, K. a Tanaka, H.** Inhibition of Wnt Signaling Pathway Decreases Chemotherapy-resistant Side-population Colon Cancer Cells. *ANTICANCER RESEARCH*. 2010, 30, stránky 2041-2048.
119. **Mlejnek, P. a Dolezel, P.** P-glycoprotein mediates resistance to A3 adenosine receptor agonist 2-chloro-N6-(3-iodobenzyl)-adenosine-5'-n-methyluronamide in human leukemia cells. *Journal of cellular physiology*. 2012, 2, stránky 676-685.
120. **Madi, L a Ochaion, A.** The A3 Adenosine Receptor Is Highly Expressed in Tumor versus Normal Cells. *Clinical Cancer Research*. 2004, 10, stránky 4472–4479.
121. **Fishman, P a Bar-Yehuda, S.** Pharmacological and Therapeutic Effects of A3 Adenosine Receptor (A3AR) Agonists. *Drug Discovery Today*. 2011, 17, stránky 359-366.
122. **Clinical Trials.** *Clinical Trials*. [Online] U.S. National Library of Medicine. <https://clinicaltrials.gov/>.
123. **Baraldi, P.G. a Cacciari, B.** A3 Adenosine Receptor Ligands: History and Perspectives. *Medicinal Research Reviews*. 2000, 20, stránky 103-128.

124. **Lee, E a Min, H.** A novel adenosine analog, thio-CI-IB-MECA, induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Biochemical Pharmacology*. 2005, 70, stránky 918–924.
125. **Gallo-Rodriguez, C a Ji, X.** Structure-activity relationships of N6-benzyladenosine-5'-uronamides as A3-selective adenosine agonists. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1994, 37, stránky 636-646.
126. **Dal Ben, D a Lambertucci, C.** Molecular modelling study of 2-phenylethynyladenosine (PEAdo) derivatives as highly selective A3 adenosine receptor ligands. *Purinergic Signalling*. 2006, 2, stránky 589–594.
127. **Kim, T.H. a Kim, Y.K.** The adenosine A3 receptor agonist CI-IB-MECA induces cell death through Ca²⁺/ROS-dependent down regulation of ERK and Akt in A172 human glioma cells. *Neurochemical Research*. 2012, 37, stránky 2667-2677.
128. **Stemmer, S.M. a Benjaminov, O.** CF102 for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma: A Phase I/II, Open-Label, Dose-Escalation Study. *Oncologist*. 2013, 18, stránky 25–26.
129. **Thomson, E.M. a Williams, A.** Overexpression of Tumor Necrosis Factor- α in the Lungs Alters Immune Response, Matrix Remodeling, and Repair and Maintenance Pathways. *The American Journal of Pathology*. 2012, 180, stránky 1413-1430.
130. **Morello, S a Petrella, A.** CI-IB-MECA inhibits human thyroid cancer cell proliferation independently of A3 adenosine receptor activation. *Cancer biology and therapy*. 2008, 7, stránky 278-284.
131. **Cohen, S a Stemmer, S.M.** CF102 an A3 Adenosine Receptor Agonist Mediates Anti-Tumor and Anti-Inflammatory Effects in the Liver. *Journal of Cell Physiology*. 2011, 226, stránky 2438–2447.
132. **Sakowicz-Burkiewicz, M. a Kitowska, A.** Differential effect of adenosine receptors on growth of human colon cancer HCT 116 and HT-29 cell lines. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2013, 533, stránky 47-54.
133. **Kim, S.G a Ravi, G.** p53-Independent induction of Fas and apoptosis in leukemic cells by an adenosine derivative, CI-IB-MECA. *Biochemical Pharmacology*. 2002, 63, stránky 871-880.
134. **Lu, J a Pierron, A.** An Adenosine Analogue, IB-MECA, Down-Regulates Estrogen Receptor α and Suppresses Human Breast Cancer Cell Proliferation. *Cancer Research*. 2003, 63, stránky 6413–6423.
135. **Joshaghani, H.R. a Jafari, S.M.** A3 adenosine receptor agonist induce G1 cell cycle arrest via Cyclin D and cyclin-dependent kinase 4 pathways in OVCAR-3 and Caov-4 cell lines. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2017, 13, stránky 107-112.
136. **Kim, S.J. a Min, H.Y.** Inhibition of cell proliferation through cell cycle arrest and apoptosis by thio-CI-IB-MECA, a novel A3 adenosine receptor agonist, in human lung cancer cells. *Cancer Letters*. 2008, 264, stránky 309-315.
137. **Abbracchio, M.P. a Camurri, A.** The A3 adenosine receptor induces cytoskeleton rearrangement in human astrocytoma cells via a specific action on Rho proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001, 939, stránky 63-73.
138. **Kohn, Y. a Sei, Y.** Induction of Apoptosis in HL-60 Human Promyelocytic Leukemia Cells by Adenosine A3 Receptor Agonists. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996, 27, stránky 904–910.

139. **Appel, E a Kazimirsky, G.** Roles of BCL-2 and Caspase 3 in the Adenosine A3 Receptor-Induced Apoptosis. *Journal of Molecular Neurosciences*. 2001, 17, stránky 285–292.
140. **Ohana, G. a Cohen, S.** A3 adenosine receptor agonist, CF102, protects against hepatic ischemia/reperfusion injury following partial hepatectomy. *Molecular Medicine reports*. 2016, 14, stránky 4335-4341.
141. **Bretones, G. a Delgado, M.D.** Myc and cell cycle control. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2015, 1849, stránky 506-516.
142. **Wang, H. a Mannava, S.** c-Myc depletion inhibits proliferation of human tumor cells at various stages of the cell cycle. *Oncogene*. 2008, 27, stránky 1905–1915.
143. **Claassen, G.F. a Hann, S.R.** A role for transcriptional repression of p21CIP1 by c-Myc in overcoming transforming growth factor beta-induced cell-cycle arrest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000, 15, stránky 9498-9503.
144. **Bellmann, K. a Martel, J.** Downregulation of the PI3K/Akt survival pathway in cells with deregulated expression of c-Myc. *Apoptosis*. 2006, 11, stránky 1311-1319.
145. **Gessi, S. a Merighi, S.** Adenosine receptors in colon carcinoma tissues and colon tumoral cell lines: focus on the A(3) adenosine subtype. *Journal of cellular physiology*. 2007, 211, stránky 826-836.
146. **Zhang, Z. a Wang, H.** MDM2 Is a Negative Regulator of p21WAF1/CIP1, Independent of p53. *Journal of Biological Chemistry*. 2004, Sv. 279, stránky 16000-16006.
147. **Diao, Y. a Rahman, M.F.** Identification of novel GLI1 target genes and regulatory circuits in human cancer cells. *Molecular Oncology*. 2018, 12, stránky 1718–1734.
148. **Biebele, A. a Tosh, D.K.** Evidence for the Interaction of A3 Adenosine Receptor Agonists at the Drug-Binding Site(s) of Human P-glycoprotein (ABCB1). *Molecular Pharmacology*. 2019, 96, stránky 180-192.
149. **He, Y a Zhang, J.** The role of c-myc in regulating mdrl gene expression in tumor cell line KB. *Chinese medical journal*. 2000, 113, stránky 848-851.
150. **Soares, A.S. a Costa, V.M.** The combination of Cl-IB-MECA with paclitaxel: a new anti-metastatic therapeutic strategy for melanoma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2014, 74, stránky 847-860.
151. **Kim, D.G. a Bynoe, M.S.** A2A adenosine receptor modulates drug efflux transporter P-glycoprotein at the blood-brain barrier. *The Journal of clinical investigation*. 2016, 126, stránky 1717-1733.