

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Proteomický profil protinádorového účinku klinicky používaných rostlinných alkaloidů

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Jana Václavková
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	MUDr. Petr Džubák, Ph.D.
Konzultant:	Mgr. Tomáš Oždian
Termín odevzdání práce:	2. 5. 2013

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 2. 5. 2013

Děkuji MUDr. Petru Džubákovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce a za poskytnutí odborných konzultací; svému konzultantovi Mgr. Tomáši Oždianovi za pomoc při realizaci experimentů, za trpělivost a za poskytnutí informací potřebných k vypracování této práce. Děkuji Mgr. Petrovi Konečnému a Mgr. Dušanu Holubovi za pomoc při realizaci některých experimentů; kolektivu laboratoře tkáňových kultur za poskytnutí biologického materiálu a přípravu vzorků pro mé experimenty. Děkuji Mgr. Miroslavu Hruškovi a Mgr. Lence Radové, Ph.D. za pomoc při statistickém zpracování dat. Děkuji vedení a kolektivu Ústavu molekulární a translační medicíny v Olomouci za vstřícný přístup a umožnění realizace mé diplomové práce. Děkuji také grantu IGA UP LF_2013_16 za poskytnutí finanční podpory. Infrastrukturální část projektu (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena Operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Jana Václavková
Název práce	Proteomický profil protinádorového účinku klinicky používaných rostlinných alkaloidů
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	MUDr. Petr Džubák, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	<p>Cílem práce bylo testování rozdílu vlivu protinádorových léčiv vinkristinu, vinorelbinu a docetaxelu na proteom buněčné linie odvozené od akutní T-lymfoblastické leukémie. Zmíněná léčiva patří do skupiny rostlinných alkaloidů a používají se zejména při léčbě rakoviny prsu, plic a některých leukémií. Tato léčiva fungují jako mitotické jedy, docetaxel stabilizuje mikrotubuly a podporuje tvorbu mikrotubulů, vinkristin a vinorelbin inhibují skládání mikrotubulů a způsobují rozpad dělicího vřeténka. Proteomické profily buněk po ošetření cytostatiky nebyly doposud ve větší míře studovány. Proteomické profily protinádorového účinku léčiv byly analyzovány 1D-elektroforézou a vysokouúčinnou kapalinovou chromatografií spojenou s hmotnostní spektrometrií. Pro kvantifikaci proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie byla použita metoda SILAC, což je metabolické <i>in vivo</i> značení proteinů izotopicky značenými aminokyselinami. Proteomické profily byly zpracovány pomocí softwaru pro analýzu buněčných procesů GeneGo. Bylo zjištěno, že zmíněná léčiva ovlivňují především apoptotickou signální dráhu, iniciaci translace a odpověď imunitního systému. Proteomické profily buněk ošetřených jednotlivými léčivy byly porovnány mezi sebou následujícími statistickými přístupy: klastrovou analýzou, určením Spearmanova korelačního koeficientu a analýzou hlavních komponent. Analýza hlavních komponent ukázala, že v buňkách ošetřených jednotlivými léčivy byly diferencně exprimovány některé izoformy histonů, ribosomální proteiny a několik dalších proteinů. Na základě získaných výsledků bylo metodou průtokové cytometrie analyzováno, zda zmíněná léčiva inhibují proteosyntézu. Signifikantní inhibice proteosyntézy byla zjištěna pouze v buňkách ošetřených vinorelbinem.</p>
Klíčová slova	protinádorový účinek, proteomické profilování, hmotnostní spektrometrie, proteosyntéza, docetaxel, vinkristin, vinorelbin
Počet stran	122
Počet příloh	0
Jazyk	Český (anglický)

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Bc. Jana Václavková
Title	Proteomic profile of anticancer effect of clinically used plant alkaloids
Type of thesis	master
Department	Department of biochemistry
Supervisor	MUDr. Petr Džubák, Ph.D.
The year of presentation	2013
Abstract	<p>The aim of this work was to test impact of anticancer drugs vincristine, vinorelbine and docetaxel on proteome of acute T-lymfblastic leukaemia derived cell line. These drugs belong to family of plant alkaloids and they are used for a treatment of breast cancer, lung cancer and some types of leukaemia. The drugs are mitotic poisons, docetaxel stabilizes microtubules and promotes microtubule assembly; vincristine and vinorelbine inhibit microtubule assembly and cause mitotic spindle disruption. Proteomic profiles of cells after cytostatic treatment have not been deeply studied yet. Proteomic profiles of anticancer effect were analysed by 1D-polyacrylamide gel electrophoresis, high performance liquid chromatography-mass spectrometry. Quantification of proteins by mass spectrometry was performed by SILAC method, which is <i>in vivo</i> metabolic labelling with stable isotope labelled amino acids in cell culture. Proteomic profiles were processed by GeneGo software, which is used for cell process analysis. It was found out that mainly apoptosis, translation initiation and immune response were affected. Proteomic profiles were compared by following statistic approaches: cluster analysis, Spearman rank correlation and principal component analysis. It was shown by principal component analysis that some isoforms of histones, ribosomal proteins and some other proteins were differentially expressed in a cells treated by vincristine, vinorelbine or docetaxel. Because of the acquired results it was analysed by flow cytometry if docetaxel, vincristine and vinorelbine inhibit protein synthesis. Significant inhibition of protein synthesis was detected only in cells treated by vinorelbine.</p>
Keywords	anticancer effect, proteomic profiling, mass spectrometry, protein synthesis, docetaxel, vincristine, vinorelbine
Number of pages	122
Number of appendices	0
Language	Czech (English)

1 OBSAH

1	Obsah	5
2	Cíle práce	7
3	Teoretická část.....	8
3.1	Úvod.....	8
3.2	Proteomika	8
3.2.1	Metody proteomické analýzy	10
3.3	Klinicky používané rostlinné alkaloidy s protinádorovým účinkem – inhibitory dynamiky mikrotubulů	16
3.3.1	Mikrotubuly	16
3.3.2	Alkaloidy	22
3.3.3	Taxoidy.....	23
3.3.3.1	Paclitaxel	24
3.3.3.2	Docetaxel	26
3.3.4	Alkaloidy z barvíčku.....	37
3.3.4.1	Vinkristin.....	40
3.3.4.2	Vinorelbin	47
3.3.5	Podophylotoxin – další inhibitor mikrotubulů s protinádorovým účinkem	52
4	Experimentální část.....	55
4.1	Materiál a metody	55
4.1.1	Chemikálie.....	55
4.1.2	Přístrojové vybavení	56
4.1.3	Software	56
4.1.4	Biologický materiál.....	56
4.1.5	Analýza IC50 a doby do apoptózy	57
4.1.6	Kultivace buněk, metabolické značení SILAC, ošetření cytostatiky a příprava buněčných lyzátů	57
4.1.7	Preparativní elektroforéza.....	58
4.1.8	Štěpení proteinů v gelu.....	59
4.1.9	Extrakce peptidů.....	60
4.1.10	Purifikace peptidů	60
4.1.11	Analýza HPLC/MS/MS-ESI/IT	61
4.1.12	Analýza HPLC/MS-MALDI TOF/TOF	62
4.1.13	Statistická a bioinformatická interpretace výsledků	64
4.1.14	Analýza inhibice proteosyntézy průtokovou cytometrií	65

4.2	Výsledky	66
4.2.1	Proteomická analýza	66
4.2.2	Analýza buněčných procesů	66
4.2.2.1	Analýza buněčných procesů v buňkách ošetřených vinkristinem	66
4.2.2.2	Analýza buněčných procesů v buňkách ošetřených vinorelbinem...	66
4.2.2.3	Analýza buněčných procesů v buňkách ošetřených docetaxelem...	66
4.2.3	Porovnání proteomických profilů účinku léčiv	66
4.2.4	Analýza inhibice proteosyntézy.....	66
4.3	Diskuse.....	67
5	Závěr	68
6	Literatura.....	69
7	Seznam použitých zkratk	82

2 CÍLE PRÁCE

I. Teoretická část

Zpracovat literární rešerši o klinicky používaných rostlinných alkaloidech, proteomice a metodách proteomické analýzy.

II. Experimentální část

Analyzovat proteom buněčné linie CEM ošetřené protinádorovými léčivy, vinkristinem, vinorelbinem a docetaxelem.

Srovnat odpověď buněčné linie CEM na ošetření zmíněnými protinádorovými léčivy na úrovni proteomu.

Vlastní výsledky porovnat s doposud známými publikovanými klinickými účinky studovaných protinádorových léčiv – zejména v oblasti křížové rezistence a rozdílů v mechanismu účinku jednotlivých léčiv.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Úvod

Diplomová práce se zabývá protinádorovým účinkem klinicky využívaných rostlinných alkaloidů docetaxelu, vinkristinu a vinorelbinu, což jsou léčiva ze skupiny jedů mitotického vřeténka. Mezi jedy mitotického vřeténka patří taxoidy (například docetaxel, paclitaxel), alkaloidy z barvínku (*Vinca*, například vinkristin, vinorelbin) a podophylotoxiny. Alkaloidy z barvínku inhibují skládání mikrotubulů a způsobují rozpad dělicího vřeténka (Bissery et al., 1991). Skládání mikrotubulů inhibuje také kolchicin (Owellen et al., 1976), což je alkaloid z ocúnu podzimního, který nemá protinádorovou aktivitu a používá se k léčbě dny (příbalová informace Colchicum dispers, 2011). Podophylotoxiny inhibují polymerizaci tubulinu, ale na tubulin se váží v jiném místě než alkaloidy z barvínku. Paclitaxel stabilizuje mikrotubuly a inhibuje jejich depolymerizaci na volný tubulin. Docetaxel působí podobně jako paclitaxel (Bissery et al., 1991). Docetaxel je však ve srovnání s paclitaxelem účinnější (Morse et al, 2005).

3.2 Proteomika

Proteomika se zabývá studiem proteomu. Termíny proteomika a proteom vznikly jako analogie termínů genom a genomika a byly poprvé použity skupinou prof. Wilkinse v 90. letech 20. století. Proteom byl definován jako kompletní soubor proteinů exprimovaný genomem daného organismu, nebo soubor proteinů exprimovaný danou buňkou, nebo tkání. Proteom je přímým produktem genomu, ale proteom se může měnit v závislosti na podmínkách, které jsou odlišné v různých tkáních daného organismu. Počet proteinů v proteomu může přesáhnout počet genů, což je dáno alternativním sestřihem genů a posttranslačními modifikacemi (Wilkins et al., 1995). Definice proteomiky existuje celá řada. Za jednu z nejlepších je považována definice, že proteomika je obor, který se zabývá systematickou analýzou proteinů z hlediska jejich identity, množství a funkcí (Chmelík, 2005).

Proteomiku lze na základě rozdílných přístupů k proteomickému studiu dále rozčlenit do několika oblastí, dále budou zmíněny pouze ty nejdůležitější. Analytická proteomika se zaměřuje na separaci proteinů ze složitých biologických směsí, jejich charakterizaci hmotnostní spektrometrií (MS) a bioinformatické zpracování dat. Hlavním cílem je identifikace proteinů, stanovení molekulové hmotnosti, sekvence aminokyselin a určení posttranslačních modifikací. Dalšími cíli jsou například

charakterizace nekovalentních interakcí bílkovin s jinými látkami a kvantitativní stanovení heterogenity. Strukturní proteomika se zabývá studiem struktury proteinů rentgenostrukturní krystalografií, nukleárně magnetickou resonancí (NMR), MS a dalšími metodami, cílem je pochopit strukturní chování bílkovin. Funkční proteomika je zaměřena na funkci proteinů a studium komplexních životních procesů. Diferenční (srovnávací) proteomika se zabývá analýzou složitých směsí proteinů, sleduje změny ve složení proteinů při různých stavech organismu (například normální versus patologický stav) s cílem nalézt a identifikovat proteiny s rozdílnou abundancí. High-throughput proteomika je zaměřena na rychlé získávání velkého množství údajů o proteinech, zejména pro screeningové účely. High-coverage proteomika se zabývá získáváním údajů o sekvenci aminokyselin, posttranslačních modifikacích proteinů s cílem co nejvyššího pokrytí primární struktury. Bottom-up proteomika představuje takový postup identifikace proteinů, kdy je daný protein nejprve izolován ze směsi a potom enzymově rozštěpen na směs peptidů, které jsou charakterizovány hmotnostní spektrometrií. Shotgun proteomika je obecný postup identifikace proteinů, kdy je neseparovaná směs proteinů nejprve enzymově rozštěpena na směs peptidů, které jsou následně separovány vhodnou metodou, nejčastěji vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC), a následně analyzovány tandemovou hmotnostní spektrometrií. Top-down proteomika je postup identifikace proteinů, kdy je daný protein izolován ze směsi a následně charakterizován. Tento přístup přináší rychlé informace o molekulové hmotnosti, sekvenci aminokyselin a posttranslačních modifikacích (Chmelík, 2005).

V praxi může být proteomika zaměřena na charakterizaci tolika proteinů přítomných ve vzorku, kolik je možno danou metodou identifikovat; dále na expresní proteomické profilování; mapování proteinových interakčních sítí a mapování posttranslačních modifikací proteinů (Liebler, 2002). V následujícím textu bude blíže popsáno expresní proteomické profilování, na které je zaměřena tato diplomová práce.

Expresní proteomické profilování je identifikace co největšího počtu proteinů v organismu, nebo v buňce, které jsou v určitém stavu (určitý stupeň diferenciací, fáze vývoje, při nemoci, po působení léčiva, po působení různých fyzikálních a chemických podnětů). Nejčastěji je využívána diferenční analýza, kdy jsou srovnávány dva stavy stejného systému (nádorové buňky ošetřené léčivem a nádorové buňky neošetřené léčivem) a jsou identifikovány rozdílně exprimované proteiny. Informace získané expresním proteomickým profilováním mají velký význam pro identifikaci potenciálních terapeutických cílů léčiv při různých onemocněních (Liebler, 2002).

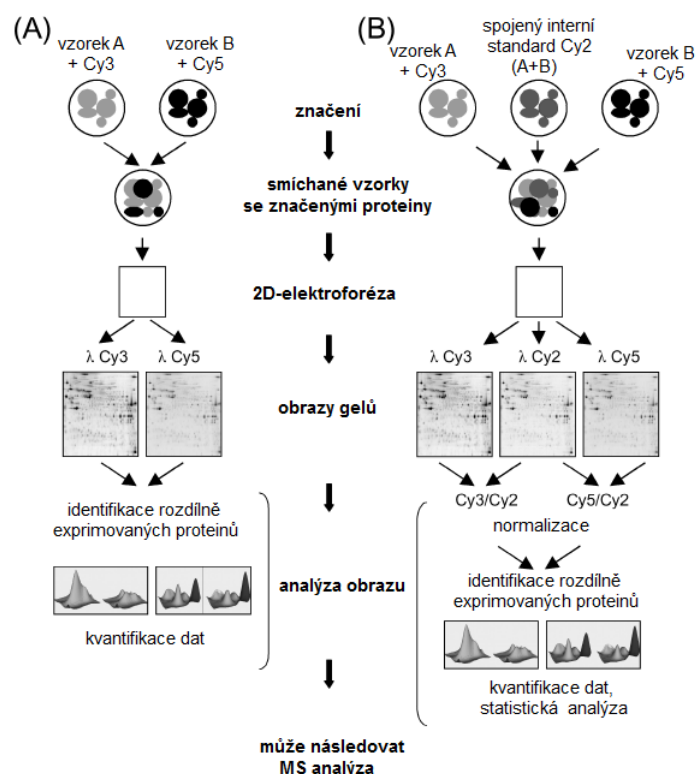
3.2.1 Metody proteomické analýzy

Tradiční metodou analytické proteomiky je dvourozměrná gelová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (2D-SDS-PAGE). K sekvenaci proteinů byla využívána Edmanova degradace, ale ta už je nyní nahrazována hmotnostní spektrometrií. Využívané jsou chromatografické metody, z nichž nejdůležitější jsou dvourozměrná kapalinová chromatografie a afinitní chromatografie (Chmelík, 2005). Největší rozvoj analytické proteomiky nastal díky zavedení nových ionizačních technik hmotnostní spektrometrie MALDI (**m**atrix **a**ssisted **l**aser **d**esorption/ionization, laserová desorpce/ionizace za účasti matrice; Karas & Hillenkamp, 1988) a ESI (**e**lectrospray ionization, ionizace elektrosprejem; Yamashita & Fenn, 1984). Metody 1D-SDS-PAGE (Laemmli, 1970), 2D-SDS-PAGE, HPLC, kapilární elektroforéza, izoelektrická fokusace, afinitní chromatografie a multidimenzionální chromatografické techniky (například iontoměničová chromatografie ve spojení s HPLC na reverzní fázi, RP-HPLC) mohou být využity jako nástroj analytické proteomiky k separaci proteinů pro následnou MS analýzu (Liebler, 2002). Nejpoužívanější postup proteomické analýzy je separace proteinů 1D-, nebo 2D-elektroforézou, digesce proteinů trypsinem v gelu a následná analýza peptidů MS, nebo LC-MS (Medzihradszky et al., 2001).

Pro expresní proteomické profilování je využívána komparativní analýza metodami 2D-SDS-PAGE a LC-MS s izotopicky značenými proteiny (Liebler, 2002).

Komparativní analýza pomocí 2D-SDS-PAGE je provedena tak, že každý vzorek je rozseparován na samostatném gelu a následně jsou tyto dva gely (případně několik gelů) softwarově porovnány (Liebler, 2002). Proteiny v gelu lze vizualizovat několika způsoby. Značení proteinů pomocí radioaktivních izotopů je velmi citlivé, ale finančně velmi náročné a představuje riziko pro zdraví osob, které experiment provádí. Barvení proteinů koloidní Coomassie blue je poměrně levné, ale málo citlivé a má malý lineární dynamický rozsah. Barvení stříbrem je velmi rozšířené, je možno detekovat i 1 ng proteinu, ale má omezený dynamický rozsah a proteiny barvené stříbrem není možné kvantifikovat, protože jednotlivé proteiny mají různou schopnost interakce se stříbrem. Barvení stříbrem také není příliš kompatibilní s MS analýzou. Velmi citlivá je detekce fluorescenčně značených proteinů, která má také široký lineární dynamický rozsah. Důležitou metodou diferenční proteomické analýzy je 2D fluorescenční diferenční gelová elektroforéza (2D-DIGE, Obr. 1). Před separací jsou proteiny ve vzorku značeny fluorescenčními cyaninovými barvivy (deriváty N-hydroxysukcinimidu; Cy3, Cy5, Cy2). Tato barviva se vážou specificky a kovalentně na ϵ -aminoskupiny lysinu v proteinech. Je možné takto označit tři různé vzorky, smísit je a separovat na jednom gelu. Pro kvantifikaci proteinů lze použít interní standard. Je zaručeno, že tentýž protein v každém ze vzorků bude migrovat stejně (má stejný náboj a molekulovou hmotnost).

Jednotlivá barviva mají různou excitaci fluorescence. 2D obraz je zpracován speciálním softwarem, například DeCyder software (Amersham Biosciences; Monteoliva & Albar, 2004).

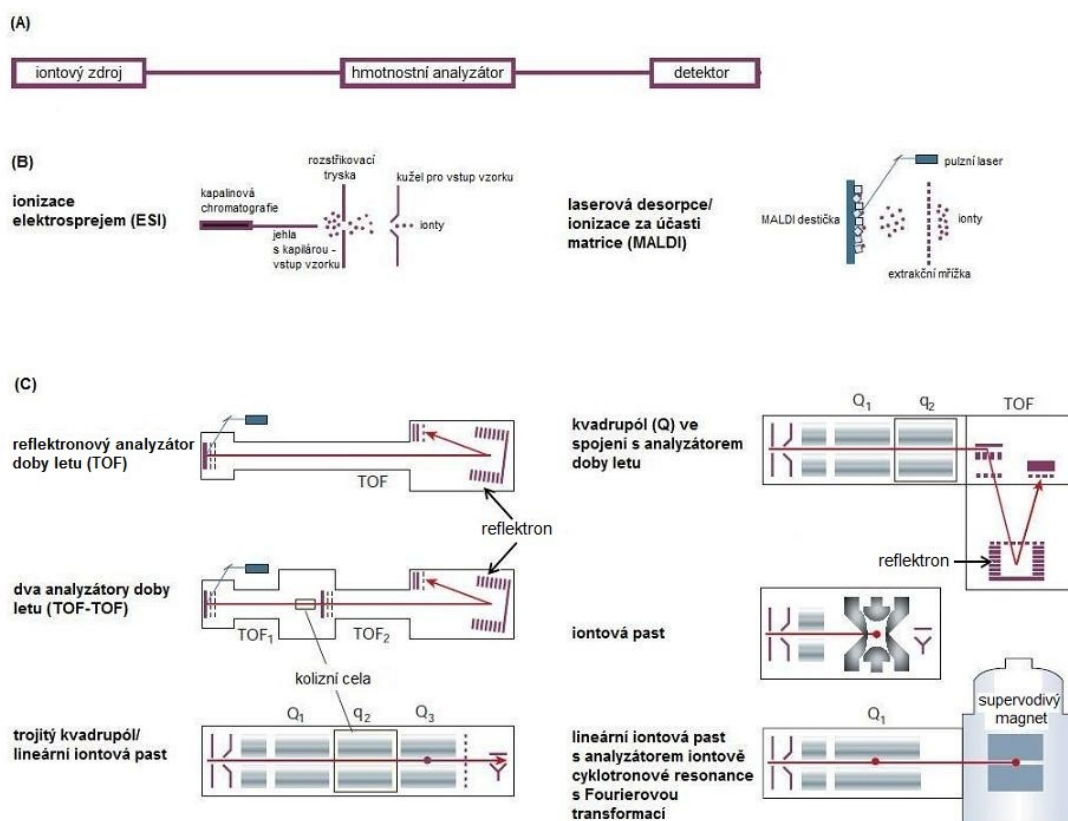


Obr. 1: Schéma provedení 2D-DIGE experimentu. (A) Diferenční analýza s využitím dvou fluorescenčních barviv Cy3 a Cy5. (B) Experiment se třemi fluorescenčními barviv (Cy3, Cy5 a Cy2) s využitím interního standardu, který byl připraven smícháním vzorků A + B v poměru 1:1 a byl značen barvivem Cy2. Interní standard sloužil k normalizaci (převzato z Monteoliva & Albar, 2004).

Elektroforetickými metodami je možné detekovat proteiny v rozmezí molekulových hmotností 10 – 120 kDa a jsou detekovány především kyselé a neutrální proteiny. Bazické a velmi bazické proteiny (pH>9,5) nejsou zaostřeny. Na 2D gelech jsou také zřídka zobrazeny hydrofobní proteiny a většinou jsou vizualizovány pouze vysoce abundantní proteiny. Identifikace spotů na 2D gelu je vždy provedena pomocí softwarových nástrojů (Monteoliva & Albar, 2004).

Nezastupitelnou roli v proteomice hraje identifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. Hmotnostní spektrometrií jsou analyzovány ionty v plynné fázi. Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru, který určí poměr hmoty a náboje (m/z) ionizovaných analytů, a detektoru, který zaznamenává počet iontů při jednotlivých hodnotách m/z (Obr. 2A; Aebersold & Mann,

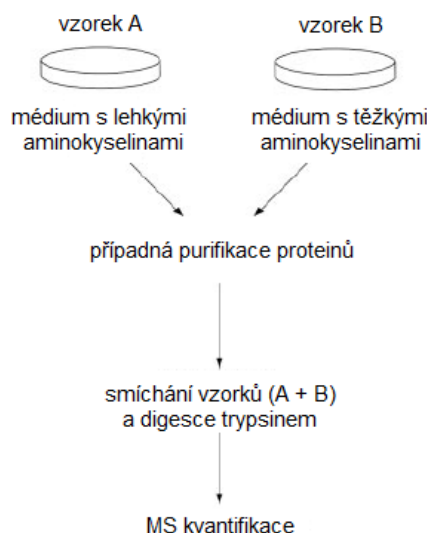
2003). V proteomice jsou využívány ionizační techniky MALDI (Obr. 2B; Karas & Hillenkamp, 1988) a ESI (Obr. 2B; Yamashita & Fenn, 1984). Bylo zjištěno, že pro proteomickou analýzu je vhodné provádět na dvou hmotnostních spektrometrech a využít obě zmíněné ionizační techniky, protože jsou považovány za komplementární (Medzihradzsky et al., 2001). V proteomické analýze se využívá několik typů hmotnostních analyzátorů (Obr. 2C): iontová past (IT) a kvadrupól (Paul & Steinwedel, 1960), lineární analyzátor doby letu (TOF; Willey & McLaren, 1955), analyzátor doby letu s reflektorem (Mamyrin et al., 1973), analyzátor iontové cyklotronové resonance s Fourierovou transformací (FT-ICR; Comisarow & Marshall, 1974), Orbitrap (Makarov, 2000). Analyzátoři se využívají samostatně, nebo jsou kombinovány s jinými analyzátoři (trojitý kvadrupól, dva analyzátoři doby letu, lineární iontová past ve spojení s analyzátořem iontové cyklotronové resonance s Fourierovou transformací a další kombinace).



Obr. 2: Hmotnostní spektrometry v proteomice. **(A)** Obecné schéma hmotnostního spektrometru. **(B)** Ionizační techniky pro hmotnostní spektrometrii proteinů. **(C)** Hmotnostní analyzátoři, na obrázku je naznačena obvyklá kombinace iontového zdroje a hmotnostního analyzátoři (převzato z Aebersold & Mann, 2003).

Proteiny lze pomocí MS identifikovat následujícími způsoby: stanovením molekulové hmotnosti intaktních proteinů, peptidovým mapováním (PMF; peptide mass fingerprinting), fragmentační analýzou peptidů a fragmentační analýzou intaktních proteinů. Metodou PMF jsou stanoveny molekulové hmotnosti peptidů vzniklých specifickým štěpením proteinů určitým enzymem. Stanovené molekulové hmotnosti peptidů jsou porovnány s teoretickými molekulovými hmotnostmi peptidů, které vznikly specifickým štěpením stejným enzymem. Nevýhodou této metody je nejednoznačnost výsledků při analýze směsí proteinů a to, že selhává u mutací a posttranslačních modifikací. Fragmentační analýzou je stanovena molekulová hmotnost fragmentových iontů vzniklých v hmotnostním spektrometru z peptidů. Na základě molekulové hmotnosti je stanovena aminokyselinová sekvence proteinů, jež je využita pro identifikaci proteinů v databázích (Chmelík, 2005).

Pro studium diferenčních změn v proteomu jsou často využívány kvantifikační metody hmotnostní spektrometrie. Většinou se kvantifikace provádí pomocí značení proteinů stabilními izotopy. Stabilní izotopy jsou do proteinů, případně peptidů, inkorporovány metabolicky, enzymaticky, chemickou cestou, nebo se provádí absolutní kvantifikace s využitím syntetických peptidových standardů. Provádí se ale i label-free kvantifikace. Metabolické značení spočívá v zabudování izotopicky značených aminokyselin do proteinů během růstu a dělení buněk (Bantscheff et al., 2007). Jako první bylo popsáno metabolické značení proteinů kvasinek. Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* byly kultivovány na médiu s ^{15}N izotopy, paralelně s nimi byly kultivovány kvasinky na médiu s lehkými izotopy dusíku. MS analýzou byl stanoven poměr intenzit $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ proteinů (Oda et al., 1999). Nejrozšířenějším metabolickým značením je SILAC (stable isotope labeling by amino acids in cell culture; Bantscheff et al., 2007). Metoda SILAC je založena na skutečnosti, že některé aminokyseliny jsou esenciální, buňky je nejsou schopny syntetizovat a musí je přijímat z média. Pokud esenciální aminokyseliny v médiu obsahují těžké izotopy, jsou inkorporovány do proteinů. Paralelně s buňkami kultivovanými na médiu s těžkými izotopy jsou kultivovány také buňky na médiu s lehkými izotopy. Hmotnostně spektrometrická kvantifikace spočívá ve srovnání množství proteinů s lehkým a těžkým řetězcem (Obr. 3; Ong et al., 2002).



Obr. 3: Provedení SILAC experimentu (převzato z Ong et al., 2002).

V původním provedení experimentu byly savčí buňky kultivovány na médiu s deuterovaným leucinem (leu-d3; Ong et al., 2002). V současnosti je nejběžnější modifikace experimentu, která využívá $^{13}\text{C}_6$ -arginin a $^{13}\text{C}_6$ -lysin. Inkorporace těžkého argininu a lysinu zaručuje, že po štěpení trypsinem bude v každém peptidu alespoň jedna těžká aminokyselina (Bantscheff et al., 2007). Enzymatické značení probíhá během proteolytického štěpení, nebo po proteolýze ve druhém kroku inkubace s proteasou. Enzymatickým značením je na C-konec nově vznikajícího peptidu během digesce proteolytickými enzymy inkorporován ^{18}O (Yao et al., 2001). Chemické značení ICAT (isotope-coded affinity tag) je přístup, kdy cysteinová rezidua jsou specifickou chemickou reakcí modifikována reagentem obsahujícím 8 atomů deuteria (těžké peptidy) a reagentem obsahujícím pouze lehké atomy vodíku (lehké peptidy), tyto reagenty jsou spojeny s biotinovou značkou pro afinitní purifikaci (Gygi et al., 1999). Chemickou reakcí s cysteiny využívá také chemická modifikace proteinů ALICE (acid-labile isotope-coded extractants). Značka ALICE obsahuje thiolovou reaktivní skupinu, která reaguje s cysteiny, linker a syntetický polymer. Linker je modifikován deseti atomy deuteria, nebo je syntetizován s vodíkovými atomy. Vazba mezi linkerem a syntetickým polymerem je štěpitelná kyselinou a slouží k uvolnění proteinů s modifikovanými cysteiny z polymeru. Peptidy ze směsi jsou kovalentně zachyceny značkou ALICE a následně jsou z polymeru působením kyseliny uvolněny (Qiu et al., 2002). Následující dvě metody jsou založeny na chemické reakci *N*-hydroxysukcinimidu s ϵ -aminoskupinami lysinu. První z těchto metod je ICPL (isotope-coded protein label). Ke značení peptidů metodou ICPL se používá *N*-nikotinoyloxysuckinimid se čtyřmi atomy deuteria a *N*-nikotinoyloxysuckinimid

s lehkými izotopy vodíku (Schmidt et al., 2005). Druhou metodou je chemická modifikace isobarickou značkou (komerční název iTRAQ, isobaric tags for relative and absolute quantification). Isobaricky značené peptidy nejsou odlišitelné jednoduchým MS experimentem, ale při MS/MS analýze vznikají charakteristická fragmentační spektra, která umožňují kvantifikaci (Ross et al., 2004). Další možností chemické modifikace je esterifikace C-konce peptidů a postranních řetězců kyselých aminokyselin (Asp, Glu) deuterovaným methanolem a současně nemodifikovaným methanolem (Goodlett et al., 2001). Pro kvantifikaci fosfoproteinů se využívá chemické značení PhIAT (**phosphoprotein isotope-coded affinity tag**) V prvním kroku je provedena β -eliminace fosfoskupiny, následuje adice 1,2-ethandithiolu se čtyřmi alkyl deuteriovými atomy, nebo 1,2-ethandithiolu se čtyřmi alkyl vodíkovými atomy. Na závěr je provedena reakce s biotinem pro afinitní purifikaci (Goshe et al., 2001). Výše zmíněné metody kvantifikace jsou relativní. Na hmotnostním spektrometru je určeno relativní množství značeného peptidu ve srovnání s neznačeným peptidem, případně peptidu s těžkou značkou ve srovnání s peptidem s lehkou značkou. Pro každou metodu izotopového značení je charakteristický určitý rozdíl m/z v hmotnostním spektru (Bantscheff et al., 2007). Absolutní kvantifikace AQUA (**absolute quantification of proteins**) využívá interní standardy. Ke vzorku je přidáno známé množství synteticky připravených peptidů značených stabilními izotopy, které jsou stejné jako nativní peptidy ve vzorku. Ze známého množství interního standardu je vypočítáno absolutní množství nativního peptidu ve vzorku (Gerber et al., 2003). Otázkou zůstává, zda manipulace se vzorkem před přidáním syntetických peptidů neovlivnila množství peptidů ve vzorku (Bantscheff et al., 2007). Label-free kvantifikace je založena na porovnání několika MS experimentů, využívají se dva přístupy. První přístup je relativní kvantifikace a označuje se jako spectral feature analýza. U tohoto přístupu jsou nejdříve MS/MS analýzou identifikovány peptidy v proteinovém digestu a následně jsou porovnány plochy píku jednotlivých peptidů mezi vzorky (Bondarenko et al., 2002). Pro druhý přístup se používá označení spectral counting a jde o absolutní kvantifikaci. Tento přístup předpokládá, že počet získaných spekter závisí na množství proteinu ve vzorku. (Silva et al., 2006)

Proteiny lze studovat také pomocí zobrazovacích technik využívajících světelnou a elektronovou mikroskopii, pomocí genetických experimentů (například yeast two-hybrid systém) a pomocí čipových technologií (Aebersold & Mann, 2003).

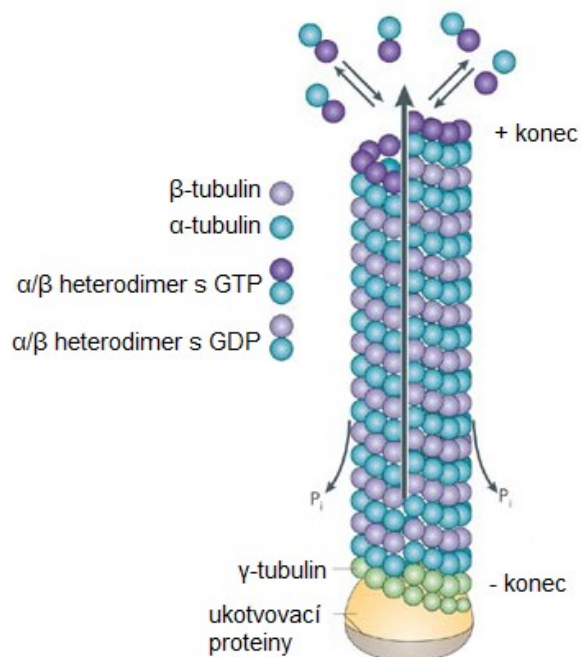
Skutečnost, zda působení léčiv a jiných xenobiotik, případně stresu má vliv na inhibici proteosyntézy, lze testovat průtokovou cytometrií (viz experimentální část

diplovové práce). Průtokový cytometr měří fluorescenci buněk, světlo rozptýlené při průchodu světelného paprsku buňkou, absorpci světla buňkami a množství buněk. Buňky jsou značeny specifickým fluorescenčním barvivem. V okamžiku, kdy buňka prochází přes paprsek světla o excitační vlnové délce, je změřena fluorescence, která poskytuje kvantitativní informaci o množství fluorescenčního barviva navázaného na buňku. Průtoková cytometrie je metoda s vysokým rozlišením (Fulwyler, 1974).

3.3 Klinicky používané rostlinné alkaloidy s protinádorovým účinkem – inhibitory dynamiky mikrotubulů

3.3.1 Mikrotubuly

Mikrotubuly jsou nekovalentní cytoskeletární polymery, které jsou součástí buněk všech eukaryotních organismů. Hrají klíčovou roli při mitóze, pohybu buněk, intracelulárním transportu, sekreci, udržují tvar buněk a určují buněčnou polarizaci. Jsou to polarizované struktury složené z podjednotek, heterodimerů α - a β -tubulinu. Tyto podjednotky dále asociují mechanismem hlava – ocas a vytváří polarizované lineární struktury, protofilamenta (Conde & Cáceres, 2009). Mikrotubuly jsou dlouhé, duté a válcovité struktury, které jsou složené z laterálně asociovaných tubulinových protofilament. Průměr mikrotubulů je roven přibližně 25 nm. Počet protofilament v mikrotubulu se může pohybovat v rozmezí 10 – 18. *In vivo* jsou mikrotubuly většinou tvořeny 13 protofilamenty, *in vitro* je počet protofilament závislý na experimentálních podmínkách. Bylo publikováno několik modelů, které popisovaly mechanismus skládání mikrotubulů na strukturní úrovni. Zjednodušující model (Obr. 4) předpokládá postupné přidávání po jednom tubulinovém dimeru na rostoucí konec centrální části (Matesanz et al., 2011).



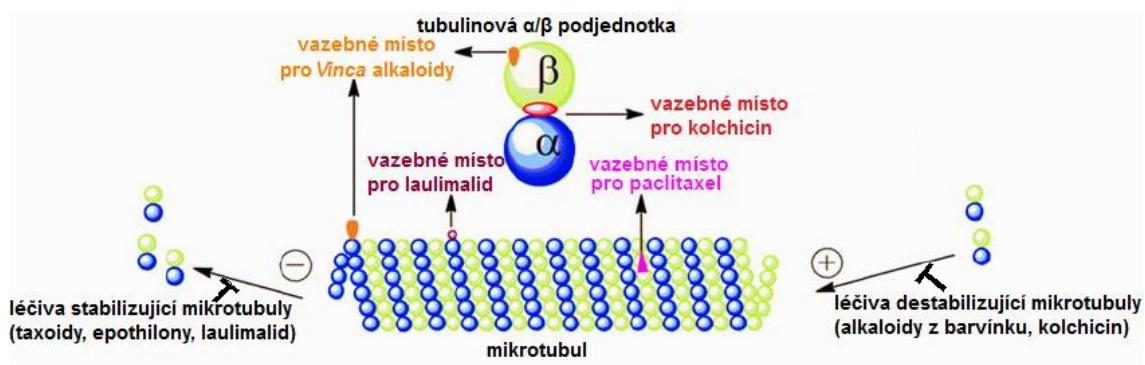
Obr. 4: Připojování α/β tubulinových heterodimerů na rostoucí (+ konec) mikrotubulu (převzato z Conde & Cáceres, 2009).

V každém protofilamentu jsou α/β heterodimery orientované tak, že β -tubulinový monomer je na rychle rostoucím konci mikrotubulu (+ konec) a α -tubulinový monomer je lokalizován na pomalu rostoucím konci (- konec). Laterální interakce mezi podjednotkami sousedních protofilament byla popsána jako mřížka B-typu se spojem (Obr. 4; spoj je označen šipkou). Součástí mikrotubulu je také třetí izoforma tubulinu, γ -tubulin, který je lokalizován na - konci a funguje jako templát pro správné složení mikrotubulů. Když se na + konec připojí nový tubulinový dimer, katalytická doména α -tubulinu aktivuje nukleotidové výměnné místo (E místo) předcházející β -podjednotky a GTP je připraveno k hydrolyze. Na + konci mikrotubulu se vytváří GTP čepička, která stabilizuje strukturu mikrotubulu. Pokud je GTP čepička hydrolyzována, protofilamenta se od sebe odchýlí a mikrotubul rychle depolymerizuje. Během polymerizace, nebo krátce po jejím ukončení tubulinové podjednotky hydrolyzují GTP, který je na nich navázán. Mikrotubuly jsou tvořeny převážně GDP-tubulinem. Depolymerizace je charakterizována rychlým ztrácením GDP-tubulinových podjednotek z + konce. Na - konci dochází ke kontaktu mezi E místem nového dimeru a katalytického regionu poslední podjednotky na konci mikrotubulu, nevytváří se zde GTP čepička (Conde & Cáceres, 2009).

Vlastnosti mikrotubulů jsou ovlivněny izoformami tubulinu, kterými jsou tvořeny, a posttranslačními modifikacemi. Součástí mikrotubulů mohou být 3 izoformy α -tubulinu

($\alpha 1$, $\alpha 2$ a $\alpha 4$) a 5 izoforem β -tubulinu (βI , βII , βIII , βIVa a βIVb). Posttranslační modifikace odlišují jednotlivé subpopulace mikrotubulů a selektivně ovlivňují jejich funkci. Mikrotubuly mohou být pozměněny řadou posttranslačních modifikací – tyrosinací, detyrosinací, acetylací, polyglutamylací, polyglycyací, fosforylací, palmitoylací a dalšími. Mimo tubulinovou tyrosinligasu, která připojuje tyrosin k volnému α -tubulinu, je většina modifikujících enzymů inkorporována do mikrotubulů. Posttranslační modifikace neovlivňují přímo dynamiku mikrotubulů, jsou však spojeny s počasem rozpadu a prostorovou distribucí mikrotubulů. (Conde & Cáceres, 2009).

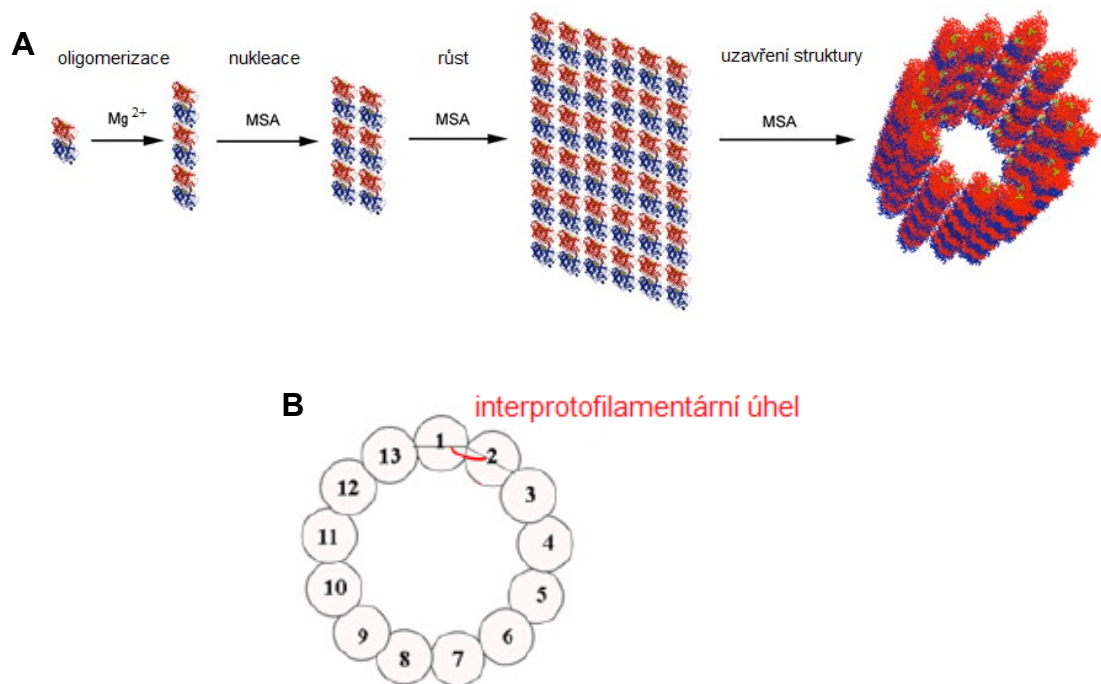
Léčiva, která narušují dynamiku mikrotubulů (tzv. antimitotická léčiva; MTA, microtubule targeting agents), jsou široce využívána při léčbě nádorových onemocnění. Na mikrotubulu existují nejméně 4 vazebná místa pro MTA (Obr. 5; Lu et al., 2012).



Obr. 5: Vazebná místa pro některá léčiva na mikrotubulu a na tubulinovém dimeru. Do vazebného místa pro paclitaxel se váží i ostatní taxoidy a epothilony (převzato z Lu et al., 2012).

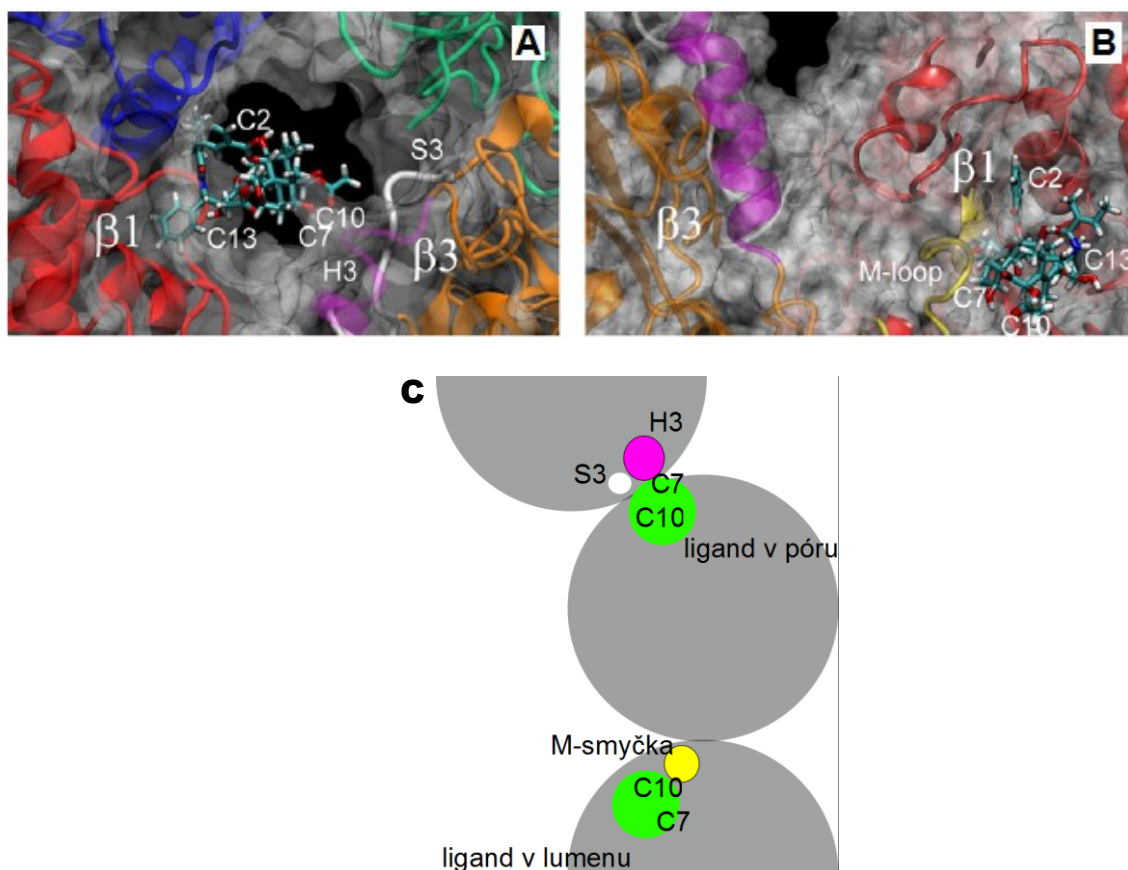
Významnou a často studovanou skupinou antimitotických léčiv jsou **léčiva stabilizující mikrotubuly** (MSA, microtubule stabilizing agents).

Byla charakterizována strukturní dráha MSA-indukované polymerizace mikrotubulů. Prvním krokem je oligomerizace tubulinových dimerů mechanismem hlava – ocas v přítomnosti Mg^{2+} iontů za vzniku lineárních oligomerů, nazývaných protofilamenta. Laterálním spojením lineárních oligomerů za přítomnosti MSA vznikne centrální část (nukleus), k níž se připojují další protofilamenta, dokud není počet protofilament dostatečný k vytvoření válcovité struktury se správným interprotofilamentárním úhlem (Obr. 6). Tento úhel je definován jako průměrný úhel mezi protofilamenty v příčném řezu válcovité struktury (Matesanz et al., 2011).



Obr. 6: (A) Skládání mikrotubulů indukované léčivy stabilizujícími mikrotubuly (MSA), (B) vyznačení úhlu (červeně), který svírají jednotlivá protofilamenta mezi sebou (převzato z Matesanz et al., 2011).

Na základě experimentů s paclitaxelem a několika jeho synteticky připravenými analogy bylo zjištěno, že MSA modifikují strukturu tubulinových polymerů tím, že ovlivňují kontakt mezi protofilamenty. V důsledku působení MSA dochází ke změně průměrného počtu protofilament v mikrotubulu a průměru mikrotubulů v nm. Tyto změny jsou různé v závislosti na použitém léčivu. Tato léčiva se váží do póru a do lumenu mikrotubulu. Ze simulací vazby MSA do póru a lumenu mikrotubulu vyplývá, že tuto vazbu silně ovlivňuje interakce MSA se třemi regiony mikrotubulu. Zmíněnými regiony jsou S7-H9 smyčka (M-smyčka), helix H3 a vlákno S3 (Obr. 7). Tyto tři regiony byly označeny jako klíčové pro interakci mezi protofilamenty (Matesanz et al., 2011).



Obr. 7: Model ligandu navázaného na mikrotubul. (A) Derivát paclitaxelu, cefalomanin, navázaný v póru mikrotubulu; **(B)** cefalomanin navázaný v lumenu mikrotubulu. **(C)** Obecné schéma interakce ligandu v obou vazebných místech (v lumenu i v póru) s vyznačením struktur, které ovlivňují vazbu ligandu na mikrotubul. Ligand vázaný v póru mikrotubulu interaguje s H3 helixem přes substituent v pozici C7, přičemž dochází ke zvětšování interprotofilamentárního úhlu, a s S3 vláknem přes substituent v pozici C10, přičemž dochází ke zmenšování interprotofilamentárního úhlu. Ligand vázaný v lumenu mikrotubulu interaguje s M-smyčkou vláknem přes substituent v pozici C10, přičemž dochází ke zmenšování interprotofilamentárního úhlu. Mikrotubul je zobrazen z + konce (převzato z Matesanz et al., 2011).

Mikrotubuly stabilizující léčiva lze rozdělit do dvou skupin podle toho, zda se váží na tři známá vazebná místa na mikrotubulech (Canales et al., 2011).

Do první skupiny se řadí paclitaxel, docetaxel, epothilony, discodermolid, dictyostatin, cyklostreptin a další (Canales et al., 2011). Discodermolid je polyhydroxylovaný alkatetraen s laktonovým kruhem, který byl izolován z mořské houby *Discodermia dissoluta* a působí jako kompetitivní inhibitor paclitaxelu. Vazbu paclitaxelu na tubulin také inhibují epothilony A a B, které byly izolovány z půdní bakterie *Sorangium cellulosum* (Kowalski et al., 1997). Dicytostatin 1 je polyketidové

cytostatikum izolované z mořské houby *Spongia* sp. (Isbrucker et al., 2003). Cyklostreptin je přirozeným produktem bakterie *Streptomyces* sp. 9885, na mikrotubuly se váže kovalentně a způsobuje ireverzibilní stabilizaci mikrotubulů (Buey et al., 2007).

Mikrotubuly stabilizující léčiva z první skupiny se kompetitivně váží na jedno, nebo obě vazebná místa v lumenu mikrotubulu (vnitřní strana tubulinové β -podjednotky) a do póru mikrotubulu (vnější strana tvořená α a β podjednotkami odlišných heterodimerů). Předpokládá se, že se léčiva váží na vnější stranu mikrotubulu, a tím usnadňují transport do lumenu. Vazba do vazebného místa v póru mikrotubulu je dostačující k indukci skládání mikrotubulů a je rychlá. Transport do lumenu je pomalejší. V případě disociace léčiva z mikrotubulu je pořadí těchto dějů opačné – první proběhne pomalé uvolnění léčiva z lumenu do póru a následuje druhý rychlý krok. Bylo prokázáno, že cyklostreptin, který se na mikrotubuly váže kovalentně, se váže do obou míst v lumenu i do póru mikrotubulu. V případě nepolymerizovaných tubulinových α/β heterodimerů byl cyklostreptin navázán pouze na vnější straně. Vnitřní (luminální) strana nepolymerizovaného tubulinu je předpokládaným vazebným místem pro epothilony. Naopak u léčiv, která využívají stejná vazebná místa jako paclitaxel, nebylo dosud prokázáno, zda se váží pouze na vnitřní stranu mikrotubulu, nebo pouze na vnější stranu mikrotubulu, nebo se váží z obou stran. Stechiometrie vazby na tubulinové podjednotky α/β je striktně v poměru 1:1, což naznačuje, že vazba k oběma podjednotkám současně se vylučuje (Canales et al., 2011).

Do druhé skupiny léčiv stabilizujících mikrotubuly patří například laulimalid a pelorusid. Léčiva z této skupiny se kompetitivně váží na jiné vazebné místo na mikrotubulech, které doposud nebylo charakterizováno (Canales et al., 2011). Laulimalid a pelorusid patří, stejně jako epothilony, do skupiny makrolidových cytostatik (tj. cytostatik obsahujících makrocyclický laktonový kruh). Pelorusid je sekundárním metabolitem novozélandské mořské houby *Mycale hentscheli* a laulimalid byl izolován z mořské houby *Cacospongia mycofijiensis* (Hood et al., 2002).

Druhou významnou skupinou antimitotických léčiv jsou **léčiva destabilizující mikrotubuly**, mezi která patří alkaloidy z barvíčku a kolchicin. Obecně se alkaloidy z barvíčku váží s vysokou afinitou na jednu, nebo více tubulinových dimerů na + konci mikrotubulu, ale neinkorporují se do mikrotubulů. Kolchicin se na rozdíl od alkaloidů z barvíčku může inkorporovat do mikrotubulů. Kolchicin navázaný na β -tubulinu stericky brání lineárnímu spojení α a β tubulinu, vzniká zakřivený dimer, a tím je inhibována polymerizace mikrotubulu (Lu et al., 2012).

Existuje řada dalších přírodních produktů, které vykazují biologickou aktivitu, cytotoxicitu a váží se do vazebného místa pro kolchicin (tzv. inhibitory vazebného

místa pro kolchicin). Do této skupiny patří například kombrestatiny (stilbenoidní fenoly izolované z africké rostliny *Combretum caffrum*, kombretastatin A-4 a jeho analoga), podofylo toxin (nealkaloidní toxický lignan z *Podophyllum* sp.), steganacin (lignanový lakton z ethanolického extraktu *Steganotaenia araliacea* Hochest), kuracin A (hlavní lipid získaný purifikací z cyanobakterie *Lyngbya majuscula*) a 2-methoxyestradiol, což je endogenní metabolit estrogenu, produkovaný jaterním cytochromem P450 (Lu et al., 2012). Do vazebného místa pro kolchicin se váže také syntetický reverzibilní inhibitor skládání mikrotubulů nokodazol (Samson et al., 1979; Lu et al., 2012) a řada dalších syntetických molekul.

3.3.2 Alkaloidy

Alkaloidy jsou většinou sekundárními metabolity zelených rostlin (Macholán, 2003). Ve větší míře jsou produkty krytosemenných rostlin, ale i některými nahosemennými, plavuněmi, přesličkami, mechorosty a řasami. Také jsou produkovány bakteriemi (alkaloidní antibiotika), houbami, mořskými živočichy (houbami, plži, hlísty a mechovkami), členovci, obojživelníky (žábami a mloky), dokonce i několika zástupci ptáků a savců (Wink, 2008).

Název alkaloidy poprvé použil v roce 1818 Meissner, který tyto látky pojmenoval podle jejich alkalické povahy. Některé alkaloidy jsou však neutrální. V rostlině jsou vázány na organické kyseliny, například šťavelovou, jablečnou, vinnou, citronovou, akonitovou, mekonovou, chelidonovou a chinovou. Izolované alkaloidy tvoří reakcí s kyselinami zpravidla bezbarvé krystalické soli hořké chuti, výjimkou je například berberin, který je žlutý. Alkaloidy obsahuje asi 10 % všech rostlinných druhů a 20 % rostlinných čeledí, převážně dvouděložných. V rostlinách jsou zastoupeny v množství pod 0,5 % sušiny, výjimečně se vyskytují i ve větším množství (například chinin a kofein). Často se tvoří jen v některém rostlinném orgánu (Macholán, 2003).

Velká část alkaloidů jsou látky heterocyklické povahy. Jen málo struktur má exocyklicky vázaný dusík (alkaloidy ocúnu, tisů a zimostrázu), vzácněji jsou dusíkaté cykly spojeny i s jinými systémy (furanovým, kumaronovým a podobně). Prekurzory alkaloidů mohou být aminokyseliny ornitin, lysin, tyrosin, tryptofan, kyselina anthranilová, prekurzorem alkaloidů může být kyselina nikotinová, purinové báze a některé další látky, některé se tvoří polyketidovou drahou, řada alkaloidů patří biogeneticky k diterpenům, seskviterpenům a triterpenům. Mnohé terpenoidní alkaloidy jsou glykosylovány. Pokud jsou alkaloidy opticky aktivní, pak převažují levotočivé formy (Macholán, 2003).

Rostlina alkaloidy produkuje zejména k ochraně před herbivory, mikroorganismy, viry a tyto alkaloidy také mohou zprostředkovávat kompetici s jinými rostlinami. Zřídka také mohou alkaloidy sloužit rostlinám jako fytoatraktanty, i když tato funkce je spíše připisována terpenoidům a fenolickým látkám. V mnoha případech může mít jeden alkaloid více než jednu biologickou funkci. Takové alkaloidy obsahují více aktivních funkčních skupin, a ty umožňují alkaloidu interagovat s několika molekulárními cíli. Alkaloidy se vždy v rostlině vyskytují ve směsi s několika dalšími alkaloidy, které mají stejný biosyntetický prekurzor a liší se funkčními skupinami. Také mohou sloužit jako zdroj dusíku nebo jako molekuly transportující dusík (Wink et al., 2008).

Mnohé alkaloidy mají silný fyziologický účinek, a proto od pradávna sloužily jako léčiva, uspávací prostředky a jedy (Macholán, 2003). Některé mají farmakologické vlastnosti a jsou využívány v klinické praxi například při léčbě vysokého krevního tlaku, k tlumení bolesti a křečí, ke stimulaci krevního oběhu a dýchacího systému, nebo jako cytostatika při léčbě rakoviny (Wink et al., 2008).

3.3.3 Taxoidy

Taxoidy (taxany) byly první klinicky dostupnou skupinou léčiv se stabilizačním účinkem na mikrotubuly. Do této skupiny léčiv patří paclitaxel a chemicky příbuzné sloučeniny (Matesanz et al., 2011). V současnosti jsou klinicky využívány především paclitaxel a docetaxel.

Dalším klinicky využívaným taxoidem je kabazitaxel (Jevtana[®], RPR 116258A, XRP6258, TXD258, systematický název (2 α ,5 β ,7 β ,10 β ,13 α)-4-acetoxy-13-((2R,3S)-3-[(*tert*-butoxykarbonyl)amino]-2-hydroxy-3-fenylpropanoyl)oxy)-1-hydroxy-7,10-dimethoxy-9-oxo-5,20-epoxytax-11-en-2-ylbenzoát/propan-2-on, benzoát a propan-2-on jsou v léčivu zastoupeny v poměru 1:1), který byl, stejně jako docetaxel, získán semisynteticky z prekurzoru izolovaného z jehličí tisu. V roce 2010 byl kabazitaxel v kombinaci s prednisonem schválen pro léčbu hormonálně rezistentního karcinomu prostaty. Kabazitaxel byl schválen pro léčbu pacientů, kteří byli předtím neúspěšně léčeni docetaxelem, nebo kombinací docetaxelu a jiných cytostatik (U. S. Food and Drug Administration, 2010). Klinické testy ukazují, že kabazitaxel je potenciálním cytostatikem pro léčbu nádorů citlivých vůči docetaxelu i nádorů rezistentních vůči docetaxelu. Stabilizuje mikrotubuly stejně účinně jako docetaxel. Při experimentech na buněčné linii CaCo-2 odvozené od kolorektálního adenokarcinomu kabazitaxel vykazoval 5× vyšší cytotoxicitu ve srovnání s docetaxelem. Buněčná linie CaCo-2 exprimuje proteiny zodpovědné za mnohočetnou lékovou rezistenci a je rezistentní vůči docetaxelu. U pacientů s pokročilými solidními

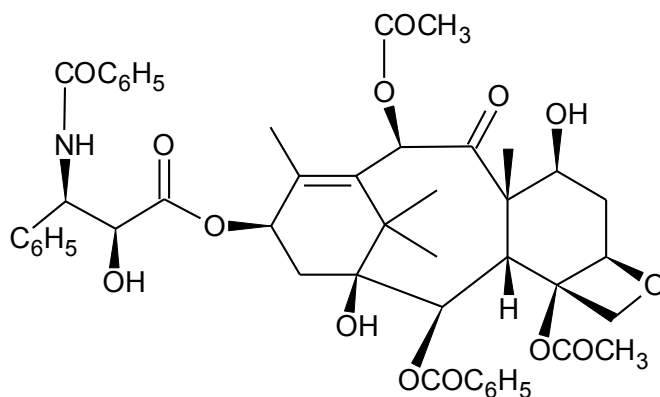
nádory, kteří byli předtím léčeni docetaxelem, nebo paclitaxelem, bylo zjištěno, že karbazitaxel je účinnou a poměrně bezpečnou léčbou těchto nádorů, má příznivý farmakokinetický profil a ve srovnání s ostatními taxoidy je méně neurotoxický (Diéras et al., 2013).

Ve fázi klinického testování je další semisyntetický taxoid larotaxel (XRP9881, systematický název (2 α ,3 ξ ,4 α ,5 β ,7 α ,10 β ,13 α)-4,10-bis(acetyloxy)-13-((2*R*,3*S*)-3-((*terc*-butoxykarbonyl)amino]-2-hydroxy-3-fenylpropanoyl]oxy)-1-hydroxy-9-oxo-5,20-epoxy-7,19-cyclotax-11-en-2-ylbenzoát). Klinické testy ukazují, že larotaxel má protinádorovou aktivitu a je potenciálním novým protinádorovým léčivem. U pacientek s metastatickou rakovinou prsu, které byly již dříve léčeny jinými taxoidy, vykazoval pozitivní protinádorovou aktivitu, přijatelnou toxicitu a dobrý terapeutický index (Diéras et al., 2008). Bylo zjištěno, že larotaxel v kombinaci s karboplatinou by mohl být využit pro léčbu pacientů s metastatickým (fáze IIIb), nebo pokročilým (fáze IV) nemalobuněčným karcinomem plic (Robert et al., 2010). Další klinické studie publikovány nebyly a dosud nebyla publikována informace, že by léčivo bylo schváleno pro použití v klinické praxi.

Pro studium vazby taxoidů na mikrotubuly (Matesanz et al., 2011) byly využity deriváty baccatinu III Chitax-1, -4, -5, -11, -12, -13, -14, -15, -17, -18, -19, -20, -21, -40 a fluorescenční deriváty Flutax-1, Flutax-2 a Hexaflutax; biologická aktivita těchto látek zatím v žádné publikaci testována nebyla.

3.3.3.1 Paclitaxel

Paclitaxel (Taxol, systematický název (2 α ,4 α ,5 β ,7 β ,10 β ,13 α)-4,10-bis-(acetyloxy)-13-[[2*R*,3*S*]-3-(benzoylamino)-2-hydroxy-3-fenylpropanoyl]oxy]-1,7-dihydroxy-9-oxo-5,20-epoxytax-11-en-2-ylbenzoát; Obr. 8) je přirozeně se vyskytující diterpenoidní alkaloid. Byl první sloučeninou s taxanovým kruhem, u něhož byla prokázána antileukemická a protinádorová aktivita (Wani et al., 1971).



Obr. 8: Struktura paclitaxelu (převzato z Bissery et al., 1991).

Byl izolován z ethanolického extraktu kůry kmene pacifického tisů *Taxus brevifolia* (Obr. 9; Wani et al., 1971). Touto cestou se však paclitaxel pro klinické účely neizoluje, protože pro izolaci 1 kg paclitaxelu je potřeba 6,7 t kůry *Taxus brevifolia*, což odpovídá 2000 – 3000 stromům. Získávání paclitaxelu z kůry by vedlo ke kritickému úbytku tisů *Taxus brevifolia*, protože odstranění kůry je destruktivní proces a tisy rostou velmi pomalu (Jennewein & Croteau, 2001). V současné době se paclitaxel získává semisynteticky z 10-deacetylbaaccatinu III z evropského tisů *Taxus baccata* přes meziprodukt 7-triethylsilylbaaccatin III, která lze také získat z baaccatinu III triethylsilylací (Denis et al., 1988). Dalším možným způsobem získávání paclitaxelu je jeho biosyntéza v buněčných kulturách (Jennewein & Croteau, 2001), která však zatím není v klinické praxi využívána.



Obr. 9: *Taxus brevifolia* (tis západoamerický; převzato z Seiler et al, 2012).

Paclitaxel se běžně používá k léčbě rakoviny prsu, plic, vaječnicků, hlavy a krku a některých dalších typů rakoviny (Jordan et al., 1993; Mekhail & Markman, 2002). V kombinaci s cisplatinou je paclitaxel léčivem první fáze používaným při léčbě nemalobuněčného karcinomu plic (Eisenhauer & Vermorken, 1998). Je účinný i při léčbě nádorů, mezi které patří například dříve léčený lymfom, malobuněčný karcinom plic, nádory jícnu, žaludku, dělohy, močového měchýře a nádory zárodečných buněk, a jež jsou rezistentní vůči jiným chemoterapeutikům. Paclitaxel je také účinný při léčbě Kamposiho sarkomu, který je spojený s nemocí AIDS (Mekhail & Markman, 2002), rakoviny děložního čípku a melanomu (Jennewein & Croteau, 2001).

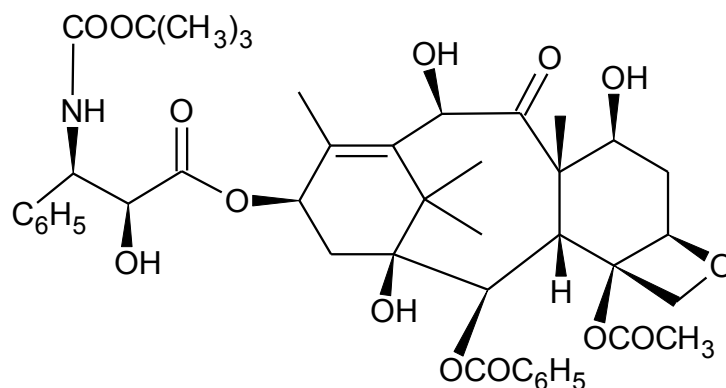
Pokud je koncentrace paclitaxelu v krevní plazmě vysoká, může být velmi toxický. Naopak pokud je jeho koncentrace v krevní plazmě nízká, může být léčba neúčinná (Taniguchi et al., 2005). Mezi toxické vedlejší účinky paclitaxelu patří hypersenzitivní reakce, neurotoxicita a hematologická toxicita (Mekhail & Markman, 2002).

Paclitaxel podporuje polymerizaci mikrotubulů a indukuje tvorbu shluků mikrotubulů. Indukuje tvorbu mnohojaderných buněk, inhibuje proliferaci buněk a blokuje mitózu na rozhraní metafáze a anafáze. Inhibice mitózy je způsobena změnou organizace mitotického vřeténka a vytvořením nekompletní metafázové roviny chromozomů. Velmi nízké koncentrace paclitaxelu (8 nM pro buňky epiteliálního buňky adenokarcinomu dělohy, tj. buněčná linie HeLa) jsou dostatečné pro inhibici proliferace buněk. Při nejnižší účinné koncentraci pro buněčnou linii HeLa (koncentrace pod 10 nM) nedochází ke změně hmotnosti mikrotubulů v buňce, při koncentraci vyšší než 10 nM se hmotnost polymerů mikrotubulů v buňce zvyšuje a při vysoké koncentraci (330 nM) paclitaxelu byla hmotnost mikrotubulů v buňkách až 5× vyšší ve srovnání s kontrolními buňkami (Jordan et al., 1993).

Schopnost pacientů metabolizovat paclitaxel je individuální, závisí na metabolické aktivitě enzymů, které se podílí na degradaci paclitaxelu. Za metabolizaci paclitaxelu jsou zodpovědné zejména 2 izoformy cytochromu P450 (CYP): CYP2C8 a CYP3A4. Pokud je lék odbouráván dvěma enzymy, závisí poměr, v jakém tyto enzymy léčivo odbourávají, na množství enzymu a na afinitě enzymu k léčivu. Přestože je CYP3A4 v lidských játrech exprimován téměř 6krát intenzivněji než CYP2C8, hlavním enzymem metabolizujícím paclitaxel je CYP2C8. Bylo zjištěno, že koncentrace produktu, který vzniká degradací paclitaxelu enzymem CYP2C8, byla 2,3krát vyšší než koncentrace produktu, který vzniká degradací paclitaxelu enzymem CYP3A4. Individuální rozdíly mezi pacienty ve schopnosti metabolizovat léčivo pak závisí na míře exprese jednotlivých enzymů (Taniguchi et al., 2005).

3.3.3.2 Docetaxel

Docetaxel (Taxoter[®], *N*-debenzoyl-*N*-*terc*-butoxykarbonyl-10-deacetyltaxol, RP 56976, NSC 628503, systematický název 1,7β,10β-trihydroxy-9-oxo-5β,20-epoxytax-11-en-2α,4,13α-triyl-4-acetát-2-benzoát-13-[(2*R*,3*S*)-3-[(*terc*-butoxykarbonyl)amino]-2-hydroxy-3-fenylpropanoát]; Obr. 10) je semisyntetickým analogem paclitaxelu (Bissery et al., 1991). Konformace taxanového kruhu, určená z krystalové struktury, je u paclitaxelu a docetaxelu podobná (Mastropaolo et al., 1995).



Obr. 10: Struktura docetaxelu (převzato z Bissery et al., 1991)

Byl získán semisyntetickou cestou z necytotoxického prekursoru 10-deacetylbaecatinu III, který byl vyextrahován z jehličí evropského tisu *Taxus baccata* (Obr. 11). K 10-deacetylbaecatinu III byl esterifikací připojen postranní řetězec, který byl připraven chemickou syntézou (Bissery et al., 1991).



Obr. 11: *Taxus baccata* (tis červený; převzato z Seiler et al., 2012).

Docetaxel se používá při léčbě rakoviny prsu, nemalobuněčného karcinomu plic, karcinomu hlavy a krku, prostaty, žaludku (příbalová informace Docetaxel Pharmaki Generics, 2012; Lau et al., 2011), rakoviny močového měchýře, karcinomu nosohltanu (Lau et al., 2011), pokročilých stádií rakoviny žaludku (Sulkes et al., 1994), malobuněčného karcinomu plic (Morse et al., 2005) a případně některých dalších typů rakoviny. Docetaxel může být podáván samotný, nebo v kombinaci s doxorubicinem, trastuzumabem, nebo capecitabinem při léčbě pokročilého nádoru prsu; v kombinaci s doxorubicinem a cyklofosfamidem při léčbě časného nádoru prsu s postižením

lymfatických uzlin; samotný, nebo v kombinaci s cisplatinou při léčbě nádoru plic; v kombinaci s prednisonem, nebo prednisolonem při léčbě karcinomu prostaty; v kombinaci s cisplatinou a 5-fluorouracilem při léčbě metastatického karcinomu žaludku a karcinomu hlavy a krku (příbalová informace Docetaxel Pharmaki Generics, 2012). Docetaxel je vysoce aktivní protinádorové léčivo a je jedním z neúčinnějších léků při léčbě rakoviny prsu (Hartmann et al., 2012). V kombinaci s lékem prednisonem se používá k léčbě pokročilých stádií rakoviny prostaty, kterou nelze léčit hormonálně. Tato léčba je účinnější než dříve používaná léčba kombinací léků mitoxantronu a prednisonu, zajišťuje delší přežívání, menší bolesti, snížení hladiny prostatického specifického antigenu a také vyšší kvalitu života léčených mužů (Tannock et al., 2004).

Docetaxel je podáván formou infuze do žíly, infuze trvá asi 1 hodinu a je podávána zpravidla 1× za 3 týdny. Po dobu jednoho dne před léčbou docetaxelem je nutné užívat premedikaci kortikosteroidy k vnitřnímu užití, například dexametazon, a dále je nutné kortikosteroidy stále užívat jeden nebo dva dny po podání docetaxelu, aby se minimalizovalo riziko některých nežádoucích účinků (alergické reakce a zadržování tekutin projevující se otoky rukou, nohou a dolních končetin nebo přírůstkem tělesné hmotnosti), které se mohou objevit po podání infuze. Pacient nemůže docetaxel užívat, pokud má nízký počet bílých krvinek, vážné postižení jater nebo je alergický, případně přecitlivělý na docetaxel a kteroukoli další složku přípravku (příbalová informace Docetaxel Pharmaki Generics, 2012).

Nejčastějšími vedlejšími účinky docetaxelu mohou být infekce, pokles počtu červených krvinek (anemie), bílých krvinek (zejména neutropenie) a krevních destiček, neuropatie, horečka, únava, příznaky podobné chřipce, nespavost, pocity snížené citlivosti nebo mravenčení, bolest svalů, kloubů, zad, kostí a hlavy, nevolnost, průjem, zácpa, zvracení, bolest břicha, trávicí obtíže, ztráta chuti k jídlu, změny ve vnímání chuti, přírůstek, nebo úbytek hmotnosti, zánět oka, zvýšená slzivost oka, otoky způsobené porušeným odtokem lymfy, dechová nedostatečnost, zvýšená nosní sekrece, zánět krku a nosu, kašel, krvácení z nosu, vřídky v ústech, vypadávání vlasů, dermatologické reakce, zarudnutí nebo otok dlaní, chodidel, případně i paží, obličeje a těla, které může vést k olupování kůže, a také hypersenzitivní reakce, která je eliminována protialergickou léčbou. Někdy může docházet k zadržování tekutin v těle, což se projevuje otoky periferních částí těla a vylévání tekutiny v pohrudnici (Sulkes et al., 1994; Lau et al., 2011; příbalová informace docetaxel Pharmaki Generics, 2012). Poměrně častým vedlejším efektem je toxické působení docetaxelu na nehty. Poškození nehtů může být po několika cyklech léčby docetaxelem velmi těžké, příčina tohoto poškození není známa (Lau, 2011). Zmíněné vedlejší účinky postihují více než 1 z 10 pacientů (příbalová informace docetaxel Pharmaki Generics, 2012). Dalšími

častými vedlejšími účinky postihujícími 1 – 10 % pacientů jsou kandidóza úst (infekce vyvolaná kvasinkou *Candida albicans*), dehydratace, závratě, poruchy sluchu, pokles krevního tlaku, nepravidelná, nebo zrychlená srdeční akce, selhání srdce, zánět jícnu, sucho v ústech, obtížné nebo bolestivé polykání a krvácivost. Objevuje se také zvýšená hladina jaterních enzymů, a proto je potřeba pravidelně provádět krevní testy. Méně častými vedlejšími účinky postihujícími 0,1 – 1 % pacientů jsou mdloby, kožní reakce v místě vpichu, flebitida (zánět žil), zánět tlustého střeva, zánět tenkého střeva, protržení střeva a tvorba krevních sraženin. Docetaxel také může poškozovat mužskou plodnost. Muži, kteří jsou léčeni docetaxelem, by neměli během léčby a ještě dalších 6 měsíců po ukončení léčby počít dítě. Ženy v průběhu chemoterapie nesmí kojit a otěhotnět, protože docetaxel může poškodit nenarozené dítě (příbalová informace docetaxel Pharmaki Generics, 2012).

V krvi dochází ke spontánní interakci docetaxelu s hemoglobinem. Interakce indukuje změnu konformace proteinu, způsobuje úbytek α -helikálních struktur a je zprostředkována převážně hydrofobní interakcí a vodíkovým můstkem. Struktura hemové skupiny není touto interakcí nijak ovlivněna. Ve struktuře hemoglobinu bylo nalezeno pouze jedno vazebné místo pro vazbu docetaxelu, a to v centrální dutině hemoglobinu. Hemoglobin reverzibilně váže řadu exogenních látek, jako jsou léčiva, herbicidy, heteropolykyseliny, flavonoidy, a endogenních látek. Interakce docetaxelu s hemoglobinem, stejně jako interakce s dalšími proteiny (například enzymy), může být toxikologicky velmi významná (Cheng et al., 2011). Skutečnost, zda interakce docetaxelu s hemoglobinem ovlivňuje kinetiku vazby kyslíku na hemoglobin, nebyla dosud publikována. Již dříve bylo zjištěno, že pokles koncentrace hemoglobinu v krvi během chemoradioterapie vede ke zkrácení doby přežívání pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic léčených paclitaxelem, nebo paclitaxelem v kombinaci s karboplatinou. Hemoglobin tedy může být významným faktorem určujícím dobu přežívání onkologických pacientů (MacRae et al., 2002).

Bylo zjištěno, že na léčbu docetaxelem dobře odpovídá 35 – 46 % pacientů s rakovinou prsu. Pokud pacientům byla podávána doporučená dávka docetaxelu (100 mg/m^2), na léčbu dobře odpovídalo 55 % pacientů. V případě, že byla pacientům podávána snížená dávka docetaxelu (75 mg/m^2), odpovídalo na léčbu pouze 33 % pacientů (O'Brien et al., 1999). Přestože na léčbu dobře odpovídá vysoké procento pacientů, mohou si jejich nádory během léčby postupně vytvořit na docetaxel rezistenci (De et al., 2009). Existuje řada různých mechanismů rezistence na taxany: nadexprese proteinového transportéru pro léčiva P-glykoproteinu, změny v metabolismu taxanů, snížená citlivost k podnětům indukujícím buněčnou smrt, změny v dynamice

mikrotubulů, případně změny ve specifické vazbě taxanů na mikrotubuly. Rezistenci nádorů na taxany mohou zprostředkovat také proteiny, které se začleňují do struktury mikrotubulů, nebo asociují s mikrotubuly, jako jsou β III-tubulin, proteiny asociující s mikrotubuly MAP4 a Tau, mikrotubuly destabilizující protein stathmin a také molekulární motory kinesiny. U buněčných linií MDA-MB-231 a MDA-MB-468 odvozených od rakoviny prsu bylo zjištěno, že pokud byl v buňkách nadexprimován některý z kinesinů KIFC3, KIFC1, KIF1A, nebo KIF5A, buňky vykazovaly zvýšenou rezistenci na léčbu docetaxelem. KIFC3 a KIFC1 jsou COOH-terminální kinesiny, KIF1A a KIF5A jsou NH₂-terminální kinesiny. Vazba kinesinů na mikrotubuly zabraňuje stabilizujícímu účinku docetaxelu. Kinesiny KIFC3, KIFC1 a KIF5A zvyšují množství volného tubulinu v buňce, což znamená, že působí jako antagonisté docetaxelu. Kinesin KIF1A ruší účinek docetaxelu, jenž stabilizuje mikrotubuly (De et al., 2009). Existuje 45 různých lidských kinesinů a každý z nich může, pokud je nadexprimován, zprostředkovat rezistenci na taxany. Při basal-like karcinomu prsu je za rezistenci na taxany zodpovědná především exprese genů *KIFC3*, *KIF5A*, a *KIF12*. Při zprostředkování rezistence na taxany hraje klíčovou roli ATPasová doména kinesinu, navrzení inhibitorů ATPasové domény kinesinů je tedy vhodnou strategií pro potlačení rezistence na taxany (Tan et al., 2012).

Na základě zjištění, že kinesiny mohou zprostředkovávat rezistenci nádorů na taxany, autoři článku De et al., 2009 předpokládali, že je možné navrhnout takové inhibitory kinesinů, které mohou být podávány s taxany a bránit vytvoření mechanismu rezistence. Prvním inhibitorem kinesinu, který byl klinicky testován, je ispinesib (SB-715992). Ispinesib je malá molekula, která je allosterickým inhibitorem ATPasové aktivity kinesinu KSP (kinesin spindle protein, KIF11, Eg5), (Tan et al., 2012). Dalšími potenciálními inhibitory KSP jsou syntetické molekuly MK-0731 (systematický název (2S)-4-(2,5-difluorofenyl)-N-[(3R,4S)-3-fluoro-1-methylpiperidin-4-yl]-2-(hydroxymethyl)-N-methyl-2-fenyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-karboxamid; Cox et al., 2008), ARRY-520 (systematický název (2S)-2-(3-aminopropyl)-5-(2,5-difluorofenyl)-N-methoxy-N-methyl-2-fenyl-1,3,4-thiadiazol-3(2H)-karboxamid; Woessner et al., 2009), nebo K858 (systematický název N-(4-acetyl-4,5-dihydro-5-methyl-5-fenyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)acetamid; Nakai et al., 2009). Účinným inhibitorem kinesinu Eg5 je také S-trityl-L-cystein a jeho *para*-substituované deriváty (Kaan et al., 2011). Inhibitory KSP také mohou minimalizovat negativní vedlejší účinky mitotických jedů na dynamiku mikrotubulů v některých nenádorových buňkách (například postmitotické neurony), protože v nich není KSP exprimován (Woessner et al., 2009).

Docetaxel patří mezi inhibitory mikrotubulů v buňce, tzv. mikrotubuly stabilizující léčiva. Experimentálně byla prokázána vazba protinádorových léčiv ze skupiny

inhibitorů mikrotubulů jak na mikrotubuly tak na nepolymerizované α/β tubulinové heterodimery (Canales, 2011). Tato protinádorová léčiva inhibují replikaci buněk, váží se spíše na vytvořené mikrotubuly než na volný tubulin, narušují dynamiku mikrotubulů, stabilizují tubulinové polymery, podporují tvorbu mikrotubulů a indukují tvorbu shluků mikrotubulů (Canales, 2011; Ringel & Horwitz, 1991). Stabilizace mikrotubulů po léčbě docetaxelem způsobuje inhibici základních dějů v buňce jako je mitóza a endosomální transport (Morse et al, 2005). Dále byla sledována distribuce DNA a RNA Ramanovou mikrospektroskopií a naměřená data byla srovnána s pozorováním distribuce nukleových kyselin po barvení hematoxylinem a eosinem. Bylo detekováno, že docetaxel indukuje fragmentaci buněčného jádra, s tím souvisí také kondenzace DNA a degradace proteinových struktur v jádře. Fragmentace jádra je pravděpodobně způsobena toxickým působením docetaxelu na mikrotubuly během mitózy (Hartmann et al., 2012). V buňkách také dochází k fragmentaci DNA (Hernández-Vargas et al., 2007).

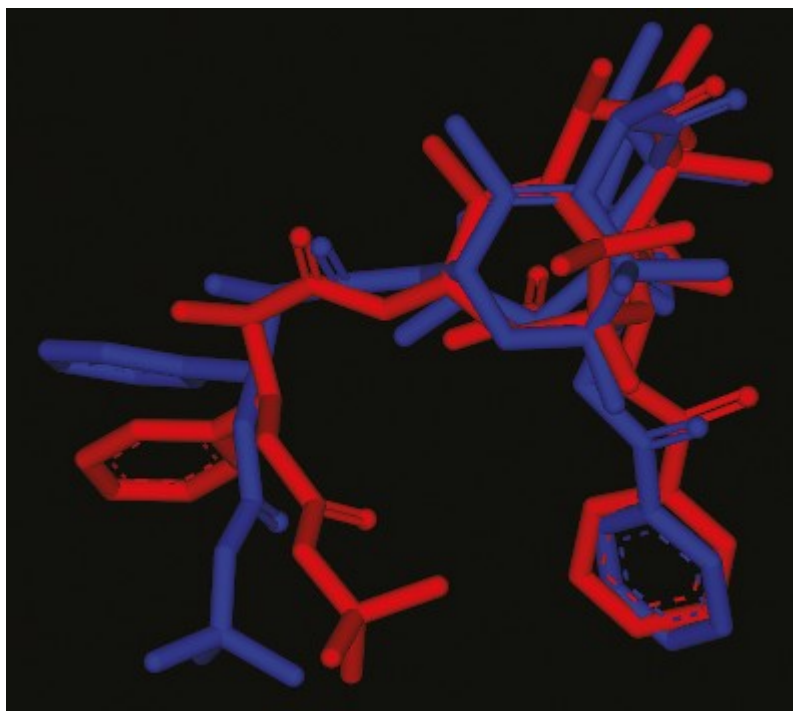
Docetaxel zastavuje buněčný cyklus dělících se nádorových buněk na přechodu mezi G2/M fází, což vede k apoptóze (Canales et al., 2011). K zastavení buněčného cyklu a následné apoptóze dochází pouze při dostatečné koncentraci docetaxelu (testovaná koncentrace 100 nM), avšak při nízké koncentraci docetaxelu (2 – 4 nM) proběhne nesprávně mitóza a následně dojde k nekróze. Bylo zjištěno, že tento rozdíl v mechanismu buněčné smrti je nezávislý na aktivitě proteinu p53 (Hernández-Vargas et al., 2007).

V mnoha publikacích je uvedeno, že právě apoptóza, ke které dochází po mitotické katastrofě indukované léčbou docetaxelem, je hlavním mechanismem buněčné smrti nádorových buněk (Hartmann et al., 2012). V publikaci Morseho et al., 2005 byl experiment proveden na buněčných liniích se zvýšenou expresí inhibitorů apoptózy. Tyto nádorové buňky reagují na léčbu docetaxelem neapoptotickou formou buněčné smrti. Primárním mechanismem buněčné smrti je v tomto případě mitotická katastrofa. Z toho lze usoudit, že léčiva, která působí jako inhibitory dělicího vřeténka, mohou být neúčinnější při léčbě nádorů rezistentních k apoptóze (Morse et al., 2005). Mechanismus buněčné smrti v popsáných případech byl studován na buněčných liniích MCF-10A (nenádorové buňky prsní tkáně), MCF-7 (nádorové nemetastazující buňky odvozené od rakoviny prsu) a MDA-MB-231 (nádorové metastazující buňky odvozené od rakoviny prsu). Lze přepokládat, že mechanismus buněčné smrti může být při odpovědi buňky na protinádorové léčivo závislý na buněčné linii, genetické informaci nádorové buňky, mechanismu účinku a dávce protinádorového léčiva (Hartmann et al., 2012; Morse et al., 2005).

Docetaxel podporuje polymerizaci tubulinu i za podmínek, za nichž by tubulin normálně nepolymerizoval, tj. za situace, kdy je na vyměnitelném místě vázáno GDP, nebo za nepřítomnosti hořčíku (Canales et al., 2011). Přítomnost docetaxelu a nepřítomnost GTP v buňkách *in vitro* vede k indukci tvorby stabilních mikrotubulů a shluků mikrotubulů (Ringel & Horwitz, 1991). Bylo publikováno, že pro polymerizaci tubulinu indukovanou taxoidy (docetaxelem a paclitaxelem) je přítomnost Mg^{2+} iontů nezbytně nutná (Díaz et al., 1993). V této studii však byly použity nízké koncentrace taxoidů: 50 μ M docetaxel a 10 μ M paclitaxel, (Canales et al., 2011), s vyššími koncentracemi taxoidů tento experiment zatím proveden nebyl. Polymerizace mikrotubulů je při pH = 6,1 – 6,7 nezávislá na pH, při pH nižším než 6,1 dochází k precipitaci tubulinu a ani při alkalickém pH tubulin nepolymerizuje (Díaz et al., 1993).

Bylo prokázáno, že docetaxel a discodermolid soutěží, alespoň částečně, o stejné vazebné místo na nepolymerizovaných tubulinových α/β heterodimerech. Předpokládaná hodnota vazebné konstanty na nepolymerizovaný tubulinový α/β heterodimer pro docetaxel je menší než $1 \times 10^3 M^{-1}$ a pro discodermolid je rovna $2 \times 10^4 M^{-1}$. Vzhledem k tomu, že v hodnotách vazebných konstant pro docetaxel a discodermolid je rozdíl o jeden řád, předpokládalo se, že pokud se k docetaxelu navázanému na nepolymerizované tubulinové α/β heterodimery přidá discodermolid, dojde k výraznému poklesu koncentrace navázaného docetaxelu. Experimentálně zjištěný pokles koncentrace navázaného docetaxelu však tak výrazný nebyl. Z toho lze usoudit, že pro docetaxel existuje ještě jiné vazebné místo než to, o které soutěží s discodermolidem. O stejné vazebné místo na nepolymerizovaných tubulinových α/β heterodimerech soutěží také, alespoň částečně, discodermolid a epothilon B (Canales et al., 2011).

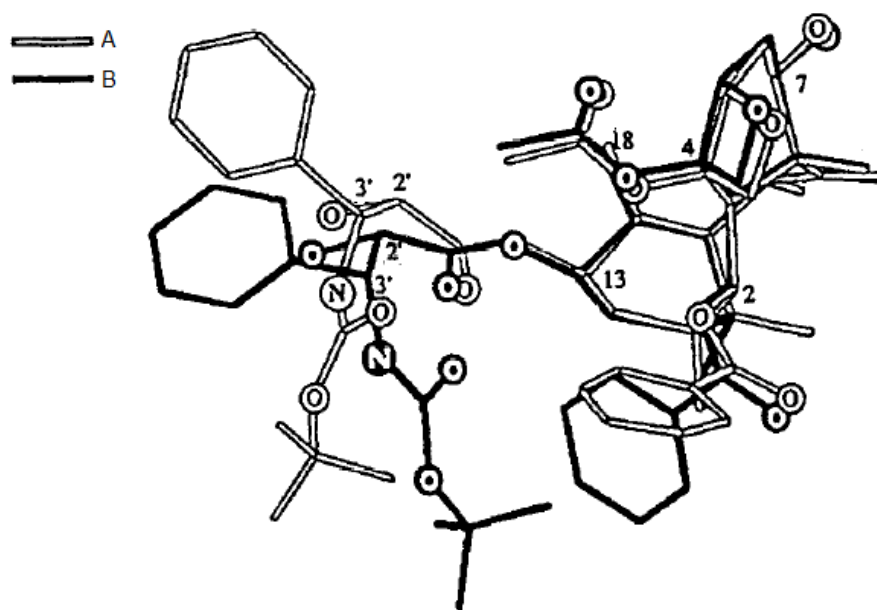
Na základě dat získaných nukleární magnetickou rezonancí (NMR) bylo zjištěno, že konformace vazby docetaxelu na nepolymerizovaný tubulinový α/β -heterodimer vykazuje otevřenější uspořádání mezi hydrofobními skupinami (2-O-benzoyl a *terc*-butoxy) než konformace vazby docetaxelu na mikrotubuly (Obr. 12). Docetaxel se na mikrotubulech váže na větší receptor než v případě nepolymerizovaného tubulinového α/β heterodimeru. Při vazbě docetaxelu na mikrotubuly i na nepolymerizovaný tubulinový α/β heterodimer se nejvíce uplatňují protony aromatických kruhů (Canales et al., 2011).



Obr. 12: Červeně je zobrazena konformace docetaxelu v případě, že se váže na mikrotubuly. Modře je zobrazena konformace docetaxelu v případě vazby na nepolymerizovaný tubulinový α/β heterodimer (převzato z Canales et al., 2011).

Rentgenostrukturní analýzou, NMR a molekulárním modelováním byla studována konformace nevázaného docetaxelu (Dubois et al., 1993). Rentgenostrukturní analýzou i molekulárním modelováním bylo potvrzeno, že volná rotace *terc*-butoxy skupiny je znemožněna intramolekulární hydrofobní interakcí s 2-O-benzoyl skupinou. Rentgenostrukturní analýzou bylo zjištěno, že v pevném stavu zaujímá postranní řetězec docetaxelu specifickou konformaci v důsledku intramolekulárních vodíkových vazeb ($1'-C=O \cdots 2'-OH$ a $2'-OH \cdots NH$) a interakcí mezi substituenty postranního řetězce a substituenty taxanového skeletu (Obr. 13, struktura A). Studium konformace docetaxelu v roztoku metodou NMR ukázalo podobný obraz vodíkových vazeb mezi protony postranního řetězce jako u konformace určené rentgenostrukturní analýzou. Největší rozdíl mezi konformacemi určenými NMR a rentgenostrukturní analýzou spočívá ve vzdálenosti mezi protonem na C2' a methylovými skupinami Me18 a methylem acetylu v pozici 4, tyto rozdíly znamenají odlišnou pozici 2' hydroxylové skupiny. Molekulárním modelováním byla získána konformace docetaxelu s nižší energií ($E = -441,3$ kcal) než rentgenostrukturní analýzou ($E = -431,6$ kcal). Konformace získaná molekulárním modelováním (Obr. 13, struktura B) se od konformace získané rentgenostrukturní analýzou (Obr. 13, struktura A) nejvíce liší

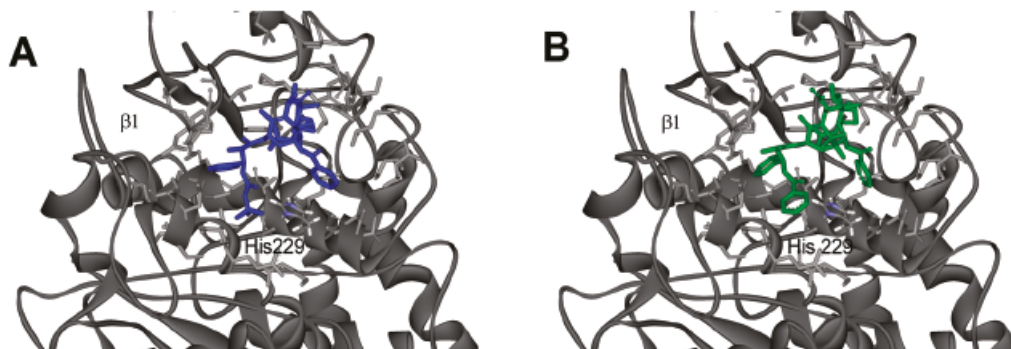
orientací hydroxyly na C2' postranního řetězce a tím, že 2-O-benzoyl skupina na C2 je blíže *terc*-butoxy skupině (Dubois et al., 1993).



Obr. 13: Konformace docetaxelu (A) určená rentgenostrukturní analýzou, (B) určená molekulárním modelováním (převzato z Dubois et al., 1993).

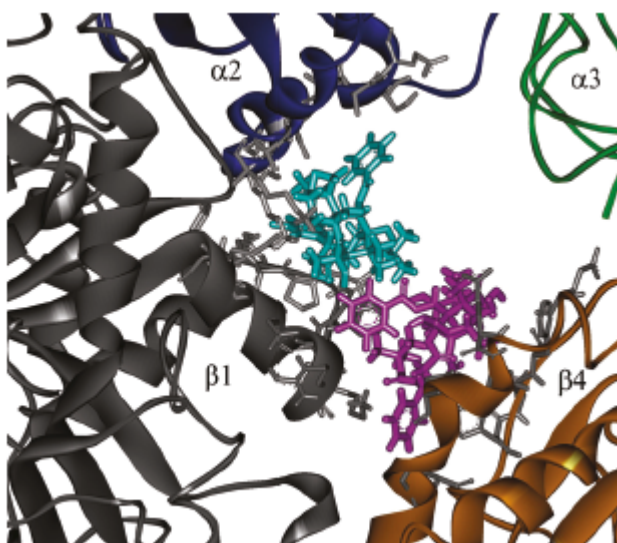
Na základě studia konformace docetaxelu a jeho dvanácti analog pomocí NMR a molekulárního modelování bylo zjištěno, že biologicky nejaktivnější jsou sloučeniny s 2'R, 3'S konfigurací, které vykazují takovou konformaci, že 2-O-benzoyl skupina na C2 drží postranní řetězec pevně v pozici určené hydrofobními interakcemi mezi postranním řetězcem a taxanovým skeletem. Naopak 2'S, 3'R izomery mají malou biologickou aktivitu a vykazují konformaci bez hydrofobních interakcí mezi postranním řetězcem a taxanovým skeletem. Docetaxel má konfiguraci 2'R, 3'S, jeho 2'S, 3'R izomer má 60× nižší biologickou aktivitu (Dubois et al., 1993).

Bioaktivní konformace docetaxelu (určená softwarovým modelováním s využitím NMR dat) ve vazebném místě v lumenu mikrotubulu je dosti podobná konformaci vazby paclitaxelu určené elektronovou krystalografií (Obr. 14). Získané 3D modely ligand-protein komplexů ukazují, že His229 tubulinové β -podjednotky na lumenální straně mikrotubulu, který současně interaguje s 2-O-benzoyl skupinou a postranním řetězcem v poloze C13 ve vnitřním vazebném místě, čímž je prostorově odděluje, nehraje žádnou z klíčových rolí v procesu rozpoznání docetaxelu pórem mikrotubulu (Canales et al., 2011).



Obr. 14: (A) Vazba docetaxelu v lumenu mikrotubulu určená softwarovým modelováním. (B) Vazba paclitaxelu v lumenu mikrotubulu určená elektronovou krystalografií (převzato z Canales et al., 2011).

Pro vazbu docetaxelu do póru mikrotubulu byly softwarově předpovězeny dva vazebné modely. V prvním případě (Obr. 15, tyrkysová struktura) byl docetaxel navázán mezi tubulinovou β -podjednotku v blízkosti lumenální strany (β 1) a α -podjednotku dalšího dimeru v protofilamentu (α 2). V druhém případě (Obr. 15, fialová struktura) byl docetaxel navázán ve spodní části póru v blízkosti podjednotek β 1 a β 4 (Canales et al., 2011).



Obr. 15: Vazba docetaxelu do póru mikrotubulu. Čtyři tubulinové heterodimery jsou označeny 1 (šedá), 2 (modrá), 3 (zelená) a 4 (oranžová). Docetaxel navázaný mezi heterodimerem 1 a 2 je znázorněn tyrkysově a docetaxel navázaný mezi heterodimerem 1 a 4 je znázorněn fialově (převzato z Canales et al., 2011).

Po srovnání experimentálních dat se softwarově předpovězenými strukturami bylo zjištěno, že nejvíce se experimentálně zjištěná a předpovězená struktura shodovala

v případě, že byl docetaxel navázán do póru mikrotubulu mezi tubulinovou β -podjednotku v blízkosti luminální strany (Obr. 15, tyrkysová struktura). V případě, že byl docetaxel navázán ve spodní části póru mikrotubulu v blízkosti podjednotek $\beta 1$ a $\beta 4$ (Obr. 15, fialová struktura) a v případě vazby docetaxelu do lumenu mikrotubulu (Obr. 14A) předpovězené struktury neodpovídaly experimentálně naměřeným datům. Pozorovaná NMR spektra odpovídala vazbě docetaxelu do póru mikrotubulu. Existence pozorované interakce nasvědčuje tomu, že proces rozpoznání docetaxelu se děje ve dvou krocích. Nejdříve dojde k navázání docetaxelu do póru mikrotubulu a následně ke vstupu docetaxelu do lumenu. Na základě srovnání experimentálních dat se softwarově předpovězenými strukturami bylo také určeno, která z možných vazebných míst na nepolymerizovaných tubulinových α/β heterodimerech interagují s docetaxelem. Nejpravděpodobnějším vazebným místem docetaxelu na nepolymerizovaný tubulin je vnitřní (luminální) místo. Nicméně míra shody mezi experimentálními a předpovězenými daty se významně zvýšila, pokud byl mezi vazebná místa zahrnut také příspěvek poloviny vazebného místa na $\beta 1$ -podjednotce. Koexistence dvou vazebných míst pro docetaxel na nepolymerizovaných tubulinových α/β heterodimerech byla také prokázána výše zmíněným kompetitivním experimentem, při němž se zjišťovalo, zda docetaxel a discodermolid soutěží o stejné vazebné místo. Docetaxel se na tubulinové α/β heterodimery váže především v místě, kde po vytvoření mikrotubulů bude lokalizováno luminální vazebné místo, a na $\beta 1$ -podjednotce, která je později součástí póru mikrotubulu (Canales et al., 2011).

Docetaxel je metabolizován především izoenzymy cytochromu P450 3A (CYP3A), přičemž vzniká několik farmakologicky neaktivních oxidačních produktů (Baker et al., 2006). U dospělých osob jsou za eliminaci léčiva zodpovědné zejména cytochromy CYP3A4, CYP3A5 a CYP3A7, přičemž nejvýznamnější je pravděpodobně role CYP3A4. Inhibice cytochromu P450 3A4 ketokonazolem vedla ke snížení schopnosti metabolizovat docetaxel o 49 %. Cytochrom P450 3A5 je u různých osob exprimován s různou intenzitou. U osob, u nichž je více exprimován CYP3A5, je vliv inhibice CYP3A4 na schopnost metabolizovat docetaxel nižší (Engels et al., 2004). Schopnost organismu eliminovat docetaxel také závisí na přítomnosti transportních proteinů, zejména P-glykoproteinu v membráně žlučových kanálků (Baker et al., 2006). Bylo publikováno (van Waterschoot et al., 2010), že P-glykoprotein (MDR1/ABCB1) společně s cytochromem P450 3A hraje nejdůležitější roli při metabolismu docetaxelu. Další významný proteinový transportér MRP2 (ABCC2) má při nízké koncentraci docetaxelu v krevní plazmě nízkou afinitu pro docetaxel, při vyšší koncentraci

docetaxelu v plazmě má relativně vysokou kapacitu pro transport docetaxelu *in vivo* (van Waterschoot et al., 2010).

Při léčbě nádorového onemocnění docetaxelem je jedním z nejzávažnějších problémů různá schopnost jednotlivých pacientů léčivo metabolizovat, což znamená riziko, že pacientovi nebude podána správná koncentrace léčiva. Dalším problémem je nízká biologická dostupnost léčiva při ústním podání, proto se docetaxel pacientům podává nitrožilně. Inhibice CYP3A a MDR1 zvyšuje biologickou dostupnost ústně podaného docetaxelu a zvyšuje dobu působení docetaxelu na buňky. Bylo zjištěno, že nádorové buňky lépe odpovídají na delší dobu působení docetaxelu než na podání vyšší koncentrace léčiva. Delší doba působení a nižší koncentrace docetaxelu v plazmě než při nitrožilním podání by vedla k efektivnější a méně toxické léčbě nádorového onemocnění. Podání inhibitorů CYP3A a MDR1 pacientům léčeným docetaxelem se nedoporučuje, protože inhibice CYP3A a MDR1 také vede k hematotoxicitě a především k toxickému působení na střeva, které může vést až ke smrti pacientů (van Waterschoot et al., 2010).

3.3.4 Alkaloidy z barvínku

Biologicky aktivní alkaloidy z barvínku vinblastin, vinleurosin, vinkristin a vinrosidin byly získány z extraktu z listů barvínku *Catharanthus roseus* (Obr. 16) z čeledi *Apocynaceae* (toješťovité). Rostlina barvínku *Catharanthus roseus* je stálezelená bylina, nebo polokeř s růžovými, nebo bílými květy (Johnson et al., 1963).



Obr. 16: *Catharanthus roseus* (barvínek růžový, převzato z Noel, 2010).

Dříve byl *Catharanthus roseus* nazýván *Vinca rosea* podle Linnaea a *Lochnera rosea* podle Reichenbacha. Rostlina *Catharanthus roseus* pochází z Madagaskaru. Od 17. století jsou známy léčivé účinky této rostliny (Gidding et al., 1999). Bylo popsáno, že extrakt z listů *Catharanthus roseus* se používal v Brazílii ke kontrole krvácení, k léčbě kurdějí, jako ústní voda při bolestech zubů, k hojení a čištění chronických zranění. Na ostrovech v Karibském moři, které byly dříve britskými koloniemi, se *Catharanthus roseus* využíval k léčbě diabetických vředů. Na Filipínách se užíval perorálně ke snížení hladiny glukosy v krvi, ke stejnému účelu se používal i v jižní Africe pod názvem Covinca. V Anglii byl rozšířen pod názvem Vin-q-lin jako lék proti diabetu. Již v 60. letech 20. století byl *Catharanthus roseus* pěstován jako okrasná rostlina v zahradách po celém světě (Johnson et al., 1963).

Bylo zjištěno, že alkaloidy ze stonku a kořene jsou mnohem méně aktivní než alkaloidy z listů (Johnson et al., 1963). Prvním čistým alkaloidem izolovaným z *Catharanthus roseus* byl vinblastin (vincalukoblastin) a bylo prokázáno, že jde o látku s indolovým cyklem. Vinkristin je chemicky blíže příbuzný vinblastinu (Whitelaw & Kim, 1964). Z *Catharanthus roseus* bylo izolováno více než 130 alkaloidů a asi 40 z nich jsou látky chemicky příbuzné vinblastinu, ale většina z nich není v klinické praxi využívána (Kelly et al. 2011). Byly popsány také protinádorové účinky semisyntetických alkaloidů z *Catharanthus roseus* – vinorelbinu (Navelbin; Rahmani et al., 1987), vindesinu (derivát vinblastinu, deacetylvinblastinamid; Barnett et al., 1978) a

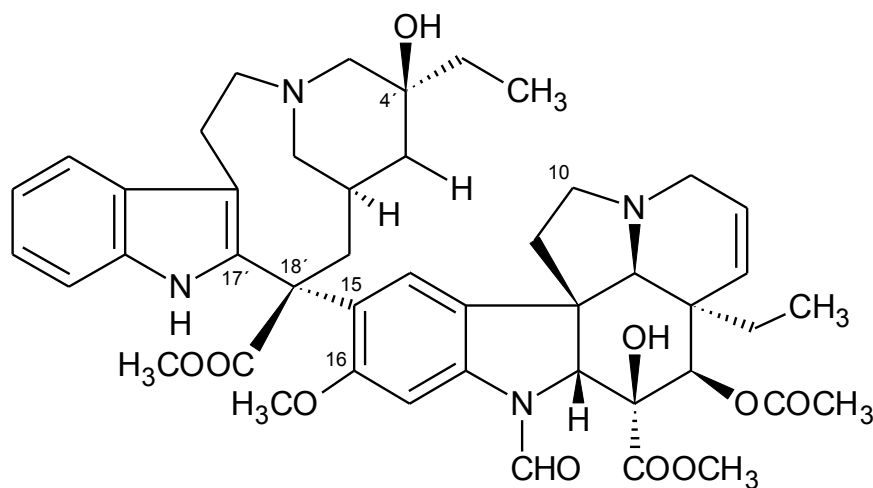
vinepidinu (derivát vinkristinu, 4'-epi-4'-deoxyvinkristin; Jordan et al., 1985). Vědecké články týkající se vinepidinu však vznikaly pouze v letech 1985 – 1992, žádné pozdější publikace nalezeny nebyly. Vinorelbin a vindesin jsou klinicky používány. Dalším klinicky používaným semisyntetickým alkaloidem z barvíčku je vinflunin (Javlor; Song et al, 2012), což je bifluorovaný derivát vinorelbinu (Hill, 2001). Většina studií týkajících se konformace a vazby alkaloidů z barvíčku na tubulin je zaměřena především na vinblastin.

Alkaloidy z barvíčku inhibují polymerizaci tubulinu (Himes et al., 1976) a indukují samovolnou asociaci tubulinu do vinutých spirálovitých agregátů. Tvorba těchto agregátů je 3 – 5× rychlejší v přítomnosti GDP než v přítomnosti GTP (Lobert et al., 1996). Bylo zjištěno, že při nízkých koncentracích alkaloidů z barvíčku v buňce dochází k efektivnímu zastavení dynamiky mikrotubulů a při vysokých koncentracích v buňce alkaloidy z barvíčku indukují depolymerizaci mikrotubulů (Kelly et al., 2011). Je známo, že alkaloidy z barvíčku se rychle a reverzibilně váží do vysoce afinitního místa na β -tubulinu (Kelly et al., 2011). Bylo publikováno, že vinkristin má v porovnání s vinblastinem a vinorelbinem největší afinitu k tubulinu, vinorelbin má afinitu k tubulinu nejnižší. Afinita k tubulinu souvisí s dávkami užívanými v klinické praxi, vinkristin je užíván v nejnižších dávkách a vinorelbin v nejvyšších. K tubulinovým α/β heterodimerům mají vinkristin, vinblastin a vinorelbin přibližně stejnou afinitu, rozdílná je jejich afinita k polymerům (Lobert et al., 1996). V publikaci Sertela et al., 2011 však byla stanovená hodnota IC₅₀ pro buněčnou linii CCRF-CEM u buněk ošetřených vinorelbinem nižší ($0,031 \pm 0,006 \mu\text{M}$) než u buněk ošetřených vinkristinem ($1,92 \pm 0,14 \mu\text{M}$). Nižší hodnota IC₅₀ znamená výraznější inhibici proliferace buněk, vinorelbin by tedy měl být účinnější. Také inhibiční konstanty vyjádřené jako pK_i naznačují, že vinorelbin (pK_i = $1,54 \mu\text{M}$) má větší afinitu k tubulinu než vinkristin (pK_i = $2,05 \mu\text{M}$; Sertel et al., 2011). Klinicky užívané dávky vinkristinu ($1,4 \text{ mg na m}^2$ tělesného povrchu) jsou však nižší než dávky vinorelbinu ($25 - 30 \text{ mg/m}^2$ tělesného povrchu) užívané v klinické praxi (příbalová informace Vincristine Teva, 2010; příbalová informace Vinorelbin Ebewe, 2012).

Nebyl pozorován vliv těchto alkaloidů na žádný jiný vláknitý protein. Způsobují rozpad dělicího vřeténka, a tím zastavují buněčné dělení v metafázi (Himes et al., 1976) a spouští apoptózu nádorových buněk (Kelly et al., 2011).

3.3.4.1 Vinkristin

Vinkristin (Oncovin[®], Vincasar Pfs[®], leurokristin, 22-oxovinkaleukoblastin, systematický název (3a*R*,3a1*R*,4*R*,5*S*,5a*R*,10b*R*)-methyl-4-acetoxy-3a-ethyl-9-((5*S*,7*S*,9*S*)-5-ethyl-5-hydroxy-9-(methoxykarbonyl)-2,4,5,6,7,8,9,10-oktahydro-1*H*-3,7-methano[1]azacykloundecino[5,4-*b*]indol-9-yl)-6-formyl-5-hydroxy-8-methoxy-3a,3a1,4,5,5a,6,11,12-oktahydro-1*H*-indolizino[8,1-*cd*]karbazol-5-karboxylát) je asymetrický dimerní alkaloid. Je složený z dihydroindolového jádra vindolinu spojeného vazbou uhlík-uhlík s indolovým jádrem catharanthinu (Obr. 17; Johnson et al., 1963). Monomerní alkaloidy vindolin a catharanthin jsou ve srovnání s dimerními alkaloidy mnohem méně účinnými inhibitory mikrotubulů (Owellen et al., 1976). Syntéza necytotoxických monomerních alkaloidů je přirozeným mechanismem rostliny, kterým se chrání před vlastními jedy. Dimerní alkaloidy působí toxicky i na rostlinná pletiva, proto rostlina tvoří méně toxické prekurzory, z nichž jsou po stimulaci signální dráhy v rostlině syntetizovány toxické produkty. Biosyntéza vinkristinu a vinblastinu z vindolinu a catharanthinu je indukována reaktivními kyslíkovými radikály (Sertel et al., 2011). Při chemoterapii se jako účinná látka používá vinkristin sulfát (příbalová informace Vincristine Teva, 2010). Empirický vzorec vinkristin sulfátu je C₄₆H₅₆N₄O₁₀H₂SO₄ (Gidding et al., 1999).



Obr. 17: Struktura vinkristinu (převzato ze Song et al., 2012; číslování uhlíkových atomů podle Kelly et al., 2011).

První publikace týkající se vinkristinu vznikaly v 60. letech 20. století. V roce 1962 byl vinkristin poprvé použit v klinické praxi (Gidding et al., 1999) a v roce 1964 Whitelaw & Kim popsali poměrně dobré výsledky léčby vinkristem u pacientů trpících Hodgkinovou chorobou, retikulárním sarkomem (primární maligní lymfom non-Hodgkinova typu), lymfosarkomem, karcinomem prsu, akutní leukémií a

choriokarcinomu. Dnes se vinkristin používá k léčbě akutní lymfatické leukémie, což je rychle rostoucí rakovina, při které vzniká v lidském těle velké množství nezralých bílých krvinek; Hodgkinovy choroby, rakoviny lymfatického cévního systému; non-Hodgkinova lymfomu, rakoviny lymfatických uzlin, která nepatří k typu Hodgkinovy choroby; rakoviny plic malých buněk; rhabdomyosarkomu, což je forma rakoviny svalů; Ewingova sarkomu, což je forma rakoviny kostí; hematomů se sníženým počtem destiček (idiopatická trombocytopenická purpura); rakoviny dřeně nadledvinek; primárního neuroektodermálního tumoru, což je rakovina části nervového systému; Wilmsova tumoru, což je typ rakoviny ledvin; rakoviny prsu, která se může dále rozšiřovat do organismu; vícečetného myelomu, což je rakovina buněk imunitního systému; retinoblastomu, což je typ rakoviny oka (příbalová informace Vincristine Teva, 2010).

Vinkristin se podává intravenózně. Obvyklá dávka u dospělých je 1,4 mg na m² tělesného povrchu (maximálně 2 mg) jednou týdně, u dětí 1,5 – 2,0 mg na m² tělesného povrchu jednou týdně a u dětí s hmotností do 10 kg je počáteční dávka 0,05 mg na kg tělesné hmotnosti jednou týdně (příbalová informace Vincristine Teva, 2010). V srpnu 2012 byly nejvyšším orgánem pro schvalování nových léčiv FDA (Food and Drug Administration) v USA schváleny liposomové injekce vinkristin sulfátu (Marqibo, Talon Therapeutics) k léčbě dospělých pacientů se vzácným typem leukémie, akutní lymfoblastickou leukémií s negativním filadelfským chromozomem (U. S. Food and Drug Administration, 2012). Jde o aplikaci vinkristinu uzavřeného v liposomálních váčcích tvořených sfingomyelinem a cholesterolem. Liposomové injekce vinkristin sulfátu (Marquibo) ve srovnání s volným vinkristinem déle cirkulují v krevní plazmě a pasivně transportují vinkristin cíleně k nádorové tkáni. Ve srovnání s volným cytostatikem zajišťuje podání vinkristinu v podobě liposomů déle trvající dostupnost, vyšší aktivitu a vyšší protinádorovou účinnost u solidních nádorů a lymfomů. Bylo prokázáno, že liposomové injekce vinkristin sulfátu vykazují dobré výsledky i při léčbě agresivního non-Hodgkinova lymfomu. U pacientů s agresivním non-Hodgkinovým lymfomem vykazovala dvojnásobná dávka vinkristinu ve formě liposomů přibližně stejnou toxicitu jako standardní dávka volného vinkristinu. Zdá se, že vinkristin podávaný ve formě liposomů může být účinný i při léčbě jiných typů rakoviny a v kombinaci s dalšími cytostatiky (Rodriguez et al., 2009).

Pacient nemůže být léčen vinkristinem, pokud je přecitlivělý na vinkristin sulfát nebo na kteroukoli složku tohoto roztoku, trpí poruchou nervů a svalů nazývanou Charcot-Marie-Tooth syndrom, trpí na zácpu nebo hrozí zablokování střeva (ileus), má závažnou poruchu jaterních funkcí, nebo se podrobuje radioterapii jater. Komplikací při chemoterapii vinkristinem mohou být také poruchy nervového systému, poruchy jaterních funkcí, srdeční onemocnění jako je ischemická choroba srdeční, případně

problémy se srdcem a krevním oběhem a užívání léků, které mohou nepříznivě ovlivňovat nervovou soustavu. Pokud pacient musí během chemoterapie užívat i jiné léky, může vinkristin s těmito léky interagovat. Vinkristin může snižovat účinek digoxinu, který se užívá ke snížení srdeční funkce a srdečních arytmií. Současné užívání vinkristinu a léků, které inhibují jaterní enzymy, jako je například ritonavir a nelfinavir (užívané k léčbě AIDS), ketokonazol a itakonazol (užívané k léčbě plísňových onemocnění), erytromycin (užívaný k léčbě infekcí) a nefazodon (užívaný k léčbě deprese) může vést k rychlému výskytu, popřípadě zvýšené závažnosti, svalových onemocnění. Při současném užívání vinkristinu a léků (například nifedipin užívaný k léčbě vysokého tlaku), které inhibují p-glykoprotein, dochází ke zvyšování hladiny vinkristinu v krvi, což může vést k většímu výskytu nežádoucích účinků. Pokud pacient užívá léky k léčbě epilepsie (například (fos)fenytoin), může vinkristin snižovat hladinu fenytoinu v krvi. Při užívání vinkristinu s dalšími léčivými přípravky k inhibici kostní dřeně jako je doxorubicin (zvláště pak v kombinaci s prednisonem) se mohou zesilovat nežádoucí účinky a inhibiční účinky na kostní dřeň. Léky, které mohou mít nepříznivý vliv na nervový systém (například isoniazid užívaný k léčbě tuberkulózy, L-asparaginasa užívaná k léčbě rakoviny krve a cyklosporin A užívaný k potlačení imunitního systému), mohou zesilovat nepříznivé působení vinkristinu na nervový systém. Vinkristin potlačuje imunitní systém, proto může mít vliv na schopnost organismu reagovat na vakcínu. Souběžné podání vinkristinu a mitomycinu C (lék užívaný k léčbě některých forem rakoviny) může vyvolat dýchací potíže. Při souběžném užití vinkristinu a cyklosporinu, takrolimu nemusí být imunitní systém schopen chránit organismus před nemocemi (imunoprese) a hrozí nebezpečí růstu některých buněk (lymfoproliferace). Léky GM-CSF a G-CSF, které se používají ke stimulaci růstu krvinek po chemoterapii, mohou při souběžném užívání s vinkristinem způsobovat onemocnění nervů (neuropatie). U pacientů s rakovinou ledvin (Wilmsův tumor) bylo při současném užívání vinkristinu a daktinomycinu hlášeno závažné poškození jater. Kombinace léčiv bleomycinu a vinkristinu může vyvolat stav ovlivňující při změnách teplot nebo stresu přívod krve do prstů rukou, nohou, nosu a uší (Raynaudův syndrom). Radioterapie může zesilovat nežádoucí účinky vinkristinu na nervový systém (příbalová informace Vincristine Teva, 2010).

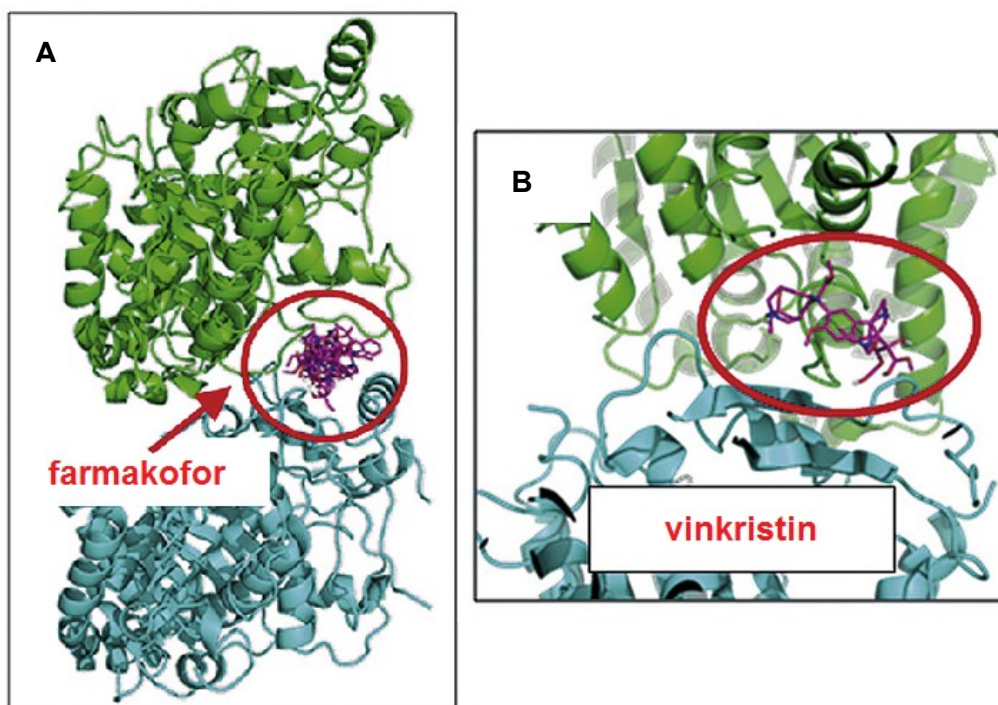
Nejčastějším vedlejším účinkem, který se vyskytuje u více než 1 z 10 pacientů, je vypadávání vlasů. U 1 – 10 % pacientů se objevuje přechodné zvýšení počtu krevních destiček, bolesti hlavy, závratě, mravenčení v prstech rukou nebo nohou, modře zbarvený nos, modřiny, krvácení dásní, periferní neuropatie, která může ovlivnit pohyblivost, vnímání a tělesné funkce, mohou se objevit smyslové poruchy, lechtivost, svědění nebo brnění bez zjevné příčiny, nervové bolesti, pohybové problémy, ztráta

reflexů (hlubokých šlach), slabost nebo ochrnutí svalů chodidla, svalová slabost, problémy s koordinací, ochrnutí, postižení kraniálního (tj. mozkového) nervu, svalová slabost v oblasti hrtanu, chrapot, obrna hlasivek, slabost vnějších očních svalů, spadání očních víček, zdvojené vidění, poruchy očních nervů, poruchy nervů okolo očí, přechodná slepota, zácpa, bolesti břicha, křeče v oblasti břicha vyvolané křečovitým stažením střev a žlučových cest, nevolnost, zvracení, podráždění v místě vpichu injekce a u mužů úbytek semene, bolest nervu varlat. Zvláště při současném užití léku s mitomycinem C se vyskytuje krátký dech a dušnost kvůli křečovitému stažení svalů dýchacích cest. Méně častými vedlejšími účinky vyskytujícími se u 0,1 – 1 % pacientů jsou snížená funkce kostní dřeně, poruchy krve jako anémie, nedostatek bílých krvinek, nedostatek krevních destiček, záchvaty, křeče často spojené se zvýšeným krevním tlakem, změny vědomí, deprese, vzrušení, nespavost, zmatenost, těžké mentální postižení s poruchou kontroly chování a jednání (psychózy), halucinace, hluchota, problémy s močením, přítomnost vysokých hladin některých látek určených k vyloučení z organismu (kyselina močová) v krvi, bolest, zánět žil a podkožních pojivových tkání během podání do žíly, horečka a u žen přerušování menstruace. Zvláště u malých dětí dochází ke ztrátě chuti k jídlu, úbytku tělesné hmotnosti, průjmu, zhoršené činnosti střevního traktu kvůli paralýze (paralytický ileus, u kterého střeva přestanou fungovat a ztratí peristaltiku). U některých pacientů, kteří byli léčeni vinkristinem v kombinaci s jinými cytostatiky nebo byli předtím ozařováni v oblasti srdce, se objevovaly poruchy cév, srdce a srdeční záchvaty. U 0,01 – 0,1 % pacientů byly pozorovány vedlejší účinky jako přecitlivělost spojená s výrazným poklesem krevního tlaku, bledost, neklid, slabý a rychlý tep, vlhká kůže, snížené vědomí, vyrážka, akumulace tekutin, zvýšení, nebo snížení krevního tlaku, zánět sliznic úst, odumírání výstelky tenkého střeva nebo výskyt poškození střevní stěny a bolest hlavy. Zvláště u dětí byly zjištěny poruchy funkce jater v důsledku uzávěru jaterní žíly. Dále dochází k nedostatečnému uvolňování antidiuretického hormonu, které vede k nízkému krevnímu tlaku, dehydrataci, abnormální hladině sloučenin obsahujících dusík, což se může projevit pocitem sucha v ústech, zmateností, únavou, a k retenci tekutin, což může vést k edému a nedostatku sodíku. U méně než 0,01 % pacientů byly zjištěny vedlejší účinky jako zánět slinivky břišní (pankreatitida) a inkontinence. Během léčby vinkristinem může také dojít k onemocnění bílé hmoty mozkové (leukoencefalopatie), nebylo však dosud zjištěno, u kolika procenta pacientů k tomu dochází. Symptomy toho onemocnění zahrnují mentální poruchy a křeče. Během chemoterapie vinkristinem nesmí ženy kojit ani se jim nedoporučuje otěhotnět. O užívání vinkristinu a jeho možných škodlivých účincích na těhotné ženy není k dispozici dostatek adekvátních informací. V pokusech na zvířatech se však tento léčivý přípravek jevil

jako škodlivý. Vinkristin může vyvolat neplodnost, která může být nevratná. Pacientům mužského pohlaví se doporučuje, aby se nepokoušeli ani během léčby ani po dobu 6 měsíců po jejím ukončení zplodit dítě (příbalová informace Vincristine Teva, 2010).

Pro konformaci vinkristinu je důležitý kontaktní úhel mezi catharanthinovým a vindolinovým skeletem vinkristinu (mezi uhlíky C17' – C18' – C15 – C16). Je umožněna volná rotace vazby C17' – C18' – C15 – C16. Volný vinkristin zaujímá konformaci s nejnižší energií, pro kterou je typický kontaktní úhel mezi C17' – C18' – C15 – C16 uhlíky $207,6^\circ \pm 0,8^\circ$ a při které piperidinový kruh vykazuje židličkovou konformaci. Vzdálenost mezi uhlíky C4' a C10 je $7,27 \pm 0,1$ Å. Po vazbě na β -tubulin se velikost zmíněného úhlu sníží na hodnotu $201,6^\circ \pm 0,7^\circ$ a vzdálenost mezi uhlíky C4' a C10 vzroste na hodnotu $8,29 \pm 0,05$ Å. U ostatních klinicky využívaných alkaloidů z barvíčku jsou rozdíly v konformaci mezi volnou formou léčiva a léčivem vázaným na β -tubulin ještě menší než u vinkristinu a nebyl pozorován žádný trend změn hodnot velikosti úhlu mezi uhlíky C17' – C18' – C15 – C16 a vzdálenosti mezi uhlíky C4' a C10.

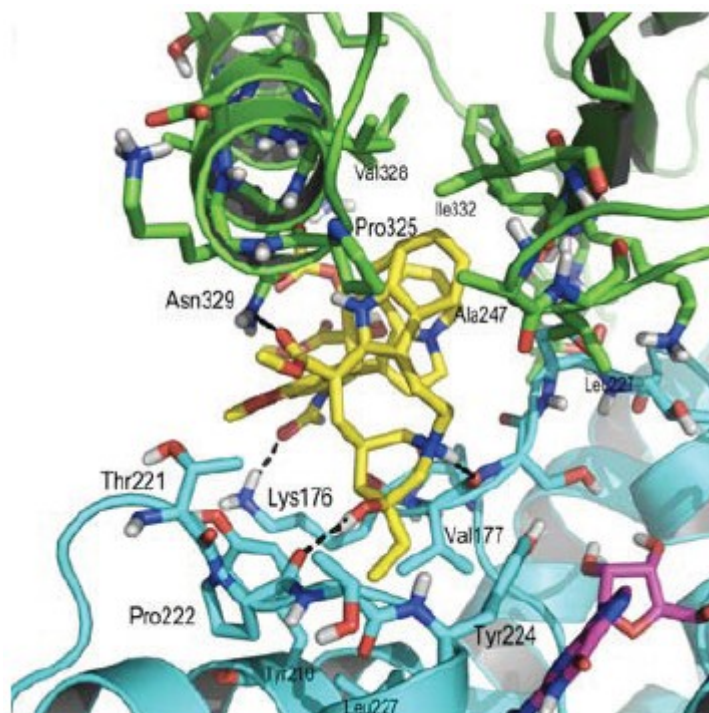
Vinkristin se váže na specifické vazebné místo na β -tubulinu. Na základě studia vinblastinu byla charakterizována *Vinca* vazebná doména, kterou tvoří 173. – 211. aminokyselina β -tubulinu, případně 172. – 177. a 208. – 225. aminokyselina β -tubulinu a dále bylo zjištěno, že součástí této vazebné domény může být ještě 11 dalších aminokyselinových reziduí. Aminokyseliny *Vinca* vazebné domény mohou být různé v závislosti na izoformě β -tubulinu (Kelly et al., 2011). Molekulárním dokováním byla analyzována vazba vinkristinu na α/β tubulinový dimer (Obr. 18; Sertel et al., 2011).



Obr. 18: Vazba vinkristinu na α/β tubulinový dimer. Je zobrazen farmakofofor specifický pro *Vinca* alkaloidy na α/β tubulinovém dimeru, **(A)** ve farmakofoforu je zobrazeno 6 struktur (catharanthin, vindolin, vinblastin, vinkristin, vinorelbin a vindesin), **(B)** vazba vinkristinu ve specifickém farmakofoforu (převzato z Sertel et al., 2011).

Analýza vazebného místa vinkristinu ukázala, že vinkristin vytváří vodíkové vazby s aminokyselinami tubulinu Asn249C, Asn329C, Lys336C, Pro222B, Tyr210B, Val177B, hydrofobní interakce s vinkristinem zprostředkovává 15 reziduí tubulinu (Sertel et al., 2011). V jiné publikaci byla popsána interakce vinkristinu při vazbě na β -tubulin interaguje s aminokyselinami Pro173, Lys174, Val175, Asp177, Tyr208, Pro220, Thr221 a Tyr222. S každou z aminokyselin interaguje 1 – 5 uhlíkových atomů. S Thr221, Lys174 a Pro222 interagují 1, 2 a 3 atomy kyslíku. Jednotlivé interakce nebyly blíže popsány. Celkový počet identifikovaných interakcí byl roven 27. Významná je interakce vinkristinu s Pro173, protože bylo zjištěno, že bodová mutace, kdy Pro173 je nahrazen alaninem, způsobuje destabilizaci mikrotubulů (Kelly et al., 2011). Vazebné místo pro alkaloidy z barvíčku na α/β bylo studováno také v publikaci Codercha et al., 2012 (Obr. 19). Bylo publikováno, že v tomto vazebném místě jsou především postranní řetězce nepolárních aminokyselin obou (α , β) tubulinových monomerů. Aminokyseliny β -tubulinu Val177, Tyr210, Thr221, Pro222, Thr223, Tyr224 a Leu227 interagují s catharanthinovou částí molekuly a aminokyseliny Pro175 a Lys176 interagují s vindolinovou částí molekuly. Na α -tubulinu zprostředkovávají kontakt s catharanthinovou doménou aminokyseliny Leu248 a Pro325, aminokyseliny

Val328, Asn329, Ile332, Ala333, a Val353 interagují jak s catharanthinovým tak s vindolinovým skeletem. Specificky pro vinkristin toto vazebné místo popsáno nebylo (Coderch et al., 2012).



Obr. 19: Vinkristin ve vazebném místě na $\beta_1\alpha_2$ tubulinu. Zeleně a modře jsou znázorněny jednotlivé podjednotky tubulinu, fialově GDP a žlutě vinkristin.

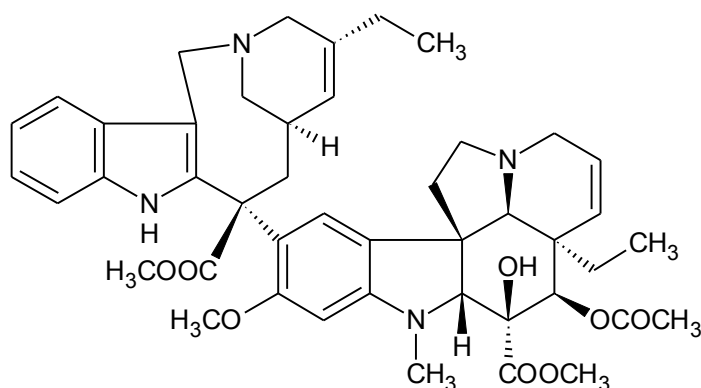
Ve všech třech publikacích byla analýza aktivního místa provedena softwarovým modelováním.

Důležitým proteinem zodpovědným za rezistenci buněk k vinkristinu je transportér léčiv P-glykoprotein (ABCB1, MDR1). Buněčná linie CEM/VCR1000, která nadexprimuje P-glykoprotein, je rezistentní k vinkristinu. Na úrovni exprese mRNA byly identifikovány geny, které jsou zodpovědné za rezistenci buněk k vinkristinu, a geny které jsou zodpovědné za citlivost buněk k vinkristinu. S rezistencí k vinkristinu jsou spojeny geny kódující ektonukleosidtrifosfátdifosfohydrolasu 1 (enzym katalyzující hydrolýzu ATP v nervovém systému a zabraňující agregaci krevních destiček) a dva neznámé proteiny. S citlivostí buněk k vinkristinu jsou spojeny geny kódující glycin N-methyltransferasu (reguluje metabolismus methioninu), receptor pro prolaktin, BCL2/adenovirální E1B 19kD interagující protein (hraje roli při apoptóze), transformující růstový faktor (protein z TGF-beta rodiny, účastní se embryogeneze a buněčné diferenciaci), kladin 1 (integrální membránový protein a součást těsných spojení buněčných membrán), KIAA1161 (pravděpodobně glukosidasa) a tři neznámé proteiny (Sertel et al., 2011).

Vinkristin je metabolizován především dvěma izoenzymy cytochromu P450 (CYP), a to CYP3A4 a CYP3A5. Tuto skutečnost potvrzují klinické studie, které uvádí, že při současném podání inhibitorů CYP3A itrakonazolu a nifepidinu a vinkristinu dochází k interakci těchto léků. Enzymy CYP3A4 a CYP3A5 metabolizují vinkristin na hlavní metabolit M1, který vzniká oxidativním štěpením piperidinového kruhu, a dva vedlejší metabolity. Úloha CYP3A5 je v metabolismu vinkristinu významnější než role CYP3A4. Enzym CYP3A5 vinkristin metabolizuje selektivněji a produkuje 9× – 14× více metabolitu M1 než enzym CYP3A4. Selektivní metabolismus vinkristinu enzymem CYP3A5 je klinicky významný, protože existují polymorfismy v jeho expresi, například alela CYP3A5*1 se nachází u 70 % populace Afroameričanů, ale pouze u 20 % Kavkazánů. Genetické polymorfismy v expresi zmíněných cytochromů se mohou podílet na interindividuální variabilitě v klinické odpovědi na vinkristin (Dennison et al., 2006).

3.3.4.2 Vinorelbin

Vinorelbin (Navelbin[®], 5'-noranhydrovinblastin, 4-(acetyloxy)-6,7-didehydro-15-((2*R*,6*R*,8*S*)-4-ethyl-1,3,6,7,8,9-hexahydro-8-(methoxykarbonyl)-2,6-methano-2*H*-azecino(4,3-*b*)indol-8-yl)-3-hydroxy-16-methoxy-1-methyl-methyl ester; Obr. 20) byl poprvé syntetizován z vindolinu a catharanthinu přes meziprodukt anhydrovinblastin N_b-oxid, ze kterého byl reakcí vycházející z modifikované Polonovskiho reakce připraven intermediát diimoniová sůl a z ní byl působením tetrahydrofuranu a vody připraven vinorelbin (5'-noranhydrovinblastin, Mangeney et al., 1979). Modifikovaná Polonovskiho reakce je reakce terciálního amin-*N*-oxidu s anhydridem kyseliny trifluoroctové (Cave et al., 1967). Později byly publikovány další cesty syntézy vinorelbinu. Využívaná je syntéza biomimetickým spojením vindolinu a catharanthinu a následným zkrácením kruhu velbenaminové části (Song et al., 2012).



Obr. 20: Struktura vinorelbinu (převzato ze Song et al., 2012)

Účinnou látkou při chemoterapii je vinorelbin ve formě ditartrátu. Používá se k léčbě některých typů rakoviny plic a rakoviny prsu (příbalová informace Vinorelbin Ebewe, 2012). Úspěšná byla léčba pokročilé a metastatické rakoviny prsu, nádorů lymfatických uzlin, měkkých tkání, kůže, plic a jater. Metastáze v kostech po podání vinorelbinu vyléčeny nebyly (Degardin et al., 1994). Je účinným chemoterapeutikem při léčbě nemalobuněčného karcinomu plic a rakoviny vaječnicků (Ngan et al., 2000).

Vinorelbin je podáván intravenózně jako pomalá injekce do žíly po dobu 5 – 10 min, nebo jako infuze do žíly po dobu 20 – 30 min. Po ukončení infuze by mělo následovat propláchnutí žíly fyziologickým roztokem. Obvyklá dávka je 25 – 30 mg/m² tělesného povrchu 1× týdně. Zásobní roztok vinorelbinu musí být před podáním naředěn fyziologickým roztokem, nebo 5% roztokem glukózy. Nesmí se ředit alkalickými roztoky, protože hrozí riziko tvorby sraženiny (příbalová informace Vinorelbin Ebewe, 2012). Vinorelbin je podáván také perorálně ve formě měkkých želatinových tobolek. Perorální podání bylo schváleno u pacientů starších 18 let, u mladších osob se doporučuje pouze intravenózní podání. Za běžných podmínek jsou tablety s vinorelbinem užívány jednou týdně, celková dávka by nikdy neměla překročit 160 mg týdně. Tekutina uvnitř tablety má dráždivé účinky, proto musí být tablety spolknuty celé, nesmí být rozkousány, nebo jinak porušeny a obsah tablety nesmí přijít do kontaktu s pokožkou, očima nebo sliznicí. Tableta nemá být zapíjena teplým nápojem, který by ji příliš rychle rozpustil (příbalová informace Navelbine Oral, 2012). Další možnou formou podání jsou injekce vinorelbinu inkorporovaného do lipidové emulze, které jsou zatím ve fázi klinického testování. Zatím publikované výsledky ukazují, že injekce s vinorelbinem ve formě lipidové emulze mají stejnou protinádorovou aktivitu a současně výrazně méně dráždí žílu v místě vpichu a má výrazně nižší toxický účinek na kostní dřeň ve srovnání s intravenózně aplikovaným vinorelbinem ve formě roztoku. Zmíněné výsledky byly pozorovány u bezsrstých myší s lidskými nádory plic (A549), prsu (BCAP-37) a s G2 (středně diferencovaným) jaterním solidním nádorem (Su et al., 2011). Ve fázi testů jsou také liposomové injekce vinorelbinu (AlocrestTM). Vinorelbin je uzavřený v liposomech tvořených sfingomyelinem a cholesterolem. U bezsrstých myší s lidskými nádory prsu MX-1 bylo zjištěno, že léčivo je doručováno cíleně k nádoru, hromadí se v nádorové tkáni a je během několika dní postupně vyloučeno z organismu. Vinorelbin ve formě liposomových injekcí vykazoval vyšší protinádorovou aktivitu bez zvýšení toxicity (Deitcher et al., 2007)

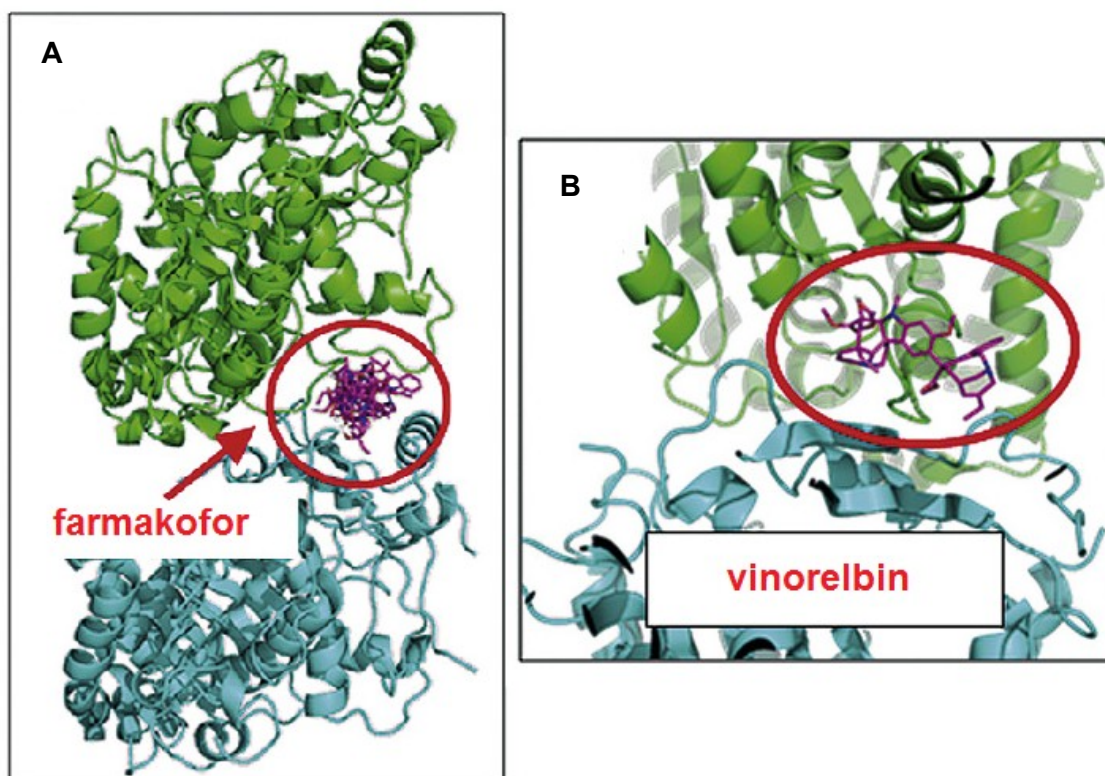
Pacient nesmí vinorelbin užívat, jestliže má, nebo v nedávné době prodělal těžkou infekci, je přecitlivělý, nebo alergický na vinorelbin a jiné alkaloidy z barvíčku, má závažně snížen počet bílých krevních buněk (neutropenie), má závažně snížen počet

krevních destiček, nebo má závažnou poruchu funkce jater. Je nutné zabránit kontaktu vinorelbinu s očima, protože existuje riziko těžkého podráždění, a dokonce zředovatění rohovky. V případě jakéhokoliv kontaktu očí s vinorelbinem musí být oko okamžitě důkladně vypláchnuto fyziologickým roztokem. Komplikací při chemoterapii vinorelbinem mohou být také ischemická choroba srdeční, radioterapie zaměřená na léčení jater, příznaky připomínající infekci (například horečka, nachlazení, bolest v krku) nebo sníženou funkce jater. Bylo zjištěno, že vinorelbin interaguje s léčivými přípravky, které mohou mít vliv na kostní dřeň, jde zejména o protinádorové léky. Dále byla popsána interakce s léky používanými k léčbě epilepsie karbamazepinem, fenytoinem a fenobarbitalem; antibiotiky rifampicinem, erythromycinem, klarithromycinem a telitromycinem; třezalkou tečkovanou (*Hypericum perforatum*); protiplísňovými léčivými přípravky ketokonazolem a itraconazolem; antivirotiky používaná k léčbě HIV (například ritonavirem, což je inhibitor HIV proteasy); lékem proti depresi nefazodonem; léky snižujícími aktivitu imunitního systému cyklosporinem a takrolimem; léky používanými při srdečních onemocněních verapamilem a chinidinem; jinými protinádorovými léky (například mitomycin C, cisplatina); léky používanými ke snížení srážlivosti krve (například warfarin); s vakcínou proti žluté zimnici a jinými živými vakcínami (například proti spalničkám, příušnicím, zarděnkám) protože ty by mohly zvýšit riziko život ohrožujícího onemocnění z vakcíny (příbalová informace Vinorelbin Ebewe, 2012; příbalová informace Navelbine Oral, 2012).

Nejčastějšími vedlejšími účinky, které se objevují u více než 10 % pacientů, jsou pokles počtu bílých krvinek, pokles počtu červených krvinek (anémie), vypadávání vlasů, zánět v ústech nebo krku, nevolnost (nauzea), zvracení, ztráta chuti k jídlu, zácpa, průjem, únava, horečka, bolesti, abnormální hodnoty jaterních testů a ztráta hlubokých šlachových reflexů. V místě vpichu injekce se mohou objevit otoky, bolest nebo vyrážka. Dalšími vedlejšími účinky pozorovanými u 1 – 10 % pacientů jsou bolest na hrudi, potíže s dýcháním, reakce dýchací soustavy, abnormální hmatové vjemy, bolest kloubů a svalů, infekce, alergické reakce, nízká hladina krevních destiček, zvýšení hladiny kreatininu v krvi, což indikuje změnu ve funkci ledvin. U 0,01 – 0,1 % pacientů dochází v důsledku léčby k zúžení, případně ucpání střeva, bolesti kloubů, zánětu slinivky břišní, snížení koncentrace sodíku v krvi, změnám na EKG, slabosti v nohách, kožním defektům kolem místa vpichu injekce, onemocnění plic, srdečnímu záchvatu a může se objevit i angina pectoris projevující se bolestí na hrudi, která vystřeluje do šije nebo ramene. Vedlejšími účinky u méně než 0,01 % případů byly Guillain-Barrého onemocnění, což je zánět periferních nervů, který může způsobit těžkou slabost, a syndrom nepřiměřené sekrece antidiuretického hormonu, mezi jehož příznaky patří přibírání na váze, nevolnost, zvracení, svalové křeče, zmatenost a

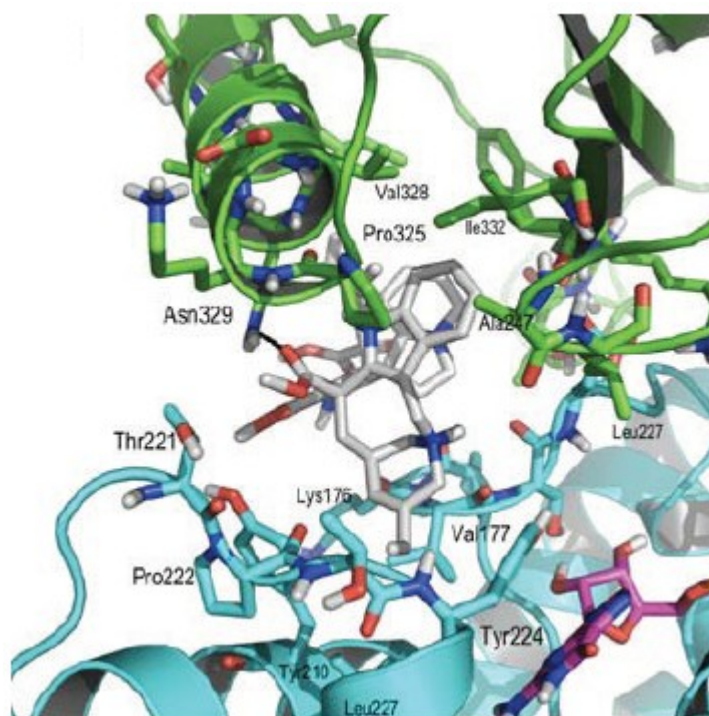
celkové křeče. Vinorelbin může mít genotoxický účinek. Nedoporučuje se, aby muži během chemoterapie vinorelbinem a po dobu 6 měsíců po jejím ukončení počali potomky. V průběhu léčby vinorelbinem také může dojít ke vzniku nevratné neplodnosti. Ženy musejí během léčby používat účinné antikoncepční metody, protože vinorelbin způsobuje vrozené vady a nesmí se užívat během těhotenství. Není známo, zda se vinorelbin dostává do mateřského mléka, kojící ženy však musí kojení přerušit (příbalová informace Vinorelbin Ebewe, 2012).

Konformace volného vinorelbínu je charakterizována kontaktním úhlem mezi catharanthinovým a vindolinovým skeletem vinorelbínu (mezi uhlíky C17' – C18' – C15 – C16), který je roven $197,0^\circ \pm 0,7^\circ$. Stejně jako u vinkristinu piperidinový kruh vykazuje židličkovou konformaci a je umožněna volná rotace vazby C17' – C18' – C15 – C16. Vzdálenost mezi uhlíky C4' a C10 je $8,07 \pm 0,04 \text{ \AA}$. Po vazbě na β -tubulin se velikost zmíněného úhlu sníží na hodnotu $195,6^\circ \pm 0,9^\circ$ a vzdálenost mezi uhlíky C4' a C10 se sníží na hodnotu $7,94 \pm 0,00 \text{ \AA}$. Také vinorelbin se váže na *Vinca* vazebnou doménu, která byla popsána pro vinblastin (Kelly et al., 2011). Vazba na α/β tubulin byla charakterizována molekulárním dokováním (Obr. 21; Sertel et al., 2011).



Obr. 21: Vazba vinorelbínu ve farmakoforu specifickém pro *Vinca* alkaloidy na α/β tubulinovém dimeru. **(A)** ve farmakoforu je zobrazeno 6 struktur (catharanthin, vindolin, vinblastin, vinkristin, vinorelbin a vindesin), **(B)** vazba vinorelbínu ve specifickém farmakoforu (převzato z Sertel et al., 2011).

Následná analýza vazebného místa ukázala, že vinorelbin vytváří vodíkové vazby s aminokyselinami Asn329C; Pro175B; Pro222B; Val353C a se 13 aminokyselinovými rezidui vytváří hydrofobní interakce (Sertel et al., 2011). Kelly et al., 2011 uvádí, že vinorelbin interaguje s následujícími aminokyselinami β -tubulinu: Pro173, Lys174, Tyr208, Thr221 a Tyr22. Vinorelbin interaguje s nižším počtem aminokyselin β -tubulinu než ostatní dimerní alkaloidy z barvíčku a s každou aminokyselinou interagují 2 – 4 atomy uhlíku. Blíže specifikované tyto interakce nebyly. Stejně jako u vinkristinu byla zjištěna interakce vinorelbinu s Pro173, jehož mutace způsobuje destabilizaci mikrotubulů (Kelly et al., 2011). Coderch et al., 2012 charakterizoval vazebné místo pro vinorelbin stejnými aminokyselinami jako u vinkristinu, tj. Val177, Tyr210, Thr221, Pro222, Thr223, Tyr224, Leu227, Pro175 a Lys176 β -tubulinu a aminokyseliny Leu248, Pro325, Val328, Asn329, Ile332, Ala333, a Val353 α -tubulinu (Obr. 22).

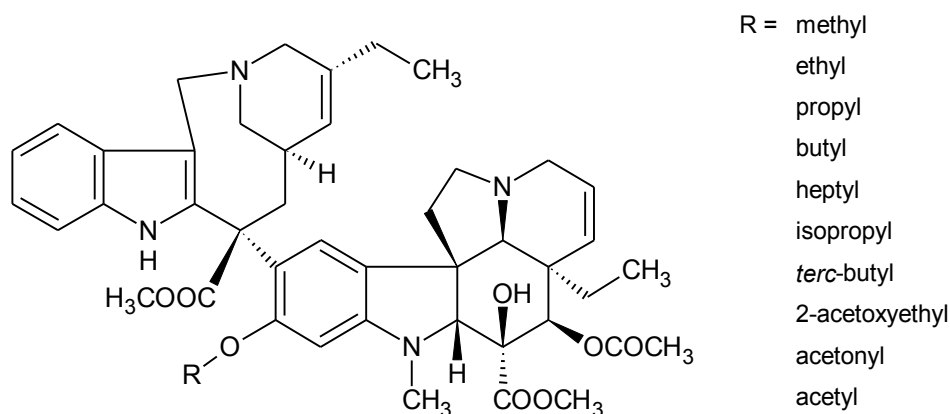


Obr. 22: Vinorelbin ve vazebném místě na $\beta_{1\alpha_2}$ tubulinu. Zeleně a modře jsou znázorněny jednotlivé podjednotky tubulinu, fialově GDP a šedě vinorelbin.

Bylo zjištěno, že vinkristin-rezistentní buňky CEM/VCR1000 více rezistentní k vinorelbinu než k vinkristinu, ve srovnání s buňkami CCRF-CEM byly buňky CEM/VCR1000 41,8× odolnější vůči vinkristinu a 341,9× odolnější vůči vinorelbinu (Sertel et al., 2011).

Vinorelbin vykazoval ve srovnání s ostatními alkaloidy z barvíčku vyšší klinickou účinnost a nižší toxicitu, proto byla studována i další analoga vinorelbinu. Tato analoga byla připravena biomimetickým spojením vindolinu s různými C16 substituenty a

catharanthinu. Výsledkem této syntézy byla struktura (Obr. 23) s různými substituenty (Song et al., 2012).



Obr. 23: Analoga vinorelbinu (převzato ze Song et al., 2012).

Cytotoxicita byla testována na buněčných liniích HeLa (epiteliální buňky adenokarcinomu dělohy) a A549 (buňky nemalobuněčného karcinomu plic). Bylo zjištěno, že cytotoxicita připravených analog vinorelbinu klesá s rostoucí délkou alkylového řetězce C16 substituentu vindolinu. Ethyl-substituovaný derivát vykazoval přibližně stejnou cytotoxicitu jako vinorelbin, cytotoxicita propyl-substituovaného a acetyl-substituovaného derivátu byla přibližně 5× nižší než u vinorelbinu a u heptyl-substituovaného derivátu byla cytotoxicita cca 33× nižší. Překvapivě velký pokles cytotoxicity (cca 20× ve srovnání s vinorelbinem) byl zjištěn u izopropyl-substituovaného derivátu (Song et al., 2012).

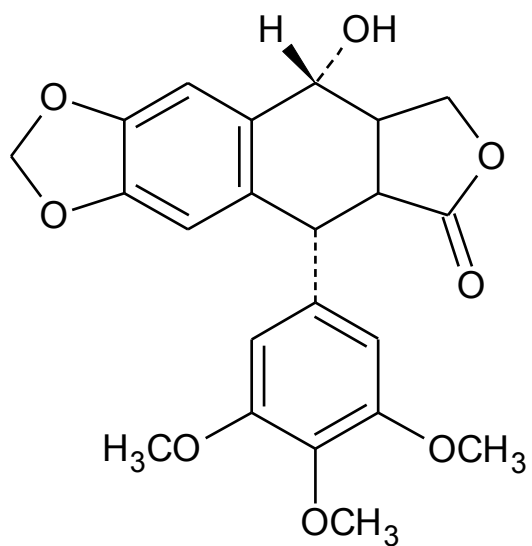
3.3.5 Podophylotoxin – další inhibitor mikrotubulů s protinádorovým účinkem

Podophylotoxin je izolován z extraktu z kořene rostlin *Podophyllum sp.* (noholist; Krishan et al., 1975) z čeledi Berberidaceae (Russell et al., 1997). Léčebné účinky tohoto extraktu jsou známy od 18. století (Krishan et al., 1975), účinky při léčbě rakoviny jsou studovány od roku 1947. Z ethanolického extraktu *Podophyllum peltatum* nebo *Podophyllum emodi* Wall (syn. *P. hexandrum* Royle) se získává podophylin, který je zdrojem aryltetralinového lignanu, podophylotoxinu (Canel et al., 2000). *Podophyllum peltatum* (Obr. 24) je původní v Severní Karolíně v USA (Russell et al., 1997).



Obr. 24: *Podophyllum peltatum* (noholist štítinatý, převzato z Russell et al., 1997)

Podophylotoxin (Obr. 25) a jemu příbuzné sloučeniny a jeho deriváty vykazují biologickou aktivitu, jsou silnými antivirovými a protinádorovými léčivy. Deriváty podophylotoxinu, etoposid (VP-16-213), etopophos (etoposid fosfát) a teniposid (VM-26), jsou také využívány k léčbě řady nádorů (Canel et al., 2000). Podophylotoxin inhibuje skládání mikrotubulů. Jeho deriváty inhibiční účinek na polymerizaci mikrotubulů nemají (Loike et al., 1978). Bylo zjištěno, že podophylotoxin a zmíněné deriváty inhibují příjem nukleosidů do buněk. U podophylotoxinu a etoposidu byla pomocí sledování radioznačeného prekurzoru pozorována inhibice syntézy makromolekul, porušení metabolismu nukleosidů a nukleotidů a inhibice transportu nukleosidů (Yalowich et al., 1984). Podophylotoxin inhibuje buněčný cyklus v G2/M fázi, případně v M fázi. Etoposid a teniposid inhibují buněčný cyklus v S a G2 fázi (Krishan et al., 1975). Podophylotoxin je podle Státního ústavu pro kontrolu léčiv homeopatickým léčivým přípravkem bez schválených léčebných indikací (příbalová informace *Podophyllum peltatum*, 2012). V současné době se jako protinádorové léčivo využívá především etoposid a jsou testovány nové deriváty podophylotoxinu.



Obr. 25: Struktura podophylotoxinu (převzato z Loike et al., 1978)

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a metody

4.1.1 Chemikálie

Voda pro MS (Direct-Q 3 System, Millipore, Francie); RPMI-1640 médium R8758 (Sigma-Aldrich, USA); fetální hovězí sérum dialyzované ultrafiltrací proti 0,15M NaCl (Sigma-Aldrich, USA); streptomycin (Sigma-Aldrich, USA); penicilin (Biotika, Česká republika); 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid (MTT; Sigma-Aldrich, USA); dodecylsulfát sodný (SDS; Sigma-Aldrich, USA); Magic Red kaspasový 3/7 test (Immunochemistry Technologies, USA); RPMI-1640 médium bez argininu a lysinu (Biowest, USA); $^{13}\text{C}_6$ -lysin a $^{13}\text{C}_6$ -arginin (Cambridge Isotope Laboratories, USA); docetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, nyní Sanofi-Aventis, USA); vinkristin (Teva Pharmaceuticals, Česká republika); vinorelbin (Pierre Fabre Oncologie, Francie); PBS, pH = 7,4 (phosphate buffered saline; ve formě sáčků se solemi, Sigma-Aldrich USA); protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich, USA); tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris; Serva, Německo); HCl (RNDr. Jan Kulich, Česká republika); močovina (Sigma-Aldrich, USA); dithiothreitol (DTT; Sigma-Aldrich, USA); Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA); bensonasa (Novagen, Německo); SDS loadovací pufr (Bio-Rad, USA); Repen Silan (GE Healthcare, Švédsko); 30% akrylamid mix (Bio-Rad, USA); 1,5M Tris pufr, pH= 8,8 (Bio-Rad, USA); 0,5M Tris pufr, pH= 6,8 (Bio-Rad, USA); dodecylsulfát lithný (LDS; Sigma-Aldrich, USA); N,N,N',N'-tetramethylendiamin (TEMED; Serva, Německo); persíran amonný (APS; Sigma-Aldrich, USA); Tris-Glycinový pufr, 10× koncentrovaný (BioRad, USA); kyselina octová, p. a. (Penta, Česká republika); ethanol (Merck, Německo); acetonitril (J. T. Baker, Nizozemí); Tris(2-karboxyethyl)fosfin hydrochlorid (TCEP; Sigma-Aldrich, USA); jodacetamid (IAA; Sigma-Aldrich, USA); Trypsin Gold pro MS (Promega, USA); kyselina octová pro MS (Fluka, Sigma-Aldrich, Německo); ethylmorfolin (Fluka, Sigma-Aldrich, Německo); kyselina trifluorooctová (TFA; Sigma-Aldrich, USA); kyselina mravenčí (FA, formic acid; Fluka, Sigma-Aldrich, Německo); α -kyanohydroxyskořicová kyselina (Bruker Daltonics, Německo); dihydrogenfosforečnan amonný ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; Sigma Aldrich, USA); Peptide calibration standard II pro hmotnostní spektrometrii MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Německo); aceton (Sigma Aldrich, USA); médium bez methioninu (Gibco, Life Technologies, USA); formaldehyd (Fagron, Česká republika); hovězí sérový albumin (BSA; Sigma Aldrich, USA), Click-iT AHA (L-azidohomoalanin; Invitrogen, Life Technologies, USA);

Click-iT kit (10× koncentrovaný Click-iT reakční pufr, aditivum do Click-iT reakčního pufru, CuSO₄, Alexa Fluor 488 Alkyne; Invitrogen, Life Technologies, USA); puromycin dihydrochlorid z *Streptomyces alboniger* (Sigma-Aldrich, USA).

4.1.2 Přístrojové vybavení

- spektrofotometr Labsystems iEMS Reader MF (Labsystems, Finsko)
- fluorimetr BMG FLUOstar Galaxy (BMG Labtech, Německo)
- aparatura pro preparativní elektroforézu Mini Prep Cell (Bio-Rad, USA)
- kolona MacroTrap (Bruker-Michrom, USA)
- kapalinový chromatograf nanoHPLC Agilent nano1200 (Agilent Technologies, USA) s HPLC kolonou Agilent Zorbax 300SB-C18 (Agilent Technologies, Německo) spojený s hmotnostním spektrometrem Bruker HCT Ultra PTM Discovery System ESI-IT (Bruker Daltonics, Německo)
- kapalinový chromatograf Agilent Capillary 1200 (Agilent Technologies, USA) s kolonou Michrom Magic C18AQ (Bruker-Michrom, USA) spojený se spoterem Proteineer fc (Bruker Daltonics, Německo)
- hmotnostní spektrometr Bruker Ultraflexxtreme (Bruker Daltonics, Německo)
- průtokový cytometr FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences, USA)

4.1.3 Software

HyStar 3.2 (Bruker Daltonics, Německo), Esquire control verze 6.2 (Bruker Daltonics, Německo), Data analysis verze 4.0 (Bruker Daltonics, Německo), WARP-LC software verze 1.3 (Bruker Daltonics, Německo), FlexAnalysis software verze 3.3 (Bruker Daltonics, Německo), Proteinscape 3.0.0 446 software (Bruker Daltonics, Německo), Mascot verze 2.4 (Matrix Science, Velká Británie), Phenyx verze 2.6 (Genebio, Švýcarsko), Bioconductor R Project verze 2.15.3 (R Development Core Team, Rakousko), GeneGo (MetaCore, Thomson Reuters), CELLQuest verze 3.3 (Becton Dickinson Biosciences, USA).

4.1.4 Biologický materiál

Pro všechny experimenty byla použita buněčná linie CCRF-CEM, což je buněčná linie odvozená od akutní T-lymfoblastické leukémie. Buňky byly získány od společnosti ATCC (American Tissue Culture Collection).

4.1.5 Analýza IC50 a doby do apoptózy

Analýza IC50 a doby do apoptózy byly provedeny již dříve pracovníky z laboratoře tkáňových kultur.

Buňky byly kultivovány v inkubátoru při 37°C, 5 % CO₂ v RPMI-1640 médiu (**Roswell Park Memorial Institute** – instituce, kde bylo médium poprvé připraveno) s 20% FCS (**Fetal Calf Serum**, fetální hovězí sérum) a s antibiotiky (0,5% streptomycin, 0,05% penicilin).

Inhibice růstu nádorových buněk byla vyjádřena hodnotou IC50 (koncentrace vyvolávající 50% inhibici růstu buněk). Hodnota IC50 byla stanovena MTT testem. MTT test je založen na tom, že na mitochondriální membráně živých buněk se žlutý MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid) redukuje na nerozpustný formazán (modré hvězdicovité krystaly). Formazán byl rozpuštěn v 10% dodecylsulfátu sodném (SDS) a intenzita modrého zbarvení byla vyhodnocena spektrofotometricky při vlnové délce 540 nm na spektrofotometru Labsystems iEMS Reader MF. Čím vyšší byla absorbance při 540 nm, tím více buněk přežilo.

Doba do apoptózy byla určena Magic Red kaspasovým 3/7 testem (Immunochemistry Technologies, USA). Pro počátek apoptózy je charakteristická aktivita kaspas 3 a 7. Kaspasy 3 a 7 specificky štěpí aminokyselinovou sekvenci aspartylglutamylvalylasparagovou kyselinu (DEVD). Enzymovou reakcí byla tato sekvence připojena k fluoroforu, kresylové violeti, a vznikl substrát pro kaspasy 3 a 7, kresylová violeť-(DEVD)₂. V přítomnosti kaspas 3 a 7 byla štěpena jedna, nebo obě aminokyselinová sekvence DEVD za vzniku červeného fluorescenčního produktu. Na fluorimetru BMG FLUOstar Galaxy byla měřena fluorescence při 590 nm.

4.1.6 Kultivace buněk, metabolické značení SILAC, ošetření cytostatiky a příprava buněčných lyzátů

Kultivace buněk, metabolické značení SILAC, ošetření cytostatiky a příprava buněčných lyzátů byly provedeny již dříve pracovníky z laboratoře tkáňových kultur.

Buňky byly kultivovány v inkubátoru při 37°C, 5 % CO₂ v RPMI-1640 médiu s 20% FCS a s antibiotiky (0,5% streptomycin, 0,05% penicilin).

Následně byly buňky centrifugovány při 290× g po dobu 5 min při 4°C a původní médium bylo odlito. K části buněk bylo přidáno RPMI-1640 médium bez argininu a lysinu s 20% FCS a byl přidán ¹³C₆-lysin a ¹³C₆-arginin – izotopicky značená buněčná linie. Ke druhé části buněk bylo přidáno opět normální RPMI-1640 médium s izotopicky neznačeným argininem a lysinem – izotopicky neznačená buněčná linie. Obě buněčné linie byly kultivovány po dobu pěti pasáží, dokud u izotopicky značené buněčné linie

nedošlo ke kompletní výměně lehkých izotopů aminokyselin za těžké izotopy. Skutečnost, že lehké aminokyseliny byly zcela nahrazeny těžkými aminokyselinami, byla ověřena MALDI hmotnostní spektrometrií. Izotopicky neznačená buněčná linie byla zředěna na koncentraci 10^6 buněk/ml a byla ošetřena cytostatiky docetaxelem, vinkristinem a vinorelbinem o koncentraci $5 \times IC_{50}$ (docetaxel $1,38 \cdot 10^{-13}$ M, vinkristin $4,54 \cdot 10^{-10}$ M, vinorelbin $7,62 \cdot 10^{-11}$ M) po dobu poloviny času do apoptózy (docetaxel 150 min, vinkristin 300 min, vinorelbin 250 min). Izotopicky značená buněčná linie nebyla ošetřena cytostatikem (jde o kontrolní buněčnou linii) a byla kultivována paralelně s buněčnou linií ošetřenou cytostatikem. Buněčná linie byla ošetřena vždy pouze jedním cytostatikem a každým z cytostatik byla buněčná linie ošetřena ve třech biologických opakováních.

Po uplynutí doby poloviny času do apoptózy byly buňky ošetřené cytostatikem smíchány s buňkami neošetřenými v poměru 1:1. Smíchané suspenze buněk byly centrifugovány při 1200 rpm po dobu 5 min při $4^{\circ}C$. Po smíchání byly buňky dvakrát promyty ledovým PBS (phosphate buffered saline, pH = 7,4; 0,01M pufr byl připraven rozpuštěním 1 sáčku se solemi v 1 l vody) s inhibitory proteas (Protease inhibitor cocktail, Sigma Aldrich) a jednou byly promyty ledovým PBS bez inhibitorů proteas. Mezi jednotlivými promytími a po promytí byly buňky centrifugovány při $290 \times g$ po dobu 5 min při $4^{\circ}C$ a supernatant (PBS) byl odsát. Následně byly buňky resuspendovány v SILAC lyzačním pufru, pH = 6,6 (20mM Tris-HCl, 7M močovina, 10mM dithiothreitol (DTT), 1% Triton X-100, 0,5% SDS) a byly přidány 2 jednotky benzonasy. Suspenze buněk v lyzačním pufru byla přenesena do mikrozkušavek a inkubována na ledu po dobu 5 min. Potom byly přidány další 2 jednotky benzonasy a vzorky byly opět inkubovány na ledu po dobu 5 min. Lyzované buňky (buněčné lyzáty) byly centrifugovány při $20\ 817 \times g$ při $4^{\circ}C$ po dobu 10 min. Supernatant byl přenesen do nové mikrozkušavky a zamražen na $-80^{\circ}C$.

4.1.7 Preparativní elektroforéza

Před separací byla provedena denaturace proteinů v buněčném lyzátu. Buněčný lyzát (100 μ l) byl smíchán s $5 \times$ koncentrovaným SDS loadovacím pufrům (40 μ l) a s 1M DTT (10 μ l). Následně byl buněčný lyzát inkubován v termobloku při teplotě $95^{\circ}C$ po dobu 10 min.

Byla sestavena aparatura Mini Prep Cell (Bio Rad) pro nalití gelu do trubičky. Stěna trubičky byla před sestavením smočena pomocí Repen Silanu pro snadnější vytlačení gelu z trubičky po separaci. Separace byla provedena v 12% akrylamidovém separačním gelu a 5% akrylamidovém zaostřovacím gelu. Separací gel byl připraven

smícháním 30% akrylamidu mix (směs akrylamid/bisakrylamid; 3,3 % C); 1,5M Tris pufru, pH = 8,8 (výsledná koncentrace 0,375 M); 10% dodecylsulfátu lithného (LDS; výsledná koncentrace 0,1 %); vody pro MS; N,N,N',N'-tetramethylendiaminu (TEMED; 0,2 µl/ml) a iniciátoru polymerizace 10% persíranu amonného (APS; výsledná koncentrace 0,1 %). Zaostřovací gel byl připraven smícháním 30% akrylamidu mix (směs akrylamid/bisakrylamid; 3,3 % C); 0,5M Tris pufru, pH = 6,8 (výsledná koncentrace 0,0625 M); 10% LDS (výsledná koncentrace 0,1 %); vody pro MS; TEMEDu (2 µl/ml) a iniciátoru polymerizace 10% APS (výsledná koncentrace 0,1 %). Separální gel byl nalit do trubičky do výšky 90 mm, zaostřovací gel byl doplněn do výšky 100 mm. Po ukončení polymerizace zaostřovacího gelu byl seskládán systém pro separaci podle návodu výrobce. Elektrodotový Tris-Glycinový pufr s LDS byl připraven naředěním 10× koncentrovaného Tris-Glycinového pufru (BioRad) a přidáním LDS (konečná koncentrace 0,1% LDS) a byl nalit do nádrží systému. Do trubičky byl nanesen vzorek. Vlastní elektroforetická separace probíhala při konstantním výkonu 1 W po dobu cca 3 h. Po separaci byl gel vytlačen z trubičky a opláchnut ve vodě. Gel byl fixován ve fixačním roztoku (kyselina octová, ethanol, voda v poměru 10:35:55) po dobu 10 min. Potom byl gel 3× po 5 min promyt ve vodě pro MS. Gel byl skladován v lednici ve vodě pro MS.

4.1.8 Štěpení proteinů v gelu

Gel s proteiny o délce 9 cm byl po elektroforetické separaci nařezán na plátky o tloušťce 2 mm (celkem 45 frakcí). Každý plátek byl nařezán na kostičky o rozměrech přibližně 1×1×2 mm a ty byly přeneseny do 45 mikrozkušavek. Jednotlivé frakce gelu byly dehydratovány přidáním 400 µl acetonitrilu, vzorky byly sonikovány po dobu 5 min a potom byl acetonitril odebrán. Disulfidové vazby mezi cysteiny proteinů byly redukovány Tris(2-karboxyethyl)fosfin hydrochloridem (TCEP). Ke každé frakci gelu bylo přidáno 150 µl 50mM TCEP, vzorky byly inkubovány při 90°C po dobu 10 min a následně byl roztok odebrán. Po redukcii byly jednotlivé frakce gelu promyty 400 µl vody, vzorky byly sonikovány po dobu 5 min a voda byla odebrána. Následovala dehydratace jednotlivých frakcí gelu přidáním 400 µl acetonitrilu, vzorky byly sonikovány po dobu 5 min a potom byl acetonitril odebrán. Redukované cysteiny byly alkylovány jodacetamidem (IAA). Ke každé frakci gelu bylo přidáno 150 µl 50mM IAA, vzorky byly inkubovány ve tmě po dobu 1 h a následně byl roztok odebrán. Po alkylování byly jednotlivé frakce gelu promyty 400 µl vody, vzorky byly sonikovány po dobu 5 min a voda byla odebrána. Byla provedena dehydratace jednotlivých frakcí gelu přidáním 400 µl acetonitrilu, vzorky byly sonikovány po dobu 5 min a potom byl acetonitril

odebrán. Promytí vodou a dehydratace acetonitrilem byly po alkylnaci provedeny celkem třikrát. Nakonec bylo k frakcím gelu přidáno 400 μ l 50% acetonitrilu, vzorky byly sonikovány po dobu 5 min a kapalina byla odebrána. Po redukci, alkylnaci a promytí byly proteiny v gelu štěpeny trypsinem. Byl připraven roztok trypsinu o koncentraci 500 ng/ μ l rozpuštěním 100 μ g trypsinu (Trypsin Gold pro MS, Promega) ve 200 μ l 50mM kyseliny octové. Trypsin o koncentraci 500 ng/ μ l byl 80 \times naředěn v pufru obsahujícím 50mM ethylmorfolin a 10% acetonitril, pH = 8,3. Ke každé frakci gelu bylo přidáno 150 μ l trypsinového pufru a vzorky byly inkubovány při 37°C přes noc.

4.1.9 Extrakce peptidů

Na laboratorní teplotu bylo schlazeno 45 mikrozkuvek s jednotlivými frakcemi gelu v trypsinovém pufru, stočeno v centrifuze a jejich kapalný obsah byl přenesen do 45 nových mikrozkuvek. V původních mikrozkuvkách zůstaly frakce gelu, ke kterým bylo přidáno 100 μ l 0,1% kyseliny trifluoroctové (TFA) v 80% acetonitrilu, tyto vzorky byly sonikovány po dobu 10 min a kapalina byla přenesena do mikrozkuvek s prvním extraktem. Dalším krokem extrakce bylo přidání 150 μ l 0,1% TFA ke gelu v mikrozkuvkách, tyto vzorky byly sonikovány po dobu 10 min a kapalina byla přenesena do mikrozkuvek s předchozími extrakty. Ke gelu v mikrozkuvkách bylo nakonec přidáno 100 μ l 50% acetonitrilu, tyto vzorky byly sonikovány po dobu 10 min a kapalina byla přidána k extraktům. Extrakty v mikrozkuvkách byly odpařeny a rozpuštěny v 5 μ l 0,1% TFA v 80% acetonitrilu a následně naředěny 145 μ l 0,1% TFA. V dalším kroku byla provedena purifikace peptidů.

4.1.10 Purifikace peptidů

Peptidy byly purifikovány na C18 koloně (MacroTRAP, Bruker-Michrom). Kolona MacroTRAP byla sestavena dle návodu výrobce. Vzorky a jednotlivé roztoky byly na kolonu aplikovány pomocí stříkačky Hamilton. Stříkačka Hamilton byla 2 \times propláchnuta 100% acetonitrilem. Kolona MacroTRAP byla 2 \times propláchnuta 100% acetonitrilem a potom 0,1% TFA v 80% acetonitrilu. V tomto okamžiku byla kolona připravena k vlastní purifikaci peptidů.

Kolona MacroTRAPu byla ekvilibrována 500 μ l 0,1% TFA. Na kolonu byl aplikován vzorek (150 μ l vzorku). Vzorek byl odsolen 500 μ l 0,1% TFA. Peptidy z kolony byly eluovány do nové mikrozkuvky pomocí 200 μ l 0,1% TFA v 80% acetonitrilu. Tímto

způsobem byly na koloně postupně přečištěny všechny vzorky, peptidy ze 45 mikrozkušavek byly eluovány do 45 nových mikrozkušavek

Eluáty v mikrozkušavkách po purifikaci byly odpařeny. Čisté peptidy byly rozpuštěny v 1 μl 0,1% TFA v 80% acetonitrilu. Roztoky peptidů byly naředěny 19 μl 0,1% kyseliny mravenčí (FA, formic acid) na konečný objem vzorku 20 μl . Vzorky ze 45 mikrozkušavek byly přeneseny do 45 inzertů, které byly umístěny do vialek. Tímto byly vzorky připraveny pro HPLC-MS analýzu.

4.1.11 Analýza HPLC/MS/MS-ESI/IT

Vzorky byly analyzovány na kapalinovém chromatografu nanoHPLC Agilent nano1200 spojeném s hmotnostním spektrometrem Bruker HCT Ultra PTM Discovery System ESI-IT s ionizačním zdrojem ESI nano sprayer. Separace HPLC probíhala na koloně Agilent Zorbax 300SB-C18 o rozměrech 150 mm \times 75 μm a velikosti částic 3,5 μm při průtoku mobilní fáze 0,5 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Byl nastaven nelineární gradient mobilní fáze (Tab. 1), mísila se voda s 0,1% FA (roztok A) a acetonitrilem s 0,1% FA (roztok B). Doba separace jednoho vzorku byla nastavena na 120 min. Parametry HPLC separace byly nastaveny v softwaru HyStar.

Tab. 1: Gradient mobilní fáze během chromatografické separace nanoHPLC Agilent nano1200.

časové rozmezí (min)	roztok A (%)	roztok B (%)
0 – 5	90	10
5 – 80	65	35
80 – 98	10	90
98 – 120	90	10

Byla měřena hmotnostní spektra peptidů eluovaných mezi 4. – 90. minutou od začátku separace. Pro získávání dat byl využit software Esquire control. Hmotnostní spektra byla měřena v pozitivním módu a ve skenovacím módu standard enhanced. Pro MS1 byl nastaven rozsah 300 – 1600 m/z. Pro MS2 byly nastaveny dvě CID fragmentace, které probíhaly v ultra scan módu, a rozsah 100 – 2800 m/z. Pro fragmentaci byla iontová past plněna na cílenou hodnotu 200 000 iontů a maximální akumulací čas byl nastaven na 200 ms. Izolační šířka pro prekurzor byla nastavena na 4,0 a pro výběr prekurzorů byly vyloučeny jednonásobně nabitě ionty. Pro výběr prekurzoru byl dále nastaven hmotnostní rozdíl (Δ mass) mezi lehkým a

těžkým partnerem 6,02 Da, maximální počet značení 2 na peptid a rozsah náboje 1 – 3.

Získaná hmotnostní spektra byla automaticky zpracována v softwaru Data analysis. Pro detekci peaků byl využit vyhledávací algoritmus apex peak finder s šířkou peaku v polovině výšky 0,1 m/z; poměrem S/N = 1,0; relativní intenzitou pozadí 0,1 % a s absolutní intenzitou pozadí 100. Pro dekonvoluci hmotnostních spekter byla zvolena dekonvoluce nábojového stavu povolených fragmentačních spekter.

Data byla následně odeslána do softwaru Proteinscape, v němž byly identifikované proteiny vyhledány dvěma algoritmy – Mascot a Phenyx. V algoritmu Mascot byly nastaveny následující parametry: databáze NCBI, taxonomie člověk (*Homo sapiens*), enzym trypsin, 2 povolená chybná štěpení, modifikace – karbamidomethylace cysteinů a případná oxidace methioninů, značení ¹³C₆ na argininu a lysinu, hmotnostní tolerance peptidů ± 0.5 Da, MS/MS tolerance ± 0.5 Da, náboj peptidů 2+ a 3+ a monoizotopická hmota. Byly akceptovány pouze peptidy s mascot skóre vyšším než 12 a proteiny s mascot skóre vyšším než 40. V algoritmu Phenyx byly nastaveny následující parametry: databáze uniprot_sprot, taxonomie *Homo sapiens*, možný náboj rodičovského iontu 2, 3, 4, hodnotící model HCTUltra, hodnota Trust parent charge byla nastavena na medium, stejné modifikace jako v algoritmu Mascot, enzym trypsin (KR), tolerance přesnosti rodičovského iontu 0,5 Da, maximálně povolená 2 chybná štěpení, cleavage mode byl nastaven na hodnotu half cleaved, Turbo on, b-y ionty, chybová tolerance 0,5 Da, 20% pokrytí sekvence. Proteiny vyhledané každým z algoritmů byly spojeny do jednoho výsledku a zpracovány v Proteinscapu s využitím nástroje Protein extractor.

Následně byl ze získaných dat pro každou frakci vygenerován Exclusion Scheduled Precursor List (SPL), který obsahoval záznam o každém z identifikovaných peptidů. Pro Exclusion SPL byla nastavena tolerance m/z - 0,3 Da a + 3 Da a tolerance retenčního času 240 s. Exclusion SPL byl využit pro následnou reanalýzu vzorku. Během této analýzy byla získána další spektra, která nebyla detekována během předchozí analýzy. Všechny parametry LC-MS analýzy i parametry vyhledání identifikovaných proteinů byly nastaveny stejně jako při první LC-MS analýze.

4.1.12 Analýza HPLC/MS-MALDI TOF/TOF

Po změření vzorků na hmotnostním spektrometru ESI/IT bylo ze 45 frakcí vzorku připraveno 20 frakcí tak, aby v jednotlivých frakcích byl přibližně stejný počet identifikovaných peptidů. Takto upravených 20 frakcí bylo analyzováno metodou HPLC/MS-MALDI TOF/TOF.

Vzorky byly separovány na kapalinovém chromatografu Agilent Capillary 1200 spojeném se spoterem Proteineer fc. Separace HPLC probíhala na koloně Michrom Magic C18AQ o rozměrech 0,2 mm × 150 mm, velikosti částic 5 μm a 200 Å velikost vnitřních částic při průtoku mobilní fáze 4 μl·min⁻¹. Byl nastaven nelineární gradient mobilní fáze (Tab. 2), mísila se voda s 0,1% FA (roztok A) a acetonitrilem s 0,1% FA (roztok B). Doba separace jednoho vzorku byla nastavena na 88 min. Pro nastavení parametrů HPLC separace byl využit software HyStar.

Tab. 2: Gradient mobilní fáze během chromatografické separace Agilent Capillary 1200.

časové rozmezí (min)	roztok A (%)	roztok B (%)
0 – 5	95	5
5 – 44	70	30
44 – 65	5	95
65 – 88	95	5

Na MALDI destičku byly spotovány frakce eluované po 15 – 48,6 min od začátku separace. Frakce z HPLC kolony na spoteru Proteineer fc smíseny s 1 μl 5,29 μM α-kyanohydroxyskořicové kyseliny v acetonitrilu s TFA (výsledná koncentrace 0,1 %) a NH₄H₂PO₄ (výsledná koncentrace 1 mM) a byly spotovány na destičku MTP AnchorChip 1536 T F, 6s step.

Po spotování vzorku byl na destičku nakapán roztok kalibrantů. Byla použita komerční směs kalibrantů Peptide calibration standard II (Bruker Daltonics, Německo) pro hmotnostní spektrometrii MALDI-TOF obsahující peptidy Bradykinin 1 – 7 (757,39916 Da); Angiotensin II (1046,54180 Da); Angiotensin I (1296,68480 Da); Substance P (1347,73540 Da); Bombesin (1619,82230 Da); Renin Substrát (1758,93261 Da); ACTH klip 1 – 17 (2093,08620 Da); ACTH klip 18 – 39 (2465,19830 Da); Somatostatin 28 (3147,47100 Da). Komerční lyofilizovaná směs kalibrantů byla rozpuštěna v 250 μl 0,1% TFA. Kalibranty v 0,1% TFA (15 μl) byly smíchány se 100 μl roztoku 5,29 mM α-kyanohydroxyskořicové kyseliny v acetonu, 200 μl ethanolu a 135 μl 0,1% TFA. Na jeden kalibrační spot bylo aplikováno 0,5 μl roztoku kalibrantů.

Hmotnostní spektra byla změřena na přístroji Bruker Ultraflex extreme v reflektorném pozitivním módu při relativní síle laseru 25 %. Rozsah byl 600 – 3500 m/z, detekce peptidů byla potlačena do hodnoty 500 Da. Rozlišení detektoru bylo nastaveno na maximální hodnotu 4 GS/s, hodnota citlivosti byla nastavena na 100 mV. Výsledné spektrum bylo sestaveno z 2000 zásahů. Měřilo se při napětí 25,24 kV na zdroji 1;

22,79 kV na zdroji 2; 7,46 kV na čočce; 26,60 kV na reflektoru 1; 13,33 kV na reflektoru 2 a při zpožděné extrakci 110 ns. Napětí na reflektrovém detektoru bylo rovno 2426 V.

Získaná hmotnostní spektra byla automaticky zpracována v softwarech WARP-LC a FlexAnalysis a tyto softwary také vybraly peptidy dané hmoty pro následnou MS/MS analýzu. Hmotnostní spektra byla odeslána do softwaru Proteinscape a identifikované proteiny vyhledány algoritmy Mascot a Phenyx. Parametry pro vyhledání identifikovaných proteinů byly stejné jako při MS-ESI/IT experimentu s výjimkou následujících parametrů: náboj peptidů 1+, MS tolerance 100 ppm, MS/MS tolerance 0,5 Da. Proteiny vyhledané každým z algoritmů byly opět spojeny do jednoho výsledku a zpracovány v Proteinscapu s využitím nástroje Protein extractor.

4.1.13 Statistická a bioinformatická interpretace výsledků

Byly zpracovány výsledky pro buňky ošetřené studovanými cytostatiky, každé biologické opakování bylo zpracováno zvlášť následujícím postupem. Seznamy proteinů pro jednotlivé frakce (45 frakcí u MS-ESI/IT experimentu a 20 frakcí u MS-MALDI TOF/TOF experimentu) byly v softwaru Proteinscape s využitím nástroje ProteinExtractor spojeny tak, aby vznikl kompletní seznam proteinů pro dané biologické opakování. Proteiny byly kvantifikovány ve WARP-LC softwaru. Kvantifikace byla vyjádřena poměrem L/H (lehké peptidy/těžké peptidy, tj. poměr intenzity píku odpovídajícího proteinu neznačené, cytostatikem ošetřené, buněčné linie a intenzity píku odpovídajícího proteinu izotopicky značené, kontrolní, buněčné linie). Z tohoto výsledku byl do MS Excel vyexportován seznam všech identifikovaných peptidů, který byl dále zpracován ve statistickém skriptu napsaném pro tento účel. V tomto skriptu byly určeny odlehle hodnoty kvantifikace peptidů, tj. takové hodnoty, které byly odlehlejší než 1,5 násobek rozdílu mezi prvním a třetím kvantilem. Po odečtení odlehlejších hodnot byl spočítán nový kvantifikační poměr a vyjádřen jako \log_2 pro stejné vyjádření podexprese a nadexprese daného proteinu. Závěrečným krokem tohoto skriptu bylo odečtení mediánu od jednotlivých proteinových poměrů, aby byla odstraněna případná chyba v míchání značeného a neznačeného vzorku, a tím bylo umožněno porovnání vzorků mezi sebou.

Protože analýzy hmotnostními spektrometry s ionizací ESI a MALDI se považují za komplementární (Medzihradszky et al., 2001), byly pomocí statistického softwaru Bioconductor R Project (R Development Core Team, 2012) spojeny výsledky každého opakování naměřené oběma hmotnostními spektrometry do jednoho souboru.

Následně byla provedena analýza těchto dat na úrovni proteinových interakcí a regulačních sítí pomocí komerčního programu GeneGo (MetaCore, Thomson Reuters). Pro GeneGo analýzu byly nastaveny následující parametry: p-hodnota 1; prahová hodnota 0.

Kompletní proteinové seznamy pro každé biologické opakování byly porovnány mezi sebou a pro analýzu byly použity jen proteiny přítomné ve všech třech biologických opakováních. Analýza hlavní komponenty a hierarchického klastrování proběhla ve spolupráci se statistiky v programu R.

4.1.14 Analýza inhibice proteosyntézy průtokovou cytometrií

Buňky byly kultivovány v inkubátoru při 37°C, 5 % CO₂ v RPMI médiu s 15% FCS a s antibiotiky (0,5% streptomycin, 0,05% penicilin). Pro analýzu bylo použito 2,5×10⁶ buněk v 10 ml média na kultivační láhev. Buňky byly kultivovány stále za stejných podmínek do následujícího dne, kdy bylo k buňkám přidáno cytostatikum o koncentraci 5×IC₅₀ (docetaxel 1,38·10⁻¹³ M, vinkristin 4,54·10⁻¹⁰ M, vinorelbin 7,62·10⁻¹¹ M). Byly analyzovány buňky ošetřené docetaxelem, vinkristinem a vinorelbinem. Buňky byly s cytostatiky inkubovány po dobu poloviny času do apoptózy (docetaxel 150 min, vinkristin 300 min, vinorelbin 250 min). Současně s každým vzorkem (buňkami ošetřenými cytostatiky) byla kultivována negativní kontrola (buňky neošetřené cytostatiky, místo cytostatika byl k buňkám přidán stejný objem vody) a pozitivní kontrola (buňky ošetřené puromycinem; c = 18,4 μM). Po uplynutí doby inkubace byly buňky sklizeny, promyty teplým PBS (37°C) a přeneseny do média bez methioninu. Po 1 h inkubace v médiu bez methioninu byl k buňkám přidán L-azidohomoalanin (Click-iT AHA; 2,58 μl/ml) a buňky byly inkubovány další hodinu. Dalším krokem bylo sklizení buněk, promytí PBS, fixace po dobu 15 min v 4% formaldehydu v PBS a permeabilizace po dobu 15 min v 0,25% Tritonu X-100 v PBS. Potom byly buňky promyty v 3% BSA v PBS. Byla připravena Click-iT reakční směs smícháním 10× zředěného Click-iT reakčního pufru (880 μl/ml), aditiva do Click-iT reakčního pufru (100 μl/ml), CuSO₄ (20 μl/ml) a Alexy Fluor 488 Alkyne (3,88 μl/ml). Buňky byly v Click-iT reakční směsi po dobu 30 min ve tmě při laboratorní teplotě. Pak byly buňky opět promyty v 3% BSA v PBS a inkubovány s propidium jodidem po dobu 15 min ve tmě při laboratorní teplotě. Následovalo měření na průtokovém cytometru. Naměřená data byla zpracována a vyhodnocena v softwaru CELLQuest.

4.2 Výsledky

Výsledky analýzy IC50 a analýzy doby do apoptózy nejsou součástí této práce, stejně tak i validace pomocí MALDI-MS, zda se metodou SILAC inkorporovaly do proteinů těžké aminokyseliny. Tyto analýzy byly již dříve provedeny pracovníky laboratoře tkáňových kultur a výsledky budou součástí připravované publikace.

V části výsledky jsou v obrázcích a tabulkách pro buňky ošetřené jednotlivými léčivy zavedeny zkratky: VCR, vinkristin; NVB, vinorelbin (navelbin); TXTR, docetaxel (taxoter).

4.2.1 Proteomická analýza

4.2.2 Analýza buněčných procesů

4.2.2.1 Analýza buněčných procesů v buňkách ošetřených vinkristinem

4.2.2.2 Analýza buněčných procesů v buňkách ošetřených vinorelbínem

4.2.2.3 Analýza buněčných procesů v buňkách ošetřených docetaxelem

4.2.3 Porovnání proteomických profilů účinku léčiv

4.2.4 Analýza inhibice proteosyntézy

4.3 Diskuse

5 ZÁVĚR

Byl zanalyzován proteom buněčné linie CCRF-CEM ošetřené protinádorovými léčivy docetaxelem, vinorelbinem a vinkristinem. Odpověď buněčné linie CCRF-CEM na ošetření zmíněnými protinádorovými léčivy byla posuzována na základě výsledků analýzy buněčných procesů a statistického srovnání jednotlivých proteomických profilů. Výsledky diplomové práce byly porovnány s doposud známými publikovanými klinickými účinky studovaných protinádorových léčiv. Bylo však zjištěno, že publikací, se kterými by bylo možné srovnávat dosažené výsledky, je málo. Byly získány zcela nové výsledky, které budou dále validovány a studovány a které budou součástí publikace. Původní myšlenkou diplomové práce bylo studovat proteomické profily účinku alkaloidů z barvíčku, vinkristinu a vinorelbínu, a srovnat je s proteomickým profilem účinku docetaxelu. Vzhledem ke stejnému mechanismu účinku vinkristinu a vinorelbínu se předpokládal také podobný proteomický profil účinku vinkristinu a vinorelbínu.. Jelikož se tento předpoklad nepotvrdil, bude dále studována také odpověď buněk na další klinicky používaný taxoid, paclitaxel.

6 LITERATURA

Aebersold R., Mann M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198 – 207.

Baker S. D., Sparreboom A., Verweij J. (2006) Clinical Pharmacokinetics of Docetaxel: Recent Developments. *Clin. Pharmacokinet.* **45**, 235 – 252.

Bantscheff M., Schirle M., Sweetman G., Rick J., Kuster B. (2007) Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* **389**, 1017 – 1031.

Barnett C. J., Cullinan G. J., Gerzon K., Hoying R. C., Jones W. E., Newlon W. M., Poore G. A., Robison R. L., Sweeney M. J., Todd G. C., Dyke R. W., Nelson R. L. (1978) Structure – Activity Relationships of Dimeric Catharanthus Alkaloids. 1. Deacetylvinblastine Amide (Vindesine) Sulfate. *J. Med. Chem.* **21**, 88 – 96.

Bissery M.-C., Guénard D., Guéritte-Voegelein F., Lavelle F. (1991) Experimental Antitumor Activity of Taxotere (RP 56976, NSC 628503), a Taxol Analogue. *Cancer Res.* **51**, 4845 – 4852.

Bondarenko P. V., Chelius D., Shaler T. A. (2002) Identification and Relative Quantitation of Protein Mixtures by Enzymatic Digestion Followed by Capillary Reversed-Phase Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **74**, 4741 – 4749.

Buey R. M., Calvo E., Barasoain I., Pineda O., Edler M. C., Matesanz R., Cerezo G., Vanderwal C. D., Day B. W., Sorensen E. J., López J. A., Andreu J. M, Hamel E., Díaz J. F. (2007) Cyclostreptin binds covalently to microtubule pores and luminal taxoid binding sites. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 117 – 125.

Canales A., Rodríguez-Salarichs J., Trigili C, Nieto L., Coderch C., Andreu J. M., Paterson I., Jiménez-Barbero J., Díaz J. F. (2011) Insights into the Interaction of Discodermolide and Docetaxel with Tubulin. Mapping the Binding Sites of Microtubule-Stabilizing Agents by Using an Integrated NMR and Computational Approach. *ACS Chem. Biol.* **6**, 789 – 799.

Canel C., Moraes R. M., Dayan F. E., Ferreira D. (2000) Podophyllotoxin. *Phytochemistry*. **54**, 115 – 120.

Cave A., Kan-Fan C., Potier P., Le Men J. (1967) Modification de la reaction de polonovsky: Action de l'anhydride trifluoroacetique sur un aminoxyde. *Tetrahedron* **23**, 4681 – 4689.

Coderch C., Morreale A., Gago F. (2012) Tubulin-based Structure-affinity Relationships for Antimitotic Vinca Alkaloids. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **12**, 219 – 225.

Comisarow M. B., Marshall A. G. (1974) Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **25**, 282 – 283.

Conde C., Cáceres A. (2009) Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 319 – 332.

Cox C. D., Coleman P. J., Breslin M. J., Whitman D. B., Garbaccio R. M, Fraley M. E., Buser C. A., Walsh E. S., Hamilton K., Schaber M. D., Lobell R. B., Tao W., Davide J. P., Diehl R. E., Abrams M. T., South V. J., Huber H. E., Torrent M., Prueksaritanont T., Li C., Slaughter D. E., Mahan E., Fernandez-Metzler C., Yan Y., Kuo L. C., Kohl N. E., Hartman G. D. (2008) Kinesin Spindle Protein (KSP) Inhibitors. 9. Discovery of (2S)-4-(2,5-Difluorophenyl)-N-[(3R,4S)-3-fluoro-1-methylpiperidin-4-yl]-2-(hydroxymethyl)-N-methyl-2-phenyl-2,5-dihydro-1H-pyrrole-1-carboxamide (MK-0731) for the Treatment of Taxane-Refractory Cancer. *J. Med. Chem.* **51**, 4239 – 4252

De S., Cipriano R., Jackson M. W., Stark G. R. (2009) Overexpression of Kinesins Mediates Docetaxel Resistance in Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* **69**, 8035 – 8042.

Degardin M., Bonneterre J., Hecquet B., Pion J.-M., Adenis A., Horner D., Demaille A. (1994) Vinorelbine (Navelbine) as a salvage treatment for advanced breast cancer. *Ann. Oncol.* **5**, 423 – 426.

Deitcher S. R., Cullis P., Wong M., Choy G. S.: Vinorelbine Liposomes Injection Results in Greater Tumor Drug Exposure Compared to Conventional Vinorelbine in Tumor-Bearing Nude Mice. *AACR-NCI-EORTC International Conference*, San Francisco, California, 2007, poster C109.

Denis J.-N., Greene A. E., Guénard D., Guéritte-Voegelein F., Mangatal L., Potier P. (1988) A Highly Efficient, Practical Approach to Natural Taxol. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 5917 – 5919.

Dennison J. B., Kulanthaivel P., Barbuch R. J., Renbarger J. L., Ehlhardt W. J., Hall S. D. (2006) Selective metabolism of vincristine in vitro by CYP3A5. *Drug Metab. Dispos.* **34**, 1317 – 1327.

Díaz J. F., Menéndez M., Andreu J. M. (1993) Thermodynamics of Ligand-Induced Assembly of Tubulin. *Biochemistry* **32**, 10067 – 10077.

Diéras V., Limentani S., Romieu G., Tubiana-Hulin M., Lortholary A., Kaufman P., Girre V., Besenval M., Valero V. (2008) Phase II multicenter study of larotaxel (XRP9881), a novel taxoid, in patients with metastatic breast cancer who previously received taxane-based therapy. *Ann. Oncol.* **19**, 1255 – 1260.

Diéras V., Lortholary A., Laurence V., Delva R., Girre V., Livartowski A., Assadourian S., Semiond D., Pierga J. Y. (2013) Cabazitaxel in patients with advanced solid tumours: Results of a Phase I and pharmacokinetic study. *Eur. J. Cancer* **49**, 25 – 34.

Dubois J., Guénard D., Guéritte-Voegelein F., Guedira N., Potier P., Gillet B., Beloeil J.-C. (1993) Conformation of Taxotere® and Analogues Determined by NMR Spectroscopy and Molecular Modeling Studies. *Tetrahedron* **49**, 6533 – 6544.

Eisenhauer E. A., Vermorken J. B (1998) The Taxoids: Comparative Clinical Pharmacology and Therapeutic Potential. *Drugs* **55**, 5 – 30.

Engels F. K., ten Tije A. J., Baker S. D., Lee C. K. K., Loos W. J., Vulto A. G., Verweij J., Sparreboom A. (2004) Effect of cytochrome P450 3A4 inhibition on the pharmacokinetics of docetaxel. *Clin. Pharmacol. Ther.* **75**, 448 – 454.

Fulwyler M. J. (1974) Status quo in flow-through cytometry. *J. Histochem. Cytochem.* **22**, 605 – 606.

Gerber S. A., Rush J., Stemman O., Kirschner M. W., Gygi S. P. (2003) Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 6940 – 6945.

Gidding C. E. M., Kellie S. J., Kamps W. A., de Graaf S. S. N. (1999) Vincristine revisited. *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* **29**, 267 – 287.

Gong Z., Xu X., Hou R., Guo Y., Sheng F., Ouyang D., Zhou H., Liu Z. (2010) Effect of docetaxel on expression of eIF3a in human lung cancer A549 cell line. *J. Cent. South Univ. Technol.* **35**, 771 – 776.

Goodlett D. R., Keller A., Watts J. D., Newitt R., Yi E. C., Purvine S., Eng J. K., von Haller P., Aebersold R., Kolker E. (2001) Differential stable isotope labeling of peptides for quantitation and de novo sequence derivation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15**, 1214 – 1221.

Goshe M. B., Conrads T. P., Panisko E. A., Angell N. H., Veenstra T. D., Smith R. D. (2001) Phosphoprotein Isotope-Coded Affinity Tag Approach for Isolating and Quantitating Phosphopeptides in Proteome-Wide Analyses. *Anal. Chem.* **73**, 2578 – 2586.

Gygi S. P., Rist B., Gerber S. A., Turecek F., Gelb M. H., Aebersold R. (1999) Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* **17**, 994 – 999.

Hartmann K., Becker-Putsche M., Bocklitz T., Pachmann K., Niendorf A., Rösch P., Popp J. (2012) A study of Docetaxel-induced effects in MCF-7 cells by means of Raman microspectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* **403**, 745 – 753.

Hayashi Y., Kuriyama H., Umezu H., Tanaka J., Yoshimasu T., Furukawa T., Tanaka H., Kagamu H., Gejyo F., Yoshizawa H. (2009) Class III β -Tubulin Expression in Tumor Cells is Correlated with Resistance to Docetaxel in Patients with Completely Resected Non-Small-Cell Lung Cancer. *Intern. Med.* **48**, 203 – 208.

Hernández-Vargas H., Palacios J., Moreno-Bueno G. (2007) Molecular profiling of docetaxel cytotoxicity in breast cancer cells: uncoupling of aberrant mitosis and apoptosis. *Oncogene* **26**, 2902 – 2913.

Hill B. T. (2001) Vinflunine, a second generation novel Vinca Alkaloid with a distinctive pharmacological profile, now in clinical development and prospects for future mitotic blockers. *Curr. Pharm. Design* **7**, 1199 – 1212.

Himes R. H., Kersey R. N., Heller-Bettinger I., Samson F. E. (1976) Action of the *Vinca* Alkaloids Vincristine, Vinblastine, and Desacetyl Vinblastine Amide on Microtubules *in Vitro*. *Cancer Res.* **36**, 3798 – 3802.

Hood K. A., West L. M., Rouwé B., Northcote P. T., Berridge M. V., Wakefield S. J., Miller J. H. (2002) Peloruside A, a Novel Antimitotic Agent with Paclitaxel-like Microtubule-stabilizing Activity. *Cancer Res.* **62**, 3356 – 3360.

Chao H., Wang L., Hao J., Ni J., Chang L., Graham P. H., Kearsley J. H., Li Y. (2013) Low dose histone deacetylase inhibitor, LBH589, potentiates anticancer effect of docetaxel in epithelial ovarian cancer via PI3K/Akt pathway *in vitro*. *Cancer Lett.* **329**, 17 – 26.

Cheng H., Liu H., Bao W., Zou G. (2011) Studies on the interaction between docetaxel and human hemoglobin by spectroscopic analysis and molecular docking. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* **105**, 126 – 132.

Chmelík J. (2005) Proteomický průvodce. *Chem. Listy* **99**, 883 – 885.

Isbrucker R. A., Cummins J., Pomponi S. A., Longley R. E., Wright A. E. (2003) Tubulin polymerizing activity of dictyostatin-1, a polyketide of marine sponge origin. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 75 – 82.

Jennewein S., Croteau R. (2001) Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**, 13 – 19.

Johnson I. S., Armstrong J. G., Gorman M., et al. (1963) The *Vinca* Alkaloids: A New Class of Oncolytic Agents. *Cancer Res.* **23**, 1390 – 1427.

Jordan M. A., Himes R. H., Wilson L. (1985) Comparison of the Effects of Vinblastine, Vincristine, Vindesine, and Vinepidine on Microtubule Dynamics and Cell Proliferation *in Vitro*. *Cancer Res.* **45**, 2741 – 2747.

Jordan M. A., Toso R. J., Thrower D., Wilson L. (1993) Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9552 – 9556.

Kaan H. Y. K., Weiss J., Menger D., Ulaganathan V., Tkocz K., Laggner C., Popowycz F., Joseph B., Kozielski F. (2011) Structure-Activity Relationship and Multidrug Resistance Study of New S-trityl-L-Cysteine Derivatives As Inhibitors of Eg5. *J. Med. Chem.* **54**, 1576 – 1586.

Karas M., Hillenkamp F. (1988) Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons. *Anal. Chem.* **60**, 2299 – 2301.

Kelly E. B., Tuszynski J. A., Klobukowski M. (2011) QM and QM/MD simulations of the Vinca alkaloids docked to tubulin. *J. Mol. Graph.* **30**, 54 – 66.

Kowalski R. J., Giannakakou P., Gunasekera S. P., Longley R. E., Day B. W., Hamel E. (1997). The Microtubule-Stabilizing Agent Discodermolide Competitively Inhibits the Binding of Paclitaxel (Taxol) to Tubulin Polymers, Enhances Tubulin Nucleation Reactions More Potently than Paclitaxel, and Inhibits the Growth of Paclitaxel-Resistant Cells. *Mol. Pharmacol.* **52**, 613 – 622.

Krishan A., Paika K., Frei E. (1975) Cytofluorometric studies on the action of podophyllotoxin and epipodophyllotoxins (VM-26, VP-16-213) on the cell cycle traverse of human lymphoblasts. *J. Cell Biol.* **66**, 521 – 530.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lau C., Hui P., Chan T. (2011) Docetaxel-induced nail toxicity: a case of severe onycholysis and topic review. *Chin. Med. J.* **124**, 2559 – 2560.

Liebler D. C. (2002) Introduction to Proteomics: Tools for the New Biology, pp. 3 – 13, pp. 137 – 149, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA.

Lobert S., Vulevic B., Correia J. J. (1996) Interaction of Vinca Alkaloids with Tubulin: A Comparison of Vinblastine, Vincristine, and Vinorelbine. *Biochemistry* **35**, 6806 – 6814.

Loike J. D., Brewer C. F., Sternlicht H., Gensler W. J., Horwitz S. B. (1978) Structure-Activity Study of the Inhibition of Microtubule Assembly *in Vitro* by Podophyllotoxin and Its Congeners. *Cancer Res.* **38**, 2688 – 2693.

Lu Y., Chen J., Xiao M., Li W., Miller D. D. (2012) An Overview of Tubulin Inhibitors That Interact with the Colchicine Binding Site. *Pharm. Res.* **29**, 2943 – 2971.

MacRae R., Shyr Y., Johnson D., Choy H. (2002) Declining hemoglobin during chemoradiotherapy for locally advanced non-small cell lung cancer is significant. *Radiother. Oncol.* **64**, 37 – 40.

Macholán L. (2003) Sekundární metabolity, pp. 39 – 57, Vydavatelství Masarykovy univerzity v Brně, Brno – Kraví hora.

Makarov A. (2000) Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Anal. Chem.* **72**, 1156 – 1162.

Mamyrin B. A., Karataev V. I., Shmikk D. V., Zagulin V. A. (1973) The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution. *Zh. Eksp. Teor. Fiz.* **64**, 82 – 89.

Mangeny P., Zo Andriamialisoa R., Langlois N., Langlois Y., Potier P. (1979) A New Class of Antitumor Compounds: 5'-Nor and 5',6'-Seco Derivatives of Vinblastine-Type Alkaloids. *J. Org. Chem.* **44**, 3765 – 3768.

Mastropaolo D., Camerman A., Luo Y., Brayer G., Camerman N. (1995) Crystal and molecular structure of paclitaxel (taxol). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6920 – 6924.

Matesanz R., Rodríguez-Salarichs J., Pera B., Canales Á., Andreu J. M., Jiménez-Barbero J., Bras W., Nogales A., Fang W.-S., Díaz J. F. (2011) Modulation of Microtubule Interprotofilament Interactions by Modified Taxanes. *Biophys. J.* **101**, 2970 – 2980.

Matsuzaki K., Harada A., Takeiri A., Tanaka K., Mishima M. (2010) Whole cell-ELISA to measure the γ H2AX response of six aneugens and eight DNA-damaging chemicals. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **700**, 71 – 79.

Medzihradzky K. F., Leffler H., Baldwin M. A., Burlingame A. L. (2001) Protein Identification by In-Gel Digestion, High-Performance Liquid Chromatography, and Mass Spectrometry: Peptide Analysis by Complementary Ionization Techniques. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **12**, 215 – 221.

Mekhail T. M., Markman M. (2002) Paclitaxel in cancer therapy. *Expert Opin Pharmacother.* **3**, 755 – 766.

Mhaidat N. M., Wang Y., Kiejda K. A. (2007) Docetaxel-induced apoptosis in melanoma cells is dependent on activation of caspase-2. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 752 – 761.

Monteoliva L., Albar J. P. (2004) Differential proteomics: An overview of gel and non-gel based approaches. *Brief. Funct. Genomics Proteomics* **3**, 220 – 239.

Morse D. L., Gray H., Payne C. M., Gillies R. J. (2005) Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **4**, 1495 – 1504.

Nakai R., Iida S., Takahashi T., Tsujita T., Okamoto S., Takada C., Akasaka K., Ichikawa S., Ishida H., Kusaka H., Akinaga S., Murakata C., Honda S., Nitta M., Saya H., Yamashita Y. (2009) K858, a Novel Inhibitor of Mitotic Kinesin Eg5 and Antitumor Agent, Induces Cell Death in Cancer Cells. *Cancer Res.* **69**, 3901 – 3909.

Ngan V. K., Bellman K., Panda D., Hill B. T., Jordan M. A., Wilson L. (2000) Novel Actions of the Antitumor Drugs Vinflunine and Vinorelbine on Microtubules. *Cancer Res.* **60**, 5045 – 5051.

Noel J. (2010) Synthetic metabolism goes green. *Nature* **468**, 380 – 381.

O'Brien M. E. R., Leonard R. C., Barrett-Lee P. J., Eggleton S. P. H., Bizzari J.-P. (1999) Docetaxel in the community setting: An analysis of 377 breast cancer patients treated with docetaxel (Taxotere®) in the UK. *Ann. Oncol.* **10**, 205 – 210.

O'Connell K., Prencipe M., O'Neill A., Corcoran C., Rani S., Henry M., Dowling P., Meleady P., O'Driscoll L., Watson W., O'Connor R. (2012) The use of LC-MS to identify differentially expressed proteins in docetaxel-resistant prostate cancer cell lines. *Proteomics* **12**, 2115 – 2126.

Oda Y., Huang K., Cross F. R., Cowburn D., Chait B. T. (1999) Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6591 – 6596.

Ong S.-E., Blagoev B., Kratchmarova I., Kristensen D. B., Steen H., Pandey A., Mann M. (2002) Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **1**, 376 – 386.

Owellen R. J., Hartke C. A., Dickerson R. M., et al. (1976) Inhibition of Tubulin-Microtubule Polymerization by Drugs of the *Vinca* Alkaloid Class. *Cancer Res.* **36**, 1499 – 1502.

Paul W., Steinwedel H., (1960). Apparatus for separating charged particles of different specific charges. US 2939952.

Příbalová informace Colchicum dispersum, Pharmaselect International Beteiligungs: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0119697&tab=texts>, 27. 7. 2011.

Příbalová informace Docetaxel Pharmaki Generics: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0198762&tab=texts>, 3. 10. 2012.

Příbalová informace Navelbine Oral: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0005924&tab=texts>, 17. 10. 2012

Příbalová informace Podophyllum peltatum, BOIRON CZ, s.r.o.: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0062283&tab=texts>, 2012.

Příbalová informace Vincristine Teva <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0011420&tab=texts>, 20. 10. 2010.

Příbalová informace Vinorelbin Ebewe: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0102593&tab=texts>, 7. 11. 2012

Qiu Y., Sousa E. A., Hewick R. M., Wang J. H. (2002) Acid-Labile Isotope-Coded Extractants: A Class of Reagents for Quantitative Mass Spectrometric Analysis of Complex Protein Mixtures. *Anal. Chem.* **74**, 4969 – 4979.

R Development Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

Rahmani R., Bruno R., Iliadis A., Favre R., Just S., Barbet J., Cano J.-P. (1987) Clinical Pharmacokinetics of the Antitumor Drug Navelbine (5'-Noranhydrovinblastine). *Cancer Res.* **47**, 5796 – 5799.

Ringel I., Horwitz S. B. (1991) Studies With RP 56976 (Taxotere): A Semisynthetic Analogue of Taxol. *J Natl Cancer Inst* **83**, 288 – 291.

Robert F., Harper K., Ackerman J., Gupta S. (2010) A phase I study of larotaxel (XRP9881) administered in combination with carboplatin in chemotherapy-naïve patients with stage IIIB or stage IV non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **65**, 227 – 234.

Rodriguez M. A., Pytlik R., Kozak T., Chhanabhai M., Gascoyne R., Lu B., Deitcher S. R., Winter J. N. for the Marqibo Investigators (2009) Vincristine Sulfate Liposomes Injection (Marqibo) in Heavily Pretreated Patients With Refractory Aggressive Non-Hodgkin Lymphoma. *Cancer* **115**, 3475 – 3482.

Ross P. L., Huang Y. N., Marchese J. N., Williamson B., Parker K., Hattan S., Khainovski N., Pillai S., Dey S., Daniels S., Purkayastha S., Juhasz P., Martin S., Bartlett-Jones M., He F., Jacobson A., Pappin D. J. (2004) Multiplexed Protein Quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* Using Amine-reactive Isobaric Tagging Reagents. *Mol. Cell. Proteomics* **3**, 1154 – 1169.

Russell A. B., Dr. Hardin J. W., Botany; Grand L., Fraser A., Buendia M. A., Capel B. (1997) Poisonous Plants of North Carolina. North Carolina State University. <http://www.ces.ncsu.edu/depts/hort/consumer/poison/Podoppe.htm>.

Samson F., Donoso J. A., Heller-Bettinger I., Watson D., Himes R. H. (1979) Nocodazole action on tubulin assembly, axonal ultrastructure and fast axoplasmic transport. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **208**, 411 – 417.

Seiler J., Jensen E., Niemiera A., Peterson J. (2012) Forest Biology and Dendrology Education. Virginia Tech, Department of Forest Resources and Environmental Conservation, <http://dendro.cnre.vt.edu/>.

Sertel S., Fu Y., Zu Y., Rebacz B., Konkimalla B., Plinkert P. K., Krämer A., Gertsch J., Efferth T. (2011) Molecular docking and pharmacogenomics of Vinca alkaloids and their monomeric precursors, vindoline and catharanthine. *Biochem. Pharmacol.* **81**, 723 – 735.

Shaha S. P., Tomic J., Shi Y., Pham T., Mero P., White D., He L., Baryza J. L., Wender P. A., Booth J. W., Spaner D. E. (2009) Prolonging microtubule disruption enhances the immunogenicity of chronic lymphocytic leukaemia cells. *Clin. Exp. Immunol.* **158**, 186 – 198.

Shalli K., Brown I., Heys S. D., Schofield A. C. (2005) Alterations of β -tubulin isotypes in breast cancer cells resistant to docetaxel. *Faseb J.* **19**, 1299 – 1301.

Schmidt A., Kellermann J., Lottspeich F. (2005) A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics* **5**, 4 – 15.

Silva J. C., Gorenstein M. V., Li G.-Z., Vissers J. P. C., Geromanos S. J. (2006) Absolute Quantification of Proteins by LCMS^E: a virtue of parallel MS acquisition. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 144 – 156.

Song W., Hu L., Meng Y., Ma L., Guo D., Liu X., Hu L. (2012) The effect of vindoline C-16 substituents on the biomimetic coupling reaction: Synthesis and cytotoxicity evaluation of the corresponding vinorelbine analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 3485 – 3487.

Su M., Zhao M., Luo Y., Lin X., Xu L., He H., Xu H., Tang X. (2011) Evaluation of the efficacy, toxicity and safety of vinorelbine incorporated in a lipid emulsion. *Int. J. Pharm.* **411**, 188 – 196.

Sulkes A., Smyth J., Sessa C., Dirix L. Y., Vermorken J. B., Kaye S., Wanders J., Franklin H., LeBail N., Verweij J. (1994) Docetaxel (TaxoterTM) in advanced gastric cancer: results of a phase II clinical trial. *Br. J. Cancer* **70**, 380 – 383.

Tan M. H., De S., Bebek G., Orloff M. S., Wesolowski R., Downs-Kelly E., Budd G. T., Stark G. R., Eng C. (2012) Specific kinesin expression profiles associated with taxane resistance in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **131**, 849 – 858.

Taniguchi R., Kumai T., Matsumoto N., Watanabe M., Kamio K., Suzuki S., Kobayashi S. (2005) Utilization of Human Liver Microsomes to Explain Individual Differences in Paclitaxel Metabolism by CYP2C8 and CYP3A4. *J Pharmacol Sci* **97**, 83 – 90.

Tannock I. F., de Wit R., Berry W. R., Horti J., Pluzanska A., Chi K. N., Oudard S., Théodore C., James N. D., Turesson I., Rosenthal, M. A., Eisenberger, M. A. (2004) Docetaxel plus Prednisone or Mitoxantrone plus Prednisone for Advanced Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **351**, 1502 – 1512.

U. S. Food and Drug Administration, JEVTANA (cabazitaxel) Injection, full prescribing information: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/201023lbl.pdf, 16. 6. 2010.

U. S. Food and Drug Administration, vinCRISTine sulfate LIPOSOME injection, full prescribing information: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/202497s000lbl.pdf, 9. 8. 2012.

van Waterschoot R. A. B., Lagas J. S., Wagenaar E., Rosing H., Beijnen J. H., Schinkel A. H. (2010) Individual and combined roles of CYP3A, P-glycoprotein (MDR1/ABCB1) and MRP2 (ABCC2) in the pharmacokinetics of docetaxel. *Int. J. Cancer* **127**, 2959 – 2964.

Wang L. F., Yin H. T., Qian X. P., Wei J., Zhao Y., Yu L. X., Liu B. R. (2009) beta-Tubulin III mRNA expression and docetaxel sensitivity in non-small cell lung cancer. *Clin. Invest. Med.* **32**, E278 – E284.

Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., McPhail, A. T. (1971) Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 2325 – 2327.

Whitelaw D. M., Kim H. S. (1964) Vincristine in the Treatment of Neoplastic Disease. *Can. Med. Assoc. J.* **90**, 1385 – 1389.

Wilkins M. R., Sanchez J.-C., Gooley A. A., Appel R. D., Humphery-Smith I., Hochstrasser D. F., Williams K. L. (1995) Progress with Proteome Projects: Why all Proteins Expressed by a Genome Should be Identified and How To Do It. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **13**, 19 – 50.

Willey W. C., McLaren I. H. (1955) Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution. *Rev. Sci. Instrum.* **26**, 1150 – 1157.

Wink M. (2008) Ecological Roles of Alkaloids. In *Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis and Biology* (E. Fattorusso and O. Tagliatela-Scafati, ed.), pp. 3 – 24, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

Woessner R., Tunquist B., Lemieux C., Chlipala E., Jackinsky S., Dewolf jr. W., Voegtli W., Cox A., Rana S., Lee P., Walker D. (2009) ARRY-520, a Novel KSP Inhibitor with Potent Activity in Hematological and Taxane-resistant Tumor Models. *Anticancer Res.* **29**, 4373 – 4380.

Yalowich J. C., Goldman I. D. (1984) Analysis of the Inhibitory Effects of VP-16-213 (Etoposide) and Podophyllotoxin on Thymidine Transport and Metabolism in Ehrlich Ascites Tumor Cells *in Vitro*. *Cancer Res.* **44**, 984 – 989.

Yamashita M., Fenn J. B. (1984) Electrospray Ion Source. Another Variation on the Free-Jet Theme. *J. Phys. Chem.* **88**, 4451 – 4459.

Yao X., Freas A., Ramirez J., Demirev P. A., Fenselau C. (2001) Proteolytic ¹⁸O Labeling for Comparative Proteomics: Model Studies with Two Serotypes of Adenovirus. *Anal. Chem.* **73**, 2836 – 2842.

Zhang F., Zhang T., Qu Y., Jiang T., Cao Y.-X., Li C., Fan L., Mei Q.-B. (2010) Replication-dependent γ -H2AX formation is involved in docetaxel-induced apoptosis in NSCLC A549 cells. *Oncol. Rep.* **24**, 1297 – 1305.

Zhang J., Chatterjee K., Alano, C. C., Kalinowski M. A., Honbo N., Karliner J. S. (2010) Vincristine Attenuates N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-Induced Poly-(ADP) Ribose Polymerase Activity in Cardiomyocytes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **55**, 219 – 226.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

1D-SDS-PAGE	jednorozměrná gelová elektroforéza s dodecylsulfátem sodným na polyakrylamidovém gelu
2D-DIGE	dvourozměrná fluorescenční diferenční gelová elektroforéza
2D-SDS-PAGE	dvourozměrná gelová elektroforéza s dodecylsulfátem sodným na polyakrylamidovém gelu
A549	buněčná linie odvozená od nemalobuněčného karcinomu plic
ACTH	adrenokortikotropní hormon
AHA	L-azidohomoalanin
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome, syndrom získaného selhání imunity
ALICE	acid-labile isotope-coded extractants, značení proteinů izotopickou značkou, která je štěpitelná kyselinou
APS	persíran amonný
AQUA	absolute quantification of proteins, absolutní kvantifikace proteinů
ATP	adenosintrifosfát
BCAP-37	nádorové buňky odvozené od rakoviny prsu
BSA	hovězí sérový albumin
CaCo-2	buněčná linie odvozená od kolorektálního adenokarcinomu
CCRF-CEM	buněčná linie odvozená od akutní T-lymfoblastické leukémie
CDC42	kontrolní protein buněčného dělení 42
CDK	cyklin-dependentní kinasa
CEM/VCR1000	buněčná linie odvozená od akutní T-lymfoblastické leukémie rezistentní k vinkristinu
CID	kolizí indukovaná disociace
CLL	buněčná linie odvozená od chronické lymfocytické leukémie
Cy2, Cy3, Cy5	cyaninové fluorescenční barvivo 2, 3, 5
CYP	cytochrom P450
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
ECM29	protein asociující s proteasomem
eIF	eukaryotní factor iniciace translace
EKG	elektrokardiogram
ESI	electrospray ionization, ionizace elektrosprejem

FA	kyselina mravenčí
FCS	fetální hovězí sérum
FDA	Food and Drug Administration, organizace pro schvalování léčiv pro užívání v klinické praxi
FT-ICR	Fourier transform ion cyclotron resonance, analyzátor iontové cyklotronové resonance s Fourierovou transformací
G-CSF	granulocytový kolonie stimulující faktor
GDP	guanosindifosfát
GM-CSF	granulocytový makrofágový kolonie stimulující faktor
GTP	guanosintrifosfát
HeLa	buněčná linie epiteliálního buňky adenokarcinomu dělohy
HIV	lidský imunodeficientní virus
HNF4	játerní jaderný faktor transkripce 4
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HSP	heat-shock protein, protein teplotního šoku
IAA	jodacetamid
IC50	koncentrace vyvolávající 50% inhibici růstu buněk
ICAT	isotope-coded affinity tag, značení proteinů izotopickou značkou
ICPL	isotope-coded protein label, značení proteinů izotopickou značkou
IT	ion trap, hmotnostní analyzátor iontová past
iTRAQ	isobaric tags for relative and absolute quantification, značení proteinů pro relativní a absolutní kvantifikaci izobarickou značkou
KIF	kinesin
KSP	kinesinový protein dělicího vřeténka
L/H	poměr intensity píku lehkých peptidů/těžkých peptidů
LC-MS	kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
LDS	dodecylsulfát lithný
m/z	poměr hmotnost/náboj
MALDI	matrix assisted laser desorption/ionization, laserová desorpce/ionizace za účasti matrice
MAP	proteiny asociující s mikrotubuly
MAP3K	mitogenem aktivovaná kinasa-kinasa-kinasa
MAPK	mitogenem aktivovaná kinasa

MCF-10A	nenádorové buňky prsní tkáně
MCF-7	nádorové nemetastazující buňky odvozené od rakoviny prsu
MDA-MB-231	nádorové metastazující buňky odvozené od rakoviny prsu
MDA-MB-468	nádorové buňky odvozené od rakoviny prsu bez receptoru pro estrogen a nadexprimující receptor pro epidermální růstový faktor
MDR1	multidrug resistance protein 1, mnohočetnou lékovou rezistenci zprostředkovávající protein 1 = P-glykoprotein
mRNA	mediátorová RNA
MRP2	multi-drug resistance protein 2, protein zodpovědný za mnohočetnou lékovou rezistenci
MS Excel	Microsoft Excel
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MSA	microtubule stabilizing agents, léčiva stabilizující mikrotubuly
MTA	microtubule targeting agents, antimitotická léčiva
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid
MX-1	nádorové buňky odvozené od rakoviny prsu
NAD ⁺	nikotinamidadeninukleotid, oxidovaná forma
NADH	nikotinamidadeninukleotid, redukováná forma
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF-κB	jaderný transkripční faktor κB
NK	negativní kontrola
NMR	nukleárně magnetická resonance
NVB	vinorelbin (navelbin)
PARP-1	poly-(ADP)ribosapolymerasa-1
PBS	phosphate buffered saline, fosfátový solný pufr
PC1	příspěvek změny ke konečné podobě grafického vyjádření analýzy hlavních komponent v 1. dimenzi
PC2	příspěvek změny ke konečné podobě grafického vyjádření analýzy hlavních komponent v 2. dimenzi
PC-3, DU-145, 22RV1	buněčné linie odvozené od rakoviny prostaty
PCA	analýza hlavních component
PhiAT	phosphoprotein isotope-coded affinity tag, značení fosfoproteinů izotopickou značkou
PK	pozitivní kontrola
PMF	peptide mass fingerprinting

PSMD	ne-ATPasová regulační podjednotka 26S proteasomu
RNA	ribonukleová kyselina
RP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S/N	poměr signál/šum
SDS	dodecylsulfát sodný
SEC61	proteinová translokasa
SILAC	stable isotope labeling by amino acids in cell culture, značení buněk pomocí aminokyselin se stabilními izotopy
SPL	Scheduled Precursor List, seznam prekurzorových iontů
TCEP	Tris(2-karboxyethyl)fosfin hydrochlorid
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylendiamin
TFA	kyselina trifluoroctová
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor
TOF	time-of-flight, hmotnostní analyzátor doby letu
TRAF6	faktor 6 asociovaný s receptorem TNF
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TXTR	docetaxel (taxoter)
VCR	vinkristin
WASP	protein Wiskott-Aldrichova syndromu