

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Vliv vybraných komplexů dithiokarbamátů s kovy na proteazom a NF- κ B dráhu ve dvou ovariálních nádorových liniích: citlivé (A2780) i rezistentní (A2780cis) k cis-platině

Diplomová práce
Bc. Jindřich Sedláček
Obor: N1501 Molekulární a buněčná biologie

Vedoucí práce: Mgr. Boris Cvek Ph.D.

Olomouc 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracoval samostatně, pod vedením Mgr. Borise Cveka Ph.D., s použitím níže citované literatury.

V Olomouci dne.....

Poděkování

Na tomto místě je mou milou povinností poděkovat vedoucímu diplomové práce panu Mgr. Borisi Cvekovi Ph.D., za odborné vedení a cenné rady. Dále bych chtěl poděkovat Doc. Mgr. Radimu Vrzalovi Ph.D, Bc. Petře Koudelkové, Mgr. Anetě Dořičákové a Mgr. Anetě Novotné za postupné zasvěcení do tajů laboratorních. Veliký dík patří rovněž i mým rodičům za podporu během studia.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Jindřich Sedláček

Název práce: Vliv vybraných komplexů dithiokarbamatů s kovy na proteazom a NF- κ B dráhu ve dvou ovariálních nádorových liniích: citlivé (A2780) i rezistentní (A2780cis) k cisplatině

Typ práce: Diplomová práce

Pracoviště: Katedra genetiky a molekulární biologie, PřF UP, Olomouc

Vedoucí práce: Mgr. Boris Cvek, PhD.

Rok obhajoby práce: 2011

Abstrakt:

Proteazom je 2,5 kDa velký proteázový komplex, ve kterém probíhá specifická degradace buněčných proteinů označených ubikvitinem. Jako klíčový prvek řízené degradace proteinů a apoptózy hraje proteazom ústřední roli v regulaci buněčného cyklu, protože mezi jeho substráty patří i řada regulačních proteinů, které po označení ubikvitinem mohou být rychle degradovány. Díky tomu, že inhibice proteazomu je schopna potlačit signální dráhu NF- κ B, která je spojená s proliferací a přežíváním nádorových buněk, se proteazom stal atraktivním cílem pro vývoj nových protinádorových léčiv. První takovou látkou je bortezomib, který byl v roce 2003 v USA schválen pro léčbu mnohočetného myelomu a je používán i u nás. V současné době probíhá testování nových inhibitorů proteazomu, které inhibují proteazom různými způsoby. Mezi tyto látky patří i disulfiram (Antabus), který se používá k léčbě chronických alkoholiků již po několik desetiletí. Jeho protinádorové působení je zapříčiněné schopností redukované formy (dithiokarbamátu) vytvářet po požití samovolně v organizmu komplexy s kovy, které jsou schopny inhibovat proteazom. Tento lék je nyní předmětem intenzivního zájmu kvůli své nízké toxicitě, známým farmakokinetickým vlastnostem a skončením patentové ochrany. Zpřístupnění tohoto léku může znamenat mnohem levnější a dostupnější léčbu řady nádorových onemocnění, proto se tato práce zabývá stanovením účinků dithiokarbamatových komplexů s kovy na buněčné linie odvozené od rakoviny vaječníku. Byly stanoveny jejich cytotoxicity, dále byl testován vliv těchto látek na proteazom a signální dráhu NF- κ B.

Klíčová slova: Rakovina vaječníku, komplexy diethyldithiokarbamátu, proteazom, NF- κ B, A2780, A2780cis

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Jindřich Sedláček

Title: Influence of selected dithiocarbamate complexes with metals on proteasome and NF- κ B pathway in two ovarian tumor lines: cisplatin-sensitive (A2780) and cisplatin-resistant (A2780cis)

Type of thesis: diploma paper

Department Department of genetics and molecular biology, Palacky University, Olomouc

Supervisor: Mgr. Boris Cvek, PhD.

The year of presentation: 2011

Abstract:

Proteasome is a 2.5 kDa, macromolecular protease complex, where the specific degradation of cellular proteins labelled by ubiquitin is in progress. It is a key element of controlled protein degradation and apoptosis and plays a central role in regulating cell cycle, because it is responsible for the degradation of regulatory proteins labelled by ubiquitin. Inhibitors of proteasom activity are able to suppress the signalling pathway NF- κ B. This pathway is associated with proliferation and survival of tumor cells. Proteasom has become an attractive target for developing new anticancer drugs. The first such substance is bortezomib, which was approved for the treatment of multiple myeloma in the United States in 2003 and is used in our country. Testing new proteasome inhibitors, which inhibit the proteasome in different ways, is currently running. Disulfiram (Antabuse) has been used to treat chronic alcoholism for several decades. Its antitumor effect is caused by ability to create complexes with metals in the body, which are able to inhibit the proteasome. This drug becomes now the subject of interest because of its low toxicity, known pharmacokinetic properties and the end of patent protection. This drug can mean a much cheaper and accessible treatment of cancers. Therefore, this thesis deals with the effects of dithiocarbamat complexes with metals in cell lines derived from ovarian cancer. I determined their cytotoxicity and tested the influence of the substances on the proteasome and the signalling pathway NF-B.

Key words: Ovarian cancer, diethyldithiocarbamat complexes, proteasome, NF- κ B, A2780, A2780 cis

OBSAH:

1 ÚVOD	- 1 -
2 PROTEAZO	- 3 -
2.1 Struktura.....	- 3 -
2.2 Ubikvitinace a degradace proteinů.....	- 7 -
2.5 Další role ubikvitinace proteinů v buňce.....	- 11 -
3 RAKOVINA VAJEČNÍKU	- 13 -
3.1 Obecná charakteristika.....	- 13 -
3.2 Diagnostika.....	- 16 -
3.3 Léčba.....	- 17 -
4 SIGNÁLNÍ DRÁHA NF-κB	- 19 -
4.1 Aktivace.....	- 20 -
4.2 Role signální dráhy NF-κB při nádorových onemocnění.....	- 22 -
5 INHIBITORY PROTEAZOMU	- 24 -
5.1 Bortezomib (VELCADE).....	- 25 -
5.2 Disulfiram.....	- 30 -
5.3 Další inhibitory proteazomu.....	- 35 -
6 CÍL PRÁCE	- 39 -
7 MATERIÁL	- 39 -
7.1 Použité nádorové linie.....	- 39 -
7.2 Chemikálie.....	- 39 -
7.2.1 Protilátky.....	- 40 -
7.3 Použitá media a roztoky.....	- 30 -
7.4 Přístrojové vybavení laboratoře.....	- 41 -
8 PRACOVNÍ POSTUPY	- 43 -
8.1 Kultivace nádorových linií A2780 a 2780-cis.....	- 43 -
8.1.1 Rozmrazení buněk.....	- 43 -
8.1.2 Počítání buněk.....	- 44 -
8.1.3 Pasážování buněk.....	- 44 -
8.1.4 Udržování rezistence k cisplatině.....	- 44 -
8.1.5 Zamrazování buněk.....	- 44 -
8.2 Stanovení toxicit.....	- 45 -
8.3 Příprava vzorků.....	- 46 -
8.3.1 Izolace nukleárních extraktů.....	- 46 -
8.3.2 Izolace cytoplazmatických proteinů.....	- 47 -
8.4 SDS-PAGE a western blot.....	- 48 -
9 VÝSLEDKY	- 50 -
9.1 Stanovení cytotoxického účinku Cu(EtDTC) ₂ , Zn(EtDTC) ₂ a bortezomibu, CuCl ₂ , ZnCl ₂ a diethyldithiokarbamátu.....	- 50 -
9.2 Nepřímé stanovení inhibice proteazomu.....	- 52 -
9.3 Akumulace v ubikvitinovaných proteinů v závislosti na množství buněk.....	- 54 -
9.4 Vliv Cu(EtDTC) ₂ a Zn(EtDTC) ₂ na aktivaci signální dráhy NF-κB.....	- 55 -

9.5 Inhibice signální dráhy NF- κ B pomocí komplexů a bortezomibu.....	- 56 -
10 DISKUZE.....	- 57 -
11 ZÁVĚR.....	- 62 -
12 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	- 64 -
13 POUŽITÁ LITERATURA.....	- 66 -
14 WEBOVÉ ODKAZY.....	- 78 -

1 ÚVOD

U léků, které jsou nyní na trhu, je povědomí, že jsou určeny vůči jednomu konkrétnímu fyziologickému cíli, což nemusí být pravda, jak se někdy dozví i pozorný čtenář příbalových letáků, jejichž obsah většinou popisuje možné obtíže při užívání daného léčiva. Právě díky svým nepředvídaným vedlejším účinkům se nechvalně proslavil např. thalidomid, který původně užívaly těhotné ženy jako sedativum, které způsobovalo vážné deformace plodu, proto bylo třeba předejít nežádoucím účinkům léků, aby již nedošlo k dalším neštěstím jako v případě thalidomidu (Bartlett et al., 2004).

Z těchto důvodů byly navrženy zkoušky obsahující řadu preklinických a několik klinických sérií testů k potvrzení bezpečnosti nově zaváděných látek. O průběh a schvalovací procedury se starají centrálně řízené instituce jako např. americká FDA (Food and Drug Administration) nebo evropská léková agentura (EMA). Farmakologický výzkum je financován z peněz farmaceutických firem nebo z veřejných zdrojů. V tomto případě má výzkum i mnohem větší publicitu a je snaha veškeré jeho výsledky publikovat v prestižních časopisech (Knox *et al.*, 2000, Marchetti *et Schellens* 2007).

Bohužel kvůli schvalovacím procedurám obsahujícím klinické testy se vývoj léků stává extrémně drahý. Udává se, že do uvedení jednoho přípravku na trh tyto náklady v USA přesahují 800 milionů dolarů a schvalovací procedura trvá až 15 let. Farmaceutické firmy pro návratnost svých investic do vývoje a uvedení nových látek na trh, např. proti rakovině, tyto léky patentově chrání, což je činí nedostupnými pro obyvatele v rozvojových zemích (Verma *et al.*, 2005, Chong *et Sullivan* 2007).

Samotný vývoj léků zahrnuje jednak hledání nových látek, které je velice náročné na čas i finanční prostředky, proto se čím dál tím více začíná uplatňovat tzv. molekulární modelování a to kvůli rozšířenému poznání v oblasti proteomiky. Díky tomu mohou být léčivé látky navrhovány pomocí výpočetní techniky na základě znalosti 3D struktury molekul zapojených v patologických procesech. Takto navržené sloučeniny především blokují vazebná místa enzymů over-exprimovaných v signálních dráhách rakovinných buněk (Bohacek *et al.*, 1996).

Dále existuje mnoho látek, které je možné použít k jiným účelům, nežli ke kterým byly původně schváleny. Výhodou bývá, že s jejich užíváním jsou již mnohaleté zkušenosti. Dokonce se odhaduje, že v USA je 40-60 % lékařských receptů vydáno k jinému než schválenému užití (Verma *et al.*, 2005). Jako nejznámější případ mohu uvést aspirin, který se mimo jiné využívá při snižování úmrtnosti na infarkt myokardu nebo kancerostatikum Sirolimus (Rapamycin), které bylo původně schváleno FDA k užívání jako fungicid a teprve v průběhu klinického užívání byly odhaleny jeho protinádorové účinky (Verma *et al.*, 2005). Dnes se začíná ukazovat, že i nechvalně proslulý thalidomid a jeho deriváty účinně potlačují nádorovou angiogenezy i proliferaci. Díky chemickým modifikacím této látky se v budoucnu snad dočkáme nadějných chemoterapeutik (Bartlett *et al.*, 2004).

K obdobným objevům většinou vedou náhodná pozorování jako například zvýšení výskytu burkittova lymfomu po vysazení antimalarika chloroquinu, poté co k němu malarické kmeny v Africe získaly rezistenci. Dnes je tato látka, která se mimo jiné používala i k léčbě revmatoidní artritidy, považována za velmi nadějnou v terapii rakoviny i proto, že potlačuje rezistenci rakovinných buněk vůči konvenční chemoterapii (Geser *et al.*, 1989, Solomon *et Lee* 2009). Nebo příběh antabusu, o jehož protinádorových účincích svědčí, že je schopný potlačovat nádorové bujení *in vitro* (Chen *et al.*, 2006).

Podstata protinádorového působení antabusu spočívá zřejmě v narušení mechanismu řízené degradace proteinů v buňkách pomocí proteazomu (Cvek 2011, Cvek *et Dvorak* 2008). Dříve se předpokládalo, že narušení tohoto procesu by bylo pro organismus fatální. Překvapivě se ukázalo, že látky schopné inhibovat proteazom selektivně zabíjejí nádorové buňky. Dnes jsou tyto sloučeniny objektem intenzivního zájmu (Adams 2004ab).

Inhibovat proteazom mohou i dobře známé léky jako např. antabus, který je schválen k jinému účelu, a proto nemusí procházet celou schvalovací procedurou. Díky tomu může být testování známých léků k jiným účelům alternativou k nákladným farmaceutickým výzkumům (Cvek *et Dvorak* 2008). Velkou výhodou těchto látek je, že obvykle patří mezi takzvaná generika, což jsou léky, jimž skončila patentová ochrana a vyrábět je za přijatelné ceny může prakticky kdokoliv. Bohužel jejich testování k novému použití by bylo pro farmaceutické firmy nerentabilní, proto by měly být tyto výzkumy placeny z veřejných peněz, což se dnes děje jen v malé míře (Cvek 2011ab, Cvek 2010).

2 PROTEAZOM

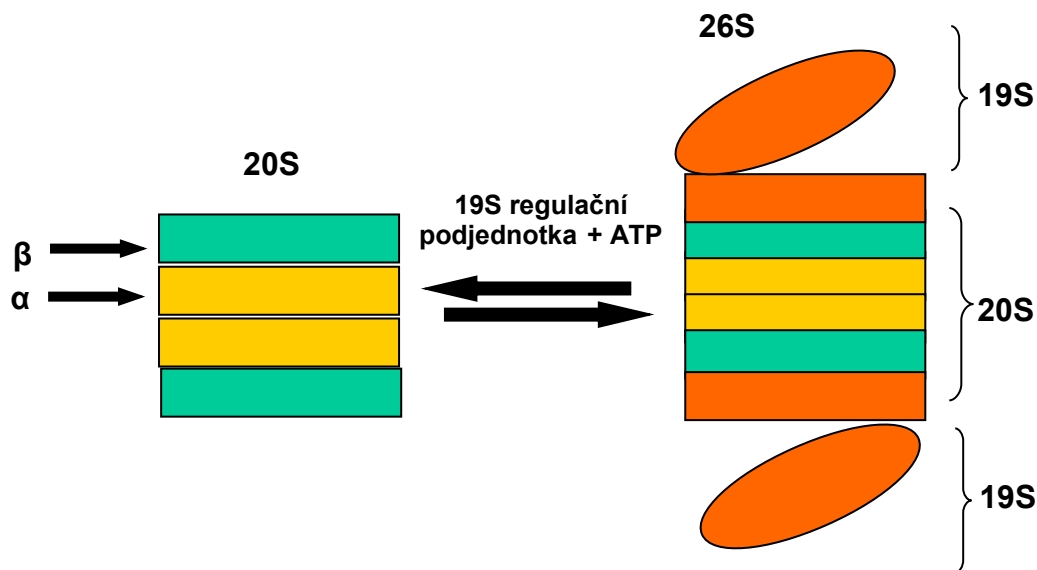
26S proteazom je přibližně 2,5 MDa. velký multiproteinový enzymatický komplex, který slouží k selektivní degradaci buněčných proteinů na krátké peptidové řetězce. U eukariotických organismů se vyskytuje v jádře, tak i cytoplazmě buněk a vyvinul se z jednodušších forem vyskytujících se již u archeobakterií. U savců představuje až 1% z celkového množství buněčných proteinů a nejvyšší souhrnné zastoupení má tento komplex v játrech (Drews *et al.*, 2007, Wollenberg *et Swaffield* 2001).

2.1 Struktura

Proteazom 26S se skládá z hlavní podjednotky 20S ve tvaru barelu s centrální dutinou (obr.1), kde probíhá vlastní enzymatické štěpení proteinů na oligopeptidy dlouhé 3-25 aminokyselin. Samotný 20S se skládá ze čtyř na sebe naskládaných prstenců. Vnější dva prstence jsou tvořeny sedmi α -jednotkami bez proteolytické aktivity (α 1-7). Dále 20S proteazom obsahuje dva vnitřní prstence složené ze sedmi β podjednotek nacházejících se v centrální části proteazomu. Z těchto sedmi β podjednotek (obr.1) pouze tři vykazují proteolytickou aktivitu a to podjednotky β 1, β 2 a β 5 (DeMartino *et Gillette* 2007).

Tyto tři β podjednotky se liší ve své substrátové specifitě a enzymatické aktivitě, protože vykazují jistou podobnost s některými proteolytickými enzymy v jejich aktivitě, bývají podle těchto vlastností také nazývány. Dají se přirovnat k proteolytickému působení chymotrypsinu, trypsinu, kaspáz, a post-glutamylázy peptid-hydroláz (Adams 2003, Hendil *et al.*, 2009). Proteazom 26S se skládá ze samotné proteolytické částice 20S (700 kDa) a dvou 19S regulačních částic (900 kDa), které jsou připojeny k jednomu nebo oběma koncům proteazomu 20S.

Částice 19S regulují aktivitu proteazomu tím, že rozeznávají a rozvíjejí ubiquitinované substráty pro samotné odbourávání v katalytické části 20S. Regulační částice 19S se dělí na dva subkomplexy. První se spojuje s katalytickou částicí 20S a periferním víkem. Tato část se skládá ze šesti ATPázových podjednotek Rpt1-Rpt6 a zbylé čtyři, které nevykazují ATPázovou aktivitu, jsou tyto: Rpn1, Rpn2, Rpn10 a Rpn13. Tyto podjednotky v bázi podjednotky 19S jsou potřebné například k rozvinutí substrátových proteinů před vstupem do centrální dutiny podjednotky 20S (Sharon *et al.*, 2006a).



Obr. 1- Struktura 26S proteazomu, který je složen z 20S proteazomu a dvou regulačních podjednotek 19S rozpoznávajících ubiquitinem značené proteiny, které jsou následně štěpeny v centrální dutině 20S proteazomu složené z α a β -podjednotek.

Oproti tomu je víko proteazomu složeno z devíti podjednotek bez ATPázové aktivity. Hlavní funkcí víka je rozeznání a výběr ubiquitinovaného substrátu a jeho deubikvitinace, která je nezbytná pro samotnou degradaci proteinů v centrální dutině podjednotky 20S (Sharon *et al.*, 2006a). Rovněž některé proteiny jsou před samotnou degradací po určitou dobu navázány na podjednotce 20S a teprve poté dojde k jejich proteolytické degradaci (Sharon *et al.*, 2006b). Víko proteazomu vykazuje vysokou sekvenční homologii s proteinem COP9, který slouží jako vývojový regulátor u eukariotických organismů. Tato homologie svědčí o jejich společném evolučním původu (Glickman *et al.*, 2006).

K 20S proteazomu se může vázat i další druh regulačních částic tzv. 11S. Tyto částice neobsahují ATPasy a podporují degradaci krátkých peptidů, ale ne kompletních bílkovin, protože se předpokládá, že částice 11S není schopná rozvinout kompletní proteiny. K 20S proteazomu se pojí pomocí svých c-terminálních konců a je zodpovědná především za vytváření peptidů, které se následně váží na MHC-I molekuly při virové infekci (Wang *et al.*, 2006, Förster *et al.*, 2005).

Na označení ubikvitinem, které většinou předchází samotnému proteolytické degradaci, můžeme zjednodušeně pohlížet jako na přidělení jakéhosi molekulárního směrovacího čísla, které je užito k nasměrování rozdílně ubikvitinovaných proteinů do nejrozličnějších destinací v rámci jedné buňky. Proteiny regulační podjednotky 19S, které se účastní proteozomálního odbourávání čtou tuto adresu pomocí několika rodin, tzv. ubikvitin vazebných domén (UBD). Ubikvitinované řetězce proteinů v buňce převážně slouží jako rozpoznávací motiv pro proteazomy (Harper *et* Schulman 2006).

Pro samotnou degradaci je nejdůležitější enzymatické odstranění řetězce polyubikvitinů, ke kterému dochází na podjednotce 19S. Nejdůležitějším proteozomálním deubikvitinačním enzymem je Poh1 se svým kvasinkovým homolegem Rpn11. Tyto proteiny obsahují ve své struktuře tzv. JAMM motivy, které vykazují metalodependentní deubikvitinační aktivitu (Gallery *et al.*, 2007). Toto se zjistilo díky studiu kvasinkových mutantů, protože mutace v histidinových kodonech JAMM motivu jsou pro tyto mikroorganismy smrtící, což bylo potvrzeno i na lidských HeLa buňkách, ve kterých byl pomocí RNA interference vypnut příslušný gen. Ovlivněné buňky posléze mají zvýšenou hladinu polyubikvitinovaných proteinů v cytoplazmě, čímž jsou narušeny jejich signální dráhy a takto ošetřené buňky směřují k apoptóze (Gallery *et al.*, 2007). Zajímavější však je deubikvitinační enzym Ubp6, který je spojený přímo s bází 20S proteazomu a jeho působením se zpomaluje deubikvitinaci cílových proteinů před jejich degradací. Nicméně zpoždění degradace proteinů způsobené Ubp6 je nezávislé na katalytické aktivitě proteazomu, což naznačuje, že Ubp6 by mohl regulovat činnost proteazomu (Gallery *et al.*, 2007, Hanna *et al.*, 2006).

Hlavní funkce Ubp6 však spočívá v recyklaci ubikvitinu tím, že brání jeho proteozomálnímu rozkladu. Což je mnohdy vyvoláno jeho nedostatkem v buňce. V tomto případě se zvyšuje zastoupení proteazomů s Ubp6. Katalyticky neaktivní mutanti v Ubp6 nedokáží recyklovat ubikvitin a díky tomu jsou inhibovány jejich proteazomy.

Tyto výsledky ukazují, že UPS může být regulován prostřednictvím koncentrace buněčného ubikvitinu, protože při poklesu hladiny ubikvitinu, a to vzhledem ke snížení jeho syntézy nebo zvýšení jeho degradace, stoupá množství deubikvitinázy Ubp6 a naopak při zvýšení hladiny ubikvitinu v buňce poklesne množství Ubp6 (Hanna *et al.*, 2007).

Na proteazomu byla rovněž identifikována ubikvitin ligáza Hul5. Jedna teorie tvrdí, že činnost Hul5 může podporovat degradaci proteinů tím, že prodlužuje ubikvitinový řetězec a díky tomu je substrát k proteazomu vázán pevněji a tím pádem je degradace proteinů účinnější. Rovněž některé výsledky naznačují, že Hul5 působí proti Ubp6 a zrychluje proteazomální degradaci proteinů, protože mutanti v Hul5 se vyznačují sníženou schopností proteazomální degradace (Crosas *et al.*, 2006, Kohlmann *et al.*, 2008).

Samotné proteazomy existují i ve více strukturních formách 26S, ačkoliv byly běžně považovány pouze za jeden subjekt. Dnes se však začíná ukazovat, že se jedná o velice variabilní struktury mnohdy plnící specializované funkce v rámci buňky (DeMartino *et Gillette* 2007). Proteazomální degradace proteinů je rovněž zodpovědná za downregulaci komplexu p53-MDM2 a tím pomáhá buňkám překonat apoptózu, protože proteozomální aktivátor PA28 γ působí i jako kofaktor při interakci MDM2 a p53. Po vyloučení tohoto proteinu v nádorových buňkách se narušuje MDM2-zprostředkovaná degradace p53 a zvyšuje svou aktivitu. Díky tomu se zvyšuje i podíl apoptických buněk (Zhang *et Zhang* 2008).

2.2 Ubikvitinace a degradace proteinů

Po objevení prostorové struktury DNA a následně i genetického kódu byl rozvíjen zájem spíše o výzkum syntézy proteinů a naopak jen malá pozornost byla věnována skutečnosti, že mnohé proteiny jsou v rámci buňky rychle a hlavně selektivně degradovány. K obratu došlo především díky průkopnické práci Rudolfa Schoenheimera, který podal laboratorním potkanům izotopem označenou aminokyselinu leucin. Ten byl následně sledován v organismu až do vyloučení ve formě močoviny. Schoenheimer díky postupnému vylučování značeného leucinu dospěl k závěru, že nově přijímané aminokyseliny musí dynamicky nahradit aminokyseliny v tkáních již přítomné ve formě proteinů (Hershko 2005, Guggenheim 1991).

Pro další práci bylo ale důležitější zjištění Rabinowitze a Fishera (1964), že abnormální bílkoviny jsou z těla rychle eliminovány (Hershko 2005). Tyto práce posléze byly zdrojem inspirace pro Avrama Hershka, který se během svého postgraduálního studia (1969-1971) v laboratoři Gordona Tomkinse na Kalifornské univerzitě v San Francisku zabýval regulací činnosti enzymu tyrosin aminotransferázy (TAT), a zjistil, že eliminace regulující činnosti tyrosin aminotransferázy je závislá na energii ve formě ATP (Hershko 2005). Jeho základní experimenty spočívaly v tom, že inhiboval energetický metabolismus buněk fluoridem draselným a posléze i dalšími inhibitory a tím zastavil odbourávání TAT. Nejdůležitější však bylo zjištění, že nejdříve bylo zastaveno odbourávání TAT a naopak inaktivace tohoto enzymu v důsledku vyčerpání ATP nastala až opožděně. V tu samou dobu ale bylo již zastaveno lysozomální odbourávání proteinů, protože je závislé na ATP, jež je nutné k udržení nízkého pH uvnitř této organely, která byla v té době považována za ústřední místo degradace proteinů v buňce (Hershko *et* Tomkins 1971).

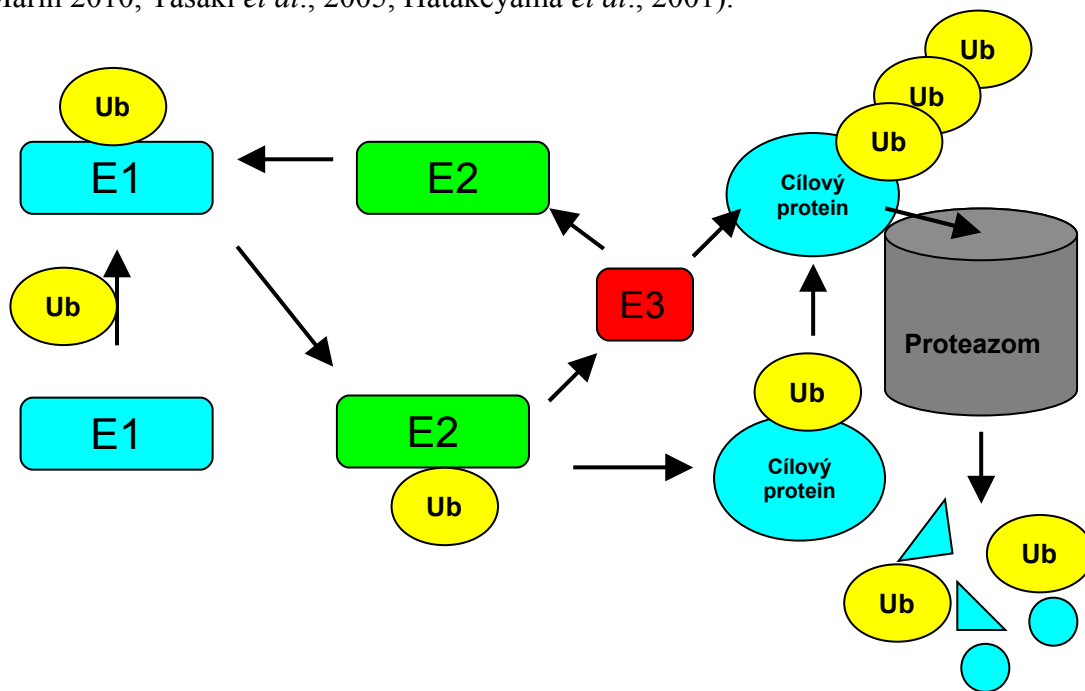
Těmito experimenty vyvrátil Avram Hershko zažitou teorii, že buněčné proteiny jsou lysozomálně degradovány. Vzhledem k tomu, že vyčerpání buněčné ATP předcházelo inaktivaci enzymatické činnosti TAT dospěl také k závěru, že je energie zapotřebí již v prvních krocích tohoto děje. Poté následovalo období, kdy byly z buněčných lyzátů postupně izolovány jednotlivé složky ubikvitin-proteazomového systému, které byly následně popsány díky svým interakcím v umělém systému (Hershko 2005, Hershko *et* Tomkins 1971).

Za tento objev obdržely Aaron Ciechanover, Avram Hershko a Irwin Rose v roce 2004 Nobelovu cenu za chemii (Nobelprize.org). Předcházející dvě dekády byly doprovázeny dramatickým nárůstem znalostí o funkcích ubikvitinem zprostředkované degradace proteinů, která se účastní takřka všech základních biologických procesů. Výhody specifické degradace se jeví obzvláště důležité u proteinů jako jsou cykliny, inhibitory cyklin dependentních kináz nebo u dalších proteinů účastnících se regulace buněčného cyklu.

Jednotlivé biochemické kroky vedoucí k proteozomální degradaci vyžadují postupné působení nejméně tří enzymů a je to děj závislý na energii ve formě ATP (Hershko *et* Ciechanover 1998). Před samotnou specifickou degradací v proteazomu bývá cílový protein obvykle kovalentně označen molekulami ubikvitinu, což je malý protein o délce 76 aminokyselin. Tento proces zahrnuje několik kroků a je postupně katalyzován třemi skupinami enzymů označených jako: E1- ubikvitin aktivační, E2- ubikvitin konjugační a E3-ubikvitin ligační enzym. V prvním kroku glycinové zbytky ubikvitinu na jeho c-konci vytvoří thioesterovou vazbu s vnitřním cysteinem aktivačního enzymu E1. Během tohoto děje vznikají i meziprodukty. Tento děj je ATP dependentní a katalyzovaný rovněž působením ubikvitin aktivačního enzymu E1. Dále je aktivovaný ubikvitin navázán svými cysteinovými zbytky na konjugační enzym E2, který slouží jako jeho nosič. Ve třetím kroku je tento děj katalyzován E3 ubikvitin ligázou. Tento enzym kovalentně připojuje peptidickou c-terminální vazbou aktivovaný ubikvitin k lysinovým zbytkům cílové bílkoviny (obr. 2). Obvykle je přítomný jen jediný E1, i když v poslední době byly identifikovány další proteiny s obdobnou funkcí (Jin *et al.*, 2007, Hershko *et* Ciechanover 1998).

Existuje však mnoho druhů ubikvitin konjugačních enzymů s označením E2 a dokonce i více proteinových rodin ubikvitin ligáz E3. Ty obvykle spojují molekuly ubikvitinu vazbami lysinů v pozici K48 (Ciechanover *et al.*, 2000, Hershko *et Ciechanover* 1998). Skupina ubikvitin ligáz E3 jenom u savců obsahuje bezmála 500 členů, které mají rozdílné funkce (Tasaki *et al.*, 2005).

Tyto ubikvitin ligázy rozpoznávají cílové proteiny díky čtyřem základním doménám, které vykazují odlišnou substrátovou specifitu. První je významná rodina RBR, která obsahuje ve své struktuře tzv. RING doménu. Pro další E3 rodinu je typický motiv HECT. Další skupina obsahuje ve své struktuře takzvaný U-box. Tato skupina enzymů byla také objevena nejpozději. Rodiny RBR a HECT jsou evolučně velmi staré a vyskytují se v různě pozměněné formě u všech eukaryotických organismů (Marín 2010, Tasaki *et al.*, 2005, Hatakeyama *et al.*, 2001).



Obr. 2- Znázornění ubikvitin-proteazomového systému. Cílový protein je nejprve označen ubikvitiovým řetězcem pomocí enzymatické kaskády E1, E2 a E3 a poté je rozpoznán a rozštěpen proteazomem.

Další skupina enzymů, která vykazuje ubikvitin ligační aktivitu obsahuje tzv. PHD domény, které jsou příbuzné tzv. „zinkovým prstům“ a obvykle se účastní především virové ubikvitinace MHC1 molekul viry napadené hostitelské buňky. Strukturální příbuznost PHD a RING domén rovněž naznačuje, že ubikvitin ligační (E3) může aktivitu sdílet s celou řadou dalších zatím neidentifikovaných proteinů (Coscoy *et Ganem* 2003).

Dále byl identifikován i faktor E4, který napomáhá enzymatickým komponentům E2 a E3 syntetizovat dlouhé řetězce polyubikvitinu v případě nedostatečně ubikvitinovaných molekul proteinů (Koegl *et al.*, 1999, Hoppe 2005).

Některé bílkoviny mohou být degradovány v proteazomu bez předchozího označení ubikvitinem. Jedná se např. o kalmodulin nebo ornitindekarboxylázu (Tarcsa *et al.*, 2000). Tímto způsobem může být rovněž degradován i nádorový supresor p53, transkripční faktor HIF1 nebo inhibitor cyklin dependentních kináz p21WAF1/CIP1. Tyto proteiny předurčuje k degradaci buď asociace s jinými proteiny, nebo možná existence jiného rozpoznávacího systému, popřípadě i rozpoznávání neuspořádaných struktur poškozených proteinů přímo proteazomem. Zastoupení degradace proteinů nezávislé na ubikvitinu v buňkách může být ve skutečnosti značně podceněno (Jariel-Encontre *et al.*, 2008).

2.3 Další role ubikvitinace proteinů v buňce

Jiná spojení ubikvitinu jsou např. v pozici lysinu K63 nebo méně často se vyskytují molekuly ubikvitinu spojené v pozici lysinu K11 či K 29 nebo pouze monoubikvitinace proteinů. Neslouží v buňkách jako rozpoznávací značka pro proteazom, ale nesou rozličné signální funkce. Například monoubikvitinace je nejčastější úpravou savčích histonů H2A a je zodpovědná např. za transkripční represi proteinů Polycomb u drozofily (Hartmann *et al.*, 2003, Vissers *et al.*, 2008). Ubikvitinace je rovněž prostřednictvím proteinů RAD6 a MMS2-UBC13 nepostradatelná pro reparaci DNA (Hoege *et al.*, 2002).

Po objevu ubikvitinu v sedmdesátých letech se zjistilo, že existuje celá další rodina malých proteinů příbuzných ubikvitinu tzv. ubiquitinlike proteiny nebo (Ubls). Stále jsou také popisovány další proteiny této skupiny. Její členové nemusí nutně být vysoce sekvenčně podobní ubikvitinu. Všechny tyto proteiny ale mají podobnou 3D strukturu zejména tzv. β -grasp fold. Samotný ubikvitin i většina Ubls jsou syntetizovány jako neaktivní prekurzory a k získání své finální biologické funkce musí být ještě dále upravovány. Ke svým substrátům jsou rovněž připojovány s ubikvitinem evolučně spřízněnými enzymatickými cestami (Hochstrasser 2009, Kerscher *et al.*, 2006).

Přes veškeré společné rysy existuje mezi Ubls i mnoho rozdílů především v konjugačních cestách. Za společné předchůdce těchto enzymatických cest ubikvitinu a Ubls se považují na základě sekvenčních i strukturních podobností některé prokaryotické sulfotransferázy (Hochstrasser 2009). Ligační enzymy jsou většinou specifické pouze pro jeden určitý Ubls. Samotná konjugace těchto proteinů je předmětem mnoha druhů buněčných kontrol, včetně regulací v dostupnosti nebo aktivitě enzymů. Dysfunkce v jejich konjugačních drahách pak přispívá k progresi nejrůznějších onemocnění, jako je rakovina či různé neurodegenerativní poruchy (Hochstrasser 2009, Kerscher *et al.*, 2006).

Ubikvitin se v buňkách vyskytuje buď ve volné monomerní formě, nebo v konjugované formě polyubikvitinu. Tento stav je v rámci jednoho typu buněk dynamický. Liší se však mezi jednotlivými tkáněmi. Například u studie, která byla provedena u prasat, se největší množství jak volného, tak i konjugovaného ubikvitinu nachází v plicích a slezině, naopak nejnižší hladiny byly zjištěny ve svalech. Nejvíce konjugované formy bylo přítomno v srdci, což naznačuje určitý tkáňový patern. Zajímavější je, že činnost proteazomu nekoreluje s hladinou volného ani vázaného ubikvitinu. Navzájem však koreluje množství volného a vázaného ubikvitinu, což naznačuje, že procentuální frakce obou forem ubikvitinu jsou ve zdravé tkáni zhruba stejné (Patel *et Majetschak* 2007).

Recyklace ubikvitinových konjugátů na volné ubikvitinové jednotky, které se mohou zapojit dále do konjugace se děje např. prostřednictvím izopeptidazy T. Tento děj probíhá v cytoplazmě po oddělení částí řetězce polyubikvitinu z 26S proteazomu (Hadari *et al.*, 1992, Wilkinson *et al.*, 1995). Z dalších deubikvitinačních enzymů je nutno zmínit ubikvitin c-terminalní hydrolázy (UCH) štěpící řetězce ubikvitinu hydrolyticky (Larsen *et al.*, 1998).

Rovněž i deubikvitinace má v buňce rozhodující regulační úlohy, např. deubikvitinační enzymy hrají roli ve vývojových procesech u drosofil. A dokonce při některých neurodegenerativních onemocněních je charakteristické hromadění ubikvitinovaných konjugátů důsledkem mutace v genu pro deubikvitinační enzym Uch-L1 (Ciechanover *et al.*, 2000).

3. RAKOVINA VAJEČNÍKU

3.1 Obecná charakteristika a rozdělení

Rakovina vaječníku je zhoubné nádorové onemocnění, které je obzvláště časté v severní Evropě a Spojených státech amerických, kde je ročně nově diagnostikováno více než 23 000 případů. Jedná se o jednu z nejčastějších gynekologických malignit u žen. Frekvence jejího výskytu se však výrazně liší mezi různými regiony, ale i mezi etnickými skupinami v rámci jednoho státu, např. ženy evropského původu v USA trpí touto chorobou častěji než např. Afro-američanky. Tyto rozdíly jsou způsobené odlišným reprodukčním chováním (viz níže). Celkový počet úmrtí na rakovinu vaječníku je vyšší než u všech dalších gynekologických malignit. Většina případů této choroby bývá sporadických, ale zhruba 5 % až 10 % tvoří případy familiárního původu v důsledku dědičné predispozice (Holschneider *et* Berek 2000).

Vznik rakoviny vaječníků jako ostatně všech maligních onemocnění je mnohastupňový proces postupného hromadění genetických změn vedoucích k transformaci normální buňky v nádorovou (Holschneider *et* Berek 2000). Všeobecně je o podstatě vzniku této choroby známo pouze málo informací, a to díky tomu, že se nepodaří zachytit časná stadia této nemoci. Základní schéma ovariální kancerogeneze je již známé. Spočívá především v kontinuální ovulaci (uvolňování vajíčka z vaječníků), kdy je soustavně poškozován epitel dělohy. Což může mít za následek vznik cyst a lézí, které pod vlivem dalších onkogenních podnětů podstupují maligní transformaci (Holschneider *et* Berek 2000).

Zhruba pro jednu třetinu případů rakoviny vaječníků je z onkogenů typická overexprese genu HER-2/neu, který kóduje receptor pro epidermální růstový faktor. K overexpresi HER-2/neu dochází především z důvodu přítomnosti více kopií tohoto genu. To potvrzují i imunohistochemické studie, které ukazují až čtyřicetinásobné zvýšení hladiny receptoru kódovaného genem HER-2/neu (Gallion *et al.*, 1995).

Pravidelně bývají zjišťovány i mutace v některém proto-onkogenu z rodiny Ras, díky nimž jsou tyto proteiny konstitutivně aktivní a stimulují buňku k dalšímu dělení. Nejčastěji to bývají mutace k-ras, které se vyskytují především u mucinozních (hlenovitých) typů nádorů (Gallion *et al.*, 1995). Další velice nepříjemnou vlastností ovariálních nádorů je jejich familiární výskyt a stejně jako u rakoviny prsu jsou predispozice k této chorobě dány mutacemi v genech BRCA1 nebo BRCA2, což jsou tumor supresorvé geny zodpovědné za opravy zlomů v DNA. Současné mutace v obou těchto genech jsou charakteristické pro převážnou většinu rodin s dědičnou náchylností k rakovině vaječníků (Welch *et al.* 2001).

Zajímavým zjištěním je, že fenotypový projev mutací v genech BRCA1 a BRCA2 s ohledem na poměr rakoviny prsu k rakovině vaječníků se liší v závislosti na poloze mutace v rámci těchto genů. Pro rakovinu vaječniku je např. typické zkrácení genu BRCA2 umístěné na exonu 11 (Gayther *et al.*, 1997). Cytogenetické analýzy ovariální nádorové masy ukázaly rovněž časté strukturní změny či delecce chromozomů 1, 3, 6 nebo 11. Nejtypičtější jsou však strukturní změny chromozomu sedmnáct. Ty se vyskytují ve více než 70 % nádorů a jsou nejčastější u dědičných forem rakovin vaječniku, protože se na dlouhém ramínku tohoto chromozomu nalézá i již zmíněný gen BRCA1. Odhaduje se, že až 10 % případů rakoviny vaječniku je v důsledku dědičné predispozice související se ztrátou či mutací tohoto genu. Na stejném chromozomu se rovněž nachází i gen pro tumor-supresorový protein p53 (Gallion *et al.*, 1995, Kupryjańczyk *et al.*, 1993).

V rodinách s anamnézou rakoviny prsu či vaječníků je kumulativní riziko vzniku těchto dvou rakovin u žen s mutací v alele BRCA1 odhadováno dokonce na 76 % do věku 70 let čímž je naznačeno, že gen BRCA 1 je obzvláště důležitý v predispozici obou malignit (Gallion *et al.*, 1995). Dalším velice častým molekulárním znakem této choroby jsou mutace v proteinu p53, které vedou ke ztrátě jeho funkce a v některých případech i k akumulaci nefunkční mutované formy proteinu p53 v postižených buňkách (Kupryjańczyk *et al.*, 1993).

Špatnou prognózu mívá tato rakovina především díky pozdní diagnóze, protože odhalení časných stádií je velice obtížné díky bezpříznakovému průběhu této choroby a absenci vhodných skriningových testů pro její identifikaci. Významnou roli hraje i nespecifičnost symptomů v pozdních fázích této nemoci. Proto bývají ovariální rakoviny diagnostikovány až v pokročilém stádiu, kdy už se metastáze rozšířily i mimo vaječníky a léčba takto pokročilých onemocnění je značně komplikovaná (Amadori *et al.*, 1997).

V rámci organismu se rakovina vaječníku šíří nejčastěji prorůstáním do okolních tkání a v pokročilejších stádiích nemoci i za pomoci lymfatického systému, a to nejčastěji do orgánů v pánevní oblasti. Její metastáze dále bývají velice často nalézány v oblasti pobřišnice či v játrech. Méně často a převážně v pokročilých stádiích nemoci pronikají metastáze i do kostí a centrální nervové soustavy. V tomto případě mají nemocné ženy vůbec nejhorší možnou prognózu (Amadori *et al.*, 1997).

Z hlediska původu jsou zdaleka nejčastější nádory pocházející z ovariálního epitelu, které tvoří cca 85-90 % těchto malignit (Amadori *et al.*, 1997). Samotné epiteliální nádory jsou rozděleny do různých kategorií, dle morfologického vzhledu nádorové tkáně na typy: serozní, mucinózní, endometrické, přechodné a nejrůznější smíšené nebo nediferencované histologické typy. Každý z výše uvedených histologických typů je spojen i s výrazně odlišnými morfologickými a molekulárními změnami (Bell 2005). Do vaječníku však mohou metastázovat i nádory s jiným tkáňovým původem a to nejčastěji nádory gastrointestinálního traktu, ale ve výsledku tvoří pouze malou část ze všech ovariálních malignit (De Waal 2009).

Riziko vzniku rakoviny vaječníku u žen se snižuje užíváním hormonální antikoncepce a to až o 40 % vůči ženám, které hormonální antikoncepci nikdy v životě neužívaly. Tento účinek je dán tím, že hormonální antikoncepce zabraňuje ovulaci. Díky tomu nedochází k pravidelnému narušování ovariálního epitelu. Užívání hormonální antikoncepce prokazatelně snižuje riziko i u žen, které nesou mutace v genech BRCA1 nebo BRCA2 (Partidge *et al.*, 1999).

Nižšímu riziku této malignity jsou vystaveny ženy, které úspěšně dokončily alespoň jedno těhotenství oproti ženám, které těhotné nikdy nebyly. Kromě toho se riziko úměrně snižuje s počtem dětí. Je to dané především sníženým počtem ovulací, které daná žena během života prodělá a také hormonálními změnami během těhotenství (Partidge *et al.*, 1999).

Pro přímou souvislost mezi rizikem vzniku této choroby a hladinou progesteronu napovídá i to, že ochranný účinek je vyšší u vícečetných porodů než u těhotenství s jedním plodem. Dalším faktorem snižujícím riziko této rakoviny je kojení. Udává se, že každý započatý měsíc kojení zmenšuje riziko vzniku této malignity zhruba o 1 % díky tomu, že během kojení u žen neprobíhá ovulace. Výrazné snížení rizika o 20-50 % a je spojeno i s chirurgickými zákroky jako např. hysterektomie či podvázání vejcovodů (Partidge *et al.*, 1999).

Naopak na zvýšení rizika onemocnění má vliv časný nástup první menstruace a pozdní příchod menopauzy. Což je provázáno větším počtem ovulací během života ženy a tím pádem i častějšími opravami ovariálních epitelů. Co se životního stylu týče, riziko vzniku rakoviny vaječníku zvyšuje obezita a s ní spojené narušení endokrinní rovnováhy. Dále ještě existuje určitá asociace mezi rizikem rakoviny vaječníku a kouřením cigaret, u alkoholu však neexistuje jednoznačný trend (Partidge *et al.*, 1999, Jordan *et al.*, 2003).

3.2 Diagnostika

K detekci této choroby se využívá nádorový marker CA-125 také známý jako mucin 16, což je marker typický pro epiteliální nádory vaječníku. Jeho zvýšená hladina se využívá pro detekci recidivy onemocnění, zjišťování výskytu metastáz či jako kontrola pro zjištění odpovědi na léčbu. Tato metoda detekce je však problematická především u mucinozních nádorů. Pro širší scríning však není CA-125 využíván (Goodell *et al.*, 2009, Zorn *et al.*, 2009).

V současnosti nejvyžívanější diagnostickou metodou pro zjištění rakoviny vaječníku je ultrazvuk, kde se jako vodítka pro odlišení nádoru od zdravé tkáně využívá odlišná vaskularita nádorů oproti zdravé tkáni. Screening je doporučován hlavně ženám s rodinným výskytem tohoto onemocnění nebo u přenašeček mutací v genech BRCA (Partidge *et al.*, 1999).

Klinické příznaky tohoto onemocnění souvisí hlavně s rozšířením metastáz mimo vaječníky. Pacientky si obvykle stěžují na břišní plnost, bolesti v oblasti pánve či pocity sytosti. Postižené ženy často podstoupí rozsáhlé vyšetření zažívacího traktu, než se skutečná příčina těchto nespecifických příznaků podaří odhalit. U malé části postižených se objeví nespecifické příznaky již ve stádiu, kdy je nemoc ještě omezena na oblast pánve, ale většina pacientek je v tomto stádiu asymptomatická (Cannistra 1993).

3.3 Léčba

Rakovina vaječníku se bez ohledu na tkáňový původ nádoru léčí chirurgicky v kombinaci s chemoterapií. Statisticky dokázal již Bertelsen *et al.*, 1990, že radikální chirurgický zákrok pozitivně ovlivňuje přežívání pacientů stejně jako v případě jiných nádorů. Procentuální pětileté přežívání po chirurgické redukci nádorové tkáně je příznivé pouze v raných stádiích této choroby a to zhruba u 93 % pacientek, naopak v pokročilých fázích se pětileté přežívání pohybuje pouze okolo 25 %. Bohužel se v časných etapách podaří zachytit jen minimum případů (Holschneider *et Berek* 2000).

Samotná chirurgická léčba může být dostačující pro zhoubné nádory, pokud jsou dobře diferencované a omezeny pouze na vaječník. Při chemoterapii raných fází této rakoviny se nasazuje chemoterapeutikum mephalan, což je alkylační činidlo, nebo léčiva na bázi platiny. U pacientů s pokročilým onemocněním je chirurgická redukce v kombinaci s chemoterapií standardní. V tomto případě je nejčastěji nasazován Paclitaxel (taxol), což je přírodní látka získaná z pacifického tisu (*Taxus brevifolia*). Podává se převážně v kombinaci s karboplatinou, která nahrazuje cisplatinu, pro její nižší toxicitu. Tato kombinace léčiv se stala standardem při terapii tohoto onemocnění. Léčba ve většině případů zahrnuje šest cyklů a trvá zhruba 3 týdny (Harries *et Gore* 2009).

Dále se při léčbě využívá i intraperitoneálně podávaný radioaktivní fosfor P32. Tato látka společně s cisplatinou a jejími analogy má množství nepříznivých vedlejších účinků a dokonce se po jejich užívání mohou vytvořit v těle pacientek sekundární nádory, zapříčiněné právě předchozí radioterapií nebo chemoterapií (Bokemeyer *et Schmoll* 1993, Harries *et Gore* 2009).

Přetrvávající nemoc po chirurgické léčbě či chemoterapii je provázena zvýšenou hladinou nádorového markru CA-125, která se nevrací k normálu ani po třech cyklech chemoterapie. Pakliže po prodělané chemoterapii následuje opětovné zvýšení hladiny CA-125, je to považováno za první příznak recidivy onemocnění. Zvýšená hladina CA-125 rovněž často předchází klinickému objevu nádoru např. vyšetřením na (CT). Pacientky, které prodělávají opakující se recidivy po počáteční chemoterapii, jsou obvykle velmi špatně léčitelné (Zorn *et al.*, 2009).

Nicméně opakované terapie jsou pro organizmus velice škodlivé a rozhodnutí o léčbě pacientek s přetrvávajícím nebo recidivujícím onemocněním je často založené buď na přítomnosti nepříjemných příznaků, nebo rozhodnutím pacientek podstoupit experimentální léčbu. Naopak pacientky, které relapsují po více jak šesti měsících od zahájení léčby mají poměrně velkou šanci na uzdravení v druhém kole chemoterapie. Tato skupina pacientek však vykazuje výrazně nižší přežívání (Cannistra 1993).

4. SIGNÁLNÍ DRÁHA (NF-κB)

Inducibilní transkripční faktory napomáhají buňkám pružně reagovat na vnější podněty díky ovlivnění genové exprese. Známy nukleární faktor NF-κB byl objeven Baeuerlem a Baltimorem v roce 1986 při výzkumu regulace transkripce genů lehkých imunoglobulinových řetězců B lymfocytů (Sen *et* Baltimore 1986).

Charakteristickým znakem signální dráhy NF-κB je její rychlá inducibilita, která buňkám umožňuje reagovat na stresové podněty pomocí aktivace exprese genů podílejících se na stimulaci přežívání buněk nebo ovlivňujících buněčnou adhezi, což mnohdy souvisí se vznikem nádorů. Hlavní fyziologickou úlohou signální dráhy NF-κB je však regulace zánětlivých procesů (Gilmore 2006, Baeuerle 1991).

Jaderný faktor NF-κB je v buňkách přítomen ve formě různých dimerů složených ze členů proteinové rodiny NF-κB, která se skládá z p65 (rel-A), rel-C, rel-B a proteinů p50 a p52, které vznikly štěpením prekurzorů p105 a p100 (Bharti *et* Aggarwal 2002).

Za své regulační vlastnosti NF-κB vděčí takzvaným REL-homologním doménám (RHD) zodpovědných za jejich vazbu na DNA, dimerizaci i schopnost jaderné translokace. Kromě toho proteiny p65, rel-C a rel-B obsahují tzv. transaktivační doménu (TDD), která je nutná k aktivaci určitých genů. Regulační funkce těchto proteinů striktně závisí na jejich lokalizaci v buňce (Bharti *et* Aggarwal 2002).

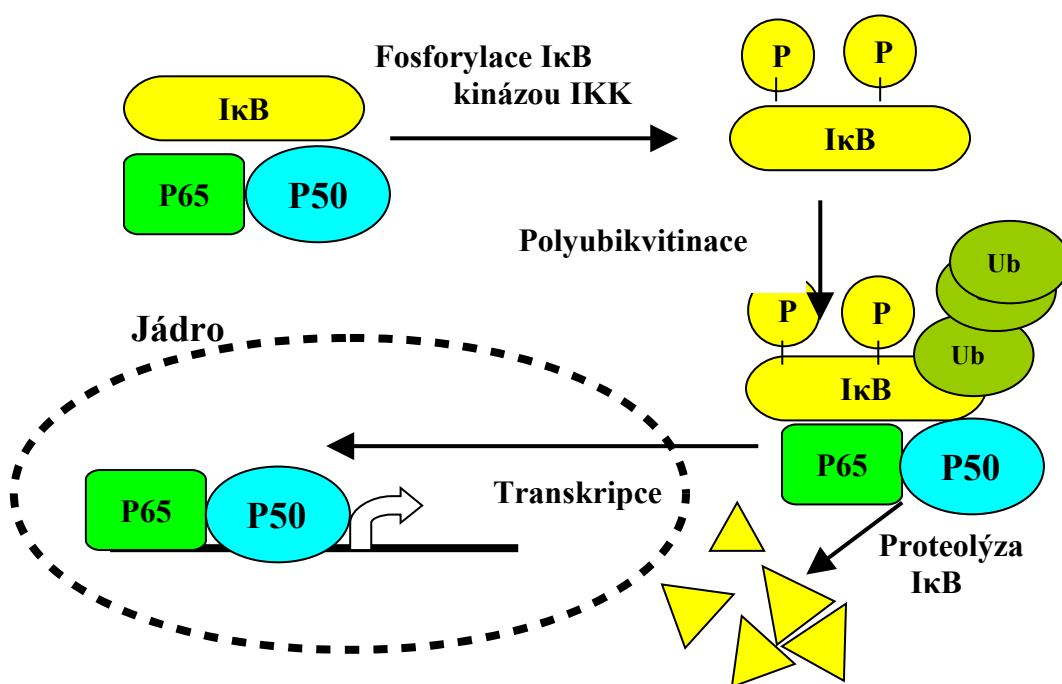
K NF-κB se váží inhibitory-κB (IκBα, IκBβ, IκBε a IκBγ), které svou vazbou zamezují aktivaci exprese cílových genů. Dále se k těmto bílkovinám také řadí protein Bcl-3 a prekurzorové proteiny p105 a p100. Rozpad komplexu NF-κB/IκB je zprostředkován tzv. (IKK) kinázami fosforylujícími inhibitory-κB, které jsou posléze ubiquitinovány a zničeny v proteazomu (Gilmore 2006, Shirane *et al.*, 1999). Pokud zabráníme jejich degradaci zabráníme tím i transkripci příslušných genů. (Gilmore 2006, Hideshima *et* Anderson 2002).

4.1 Aktivace:

Aktivace signální dráhy NF-κB je nejčastěji vyvolaná exogenními stimuly např. TNF-α, IL-1β nebo bakteriálním endotoxinem a může probíhat buď po kanonické, nebo nekanonické cestě (Ghosh *et* Karin 2002, Chandel *et al.*, 2000).

Při kanonické cestě aktivace brání inhibitory-κB svojí vazbou k heterodimeru (p65/p50) spuštění transkripce příslušných genů (Gilmore 2006, Ghosh *et* Karin 2002). Disociace komplexu (NF-κB/IκB) je aktivována prostřednictvím proteinového komplexu

IKK kináz fosforylujících inhibitory- κ B. Tento komplex o molekulové hmotnosti okolo 700 kDa. je tvořen ze dvou katalytických podjednotek IKK- α , IKK- β a regulační podjednotky zvané (NEMO) nebo také označované jako IKK- γ , jejíž fosforilace nadřazenými kinázami aktivuje IKK. (Hayden *et Ghosh* 2008, Bharti *et Aggarwal* 2002). Aktivace IKK kináz může být rovněž způsobena i ubikvitinací regulační podjednotky NEMO (Zhou *et al.*, 2004, Ea *et al.*, 2006).



Obr. 3- Schematické znázornění aktivace signální dráhy NF- κ B pomocí IKK-kinázy

Inhibitor- κ B fosforylovaný prostřednictvím IKK kinázy (obr. 3) je následně vázán komplexem ubikvitin ligazy přes protein β TrCP, který se váže na I κ B pouze v případě, že obsahuje fosforylované serinové zbytky. Dále se β TrCP váže na protein SKP1, který se podílí na akumulaci ubikvitin ligázových komplexů (E3), obsahující RING-doménový protein ROC1, který zapojuje ubikvitin ligázy (E2) do procesu polyubikvitinace fosforylovaného I κ B, díky čemuž je tento děj urychlen. Polyubikvitinované inhibitory I κ B sice zůstávají stále vázány na komplex NF- κ B, ale zároveň jsou selektivně degradovány v 26S proteazomu, což vede k zahájení exprese genů regulovaných tímto inducibilním

faktorem (Gilmore 2006, Hayden *et* Ghosh 2008). Tuto hypotézu nepřímo potvrzuje i absence IKK kinázového komplexu v jádře buněk (Ghosh *et* Karin 2002). Pokud ale zabráníme proteozomální degradaci inhibitorů- I κ B zablokujeme tím i aktivaci signální dráhy NF- κ B, protože za přítomnosti I κ B nemůže NF- κ B iniciovat zahájení genové exprese (Gilmore 2006, Hideshima *et* Anderson 2002).

Při nekanonické aktivaci NF- κ B, která probíhá například během vývoje B lymfocytů. Není aktivován obvyklý heterodimer proteinů (p65/p50), ale o komplexy obsahující proteiny p50, Bcl-3 a p52 (Hayden *et* Ghosh 2008). Po vazbě exogenního ligandu na receptor aktivovány takzvané NIK kinázy (NF- κ B inducing kinase), které fosforylací aktivují homodimer kinázových podjednotek IKK- α , který fosforyluje protein p100 na jeho c- konci. Tato fosforylace následně způsobí jeho polyubikvitinaci, která vede k rozštěpení proteinu p100 ve 26S proteazomu na samostatnou podjednotku p52, která je po vytvoření komplexu s rel-B translokována do jádra. Hlavní rozdíly spočívají v tom, že se nejedná o obvyklý heterodimer proteinů p65/ p50, ale o komplexy obsahující proteiny p50, p52 a Bcl-3 a že ke spuštění jaderné translokace těchto komplexů není nutná fosforylace a následná degradace inhibitoru- κ B (Bonizzi *et* Karin 2004, Qing *et al.*, 2005).

4 2 Role signální dráhy NF- κ B při nádorových onemocnění

První důkazy o zapojení signální dráhy NF- κ B při vzniku rakoviny přinesla práce s retroviry, které kódují vysoce onkogenní virový homolog proteinu rel-C způsobující nádory drůbeže. Zásadnější pro lidské malignity jsou geny kódující proteiny: rel-C, NF- κ B₂ (p100/p52) a Bcl-3. Tyto geny se nacházejí v oblastech genomu, které často podléhají chromozómovým přestavbám nebo bývají u nádorových buněk silně amplifikovány. Chromozomální translokace spojené se signální dráhou NF- κ B, byly původně nalezeny např. u Hodgkinovských lymfomů. Běžně se však vyskytují i u dalších rakovin. Známé jsou i mutace v genu pro I κ B α , které zapříčiňují konstitutivní aktivitu signální dráhy NF- κ B₂ u řady nádorových onemocnění (Bours *et al.*, 2000).

Další důkazy o zapojení signální dráhy NF- κ B do vzniku rakoviny souvisí s tím, že je aktivována celou řadou onkovirových proteinů, což je příklad proteinu Tax lidského viru HTLV-I, který aktivuje signální dráhu NF- κ B díky interakcím s IKK kinázami. Transkripčně aktivovat NF- κ B jsou schopné i další potenciálně onkogenní viry, jako například SV40 nebo EBV (Bours *et al.*, 2000) a dokonce bylo zjištěno, že tuto signální dráhu aktivuje dobře známá fúzní kináza BCR-ABL (Reuther *et al.*, 1998). Vztah mezi chronickými záněty a rakovinou byl znám z epidemiologických studií již dlouhou dobu před objevem NF- κ B, s čímž může souviset vznik rakoviny žaludku při chronické infekci bakterií (*Helicobacter pylori*), která tuto signální dráhu prokazatelně aktivuje již po krátké expozici (Karin 2006, Keates *et al.*, 1997).

Zvýšená aktivita této signální dráhy NF- κ B byla detekována u spinocelulárního karcinomu a u buněčných linií odvozených od rakoviny prsu. V tomto případě se však nejedná o obvyklý heterodimer proteinů p65/ p50, ale o komplexy obsahující proteiny p50, p52 a Bcl-3. Současně se však předpokládá, že jaderná akumulace Bcl-3 je nezávislá na inhibici I κ B (Baldwin 2001).

V případě nádorových buněk hraje aktivace NF- κ B roli především v ochraně těchto buněk před apoptózou vyvolanou např. TNF- α nebo působením ionizujícího záření či dalšími podněty (Bours *et al.*, 2000). Schopnost potlačit apoptózu je dána především spuštěním exprese proteinů TRAF1-2 či c-IAP1-2, které jsou schopny zastavit apoptózu pomocí inhibice efektorové kaspázy-8. Za pomoci této signální dráhy jsou transkripčně aktivovány další antiapoptické geny, jako je např. rodina genů Bcl (Bcl-2 A1/Bfl-1-xL, IEX-1, a XIAP). Signální dráha NF- κ B také reguluje expresi adhezivních molekul jako např. ICAM-1 a VCAM-1, které zajišťují adhezi především u plazmatických buněk. Jejich vysoké hladiny bývají pravidelně zjišťovány u pacientek s rakovinou vaječníku nebo prsu a jsou spojeny s progresí a metastazováním těchto onemocnění (Bhoj *et Chen* 2009, Xia *et al.*, 2001, Banks *et al.*, 1993). Rovněž jsou důkazy i o tom, že se NF- κ B účastní remodelace chromatinu, protože interaguje s histon deacetylázami (Ashburner *et al.*, 2001).

Rovněž bylo zjištěno, že i některá protinádorová léčiva jako např. taxol, doxorubicin, daunorubicin, etoposid, vincristin, anthralin, ciprofibrate, cisplatina nebo temoxifen mají schopnost aktivovat NF- κ B. Také γ -záření běžně užívané k léčbě pacientů s rakovinou rovněž aktivuje NF- κ B, proto aktivace této signální dráhy může vést k rezistenci vůči apoptóze, vyvolané chemoterapií nebo radiační léčbou. (Bharti *et Aggarwal* 2002, Nakanishi *et Toi* 2005). Simon *et al.*, (1994) dokonce zjistil, že NF- κ B je aktivována ultrafialovým zářením a to nezávisle na poškození DNA, což může napomáhat vzniku kožních nádorů.

Aktivovaná signální dráha NF- κ B potlačuje apoptický potenciál chemoterapeutik a tím přispívá k odolnosti nádorových buněk, vůči těmto látkám. Teoreticky lze látky potlačující tuto signální dráhu, jako např. inhibitory proteazomu, použít k překonání lékové rezistence u nádorových buněk (Nakanishi *et Toi* 2005). Zajímavé zjištění je, že navzdory původnímu předpokladu bortezomib vyvolává apoptózu nezávisle na inhibici NF- κ B proteazomální cestou. Díky tomu, že zabraňuje expresi inhibitorů I- κ B a zároveň aktivuje I- κ B kinázy (IKK β), které spouští fosforylaci I- κ B podporující disociaci těchto proteinů od NF- κ B (Hideshima *et al.*, 2009). Studiu NF- κ B se v současné době věnuje celá řada vědeckých týmů, díky čemuž je v databázi Pubmed přístupných více než 44 000 odborných článků na toto téma.

5. INHIBITORY PROTEAZOMU

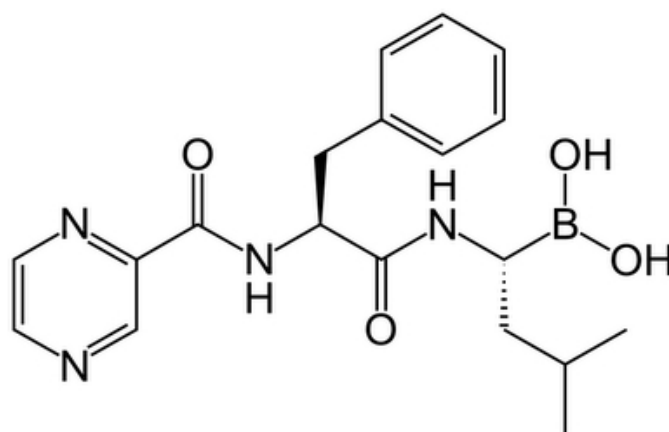
Hlavní sloučeniny inhibující proteazom můžeme rozdělit, dle jejich chemické povahy na pět základních skupin. Jedná se především o látky peptidické povahy konjugované s aldehydy, vinylsulfony, boráty nebo epoxyketony jako je např. epoxomycin a látky obsahující β -laktonový kruh jako lactacystin a jeho deriváty. Pro farmakologický výzkum je velice důležitá specifická působení, místo a mechanismus samotné reakce (Adams 2004a).

Netransformované buňky obvykle snesou vysoké koncentrace nahromaděných ubikvitinovaných proteinů. Naproti tomu nádorové buňky, které se rychle dělí, jsou díky inhibici proteazomu nuceny v mnohých případech spustit signální dráhy vedoucí k apoptóze nebo alespoň zastavit buněčný cyklus (Adams 2004ab, Adams 2003). Proteozomem zprostředkovaná signalizace je rovněž nezbytná pro rozvoj angiogeneze u solidních nádorů a tvorbu jejich metastáz. Protože na inhibici proteazomu jsou citlivé zejména rychle se dělící nádorové buňky jsou tyto látky schopné zastavit či zpomalit progresi různých nádorových onemocnění a to zejména inhibici signální dráhy NF- κ B, která podporuje růst a přežívání u řady malignit. Kromě toho, může narušení degradace proteinů zvrátit mechanismy získané rezistencí ke konvenčním chemoterapeutikům (Jung *et al.*, 2004, Adams 2004a).

Látky schopné inhibovat proteazom nám rovněž dávají možnost hlouběji porozumět fyziologickým procesům v buňkách, protože ubikvitin-proteazomový systém se podílí na většině důležitých buněčných dějů a po jeho ovlivnění můžeme dané změny studovat (Lee *et Goldberg* 1998). Zajímavým zjištěním je, že inhibitory proteazomu brání maturaci kapsidového proteinu Gag a tím i uvolňování hotových částic retrovirů HIV1 a HIV2 z buňky (Schubert *et al.*, 2000).

5.1 Bortezomib (VELCADE)

Bortezomib je první klinicky schválené léčivo na bázi inhibice proteazomu. Jeho příběh začíná v roce 1994 kdy byl syntetizován Julianem Adamsem. Následně byl identifikován jako velmi silný a specifický inhibitor proteazomu. Chemicky se jedná o dipeptid kyseliny alkyl-borité, který byl syntetizován především díky zjištění, že peptidické aldehydy jako MG132, které původně sloužily jako inhibitory buněčných proteáz, inhibují též proteazom (Adams *et al.*, 1998, Adams 2002). Jako inhibitory proteazomu jsou tyto látky velmi účinné, ale bohužel nespecifické, navíc nestabilní a špatně biologicky dostupné. Proto byla aldehydová skupina pokusně nahrazena za kyselinu alkyl-boritou (Adams *et al.*, 1998, Lee et Goldberg 1998).



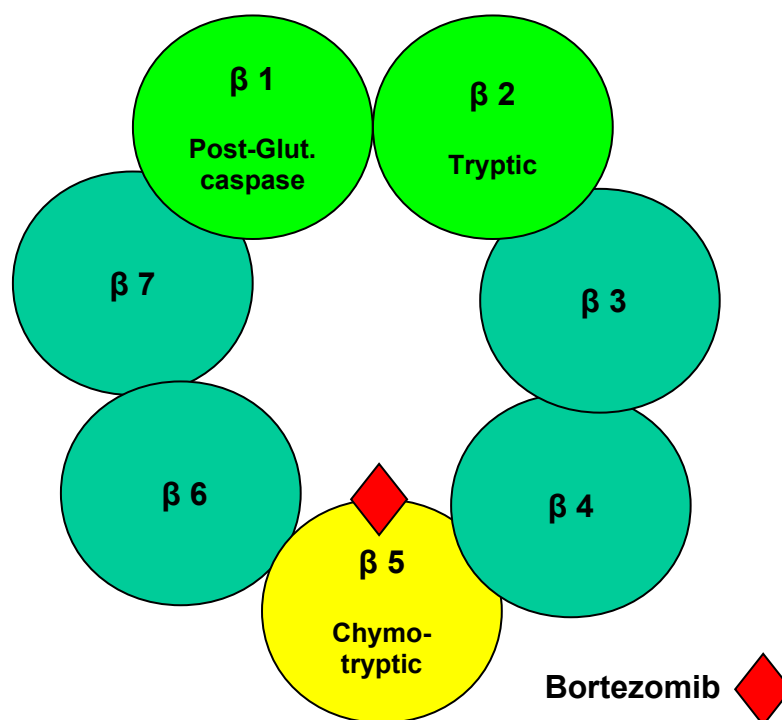
Obr. 4- Strukturní vzorec bortezomibu (Adams *et al.*, 1998)

Postupem času byl rovněž syntetizován dipeptid kyseliny alkyl-borité (Bortezomib), který byl identifikován jako velice silný inhibitor proteazomu (obr.4) Zajímavý byl díky své vyšší stabilitě a hlavně kvůli velmi malé afinitě k jiným molekulám (Adams *et al.*, 1998, Lee et Goldberg 1998). Bortezomib reverzibilně inhibuje proteazom svojí vazbou na β 5 podjednotu (obr. 5) částice 20S, která vykazuje chymotrypsinickou aktivitu (Chen *et al.*, 2011).

V roce 2003 byl bortezomib schválen americkou FDA (Food and Drug Administration) jako první inhibitor proteazomu pro klinické užití při léčbě mnohočetného myelomu. Bortezomib je rovněž známý pod označením PS-341 nebo klinickým názvem VELCADE® (Millennium Pharmaceuticals). Následně byl v dubnu roku 2004 schválen i evropskou (EMA) pro klinické užívání v členských zemích Evropské unie.

Nejčastěji se využívá při léčbě mnohočetného myelomu nebo lymfomu pláštěvých buněk (Adams *et Kauffman* 2004). Během prvních preklinických testů v National Cancer Institute bylo zjištěno, že bortezomib je selektivně toxický pro nádorové buňky. Rovněž i další testy *in vitro* ukázaly, že účinkuje v různých typech nádorů např. prsu, tlustého střeva, vaječníků, slinivky břišní, prostaty či spinocelulární karcinomy, dále i na lymfomy a již zmiňovaný mnohočetný myelom (Adams *et Kauffman* 2004, Adams 2004ab).

Následující studie provedená v NCI (National cancer institute) vedla ke zjištění, že v myších modelech, které zahrnují širokou škálu malignit, dokázal bortezomib snížit nádorovou masu a potvrdit tak svojí účinnost *in vivo*. Hlavní chorobou, která se léčí za pomoci bortezomibu však zůstává mnohočetný myelom (Jung *et al.*, 2004).



Obr. 5 - Schéma znázorňující proteolytickou aktivitu jednotlivých podjednotek 20S proteazomu a interakci bortezomibu s β5 podjednotkou (Adams 2003) .

Bezpečnost této látky se potvrdila i v rámci preklinických studií, které byly prováděny na gravidních samicích králíků a potkanů v době probíhající organogeneze plodu. Tím bylo dokázáno, že bortezomib není teratogenní, ale na vývoj plodu má nepříznivý vliv. Akutní neurotoxicita a nefrotoxicita byla změřena na opicích, myších a potkanech. Poté následovala první fáze klinických testů, při které se testovala spíše jeho bezpečnost. Proběhla na 123 pacientech s různými druhy nádorového onemocnění (Bross *et al.*, 2004).

Slibných léčebných výsledků bortezomibu bylo dosaženo již během prvního kola druhé fáze klinických testů, kdy bylo hodnoceno 193 pacientů s relapsujícím nebo refrakterním mnohočetným myelomem, kteří podstoupili předchozí bezúspěšnou terapii. Na bortezomib reagovalo 35 % pacientů. Za největší úspěch se dá považovat kompletní odpověď a to u 4 % pacientů. Střední doba progresse onemocnění se rovněž zvýšila na sedm měsíců ve srovnání se třemi měsíci po předchozí chemoterapii (Richardson *et al.*, 2003). Mnohočetný myelom je onemocnění způsobené šířením maligních klonů plazmatických buněk a přes veškerý pokrok v onkologii je tato choroba stále smrtelná pro většinu postižených pacientů a v celkovém součtu představuje zhruba 10 % všech hematologických malignit (Li *et al.*, 2007). Před objevením bortezomibu se tato nemoc léčila ne příliš úspěšně melfalanem, což je alkylační cytostatikum (Alexanian *et Dimopoulos* 1994). Dále byla testována závislost odpovědi na podané dávce a bylo doloženo, že statisticky lepší odpovědi na léčbu vykazovali pacienti, kterým byl injekčně podáván bortezomib v dávce 1,3 mg na m² oproti skupině pacientů s podávanou dávkou pouze 1 mg na m² (Bross *et al.*, 2004). Díky zrychlenému schvalovacímu procesu v americké FDA nemusel bortezomid podstoupit celou proceduru klinických testů (Bross *et al.*, 2004).

Z farmakologického hlediska je injekčně podaný bortezomib v terapeutických koncentracích z 83 % vázán na plazmatické proteiny. V organismu je následně oxidačně metabolizován prostřednictvím cytochromu P-450. Jeho průměrný eliminační half-life je v rozmezí 9 -15 h v dávkách 1,45 až 2,00 mg/m² (Bross *et al.*, 2004).

Dobré výsledky přinesl borteomib i v léčbě non-Hodgkinovských lymfomů. U solidních tumorů byla pozorována odpověď pouze u pacienta s karcinomem plic a v této souvislosti bylo navrženo užívání borteomibu v kombinaci s jinými léčivými (Adams 2003, Adams 2004a). Bohužel i u pacientek s ovariálními malignitami nedošlo k významné odpovědi na léčbu touto látkou i přes skutečnost, že byl inhibován proteazom v nádorových buňkách (Aghajanian *et al.*, 2009).

Během třetí fáze klinických testů, která přinesla důkazy o bezpečnosti a účinnosti této látky bylo rovněž navrženo užívání borteomibu s jinými léčivými může překonat odpor rakovinných buněk k chemoterapii a přitom nezvýšit celkovou toxicitu podávaných léčiv (Chen *et al.*, 2011, Awada *et al.*, 2008).

Pacienti mnohdy při užívání kombinované terapie vykazují lepší odpověď na léčbu, než při podávání pouze jedné účinné látky. Rovněž v předběžných studiích u řady solidních nádorů bylo prokázáno doplňkové protinádorové působení borteomibu v kombinaci se standardní chemoterapií. Účinnost kombinace borteomibu s docetaxelem byla prokázána při léčbě pokročilého a metastatického karcinomu prsu. Tato kombinace je dobře zvládnutá co se týče vedlejších účinků jednotlivých látek a pacienti navíc vykazují minimálně stejné nebo i lepší odpovědi na léčbu ve srovnání s monoterapií (Awada *et al.*, 2008). Terapie založená na těchto dvou látkách rovněž snižovala nádorovou masu v xenotransplantátech rakoviny pankreatu (Nawrocki *et al.*, 2004). Rovněž cisplatina v kombinaci z borteomibem dosahuje lepších výsledků a v klinické praxi může být přistoupeno na snížení léčebné dávky podávané pacientům (Wagenblast *et al.*, 2008). Nadějná se ukázala i kombinace borteomibu s melfalanem, která představuje naději pro pacienty trpící mnohočetným myelomem (Berenson *et al.*, 2006). V této kombinaci se zvyšuje odpověď na léčbu a rovněž se prodlužuje progresse onemocnění (San Miguel *et al.*, 2008). Tuto kombinaci pro léčbu mnohočetného relapsujícího myelomu doporučil i Popat *et al.*, (2009) na základě zjištění, že je pro pacienty bezpečná a vysoce účinná.

Navíc jsou proteozomální inhibitory schopny snížit úroveň tzv. multidrug resistance (MDR) ovlivněním hladiny P glykoproteinu, který tento typ lékové rezistence zprostředkovává a zvýšit tak cytotoxický efekt běžných chemoterapeutik jako doxorubicinu a paclitaxelu (Fujita *et al.*, 2005). Bortezomib a jeho analogy rovněž mají velký antimalarický potenciál, protože působí i proti rezistentním malarickým kmenům (Reynolds *et al.*, 2007).

Dle Hideshima *et al.*, (2003) bortezomib rovněž zesiluje expresi proteinu p53 a MDM2, zároveň vede i k fosforylaci proteinu p53 na místě serinu 15, která vede k jeho disociaci z komplexu p53/MDM2 a tím ho aktivuje. Tato látka rovněž reguluje signální dráhu transkripčního faktoru NF- κ B i důležité proteiny buněčného cyklu jako např. p27 kip1, p21 waf1/ cip1 či cykliny (Jung *et al.*, 2004).

Dále i proteiny spojované s apoptózou jako např. (Bcl, cIAP, XIAP, Bax). Narušuje i jiné buněčné mechanismy či signální dráhy jako například p44/42 MAPK dráhu, činnost topoizomerázy II- α nebo přepis genů podílejících se na opravách poškozené DNA. Velikou výhodou tohoto léčiva je i to, že neinteraguje s proteiny způsobujícími mnohočetnou lékovou rezistenci, která se většinou vyvine po neúspěšné předchozí léčbě (Jung *et al.*, 2004).

Inhibitory proteazomu jsou rovněž schopny aktivovat apoptické kaspázy navzdory jejich inhibici antiapoptotickými proteiny a to vše nezávisle na p53. Bylo prokázáno, že bortezomib v závislosti na dávce a čase potlačuje expresi HLA I antigenů na povrchu buněk mnohočetného myelomu. Což vede k jejich zvýšené lýzi za účasti NK buněk imunitního systému (Shi *et al.*, 2008).

Během léčby pacientů s mnohočetným myelomem se ukázalo, že se vyvíjí vůči bortezomibu získaná rezistence a to u většiny pacientů léčených monoterapií a tím se značně komplikuje jejich další léčba. Rezistence je nejčastěji způsobená overexpresí β 5-podjednotky (PSMB5) proteazomu nebo bodovou mutací ve vazebné doméně této struktury. Tato rezistence je unikátní, nemá žádnou souvislost s mnohočetnou lékovou rezistencí (Oerlemans *et al.*, 2008, Lü *et al.*, 2008).

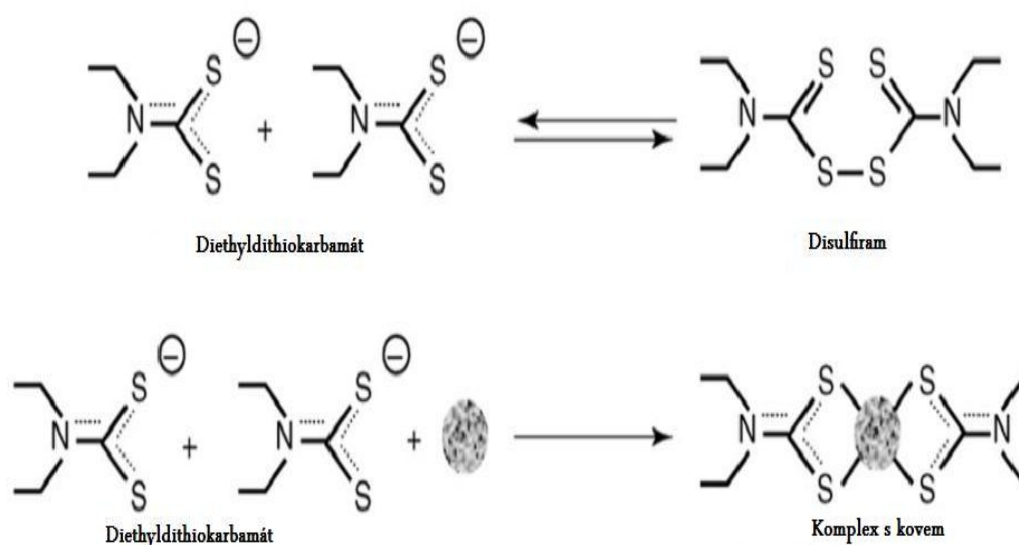
Jako nežádoucí účinky vyskytující se při léčbě bortezomibem se udává nejčastěji celková slabost u 30 % pacientů zařazených do klinických studií, dále byly pozorovány nevolnost, snížená chuť k jídlu, zácpa, průjem, trombocytopenie, periferní neuropatie, horečka, zvracení a anémie. Vedlejší účinky je možné dobře eliminovat snížením podávané dávky nebo úplným vysazením léčby (Adams 2004a).

5.2 Disulfiram

Je sloučenina známější spíše pod názvem antabus. Poprvé byl syntetizován v roce 1881 a pro medicínské vědy objeven až kolem roku 1930 (Eneanya *et al.*, 1981) a to díky svým vedlejším účinkům, které způsobil u dělníku v chemické továrně, kde se používal jako antioxidant při výrobě gumy. Intoxikace touto látkou se výhradně projevovala až po požití alkoholu. Zhruba o 10 let později testovali disulfiram Dánové Hald a Jacobsen jako tzv. vermucidní látku určenou k hubení parazitických červů. Pro jeho schopnost vyvazovat měď z hemolimy nižších organismů a tím jim znemožnit dýchání (Suh JJ *et al.*, 2006). Disulfiram je rovněž velice účinný i proti anaerobním prvokům bičenkám (*Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas foetus*) a to dokonce proti kmenům, které jsou rezistentní vůči metrodiazolu jež se běžně používá v terapii těchto parazitóz. Bohužel o molekulární podstatě tohoto působení disulfiramu se autoři již nezmiňují (Bouma *et al.*, 1998).

Velice brzo po svém objevu se začal antabus využívat při léčbě alkoholiků. Protože po požití byť jen nepatrného množství alkoholu vyvolává intenzivní nepříjemné pocity jako např. nechutenství, závratě, zvracení a rychlé bušení srdce (Suh JJ *et al.*, 2006). Tyto nepříjemné vlastnosti jsou způsobené hromaděním acetaldehydu po inhibici jaterního enzymu aldehyd dehydrogenázy (ALDH), který v metabolismu alkoholu přeměňuje acetaldehyd na acetát (Cvek *et Dvořák* 2007). Je rovněž možné, že vysoká úspěšnost disulfiramu při léčbě chronických alkoholiků částečně souvisí i s dříve neznámými účinky jeho působení na tzv. glutamátové receptory (Nagendra *et al.*, 1997). Dokonce bylo zjištěno, že antabus u narkomanů závislých na kokainu snižuje jeho spotřebu. Tato skutečnost zřejmě primárně nesouvisí s metabolismem alkoholu, ale bude spíše dána inhibicí enzymu dopamin β -hydroxylázy (Gaval-Cruz *et Weinshenker* 2009).

Disulfiram může volně v organismu vytvářet redukovanou formu dithiokarbamát nebo tvořit dithiokarbamátové komplexy s kovy (obr.5), které jsou schopné selektivně zabíjet nádorové buňky (Cvek *et Dvorak* 2008). Tyto komplexy mohou volně difundovat do tkání a dokonce jsou schopny překonat i hematoencefalickou bariéru, která tvoří bariéru mezi krví a mozkomíšním mokem (Suzuki *et al.*, 1997).



Obr.6- Reverzibilní oxidace disulfiramu na diethyldithiokarbamat a tvorba komplexů s kovy (Cvek *et Dvořák*, 2008)

Úplně první zpráva o klinickém protinádorovém působení disulfiramu byla publikována již Lewisonem (1977). V této studii byl disulfiram dlouhodobě podáván pacientce s metastázemi rakoviny prsu v žebrech, pánvi a páteři. Dotyčná pacientka byla předtím léčena konvenční chemoterapií a to do doby, než se stala silně závislá na alkoholu a léčba musela být přerušena. Po nasazení antabusu vymizely metastáze a její onemocnění se dostalo do stavu úplné klinické remise.

Recentně bylo také zjištěno, že dithiokarbamátové komplexy $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ a $\text{Zn}(\text{EtDTC})_2$ samovolně vznikají v organismu po podání disulfiramu jsou selektivně toxické pro buňky melanomu. Zinečnatý komplex rovněž napomohl ke klinické remisi onemocnění u pacientky v pokročilém stadiu metastázujícího melanomu v játrech, kdy po neúspěšné předchozí chemoterapii byla experimentálně použita léčba zahrnující podávání disulfiramu a glukonátu zinečnatého (Cen *et al.*, 2004a). Velice zajímavé je i zjištění, že u buněk melanomu vyvolalo ošetření dithiokarbamátem zvýšení intracelulární koncentraci mědi, což vedlo i k výší cyto-toxické dithiokarbamátu (Cen *et al.*, 2004b).

Potencionální selektivitu působení disulfiranu proti transformovaným buňkám naznačují i četná srovnání cyto-toxicit pro nádorové linie a netransformované buňky. Zatím byla publikována data např. pro melanocyty vs. buněčné linie odvozené od melanomu a pro chronickou myeloidní leukémií oproti mononukleárním buňkám lidské periferní krve a dále na celé řadě buněčných linií pocházejících přímo od pacientů. Disulfiram je účinnější proti hematologickým malignitám než proti solidním nádorům. In vitro je velmi účinný i proti rakovinám prsu a vaječníku (Wickström *et al.*, 2007). K obdobným závěrům dospěl i Chen *et al.*, (2006) u rakoviny prsu.

Dále disulfiram také snižuje hladinu cyklinu A, který je nezbytný při progresi buněčného cyklu v přechodu z G2 do M fáze (Brar *et al.*, 2004). Byla rovněž prokázána schopnost inhibovat angiogenezi a to nejen u kuřecích embryí. Antabus je schopen potlačit i tvorbu nových metastáz pomocí inhibice nádorových metalo-proteaz štěpících kolagen (Shiah *et al.*, 2003). Role v indukci apoptózy je disulfiramu připisována i na základě schopnosti narušení redoxního potenciálu na membráně mitochondrií (Cen *et al.*, 2002). Zabraňuje hydrolýze ATP v aktivních místech transportních proteinů MRP1 a MDR1 a tak brání jimi zprostředkované lékové rezistenci (Sauna *et al.*, 2007).

V terapii onkologických onemocnění může být disulfiram nápomocný i díky své schopnosti blokovat maturaci P-glykoproteinu, který slouží jako membránová pumpa zprostředkovávající rezistenci vůči většině konvenčních chemoterapeutik, protože je vytlačuje z buňky (Loo *et al.*, 2000). Proto je kombinace disulfiramu např. z cisplatinou in vitro účinnější než monoterapie. Bohužel u proběhnuvších klinických testů této kombinace nebylo protinádorové působení mezi kontrolními skupinami pacientů statisticky signifikantní (Kona *et al.*, 2011).

Bylo zjištěno, že do apoptózy vyvolané kombinací disulfiramu a CuCl_2 je zapojena mitochondrialní apoptická dráha reprezentovaná změnou poměru ve prospěch Bcl-2 oproti proteinu Bax. Disulfiram je rovněž schopný tvořit reaktivní kyslíkové radikály (ROS), které indukují apoptózu v níž jsou zapojené pro-apoptotické signální dráhy MAPK (JNKs) a protein p38. Apoptóza vyvolaná reaktivními kyslíkovými radikály bývá potlačována signální dráhou NF- κ B (Yip *et al.*, 2011). Je také schopný zvrátit mnohočetnou rezistenci u patogenních kvasinek (*Candida Albicans*), díky reakcí s vazebnými místy transportních proteinů pro ATP tak i místy pro jejich substrát (Shukla *et al.*, 2004).

Proběhnuvší klinické testy na 64 pacientech v USA rovněž dokázaly, že podávání dithiokarbamatu pozitivně ovlivnilo přežívání u žen s vrozeným rizikem vzniků rakoviny prsu. Po šesti letech žilo ve skupině, beroucí dithiokarbamát 81 %, sledovaných žen oproti kontrolní skupině žen beroucích pouze placebo, kde přežilo pouze 55 % pacientek. Autoři této studie se však mylně domnívali, že tato látka stimuluje imunitní systém (Dufour *et al.*, 1993).

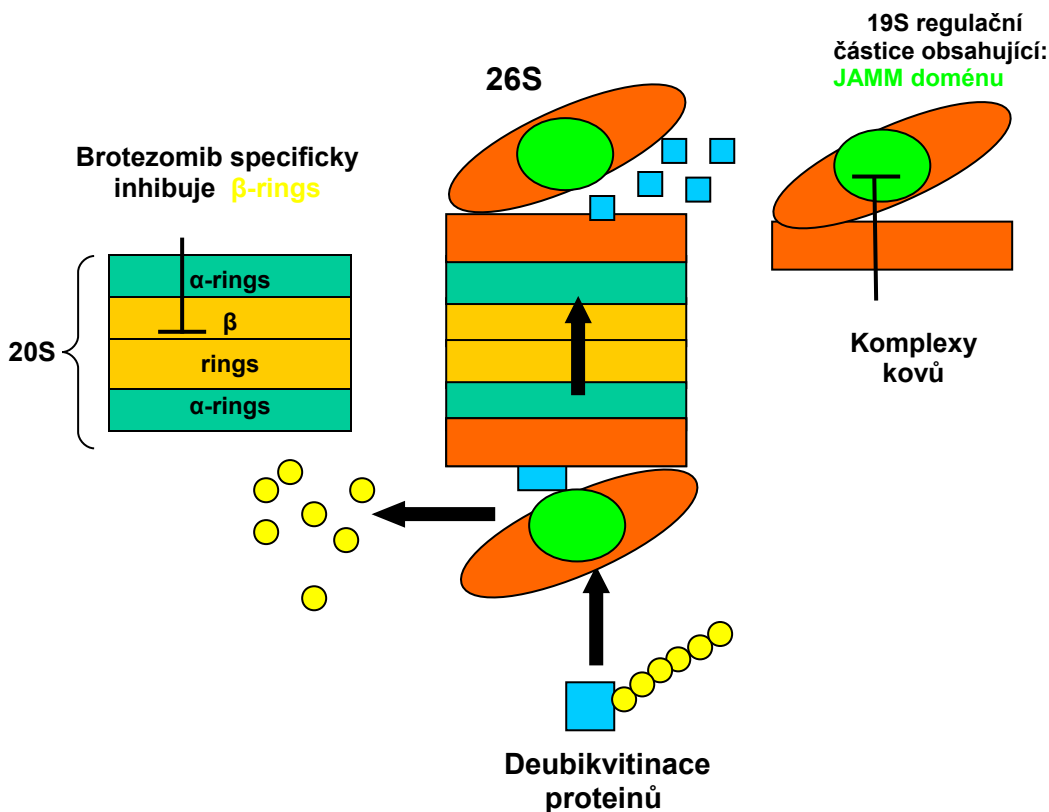
Rovněž by se dalo uvažovat o využití disulfiramu jako vedlejší terapie pokud bychom vyloučili riziko, že disulfiram bude kolidovat s hlavní terapií. Dnes v USA probíhají klinické studie antabusu jako adjuvantní terapie u rakoviny plic a dokonce jako monoterapie proti rakovinám metastazujícím do jater (Cvek 2011b).

Oproti jiným chemoterapeutikům se na něj jako na tzv. generikum nevztahuje patentová ochrana, protože je již schválený ke klinickému užívání a nemusel by procházet sérií klinických testů (Cvek 2010, Cvek 2011a).

Hlavní podstatou protinádorového působení disulfiramu však je inhibice proteazomu.

Přesný mechanismus této inhibice proteazomu dithiokarbamáty není zatím znám.

Za jeden z možných cílů působení disulfiramu pokládá Cvek *et al.*, (2008) tzv. JAMM domény, jsou nezbytnou funkční součástí proteazomu. Tento motiv, přesněji (JAB1/MPN/34metalloenzyme), obsahují různé proteiny všech říší organismů. U eukariot jsou tyto domény zodpovědné za selektivní hydrolýzu izo-peptidických vazeb ubikvitinu a ubikvitin-like proteinů. Izo-peptidázová aktivita proteinů s JAMM doménami hraje hlavní roli v klíčových bodech regulace v UPS zejména ve víku subcomplexu 19S proteazomu (Ambroggio *et al.*, 2004, Zhu *et al.*, 2007) .



Obr. 7- Schématické znázornění inhibice proteazomu bortezomibem a návrh mechanismu inhibice proteazomu pomocí dithiokarbamátových komplexů s kovy prostřednictvím JAMM domény (Cvek *et al.*, 2008).

Důležité je i zjištění, že JAMM doména je rozhodující pro deubikvitinaci proteinů *in vivo*, protože proteazomy nesoucí mutovaný JAMM motiv ztrácí svoji funkci (Ambroggio *et al.*, 2004, Zhu *et al.*, 2007). Pro funkci proteazomu je nezbytný deubikvitinační enzym Poh1 obsahující JAMM motiv, protože pro vstup proteinů do jádra proteozomální částice 20S je nutné, aby tento substrát byl deubikvitinovaný (Gallery *et al.*, 2007).

Disulfiram je aktivní i proti RING-finger ubikvitin E3 ligázám, které katalyzují specifické připojení ubikvitinu na cílový protein a jejichž inhibice může mít za následek např. stabilizaci proteinu P53. Díky tomu mohou tyto enzymy hrát významnou úlohu v rozvoji nádorových onemocnění (Kona *et al.*, 2004). To je částečně v rozporu s představou nespecifické proteozomální inhibice a s ní spojeného rozvratu signálních drah.

5.3. Další látky inhibující proteazom

Protože někteří pacienti na léčbu bortezomibem vůbec nereagují nebo se u nich vyvine sekundární rezistence, přistoupilo se k hledání nových látek s obdobným účinkem. Kromě bortezomibu byla známa celá řada dalších sloučenin se schopností inhibovat proteazom. Jedná se o látky buď přírodní, nebo syntetické.

Ze syntetických látek bych zmínil např. BU-32, což je diborátový analog bortezomibu vykazující v preklinických testech dobré výsledky, především proti rakovině prsu (Agyin *et al.*, 2009). Nebo CEP-18770 (obr. 8) známý i pod názvem (Cephalon) vykazuje s bortezomidem srovnatelnou účinnost a dokonce může být podáván perorálně. Chemicky se rovněž jedná o threoninový derivát kyseliny alkylborité. Vykazuje dobré účinky v myších modelech pro lidské solidní nádory a nyní se nachází již v první fázi klinických testů (Kuhn *et al.*, 2007, Piva *et al.*, 2008).

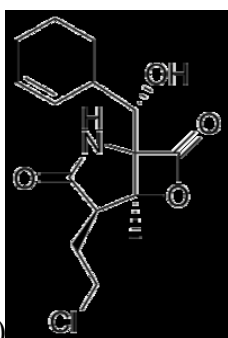
Další syntetickou sloučeninou je Carfilzomib (obr. 8), což je látka chemicky příbuzná s epoxomicinem. Vykazuje vysokou specifickou inhibici chymotrypsinové aktivity proteazomu *in vitro* a je schopný překonat rezistenci vůči bortezomibu. Díky této vlastnosti může být Carfilzomib nadějí pro pacienty, u nichž se vyvine výše zmíněná sekundární rezistence vůči bortezomibu nebo pro pacienty, kteří vůbec na léčbu nereagují (Kuhn *et al.*, 2007).

Molekuly dalších dvou zmiňovaných látek mají velmi atypickou strukturu, protože jsou tvořeny bicyklickými laktonovými kruhy. Prvním zástupcem je přírodní látka Salinosporamid A známý pod názvem (NPI-0052) nebo Marizomib (obr. 8). Tato látka byla izolována z mořské bakterie (*Salinispora tropica*) a nyní se nachází v první fázi klinických testů, protože se jedná se o silný inhibitor proteazomu s možným terapeutickým využitím proti celé řadě nádorů. Klinické testy této látky probíhají proti mnohočetnému myelomu a lymfomům u pacientů, kteří prodělali neúspěšnou léčbu bortezomibem.

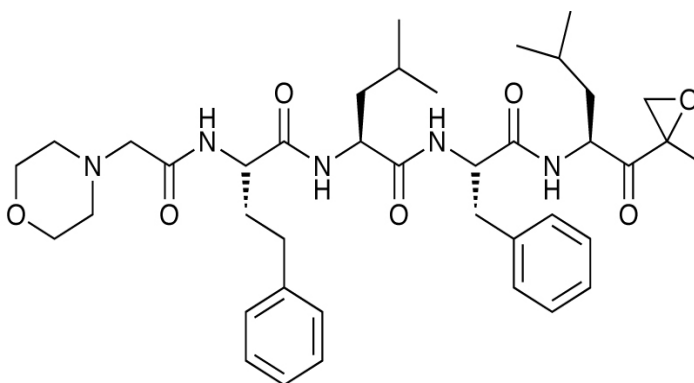
Rovněž není znám přesný mechanismus působení této látky v buňce, ale vzhledem ke schopnosti inhibovat proteazom se předpokládá, že podobně jako bortezomib brání aktivaci signální dráhy NF- κ B (Ahn *et al.*, 2008).

Mezi mikrobiální metabolity patří i lactacystin, což je metabolický produkt bakterií rodu (*Streptomyces*). Na unikátní vlastnosti této látky se přišlo díky tomu, že potlačuje buněčnou proliferaci. Následně byl zjištěn i mechanismus jeho působení. Poté se lactacystin stal široce používanou látkou při funkčních studiích proteazomu založených na jeho inhibici. Byl rovněž prvním objeveným a velmi specifickým proteozomálním inhibítorem (Fenteany *et*, Schreiber 1998).

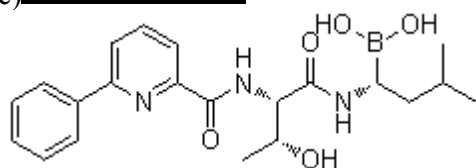
a)



b)



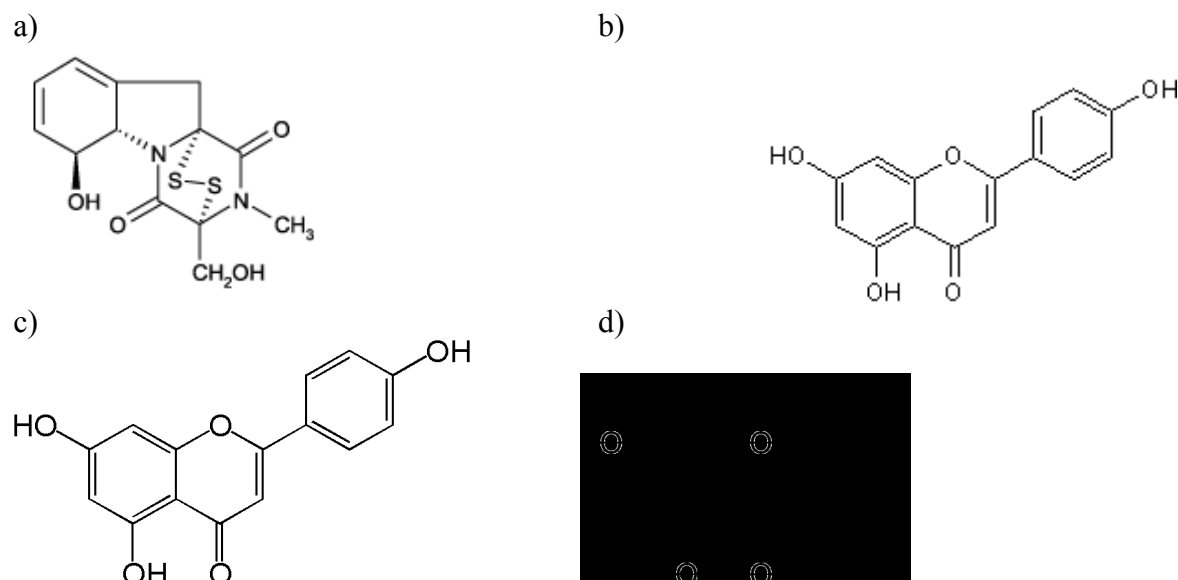
c)



obr.8- Strukturní vzorce klinicky testovaných proteozomálních inhibitorů: a) Salinosporamid A, b) Carfilzomib, c) CEP-18770 (Potts *et al.*, 2011)

Zajímavé bylo také zjištění, že zelený čaj obsahuje deriváty cathechin-3-gallátu jejichž syntetické analogy silně inhibují proteazom a vykazují protinádorovou aktivitu *in vitro*. Tyto účinky však nejsou zřejmě dány pouze inhibicí proteazomů. Zelený čaj vykazoval i v epidemiologických studiích preventivní účinky vůči maligním onemocněním. Stejných závěrů bylo dosaženo i na zvířecích modelech, protože obsahové látky zeleného čaje zabraňovaly rozvoji celé řady rakovin jako např. kůže, plic, jater, žaludku, prsu či tlustého střeva (Dou *et al.*, 2008).

Další skupinou polyfenolických látek, které jsou toxické pro nádorové buňky a u nichž byl prokázán vliv na proteazom jsou některé rostlinné flavonoidy např. luteolin, apigenin nebo chrysin (obr 9). O protektivních účincích flavonoidů bylo napsáno již mnohé a to zejména o jejich antioxidační aktivitě (Dou *et al.*, 2008). Schopnost inhibovat proteazom může být podstatou jejich protektivních účinků, které byly prokázány v epidemiologických studiích týkajících se vztahu vzniku rakoviny a konzumace ovoce a zeleniny (Chen *et al.*, 2005, Chen *et al.*, 2007). Další látkou, která má inhibiční účinky vůči proteazomu je plísňový metabolit gliotoxin (obr. 9), který inhibuje chymotrypsinovou aktivitu 20S proteazomu vazbou na non-katalytické místo, zatímco všechny výše zmiňované látky se vážou do katalytických míst (Kisselev *et*, Goldberg 2001).



Obr.9- Strukturní vzorce dalších přírodních proteozomálních inhibitorů : a) gliotoxin dle Kisseleva *et*, Goldberga (2001) b) luteolin, c) apigenin, d) chrysin dle Dou *et al.*, (2008)

6 CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo stanovit cytotoxicity dithiokarbamátových komplexů s mědí a zinkem, určit jejich účinek na signální dráhu NF- κ B a proteazom u buněčných linií A2780 a A2780cis odvozených od rakoviny vaječníku.

7 MATERIÁL

7.1 Použité nádorové linie

Pro experimenty byly užity linie odvozené od rakoviny vaječníku epiteliálního původu. Konkrétně se jednalo o adherentní linii A2780 a A2780CIS s navozenou rezistencí vůči cis-platině.

7.2 Chemikálie

Bortezomib, Millenium Pharmaceuticals

Komplexy diethyldithiokarbamátu $Zn(EtDTC)_2$ a $Cu(EtDTC)_2$, Mgr. Boris Cvek Ph.D.

Trypanová modř, T6146-256, Sigma-Aldrich

Medium RPMI 1640, penicilin/streptomycin a 10% fetální bovinní sérum, Sigma-Aldrich

Bradfordovo činidlo, B6916 500ML, Sigma-Aldrich

40% bis Akrylamid, Lot: 080703, Bio BASIC INC.

Running pufr (1,5 Tris-HCl, pH = 8,8)

Cis-platina 479306-1G Sigma-Aldrich

10% APS, A3426, Sigma-Aldrich

TEMED, Bio BASIC INC., TB0508

Stacking pufr (0,5 Tris-HCl, pH = 6,8)

izopropanol, 20037-ATO, Lach Ner

PVDF membrána, IPVH00010, Millipore

100 metanol, 30637, Lach Ner

Diethyldithiokarbamátsodný trihydrát, 22,868-0 Sigma-Aldrich

Ponseau-S, P3504, Sigma-Aldrich

Triton-X 100,37240, Serva

L-glutamin G63921-VL Sigma-Aldrich

Penicilin streptomycin (100x) P11-010 PAA

5% mléko, Laktino, odtučněné 1,3% tuku/hm, PROMIL

$ZnCl_2$, 96468-50G Sigma-Aldrich

$CuCl_2$, 307483-100G Sigma-Aldrich

Velikostní marker, Page Ruler Prest.Prot., Fermentas

Substrát pro křenovou peroxidázu, Santa Cruz

SDS (Sodium dodecil sulfát) L3771-100G Sigma-Aldrich

7.2.1 Protilátky

Anti-ubiquitin Lys 48- specific, clone Apu 2 Rabbit monoclonal Lot#L1409: NG 16389901

Actin (I-19) Lot#K1408 goat polyclonal IgG

NF- κ B P65 (A)sc-109 Lot# A2610 Rabbit polyclonal IgG

goat anti-rabbit IgG-HRP Lot#L1409

rabbit-anti-goat IgG-HRP Lot#F2910

7.3 Použitá média a roztoky

PBS 10x (pH7,4) NaCl 40g, KCl 1g, Na₂HPO₄ x12 H₂O 16,05g, KH₂PO₄ 0,1g

PBS 1x (pH7,4) NaCl 4g, KCl 0,1g, Na₂HPO₄ x12 H₂O 1,605g, KH₂PO₄ 0,01g

Extrakční pufr A 10x (100 mM HEPES (Ph 7,9), 100 mM KCl, 15 mM NaCl, 5 mM DTT, (w/v) 1% NP-40

Extrakční pufr B 1x 20 mM HEPES, 0,42 M NaCl, 0,2 mM EDTA, 1,5mM MgCl₂, 5mM LSB: 0,5 mM Tris (pH 6,8), 100 mM DTT, 2% SDS (w/v), 0,1% bromphenolová modř (w/v), 10% glycerol

MTT roztok: 3 mg MTT/ml PBS

MTT rozpouštěcí roztok: DMSO/ 1% NH₃

Tris-glycine-SDS, pufr pro SDS-PAGE 1,92 mM Tris, 200 mM glycine, 0,1% (w/v)

SDS 10%, BIO BASIC INC.

Blotovací pufr : 50 mM Tris ,40 mM glycine, 0,037% SDS (w/v), 20% methanol, BIO BASIC INC.

Laemmliho pufr: 2,5 ml 4x stacking pufr, 4 ml 10% SDS, 2 ml glycerol, 2mg bromphenolová modř. , BIO BASIC INC.

Barvicí roztok s Ponceau S: 0,2% Ponceau S (w/v), 3% TCA, 3% 5-sulfosalicylová kys.

Pro přípravu roztoků byla použita deionizovaná voda přístrojem (Aqua osmotic).

Stacking pufr (0,5 Tris-HCl, pH = 6,8)

Running pufr (1,5 Tris-HCl, pH = 8,8)

10% SDS, L3771 Sigma-Aldrich

10% APS, A3426, Sigma-Aldrich

Dezinfekce Izorapid, Oro clean chemie

TBS 1x BIO BASIC INC.

Kultivační médium: RPMI 1640 + 10% FBS L-glutamin a 1% (Penicilin /Streptomycin)

TBS 1x/Tween: TBS 1x+ 0.05% Tween-20 (500 μ l / 1L)

Zmrazovací médium: FBS /DMSO (9:1)

Zásobní roztok bortezomibu 3,5 mM/l (w/v) DMSO

Zásobní roztoky Cu(EtDTC)₂ a Zn(EtDTC)₂ v DMSO (20 mM/l). Z důvodu nízké stability byly roztoky komplexů připravovány vždy před jednotlivými experimenty z důvodu jejich nízké stability.

7.4 Přístrojové vybavení laboratoře

Autokláv PS20A Chirana, Česká republika

Box skříňový mrazicí (-80) SAN Sanyo, Japonsko

Třepačka Reax top Heidolph

Centrifuga spectrafuge 5415R eppendorf, USA

Centrifuga Mini Labnet International, USA

Centrifuga MR22i Jouan, USA

Deep Freezer VXE 380 Jouan, Francie

Dri-blocks 2D Techne, UK

Elektroforéza Bio-rad, USA

Inkubátor Contherm, Nový zeland

Laminární box SafeFASTTop, faster, Italie

Lednice Calex, Česká republika

Membránová pumpa, KNF-lab, Francie

Mikroskop T2 103411 Olympus, ČR

Napěťový zdroj Power station 300, Labnet, USA

Spektrofotometr Tecan, Švýcarsko

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

Eppendorf, USA

Pipeta multi-kanálová (30-300 μ M) Eppendorf, USA

Pipetovací nástavec, Brand, Německo

Pipetovací nástavec, Labnet, USA

Přístroj na výrobu deionizované vody, Aqua osmotic, Česká republika

Spektrofotometr Tecan, Švýcarsko

Suchá lázeň Accublock, Labnet, USA

Třepačka Heidolf, Německo

Váhy KernABS, Německo

Váhy AFP 210L, USA

Vodní lázeň LabTech, Česká republika

Výrobník ledu F100 Compact, ČR

Vyvolávací automat rentgenových snímků, Dürr XR 24PRO Dürrdental, Německo

Zdroj, Labnet USA

8 PRACOVNÍ POSTUPY

8.1 Kultivace ovariálních buněčných linií A2780 a A2780cis

Vždy pracujeme ve sterilních podmínkách laminárního boxu a rovněž všechny použité roztoky musí být také sterilní. Médium a roztok PBS 1x před prací vždy ohřejeme na fyziologickou teplotu 37 °C.

8.1.1 Rozmrazení buněk

Nejdříve ohřejeme médium ve vodní lázni na 37 °C, potom vyjmeme zamrazené buňky z mrazáku (-80 °C) či tekutého dusíku v případě dlouhodobého skladování. Pak si odlijeme cca 10 ml média do sterilní falkonky a za pomoci pipety přeneseme 1 ml média do kryozkumavky a proplachováním médiem postupně buňky rozmrazujeme a přenášíme do malé kultivační láhve (25 cm²) a tu umístíme do CO₂ - inkubátoru (5% CO₂, 37 °C). Po 24 hodinách vyměníme kultivační médium.

8.1.2 Počítání buněk

Nejdříve se napipetuje 10 µl do malé eppendorfky a poté přidáme 90 µl trypanové modři. Pipetou promícháme buněčnou suspenzi s trypanovou modří, pak odpipetujeme 10 µl do bürkerovy komůrky. Dáváme pozor, aby byla suspenze nanášena rovnoměrně do obou polí komůrky a poté ji zakryjeme krycím sklíčkem a buňky spočítáme pod mikroskopem. Nutné je spočítat nejméně 10 čtverců ohraničených dvojitou čarou. Napočítané buňky v jednotlivých čtvercích si zaznamenáme. Konečný výsledek získáme tak, že součet z jednotlivých deseti čtverců vydělíme 10 a poté toto číslo vynásobíme 10⁵, tak dostaneme počet buněk na 1ml.

8.1.3 Pasážování buněk

Nádorové linie byly pasážovány cca 3x týdně a to po dosažení konfluencie zhruba 90 % na dně kultivační nádoby. Míru konfluencie buněk kontrolujeme pomocí inverzního mikroskopu. Z kultivačních láhví odsajeme staré medium a propláchneme kultivační láhev přibližně 6 ml PBS 1x a následně vše odsajeme. Do kultivační láhve, dle jejího obsahu napipetujeme 0,5 nebo 1 ml trypsinu a necháme 2 min působit v inkubátoru při 37 °C. Pak míru trypsinizace zkontrolujeme pod mikroskopem, poté na kultivační nádobu několikrát poklepeme, aby se podkladu pustily zbylé buňky. Trypsin zneutralizujeme přidáním 4 nebo 9 ml média dle velikosti kultivační nádoby a resuspendujeme, aby se rozpadly zbylé shluky a na závěr buňky spočítáme. Trypsinizované buňky přeneseme do plastové zkumavky, centrifugujeme 3 minuty při 1500 rpm a buňky použijeme k experimentům nebo zamrazíme viz níže. Ke zbytku buněk v kultivační nádobě přidáme médium a umístíme do CO₂ inkubátoru, kult. láhve pro nebezpečí kontaminace měníme za nové zhruba každé tři pasáže.

8.1.4 Udržování rezistence k cisplatině

U nádorové linie A2780cis je uměle vypěstovaná snížená citlivost k cisplatině, abychom tuto vlastnost u buněk udrželi, musíme jednou týdně nebo po každé třetí pasáži přidávat do média v kultivační láhvi roztok cisplatinu (25mM) v DMSO, aby konečná koncentrace této látky v médiu odpovídala 1 μM.

8.1.5 Zamrazování buněk

Ze zkumavky s centrifugovanými buňkami odsajeme médium a přidáme roztok FBS/DMSO (9:1), poté buňky rychle resuspendujeme a suspenzi co nejrychleji přemístíme do kryozkumavek, které přeneseme do mrazáku (-80 °C) nebo je dlouhodobě uchováváme v tekutém dusíku.

8.2 Stanovení toxicit pomocí MTT testu

Je jednoduchá metoda umožňující detekovat toxicitu látek na buněčné kultury. Studovaná látka se přidává k buněčným liniím přímo rozpuštěná v kultivačním médiu, které musí být sérové s ohledem na 24 hodinovou dobu inkubace. V bezsérovém médiu by došlo k zastavení buněčného cyklu a takto získané výsledky by byly nepřesné. Podstatou tohoto testu je redukce MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnetetrazolium bromid) na fialové krystalky formazanu, které jsou ve vodě nerozpustné. Tato reakce je v nitru buněk zprostředkována dehydrogenázami dýchacího řetězce mitochondrií. Formazán vzniklý uvnitř živých buněk, které zůstaly na dně jamky je rozpuštěn v DMSO s přídavkem 1% NH_3 , což je silné polární rozpouštědlo, následně rozpuštěný formazán spektrofotometricky stanovíme při vlnové délce 570 nm. MTT je redukován pouze v metabolicky aktivních buňkách, proto hodnoty absorbance odpovídají množství živých buněk, čím vyšší absorbance, tím vyšší podíl živých buněk. Tato metoda však neumožňuje rozlišení jednotlivých typů buněčné smrti (Berridge et, Tan 1993).

Výsev buněk se provádí pomocí multikanálové pipety na 96 jamkovou mikrotitrační destičku v počtu cca. 25 000 buněk na jamku v 200 μl média, aby byl jejich počet v jamkách přibližně stejný, proto musíme médium s buňkami občas promíchat. Pro každou koncentraci studované látky vysíváme vzorek vždy v tripletu. Destičku necháme v inkubátoru do druhého dne a zkontrolujeme pod mikroskopem, zda jsou buňky rovnoměrně vysety ve všech jamkách.

Odsajeme staré médium a přidáme 200 μl nového média se sledovanou látkou. Kromě zájmových látek se ještě provádí pozitivní a negativní kontrola, pak kontrola vlivu použitého rozpouštědla. Jako pozitivní kontrolu používáme buňky kultivované pouze v médiu. Naopak do negativní kontroly použijeme 20% roztok Tritonu- X 100 přidaný do kultivačního média ve třech jamkách (630 μl média + 70 μl 20% Tritonu). Poté provádíme kontrolu vlivu rozpouštědla tak, že k buňkám přidáme samotné rozpouštědlo (H_2O , DMSO), ve stejné koncentraci jako u vzorků. Buňky necháme inkubovat 24 hodin a po skončení inkubace vyklepneme z destiček staré médium, promyjeme 100 μl PBS1x a následně vyklepneme i PBS. Přidáme 100 μl média s 10 x ředěným roztokem 3 mg/ml MTT a necháme inkubovat cca jednu hodinu poté vyklepneme MTT roztok a přidáme 100 μl směsi DMSO + 1% NH_3 . Lehce proklepneme, aby se formazán lépe rozpustil v roztoku a změříme absorbanci na spektrofotometru při 570 nm.

8.3 Příprava vzorků

8.3.1 Izolace nukleárních extraktů

Izolace nukleárních extraktů spočívá v postupném lyzování buněk, nejdříve se lyzuje plazmatická membrána a nakonec i membrána jaderná. Během prvního dne byly buňky vysazeny na 100 mm Petriho misky (10 ml). Ideální množství buněk pro detekci je cca 5 milionů. Experimenty byly naplánovány vždy s negativní kontrolou (netritované buňky) a pozitivní kontrolou (TNF- α) a dále vzorky tritované sledovanými látkami. Druhý den odsajeme staré médium a misky se promyjí cca 2 ml PBS 1x, který se odsaje. Na každou misku se přidá 10 ml bezsérového média a trituje s adekvátním množstvím zkoumané látky. Misky se pak vloží zpět do inkubátoru a nechají se 20 minut inkubovat poté se misky vyjmou, od této chvíle se pracuje nesterilně mimo prostředí boxu. Médium se vylije a misky se promyjí 2x ledově vychlazeným PBS 1x.

Dále se buňky z misek seškrábnou pomocí škrabky do 1 ml ledově vychlazeného PBS a přenesou se do ependorffek, od tohoto momentu provádíme všechny úkoly na ledu. Vzorky centrifugujeme při 4.500 rpm, 5 min, 4 °C. Důkladně odsajeme supernatant a resuspendujeme vzniklé pelety ve 200 μ l vychlazeného pufru A a necháme je inkubovat 15 minut na ledu. Vzorky centrifugujeme při 12.000 rpm po 10 min za teploty 4 °C. Pro důkladnou purifikaci zopakujeme tento krok ještě 4-5x. Odsajeme supernatant a pelety resuspendujeme v 100 μ l vychlazeného B pufru, do kterého se těsně před použitím přidává PMSF (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluorid), jedná se o nestabilní proteazový inhibitor. Necháme inkubovat 30 minut na ledu a občas zvertexujeme a nakonec centrifugujeme při 12.000 rpm po 20 min za teploty 4 °C. Odsajeme supernatant, což je požadovaná jaderná frakce a přeneseme ji do nové ependorffky. Vzorky skladujeme v mrazáku při -80 °C.

8.3.2 Izolace cytoplazmatických proteinů

Izolace cytoplazmatických proteinů probíhá zlyzováním plazmatické membrány. Během prvního dne byly buňky rovněž vysazeny na 100 mm Petriho misky (V=10 ml). Oproti předcházejícímu návodu byl výsev pro detekci ubiquitinovaných proteinů s cytoplazmatických extraktů prováděn v množství cca 450-500 tis. buněk na kultivační misku, aby bylo možné stanovit rozdíl mezi pozitivní a negativní kontrolou. Experimenty byly navrženy s negativní kontrolou (netritované buňky) a pozitivní kontrolou (bortezomib), pak vzorky tritované sledovanými látkami.

Druhý den odsajeme staré médium a misky se promyjí cca 2 ml PBS 1x, který se rovněž odsaje. Na každou misku se přidá 10 ml (sérového) média dle potřeby experimentu a trituje s adekvátním množstvím zkoumané látky. Misky se vloží zpět do inkubátoru a nechají se 1-6 hodin inkubovat, od této chvíle se pracuje nesterilně mimo prostředí laminárního boxu. Médium se vylije a misky se 2x promyjí ledově vychlazeným PBS 1x. Misky byly vloženy zpět do inkubátoru, kde se nechají stanovený čas inkubovat. Po 20 minutách se misky vyjmou, od této chvíle se pracuje nesterilně mimo prostředí boxu. Médium se vylije a misky se 2x promyjí ledově vychlazeným PBS 1x. Buňky se oddělí z misek a seškrábnou se do 1 ml ledově vychlazeného PBS 1x a přenesou do ependorffek, od této chvíle již všechny úkoly provádíme na ledu. Vzorky centrifugujeme při 4.500 rpm, 5 min, při 4 °C. Důkladně odsajeme supernatant a resuspendujeme vzniklé pelety ve 200 µl vychlazeného pufru A a necháme inkubovat 15 minut na ledu. Poté vzorky centrifugujeme při 12.000 rpm po 10 min a teplotě 4 °C. Odsajeme supernatant a přeneseme do nové ependorffky. Vzorky skladujeme v mrazáku při -80 °C.

8.3.3 SDS-PAGE a western blot

Nejprve si připravíme gel pro SDS-PAGE dle (Tab. 1), jako poslední vždy přidáváme APS, aby nedošlo k předčasnému ztuhnutí. Po nalití dělicího gelu se zbavíme bublin za pomoci 20 μ l izopropanolu, který následně vypláchneme deionizovanou vodou a teprve poté nalijeme i zaostřovací gel a do aparatury umístíme hřebínek. Do jamek v stacking gelu nanese vyizolovatné proteiny ve stejném množství 45 μ g (koncentrace stanovena dle metody Bradfordové) a velikostní marker (Page Ruler) pro SDS-PAGE. V dalším kroku byl gel v aparatuře zalit migračním pufrem a připojen k elektrickému zdroji.

Tab. 1- Rozpis komponent na přípravu 8% akrilamidového gelu pro SDS-PAGE

komponenta	dělicí gel	zaostřovací gel
deionizovaná voda	5,4 ml	2,56 ml
akrylamid (40%)	2 ml	0,4 ml
Running/stacking pufr	2,5 ml	1 ml
10% APS	100 μ l	30 μ l
10% SDS	100 μ l	40 μ l
TEMED	10 μ l	6 μ l

Následná separace probíhala nejdříve při napětí 350 V a proudu (10 mA/gel) mA za 10-15 minut byl následně proud zvýšen na (20 mA/gel) mA po dobu přibližně 70 minut. Po ukončení elektroforézy byly gely vyjmuty a vloženy do blotovací aparatury mezi dvě dvojice filtračních papírů a podloženy membránou, aby směřovala v aparatuře pro transfer proteinů k anodě na membránu. Membrána byla nejprve hydratována v methanolu a deionizované vodě, a nakonec v transferovém pufru. Poté byla vložena s gelem do transferové aparatury chlazené ledem.

Po zapojení k zdroji přenos probíhal při napětí 130 V a proudu 350 mA po dobu 75 minut. Na membrány s přenesenými proteiny byly nanесeny nejdříve primární protilátky v 5% sušeném mléce rozpuštěném v TBS/Tween na dobu 2-3 hodin inkubovány na třepačce. Po inkubaci byly membrány třikrát promývány, vždy po dobu alespoň 10 minut v čistém TBS/Tween pufru. Následovala inkubace membrán se sekundárními protilátkami značenými křenovou peroxidázou v 2,5% mléce v TBS/Tween po dobu 1 hodiny a opětovném trojnásobném promytí. Na membránu byly aplikovány chemoluminiscenční reagenty. Po 2 minutách působení byl přebytečný roztok odstraněn a membrány byly vloženy mezi fólie a uzavřeny do speciálních neprůhledných desek. Vzniklý signál byl zobrazen přes exponované rentgenové filmy, které byly v temné komoře vyvolány ve speciálním přístroji. Pro kontrolu, zda je ve vzorcích přítomno stejné množství proteinů byl současně se vzorky detekován také β -aktin 43 kDa.

9 VÝSLEDKY

9.1 Stanovení cytotoxického účinku $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$, $\text{Zn}(\text{EtDTC})_2$ a bortezomibu, CuCl_2 , ZnCl_2 a diethyldithiokarbamátu

Cytotoxicitu těchto látek jsem stanovil vůči ovariálním buněčným liniím A2780 a A2780 cis prostřednictvím MTT testu. Před vlastním stanovením toxicity předcházela kultivace buněk v kultivačních lahvích tak, aby dosáhly potřebné konfluency. V případě cisplatině rezistentní linie musela být navíc udržována rezistence tím, že k buňkám byla vždy po třetí pasáži přidána cisplatina, aby její výsledná koncentrace v kultivační láhvi dosáhla ($1 \mu\text{M/l}$). K samotnému stanovení toxicity k cisplatině rezistentní linii byla vybrána pasáž před přidáním cisplatinu. Rozsah testovaných koncentrací pro dithiokarbamátové komplexy byl zvolen dle doporučení Borise Cveka od 1 do $15 \mu\text{M/l}$. Po následném přidání MTT byla absorbance odpovídající zastoupení živých buněk v jamce změřena na spektrofotometru při 570 nm . Jako pozitivní kontrola byly brány tři jamky, ve kterých bylo k buňkám přidáno pouze rozpouštědlo, které bylo použito u vzorku. Pouze v takovém ředění, aby dosahovalo u vody maximálně 1% a v případě DMSO 1% roztoku, protože by vyšší koncentrace rozpouštědla mohla negativně ovlivnit experimenty. Aritmetický průměr těchto tří jamek byl rovněž brán jako 100% vůči buňkám, které byly ovlivněny testovanými látkami. Rozdíl mezi kontrolou pro rozpouštědlo a tripletem jamek, kde bylo přidáno pouze médium se během experimentů pohyboval maximálně do 15% .

Z tabulek (tab. 2 a 3) je patrné, že bortezomib a testované komplexy vykazují silný cytotoxický efekt. K největšímu snížení variability došlo působením bortezomibu při nízkých koncentracích u obou ovariálních liniích ($\text{A2780} = 0,99 \mu\text{M/l}$, $\text{A2780cis} = 0,7 \mu\text{M/l}$). Také cytotoxické působení $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$, $\text{Zn}(\text{EtDTC})_2$ a bortezomibu bylo velmi podobné u obou buněčných linií. Pro srovnání zinečnatý komplex (IC_{50} : $\text{A2780} = 4,4 \mu\text{M/l}$, $\text{A2780cis} = 6,2 \mu\text{M/l}$) a poté následoval i komplex mědi (IC_{50} : $\text{A2780} = 5,2 \mu\text{M/l}$, $\text{A2780cis} = 6,1 \mu\text{M/l}$). Oproti tomu chloridy vykazovaly nesrovnatelně nižší toxicity a u diethyldithiokarbamátu se koncentrace IC_{50} nacházela za hranicí rozpustnosti této látky v médiu ($>200 \mu\text{M/l}$), kterou jsem určil jako koncentraci, při níž v jamkách mikrotitračních destiček po 24 hodinové kultivaci, vznikly nerozpouštěné látky rozeznatelné mikroskopem

Tab. 2- Stanovené hodnoty (IC 50) v $\mu\text{M/l}$ po 24 hodinách inkubace s buněčnou linií A2780 (tři nezávislé experimenty).

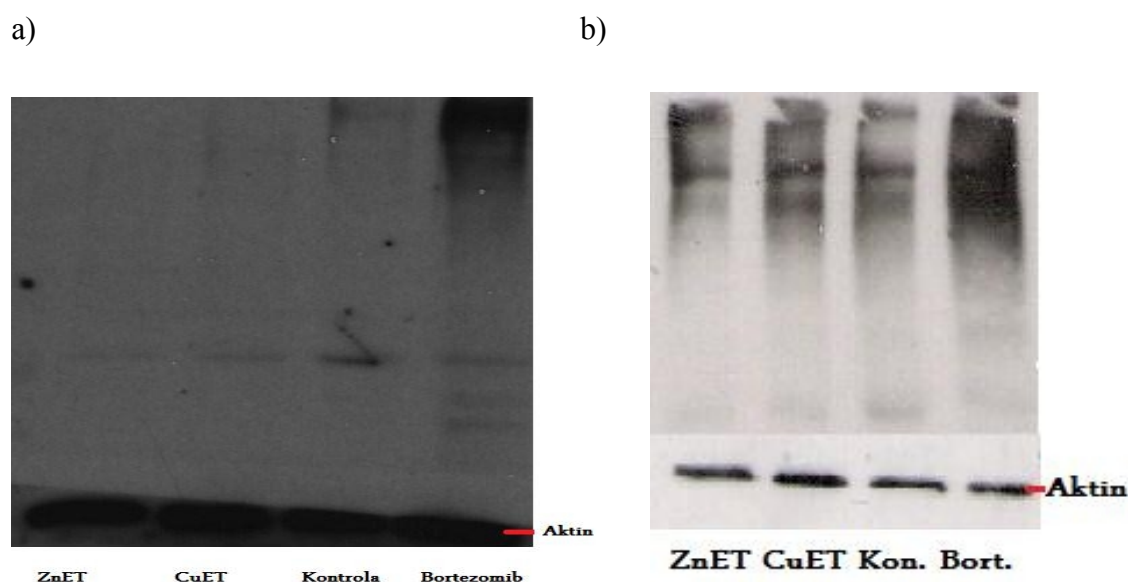
látko	IC50 μM			průměr	SD
disulfiram	>200	>200	>200	-	-
Zn(EtDTC) ₂	3	4,1	5,9	4,4	1,4
Cu(EtDTC) ₂	6	4,1	5,63	5,2	1
ZnCl ₂	467	533,5	568	523	51,3
CuCl ₂	416	437	543	465,3	68,2
bortezomib	0,77	1,23	0,98	0,99	0,2

Tab. 3- Stanovené hodnoty (IC 50) v $\mu\text{M/l}$ po 24 hodinách inkubace s buněčnou linií A2780cis (tři nezávislé experimenty).

Látka	IC50 μM			průměr	SD
disulfiram	>200	>200	>200	-	-
Zn(EtDTC) ₂	6,6	7,5	4,6	6,2	1,5
Cu(EtDTC) ₂	4,8	5,7	7,8	6,1	1,6
ZnCl ₂	577	648	355	526,7	152,8
CuCl ₂	936	555	581	690,7	212,7
bortezomib	0,76	0,83	0,64	0,7	0,1

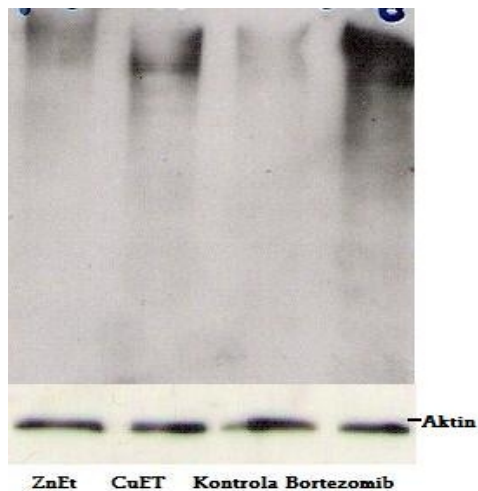
9. 2 Nepřímé stanovení inhibice proteazomu

Míru inhibice proteazomu jsem nepřímo stanovil na základě akumulace polyubikvitinovaných proteinů, které nebyly degradovány proteazomem v buněčných lyzátech. Polyubikvitinované proteiny byly detekovány z buněčných lyzátů pomocí imunoblotu, při kterém byla použita specifická protilátka oproti (Lys48), přes který jsou navzájem vázány polyubikvitinové řetězce. Provedeným experimentům předcházela dlouhá optimalizace, zejména co se týče pozitivní a negativní kontroly. Jako pozitivní kontrola byl použit bortezomib v koncentraci 3,5 $\mu\text{M/l}$, jako negativní kontrola posloužily ničím netritované buňky. Díky vysoké konfluenci buněk bylo i v negativní kontrole přítomné velké množství polyubikvitinovaných proteinů. Dále záleželo i na koncentraci primárních a sekundárních protilátek, aby nedocházelo k nespecifickým vazbám. Jako nejlepší se mi ukázala koncentrace protilátek anti (Lys48) ubikvitin 2 000x v 5% sušeném mléce rozpuštěném v TBS/tween. Koncentrace sekundární anti-rabit protilátky 2 000x v 2,5% mléce rozpuštěném v TBS/tween. Nejdříve se ubikvitinované proteiny hromadily, v případě bortezomibu, a to po jedné hodině (obr. 10). Znatelnou akumulaci jsem pozoroval u $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ po 4 hodinách (obr. 11) s nejlepším výsledkem při šestihodinovém treatmentu (obr. 12). U $\text{Zn}(\text{EtDTC})_2$ je nárůst ubikvitinovaných proteinů vůči kontrole jen nepatrný. Tyto výsledky byly přibližně shodné pro obě linie.

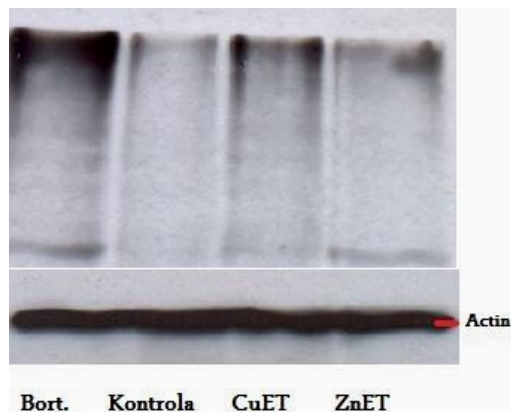


Obr. 10 - Akumulace ubikvitinovaných proteinů po 1 hodině inkubace s bortezomibem, $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ a $\text{Zn}(\text{EtDTC})_2$ o koncentracích (3,5 $\mu\text{M/l}$, 5 $\mu\text{M/l}$, 5 $\mu\text{M/l}$,) u nádorových linií a) A2780, b) A2780 cis

a)

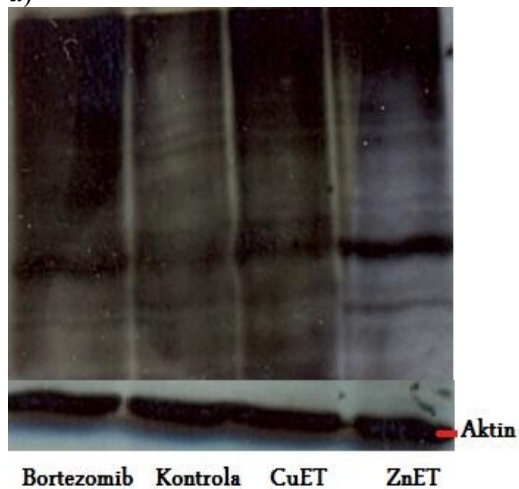


b)

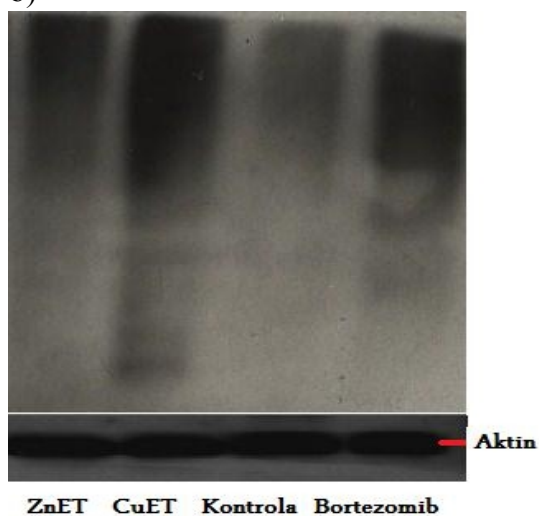


Obr. 11 - Akumulace ubikvitinovaných proteinů po 4 hodinách inkubace s bortezomibem, $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ a $\text{Zn}(\text{EtDTC})_2$ o koncentracích (3,5 $\mu\text{M}/\text{l}$, 5 $\mu\text{M}/\text{l}$, 5 $\mu\text{M}/\text{l}$,) u nádorových linií a) A2780, b)A2780cis

a)



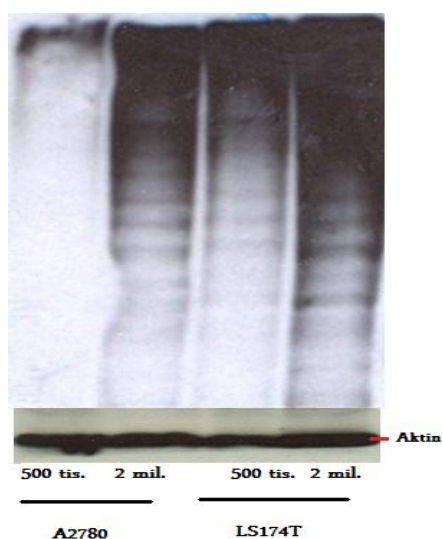
b)



Obr. 12 - Akumulace ubikvitinovaných proteinů po 6 hodinách inkubace s bortezomibem, $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ a $\text{Zn}(\text{EtDTC})_2$ o koncentracích (3,5 $\mu\text{M}/\text{l}$, 5 $\mu\text{M}/\text{l}$, 5 $\mu\text{M}/\text{l}$,) u nádorových linií a) A2780, b)A2780cis

9.3 Akumulace v ubikvitinovaných proteinů v závislosti na množství buněk

Akumulaci ubikvitinovaných proteinů jsem určil jako v předchozím případě pomocí imunoblotu. Rovněž i ředění protilátek bylo obdobné jako v předcházejícím experimentu. Buňky jsem ničím netrávil a jenom jsem je vysel na kultivační misky v různém počtu (500tis. oproti 2 mil. buněk) na kultivační misky o objemu 10 ml. Poté jsem po 24 hodinové kultivaci buňky lyzoval stejně jako u všech těchto experimentů pomocí A-B pufrů a změřil koncentraci proteinů v lyzátu metodou bradfordové a za stejné koncentrace byly naneseny na SDS-PAGE. Poté byly pomocí specifických protilátek proti (Lys48) detekovány rozdíly v množství ubikvitinovaných proteinů u vzorků s různou konfluencí buněk (obr.13).

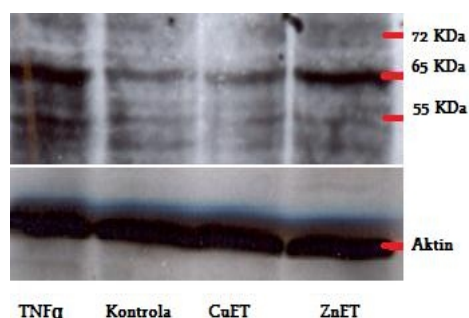


Obr. 13- Akumulace ubikvitinovaných proteinů v závislosti na koncentraci buněk na kultivační misce

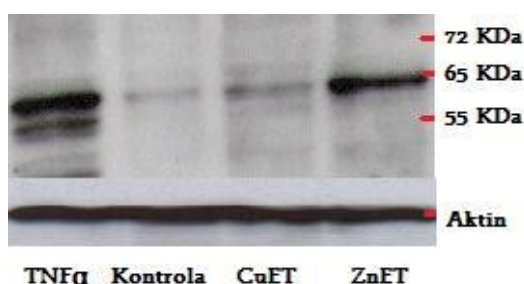
9.4 Vliv Cu(EtDTC)₂ a Zn(EtDTC)₂ na aktivaci signální dráhy NF-κB

Vliv na signální dráhu NF-κB byl stanoven z jaderných lyzátů po 20 minutovém působení komplexů s kovy v bezsérovém médiu buňky. Jako pozitivní kontrola byl použit TNF-α v množství (0,05 ng) a jako negativní kontrola sloužily ničím netreatované buňky. Inducibilní faktor NF-κB byl posléze detekován na imunoblotu pomocí specifické protilátky proti proteinu p65, který je jako součást diméru NF-κB translokován do jádra při aktivaci této dráhy. Rovněž bylo zásadní optimalizovat si poměry ředění primární a sekundární protilátky, aby nebyl příliš slabý signál nebo nedocházelo k nespecifickým vazbám. Jako nejlepší se ukázalo ředění protilátek anti-(p65) 500x v 5% mléce rozpuštěném v TBS/tween a koncentrace sekundární anti-rabit protilátky 2 000x v 2,5% mléce rozpuštěném v TBS/tween. Po dvacetiminutové expozici komplexům prokazatelně aktivoval signální dráhu NF-κB pouze Zn(EtDTC)₂ a při koncentraci (5 μM) a to u obou buněčných linií (obr.14).

a)



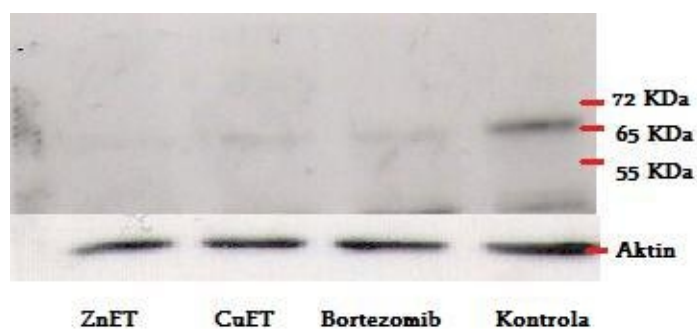
b)



Obr.14 - Aktivace signální dráhy NF-κB po 20 minutové inkubaci s komplexy v bezsérovém médiu u nádorových linií a) A2780, b) A2780cis

9. 5 Inhibice signální dráhy NF-κB pomocí komplexů a bortezomibu

Inhibice signální dráhy NF-κB byla stanovena pomocí experimentů, při kterých byly buňky nejdříve po jednu hodinu vystaveny působení $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$, $\text{Zn}(\text{EtDTC})_2$ a bortezomibu při koncentracích (5 $\mu\text{M}/\text{l}$, 5 $\mu\text{M}/\text{l}$, 3,5 $\mu\text{M}/\text{l}$) a po vymytí těchto látek PBS 1x. Buňky byly vystaveny po dvacet minut působení TNF- α jako v předchozím experimentu. Výsledky ukázaly, že po hodinovém působení všechny tyto látky dokáží zabránit jaderné translokaci NF-κB (obr.15), kterou není poté schopen vyvolat ani aktivátor této signální dráhy TNF- α . (0,05 ng). Koncentrace protilátek byly obdobné jako v předchozím případě. Bohužel z časových důvodů byl tento experiment proveden jen na linii A2780.



Obr.15 - Inhibice signální dráhy NF-κB po hodinové inkubaci s $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$, $\text{Zn}(\text{EtDTC})_2$ a bortezomibu v bezsérovém médiu, po kterém následovalo 20 minutové působení TNF- α u nádorové linie A2780

10. DISKUZE

V praktické části diplomové práce jsem stanovil toxicity pomocí MTT testu po 24 hodinovém působení bortezomibu, diethyldithiokarbamátu sodného, dithiokarbamátových komplexů s kovy ($\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$, $\text{Zn}(\text{EtDTC})_2$) a chloridů (CuCl_2 , ZnCl_2) na buněčné linie A2780 a A2780cis odvozené od rakoviny vaječníku. Poté byly ze závislosti viability na koncentracích testovaných látek stanoveny hodnoty IC50, ze kterých vyplývá, že vůči oběma ovariálním liniím byl nejúčinnější bortezomib, následován dithiokarbamátovými komplexy zinku a mědi (tab. 1-3). Tyto dvě látky vykazovaly vysokou toxicitu oproti svým prekurzorům: chloridům (CuCl_2 , ZnCl_2) a diethyldithiokarbamátu sodného.

Z výsledků také vyplývá, že získaná rezistence vůči cisplatině příliš neovlivňuje toxicitu proteozomálních inhibitorů v porovnání mezi standardní linií A2780 a od ní odvozené linie A2780cis rezistentní vůči cisplatině. Rezistence vůči cisplatině může být dána jednak refluxem molekul cisplatinu z buněk nebo zvýšeným množstvím některých sloučenin jako např. glutathionu, který je schopný cisplatinu chemicky inaktivovat, ale také změnou v expresi regulačních proteinů (Kartalou *et al.* 2001). V této souvislosti je známo, že klasická chemoterapie kombinovaná s proteozomálními inhibitory snižuje úroveň získané rezistence nádorových buněk proti chemoterapii, a tím i zlepšuje účinek společně podávaných látek oproti monoterapii, jak publikovali např. (Wagenblast *et al.*, 2008, Jandial *et al.*, 2009). V případě cisplatinu a disulfiram byl publikován i fakt, že disulfiram při společném užívání s cisplatinou snižuje její nefrotoxicitu. (Berry *et al.*, 1900, Bouvet *et al.*, 2006). Tato vlastnost nemusí být dána pouze chemickou inaktivací disulfiramem, ale i schopností proteozomálních inhibitorů snížit úroveň cisplatinou vyvolané nefrotoxicity. Jak dokázal na molekulární úrovni Liu *et al.* (2010), a proto by nebylo vůbec od věci ověřit jeho výsledky i v případě dithiokarbamátových komplexů.

Získané výsledky naznačují, že testované proteozomální inhibitory mohou být užitečné při léčbě nádorů rezistentních vůči cisplatině i dalším chemoterapeutikům, protože jsou schopny zvrátit rezistenci vůči chemoterapii zprostředkovanou P- glykoproteinem (Awada *et al.*, 2008, Berenson *et al.*, 2006, Fujita *et al.*, 2005).

Nejvyšší cytotoxicitu vůči oběma liniím vykazoval bortezomib a byla zhruba 5x vyšší, než v případě studovaných komplexů, ale i přes to mohu tvrdit, že díky hodnoty IC50 bortezomibu i dithiokarbamátových komplexů s mědí a zinkem pohybují v příznivých terapeutických koncentracích (DeGeorge *et al.*, 1998).

Pro kontrolu jsem stanovil pomocí MTT testu i toxicity chloridů (CuCl_2 , ZnCl_2) a diethyldithiokarbamátu sodného, což jsou prekurzory diethyldithiokarbamátových komplexů s kovy. Toxicita chloridů (CuCl_2 , ZnCl_2) ve srovnání s dithiokarbamátovými komplexy těchto kovů byla nesrovnatelně nižší (tab. 2 a 3). Nepodařilo se mi stanovit toxicitu diethyldithiokarbamátu sodného, protože hodnota IC_{50} této látky leží za hranicí její rozpustnosti v médiu.

O tvorbě terapeuticky zajímavých organokomplexů v tělních tekutinách svědčí např. zvýšená toxicita disulfiramu v médiu obohaceném mědí (Cen *et al.*, 2004ab, Brar *et al.*, 2004). Nebo schopnost $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ prostupovat hematoencefalickou bariéru (Suzuki *et al.*, 1997).

Míru inhibice proteazomu jsem stanovil nepřímo pomocí detekce akumulovaných ubikvitinovaných proteinů western blotem. Zásadní problém jsem během experimentů měl s kontrolami, protože v negativní kontrole bylo stále přítomno velké množství ubikvitinovaných proteinů, díky nimž nešlo rozlišit negativní od pozitivní kontroly. Ke stejným závěrům jsem dospěl i v případě jiných buněčných linií. Tento problém s kontrolami se mi po čase podařilo odstranit výsevem malého počtu buněk (450-500 tis.) na kultivační misky.

V dalších experimentech, které však již nebyly předmětem mé diplomové práce jsem rovněž pozoroval variabilní hladiny polyubikvitinaci proteinů v různých lidských nádorových liniích (A2780, LS174T, Skhep1, HepG2), ale i závislost množství ubikvitinovaných proteinů na počtech vysévaných buněk. U jaterní linie HepG2, která roste jakoby v trsech jsem dokonce díky vysoké hladině ubikvitinovaných proteinů nebyl schopen vůbec detekovat rozdíl mezi pozitivní a negativní kontrolou. Domnívám se, že příčina, proč se mi nedařilo určit míru inhibice proteazomu, nejen u buněčné linie HepG2 je závislost množství ubikvitinovaných proteinů na konfluenci buněk, což zřejmě souvisí s regulací buněčného růstu. Rovněž by bylo do budoucna zajímavé porovnat ubikvitinový patern lidských tkání ve srovnání s malignitami totožného tkáňového původu.

Co se týče experimentů s ovariálními liniemi, nejvyšší míra akumulace ubikvitinovaných proteinů byla pozorována u bortezomibu, nižší hladiny polyubikvitinovaných proteinů byly přítomny u $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ a pouze nepatrný nárůst byl pozorován u $\text{Zn}(\text{EtDTC})_2$. Po hodinovém působení této látky byl nárůst množství polyubikvitinovaných proteinů patrný pouze v případě bortezomibu, zatímco u měďnatého komplexu došlo k podstatně slabší akumulaci polyubikvitinovaných proteinů teprve po čtyřech hodinách. Naopak u zinečnatého komplexu nebyla akumulace pozorována takřka vůbec ani v delších časových intervalech. Tyto výsledky jsou opět shodné pro obě buněčné linie.

Bohužel z těchto výsledků nemohu dokázat, zda je skutečně v případě bortezomibu inhibována chymotrypsinová aktivita proteazomu, nebo že komplexy dle předpokladu Cveka *et al.*, (2008) intereagují s JAMM doménou enzymů víka proteazomu, a tím ho inhibují. Rozdíly v intenzitě signálu bortezomibu a měďnatého komplexu mohou být způsobeny odlišným účinkem obou látek na 26S proteazom. Rovněž se nabízí otázka, zda v případě dithiokarbamátových komplexů i bortezomibu nemůže být inhibována i jiná než „chymotrypsin like“ aktivita proteazomu, protože výše uvedené výsledky nasvědčují, buď rozdílnému působení těchto sloučenin na 26S proteazom, anebo $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ může inhibovat 20S proteazom podobně jako bortezomib, ale pouze s mnohem nižší afinitou k 20S.

Otázkou zůstává, proč se ubikvitinované proteiny hromadí nejdříve po působení bortezomibu. Cvek *et al.*, (2008) uvádí, že oba komplexy inhibují účinněji 26S proteazom než samotný 20S, a proto je možné, že bortezomib narušuje strukturu proteazomu daleko více a díky tomu se i rychleji hromadí polyubikvitinované proteiny než v případě $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$. Vysvětlení vidím ve schopnosti disulfiramu inhibovat ubikvitin ligázy (E3) obsahující RING domény, jež inhibice může způsobovat nižší akumulaci ubikvitinovaných proteinů oproti bortezomibu (Kona *et al.*, 2011)

Jaderná translokace inducibilního faktoru NF- κ B (p65) byla aktivována u obou linií po 20 minutovém působení $\text{Zn}(\text{EtDTC})_2$. V těchto výsledcích se shodují s Cvekem *et al.*, (2007). Zjištěná skutečnost, že zinečnatý komplex aktivuje signální dráhu NF- κ B odporuje obecné představě o inhibičním působení proteozomálních inhibitorů na NF- κ B (Cvek *et Dvorak* 2007). Jaderná translokace po jeho dvaceti minutovém působení $\text{Zn}(\text{EtDTC})_2$

nemusí znamenat iniciaci exprese cílových genů a odpovídá i zjištění, že celá řada chemoterapeutik způsobuje jadernou translokaci NF- κ B (Bharti *et Aggarwal* 2002).

Významnějším faktem je, že po hodinovém působení Zn(EtDTC)₂ se nepodařilo signální dráhu NF- κ B aktivovat ani následným dvacetiminutovým působením TNF- α , což pravděpodobně svědčí o tom, že zinečnatý komplex inhibuje proteazom (Cvek *et al.*, 2008) a díky tomu blokuje jadernou translokaci NF- κ B (Cvek *et Dvorak* 2007).

Naproti tomu Cu(EtDTC)₂ po 20 minutové expozici jadernou translokaci NF- κ B nespouštěl a při hodinové expozici následovanou působením TNF- α se nepodařilo spustit jadernou translokaci stejně jako v případě Zn(EtDTC)₂. Tyto výsledky se shodují se závěry Yipa *et al.*, (2011), který pomocí disulfiramu přidaného do média obohaceného mědí inhiboval signální dráhu NF- κ B u buněčné linie s její konstitutivní aktivitou.

Nemohu také zodpovědět otázku, proč se ubikvitinované proteiny nehromadí po expozici ovariálních buněk zinečnatému komplexu, který dle vlivu na NF- κ B i dle závěrů Cveka *et al.*, (2008) proteazom inhibuje. Burger *et al.*, (2005) však dokázal, že disulfiram je schopen inhibovat i ubikvitin ligázy E3 obsahující ve své struktuře RING doménu. Domníval se však, že tato vlastnost je způsobena chelatací zinku z buněk.

Jestliže by zinečnatý komplex inhiboval ubikvitin ligázy (E3) obsahující RING domény, tak by práce Burgera *et al.*, (2005) mohla částečně vysvětlovat, proč se v buňkách nehromadily ubikvitinované proteiny v důsledku inhibice proteazomu. Bohužel díky velkému počtu nejrůznějších ubikvitin ligáz (E3) nemusí inhibice jedné skupiny těchto enzymů blokovat signální dráhu NF- κ B ani vést k akumulaci polyubikvitinovaných proteinů.

Důvod, proč se nepodařilo po působením Zn(EtDTC)₂ aktivovat signální dráhu NF- κ B pomocí TNF- α může být způsoben i inhibicí ubikvitin ligáz (E1), které prokazatelně inhibuje chemicky blízká sloučenina dimethyldithiokarbamat zinečnatý, což by mohlo vysvětlovat, proč se v důsledku inhibice proteazomu nehromadily polyubikvitinované proteiny (Choua *et al.*, 2008).

Pokud by Zn(EtDTC)₂ zabraňoval pouze procesu ubikvitinace, mělo by to na signální dráhu NF- κ B stejný důsledek jako v případě inhibice proteazomu. Nehromadily by se ubikvitinované proteiny a v důsledku snížené ubikvitinace by nebyly degradovány I- κ B a proto by nedocházelo k jaderné translokaci NF- κ B (Shembade *et al.*, 2010). Vliv Zn(EtDTC)₂ na ubikvitinační kaskádu by se dal dokázat nižší přítomností ubikvitinovaných

proteinů po ovlivnění buněk $Zn(EtDTC)_2$, následovaným působení proteozomálního inhibitoru např. bortezomibu.

11 ZÁVĚR

V rámci diplomové práce byly splněny následující cíle: vypracování literární rešerše na téma proteazom, proteazomální inhibitory, jejich vliv na signální dráhu NF- κ B a použití při terapii nádorových onemocnění se zaměřením na rakovinu vaječníku.

V praktické části byly otestovány dithiokarbamátové komplexy se zinkem a mědí, bortezomib, diethyldithiokarbamát sodný a chloridy příslušných kovů (CuCl_2 , ZnCl_2) na ovariálních nádorových liniích A2780 a A2780cis. Jejich cytotoxické účinky byly porovnány navzájem a také s bortezomibem. Tyto látky vykazovaly různý cytotoxický účinek, ale v porovnání mezi liniemi A2780 a A2780cis se téměř nelišily. Nejvyšší cytotoxicitu pro obě ovariální linie vykazoval bortezomib, jehož IC 50 činila (A2780 = 0,99 $\mu\text{M/l}$, A2780cis = 0,7 $\mu\text{M/l}$). Poté následoval zinečnatý komplex (IC 50: A2780 = 4,4 $\mu\text{M/l}$, A2780cis = 6,2 $\mu\text{M/l}$) a měďnatý komplex (IC 50: A2780 = 5,2 $\mu\text{M/l}$, A2780cis = 6,1 $\mu\text{M/l}$). Jako kontrolu toxicity kovů, které jsou součástí testovaných komplexů jsem kvůli rozpustnosti použil chlorid zinečnatý a měďnatý. Chloridy vykazovaly cytotoxický účinek pro obě buněčné linie až při vysokých koncentracích: ZnCl_2 (IC 50: A2780 = 523 $\mu\text{M/l}$, A2780cis = 526,7 $\mu\text{M/l}$), CuCl_2 (IC 50: A2780 = 458 $\mu\text{M/l}$, A2780cis = 690,7 $\mu\text{M/l}$). Jako druhou složku komplexů jsem testoval diethyldithiokarbamát sodný, který samovolně vytváří komplexy s kovy, ale samostatně nevykazuje cytotoxický efekt ani do hranice své rozpustnosti v médiu (200 $\mu\text{M/l}$).

Dále byl určen vliv dithiokarbamátových komplexů s kovy na signální dráhu NF- κ B respektive na (p65), jehož jadernou translokaci po 20 minutovém působení aktivoval u obou buněčných linií pouze $\text{Zn}(\text{EtDTC})_2$ při koncentraci (5 $\mu\text{M/l}$). Naproti tomu po hodinovém působení komplexů a bortezomibu na buňky následovanou 20 minutovou expozicí TNF- α , byl NF- κ B přítomen jen v jádře u pozitivní kontroly (buněk ovlivněných pouze TNF- α), což naznačuje schopnost obou komplexů inhibovat proteazom.

Nakonec jsem nepřímo stanovil aktivitu 26S proteazomu pomocí detekce akumulace polyubikvitinovaných proteinů imunoblotem po ovlivnění buněk komplexu kovů a bortezomibem. Zjistil jsem, že k nahromadění ubikvitinovaných proteinů dochází v případě bortezomibu (3,5 $\mu\text{M/l}$), mírnější akumulace byla pozorována u $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ při (5 $\mu\text{M/l}$) a pouze nepatrnou akumulaci ubikvitinovaných proteinů jsem zaznamenal při stejné koncentraci u $\text{Zn}(\text{EtDTC})_2$. Nejlepších výsledků bylo dosaženo po 6 hodinách treatmentu a tyto výsledky se mezi liniemi prakticky nelišily, což může být dáno jejich vzájemnou blízkostí. Měďnatý komplex, který vykazoval lepších výsledků při nepřímém

stanovení míry inhibice proteazomu je v současné době zařazen do klinických testů probíhajících v USA.

12 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ALDH - Aldehyd dehydrogenáza

APS - Amoniumpersulfát

ATP - Adenosintrifosfát

BRCA1 - breast cancer type 1

BRCA2 - breast cancer type 2

CA-125 - cancer antigen 125

CEP-18770 - Cephalon

CT - Computed Tomography, výpočetní tomografie

Cu(EtDTC)₂ - Diethyldithiokarbamat měďnatý

DMSO - Dimethylsulfoxid

DNA - Deoxyribonukleová kyselina

EBV- Virus Epstein-Barrové

EMA - European Medicines Agency, Evropská agentura pro léčiva

FBS - Fetální bovinní sérum

FDA - Food and Drug Administration

HECT - homologous to E6-AP C-terminus, Rodina ubiquitin ligáz (E3)

HER-2/neu - Human epidermal growth factor receptor 2, receptor pro epidermální růstový faktor 2

HTLV-I - Human T-lymphotropic virus type I

IC₅₀ - inhibition concentration at 50 %, koncentrace 50% inhibice

ICAM - Intracellular adhesion molecule, intrabuněčná adhesivní molekula

IEX-1 - immediate early response gene X-1, gen indukovaný stresem

IL - Interleukin

IκB - Inhibitor jaderného transkripčního faktoru kappa B

IKK - Inhibitor Kappa-B kináza

kDa - Kilodalton

MAPK - Mitogenem aktivované protein kinázy

MEK- MAP kinase kinase,

MDM2-The murine double minute,

MHC - major histocompatibility complex Hlavní histokompatibilní komplex

MTT - 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid

NEMO - NF-κB essential modulator, regulační podjednotka IKK kinázy

NF-κB - Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

PAGE - polyakrylamidová gelová elektroforéza
PBS - Fosfátový fyziologický roztok
Poh1 - Pad one homolog 1, deubikvitináza
Ras - RAt Sarcoma, protein z rodiny malých GTPáz
Rb - Retinoblastoma protein
Rpm - Rotation per minute, Otáčky za minutu
RING - Really interesting new gene, doména ubikvitin ligáz
RPMI - Roswell park memorial institute, zkratka pro místo kde bylo médium namícháno
Rpn11 - Proteasome regulatory subunit, regulační podjednotka proteazomu
SDS - Sodiumdodecylsulfát
SV40 - Simian virus 40
Uch-L1 - ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1, ubikvitin c-koncová esteráza
UBD - ubiquitin-binding domain, ubikvitin vazebná doména
USA - Spojené státy americké
TRAF1-2 Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1-2, asociované faktory s receptorem pro tumor nekrotizující faktor
Ubp6 - ubiquitin specific protease 6, ubikvitin specifická proteáza 6
UPS - Ubikvitin proteazom systém
TAT - tyrosine aminotransferase, tyrozin aminotransferáza
TEMED - Tetramethylethyldiamin
TNF α - Tumor necrosis factor α , tumor nekrotizující faktor α
UCH- Ubiquitin c-terminal hydrolasa, ubikvitin c-koncová hydroláza
Ubls - Ubiquitin-like Modifiers, proteiny podobné ubikvitinu
VCAM-1 Vascular cell adhesion molecule-1, adhezivní molekula vaskulárních buněk
XIAP- X-linked inhibitor of apoptosis protein
Zn(EtDTC)₂ - Diethyldithiokarbamát zinečnatý

13. POUŽITÁ LITERATURA

Adams J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev.* 2004; 4: 349-360a

Adams J. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell* 2004; 5: 417-421b

Adams J, Behnke M, Chen S, Cruickshank AA, Dick, LR, Grenier L, Klunder JM, Ma YT, Plamondon L, Stein RL. Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg Med Chem Lett.* 1998; 8: 333–338

Adams J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Canc Treat Rev.* 2003; 29: 3-9

Adams J. Development of the proteasome inhibitor PS-341. *Oncologist* 2002;7:9-16

Adams J, Kauffman M. Development of the Proteasome Inhibitor Velcade™ (Bortezomib). *Cancer investigation* 2004; 2: 304-311

Alexanian R, Dimopoulos M. The treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med.* 1994; 330:484-489

Agyin JK, Santhamma B, Nair HB, Roy SS, Tekmal RR. BU-32: a novel proteasome inhibitor for breast cancer. *Breast Cancer Research* 2009; 11: doi:10.1186/bcr2411

Aghajanian C, Blessing JA, Darcy KM, Reid G, DeGeest K, Rubin SC, Mannel RS, Rotmensch J, Schilder RJ, Riordan W. A phase II evaluation of bortezomib in the treatment of recurrent platinum-sensitive ovarian or primary peritoneal cancer: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic oncology* 2009; 2: 215-220

Aghajanian C, Dizon DS, Sabbatini P, Raizer JJ, Dupont J, D.R. Spriggs DR. Phase I trial of bortezomib and carboplatin in recurrent ovarian or primary peritoneal cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 25: 5943-5949

Ahn KS, Sethi G, Chao T, Neuteboom STC, Chaturvedi MM, Palladino MA, Younes A, Aggarwal BB. Salinosporamide A (NPI-0052) potentiates apoptosis, suppresses osteoclastogenesis, and inhibits invasion through down-modulation of NF- κ B regulated gene products. *Blood* 2007; 110: 2286-2295

Amadori D, Sansoni E, Amadori A. Ovarian cancer: natural history and metastatic pattern. *Front Biosci.* 1997; 2: 8-10

Ambroggio XI, Rees DC, Deshaies RJ. JAMM: A Metalloprotease-Like Zinc Site in the Proteasome and Signalosome. *PLoS Biol.* 2(1): e2. doi:10.1371/journal.pbio.0020002

Annunziata CM, Davis RE, Demchenko Y, Bellamy W, Gabrea A, Zhan F, Lenz G, Hanamura I, Wright G, Xiao W, Dave S, Hurt EM, Tan B, Zhao H, Stephens O, Santra M, Williams DR, Dang L, Barlogie B, Shaughnessy JD, Kuehl WM, Staudt LM. Frequent Engagement of the Classical and Alternative NF- κ B pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer cell* 2007; 2: 115-130

Arao S, Suwa H, Mandai M, Tashiro H, Miyazaki K, Okamura H, Nomura H, Hiai H, Fukumoto M. Expression of Multidrug Resistance Gene and Localization of P-Glycoprotein in Human Primary Ovarian Cancer. *Cancer Res.* 1994; 54: 1355

Ashburner BP, Westerheide SD, Baldwin AS. The p65 (RelA) subunit of NF- κ B interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Molecular and cellular biology* 2001; 20: 7065-7077

Awada A, Albanell J, Canney PA, Dirix LY, T Gil T, Cardoso F, Gascon P, Piccart MJ, Baselga J. Bortezomib/docetaxel combination therapy in patients with anthracycline-pretreated advanced/metastatic breast cancer: a phase I/II dose-escalation study. *Br J Cancer.* 2008; 98:1500-1507

Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- κ B. *The journal of clinical investigation* 2001;107: 241-246

Banks RE, Gearing AJH, Hemingway IK, Norfolk DR, Perren TJ, Selby PJ. Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human malignancies. *British Journal of Cancer* 1993; 68: 122-124

Bartlett JB, Dredge K, Dalglish AG. The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. *The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. Nature Reviews Cancer* 2004; 4: 314-322

Baeuerle PA. The inducible transcription activator NF- κ B: regulation by distinct protein subunits. *Biochim. Biophys. Acta* 1991; 1072:63-80

Bell DA. Origins and molecular pathology of ovarian cancer. *Mod Pathol.* 2005; 18: 19-32

Berenson JR, Yang HH, Sadler K, Jarutirasarn SG, Vescio RA, Mapes R, Purner M, Lee S, Wilson J, Morrison B, Adams J, Schenkein D, Swift R. Phase I/II trial assessing bortezomib and melphalan combination therapy for the treatment of patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2006; 6: 937-944

Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, dependence, and involvement of mitochondrial Electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys.* 1993; 303: 474-482

Berry JM, Jacobs C, Sikic B, Halsey J, Borch RF. Modification of cisplatin toxicity with diethyldithiocarbamate. *J. Clin. Oncol.* 1990; 8: 1585-1590

Bertelsen K. Tumor reduction surgery and long-term survival in advanced ovarian cancer: A DACOVA study. *Gynecol Oncol.* 1990; 38: 203-209

Bharti AC, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochemikal Pharmacology* 2002; 64: 883-888

Bhoj VG, Chen ZJ. Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature*

2009; 458: 430-437

Bohacek RS, McMartin C, Guida WC. The art and practice of structure-based drug design: a molecular modeling perspective. *Med Res Rev.* 1996; 16: 3-50

Bokemeyer C, Schmoll HJ. Secondary neoplasms following treatment of malignant germ cell tumors. *J. Clin. Oncol.* 1993; 11: 1703-1709

Bouvet D, Michalowicz A, Crauste-Manciet S, Brossard D, Provost K. EXAFS and IR structural study of platinum-based anticancer drugs degradation by diethyl dithiocarbamate. *Inorg. Chem.* 2006; 45: 3393-3398

Bouma MJ, Snowdon D, Fairlamb AH, Ackers JP. Activity of disulfiram (bis(diethylthiocarbamoyl)disulphide) and ditiocarb (diethyldithiocarbamate) against metronidazole-sensitive and resistant *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *J Antimicrob Chemother.* 1998; 42: 817-820

Bours V, Bentires-Alj M, Hellin AC, Viatour P, Robe P, Delhalle S, Benoit V, Merville MP. Nuclear factor- κ B, cancer, and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2000; 8: 1085-1089

Brar SS, Grigg C, Wilson KS, Holder WD Jr, Dreau D, Austin C, Foster M, Ghio AJ, Whorton AR, Stowell GW, Whittall LB, Whittle RR, White DP, Kennedy TP. Disulfiram inhibits activating transcription factor/cyclic AMP-responsive element binding protein and human melanoma growth in a metal-dependent manner *in vitro*, in mice and in a patient with metastatic disease. *Mol Cancer Ther.* 2004; 9: 1049-1060

Bross PF, Kane R, Farrell AT, Abraham S, Benson K, Brower ME, Bradley S, Gobburu JV, Goheer A, Lee SL, Leighton J, Liang CY, Lostritto RT, McGuinn WD, Morse DE, Rahman A, Rosario LA, Verbois SL, Williams G, Wang YC, Pazdur R. Approval Summary for Bortezomib for Injection in the Treatment of Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res* 2004;10: 3954- 3964

Bundy DL, McKeithan TW. Diverse Effects of BCL3 Phosphorylation on Its Modulation of NF- κ B p52 Homodimer Binding to DNA. *J Biol Chem.* 1997; 272: 33132-33139

Burger AM, Gao Y, Amemiya Y, Kahn HJ, Kitching R, Yang Y, Sun P, Narod SA, Hanna WM, Seth AK. A Novel RING-Type Ubiquitin Ligase Breast Cancer-Associated Gene 2 Correlates with Outcome in Invasive Breast Cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 10401-10412

Cannistra SA. Cancer of the Ovary. *N Engl J Med.* 1993; 329:1550-1559

Cen D, Brayton D, Shahandeh B, Meyskens FL, Farmer PJ. Disulfiram facilitates intracellular Cu uptake and induces apoptosis in human melanoma cells. *J Med Chem.* 2004; 47: 6914-20a

Cen D, Gonzalez RI, Buckmeier JA, Kahlon RS, Tohidian NB, Meyskens FL. Disulfiram induces apoptosis in human melanoma cells: A redox-related process. *Mol Cancer Ther.* 2002; 1: 197-204b

Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays* 2000; 22:442-451

Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, Schumacker PT. Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol* 2000; 165: 1013-1021

Chen D, Cui QC, Yang H, Dou QP. Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug and copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures and xenografts via inhibition of proteasome activity. *Cancer Research* 2006; 21: 10425-10433

Chen D, Daniel KG, Chen MS, Kuhn DJ, Landis-Piowar KR, Dou QP. Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. *Biochem Pharmacol.* 2005; 69: 1421-1432

Chen D, Frezza M, Schmitt S, Kanwar J, Dou QP. Bortezomib as first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets.* 2011; 11:239-253

Chen D, Chen MS, Cui QC, Yang H, Dou QP. Structure-proteasome-inhibitory activity relationships of dietary flavonoids in human cancer cells. *Front Biosci.* 2007; 12:1935-1945

Chong CR, Sullivan DJ. New uses for old drugs. *Nature* 2007; 448: 645-646

Chou AP, Maidment N, Klintonberg R, Casida JE, Li S, Fitzmaurice AG, Fernagut PO, Mortazavi F, Chesselet MF, Bronstein JM. Ziram causes dopaminergic cell damage by inhibiting E1 ligase of the proteasome. *J Biol Chem.* 2008;283:34696-34703

Coscoy L, Ganem D. PHD domains and E3 ubiquitin ligases: viruses make the connection. *Trends Cell Biol.* 2003;13: 7-12

Crosas B, John Hanna J, Kirkpatrick DS, Zhang DP, Tone Y, Hathaway NA, Buecker C, Leggett DS, Schmidt M, King RW, Gygi SP, Finley D. Ubiquitin chains are remodeled at the proteasome by opposing ubiquitin ligase and deubiquitinating activities. *Cell* 2006; 127: 1401-1413

Cusack JC: Rationale for the treatment of solid tumors with the proteasome inhibitor *Cancer Treat Rev.* 2003; 29: 21-31

Cvek Antabuse repurposing: We need more knowledge and wide international support. *Int J Cancer.* 2011;129: 1286-1287a

Cvek B. Targeting malignancies with disulfiram (Antabuse): multidrug resistance, angiogenesis, and proteasome. *Curr Cancer Drug Targets.* 2011; 11:332-337b

Cvek B. Antabuse (disulfiram) as a pilot case of nonprofit drug. *Int J Cancer.* 2010; 127:2486

Cvek B, Dvorak Z. Can the old drug, disulfiram, have a bright new future as a novel proteasome inhibitor? *Drug Discov Today.* 2008; 13: 716-722

- Cvek B, Dvorak Z. Targeting of nuclear factor- kappa-B and proteasome by dithiocarbamate complexes with metals. *Curr Pharm Des.* 2007; 13: 3155-3167
- Cvek B, Dvorak Z, Taraba J, Muller L, Vrzal R, Ulrichova J. Opposite effects of two zinc(II) dithiocarbamates on NF-kB pathway. *Nature precedings* 2007; doi:10.1038/npre.2007.735.1.
- Cvek B, Milacic V, Taraba J, Ping Dou Q. Ni(II), Cu(II), and Zn(II) Diethyldithiocarbamate complexes show various activities against the proteasome in breast cancer cells. *J Med Chem.* 2008; 51: 6256-6258
- DeGeorge JJ, Ahn CH, Andrews PA, Brower ME, Giorgio DW, Goheer MA, Lee-Ham DY,, McGuinn WD, Schmidt W, Sun CJ, Tripathi SC. Regulatory considerations for preclinical development of anticancer drugs. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1998;41:173-185
- DeMartino GN, Gillette TG, Proteasomes: Machines for All Reasons. *Cell* 2007; 129: 659-662
- De Waal YR, Thomas CM, Oei AL, Sweep FC, Massuger LF Secondary ovarian malignancies: frequency, origin, and characteristics. *Int J Gynecol Cancer.* 2009; 19:1160 - 1165
- Dijkmans BAC, Scheper RJ, Jansenl G. Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit β 5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein . *Blood* 2008; 6: 2489-2498
- Dimasi JA, Hansen RW , Grabowski GH. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ* 2003;22:151-185
- Dou PQ, Landis-Piowar KR, Chen D, Huo C, Wan SB, Chan TH. Green tea polyphenols as a natural tumour cell proteasome inhibitor. *Inflammopharmacology* 2008; 16: 208-212
- Dufour P, Lang JM, Giron C, Duclos B, Haehnel P, Jaeck D, Jung JM, Oberling F. Sodium ditiocarb as adjuvant immunotherapy for high risk breast cancer: a randomized study. *Biotherapy* 1993; 6: 9-12
- Drews O, Zong C, Ping P. Exploring proteasome complexes by proteomic approaches. *Proteomics* 2007; 7: 1047-1058
- Ea CK, Deng L, Xia ZP, Pineda G, Chen ZJ. Activation of IKK by TNF α requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Molecular cell* 2006; 2: 2545-2557
- Elliott PJ, Ross JS. The proteasome a new target for novel drug therapies. *Am J Clin Pathol.* 2001;116: 637-646
- Eneanya DI, Bianchine JR, Duran DO, Andresen, B. D. The actions of metabolic fate of disulfiram. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1981; 21: 575-596

Feling RH, Buchanan GO, Mincer TJ, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W. Salinosporamide A: A Highly Cytotoxic Proteasome Inhibitor from a Novel Microbial Source, a Marine Bacterium of the New Genus *Salinospira*. *Angew Chem*. 2003; 3: 355-357

Fenteany G, Schreiber SL. Lactacystin, proteasome function, and cell fate. *J Biol Chem*.1998; 15: 8545-8548

Förster A, Masters EI, Whitby FG, Robinson H, Hill CP. The 1.9 Å Structure of a Proteasome-11S Activator Complex and Implications for Proteasome-PAN/PA700 Interactions. *Mol Cell*. 2005; 18: 589-599

Fujita T, Washio K, Takabatake D, Takahashi H, Yoshitomi S, Tsukuda K, Ishibe Y, Ogasawara Y, Doihara H, Shimizu N. Proteasome inhibitors can alter the signaling pathways and attenuate the P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Int J Cancer Suppl*. 2005; 4: 670–682

Gallery M, Blank JL, Lin Y, Gutierrez JA, Pulido JC, Rappoli D, Badola S, Rolfe M, McBeth KJ. The JAMM motif of human deubiquitinase Pdh1 is essential for cell viability *Mol Cancer Ther*. 2007; 6: 262-268

Gallion HH, Pieretti M, DePriest PD, van Nagell JR. The molecular basis of ovarian cancer. *Cancer* 1995; 76: 1992-7

Gaval-Cruz M, Weinshenker D. Mechanisms of disulfiram-induced cocaine abstinence: antabuse and cocaine relapse. *Mol Interv*. 2009; 9: 175-187

Gayther SA, Mangion J, Russell P, Seal S, Barfoot R, Ponder BAJ, Stratton MR, Easton D. Variation of risks of breast and ovarian cancer associated with different germline mutations of the BRCA2 gene. *Nature Genetics* 1997;15: 103-105

Geser A, Brubaker G, Draper CC. Effect of a malaria suppression program on the incidence of african burkitt's lymphoma. *Am. J. Epidemiol*. 1989; 129: 740-752

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*.1998;16: 225-260

Ghosh S, Karin M. Missing Pieces in the NF-κB Puzzle. *Cell* 2002; 2: 81-96

Gilmore TD. Introduction to NF-κB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 2006; 25: 6680–6684

Glickman MH, Rubin DM, Coux O, Wifes I, Pfeifer G, Cjeka Z, Baumeister W, Fried VA, Finley D. A Subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* 1998; 5: 615-623

Guggenheim KY. Rudolf Schoenheimer and the Concept of the Dynamic State of Body Constituents. *J Nutr*.1991; 121: 1701-1704

Hadari T, Warms JV, Rose IA, Hershko A. A ubiquitin c-terminal isopeptidase that acts on polyubiquitin chains. Role in protein degradation. *J Biol Chem.* 1992; 267: 719-727

Hanna J, Hathaway NA, Tone Y, Crosas B, Elsasser S, Kirkpatrick DS, Leggett DS, Gygi SP, King RW, Finley D. Deubiquitinating enzyme Ubp6 functions noncatalytically to delay proteasomal degradation. *Cell* 2006; 127: 99-111

Hanna J, Meides A, Zhang DP, Finley D. A Ubiquitin Stress Response Induces Altered Proteasome Composition. *Cell* 2007;129: 747-759

Hanna TP, Kangolle ACT. Cancer control in developing countries: using health data and health services research to measure and improve access, quality and efficiency. *BMC Int Health Hum Rights* 2010; 10: 24

Harries M, Gore M. Part I: Chemotherapy for epithelial ovarian cancer—treatment at first diagnosis. *Lancet Oncol.* 2009; 9: 529-534

Harper JW, Schulman BA. Structural complexity in ubiquitin recognition. *Cell* 2006; 124: 1133-1136

Hartmann-Petersen R, Seeger M, Gordon C. Transferring substrates to the 26S proteasome. *Trends Biochem Sci.* 2003; 1: 26-31

Hatakeyama S, Yada M, Matsumoto M, Ishida N, Nakayama K. U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J Biol Chem.* 2001; 276: 33111-33120

Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell* 2008;3: 344-362

Hendil KB, Kriegenburg F, Tanaka K, Murata S, Lauridsen AM, Johnsen AH, Hartmann-Petersen R. The 20S Proteasome as an Assembly Platform for the 19S Regulatory Complex. *J Mol Biol.* 2009; 394: 320-328

Hershko A. The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle. *Cell Death Differ.* 2005; 12: 1191-1197

Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:425-479

Hershko A, Tomkins GM. Studies on the degradation of tyrosine aminotransferase in hepatoma cells in culture. Influence of the composition of the medium and adenosine triphosphate dependence. *J Biol Chem.* 1971;246 :710-714

Hideshima T, Anderson KC. Molecular mechanisms of novel therapeutic approaches for multiple myeloma. *Nature reviews cancer* 2002;12:927-937

Hideshima T, Mitsiades C, Akiyama M, Hayashi T, Chauhan D, Richardson P, Schlossman R, Podar K, Munshi NC, Mitsiades N, Anderson KC. Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. *Blood* 2003; 4: 1530-1534

Hideshima T, Ikeda H, Chauhan D, Okawa Y, Raje N, Podar K, Mitsiades C, Munshi NC, Richardson PG, Carrasco RD, Anderson KC. Bortezomib induces canonical nuclear factor-kappaB activation in multiple myeloma cells. *Blood*. 2009;114:1046-1052

Hochstrasser M. Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* 2009; 458: 422-429

Hoegge C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakis G, Jentsch S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 2002; 419: 135-141

Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol*. 2000; 19: 3-10

Hoppe T. Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends Biochem Sci*. 2005; 4: 183-187

Jandial DD, Farshchi-Heydari S, Larson CA, Elliott GI, Wrasidlo WJ, Howell SB. Enhanced delivery of cisplatin to intraperitoneal ovarian carcinomas mediated by the effects of bortezomib on the human copper transporter 1. *Clin Cancer Res*. 2009;15:553-560

Jariel-Encontre I, Bossis G, Piechaczyk M. Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. *Biochim Biophys Acta*. 2008;2:153-177.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. Cancer Statistics 2006. *CA Cancer J Clin* 2006; 56:106-130

Jin J, Li X, Gygi SP, Harper JW. Dual E1 activation systems for ubiquitin differentially regulate E2 enzyme charging. *Nature* 2007; 447:1135-1138

Jordan SJ, Purdie DM, Whiteman DC, Webb PM. Risk factors for epithelial ovarian cancer. *Cancer forum* 2003; 3:148-151

Jung L, Holle L, Dalton WS. Discovery, Development, and Clinical Applications of Bortezomib. *Oncology* 2004;18: 4-13

Karin M. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature* 2006; 441: 431- 436

Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutation Res*. 2001; 478: 23-43

Keates S, Hitti YS, Upton M, Kelly CP. Helicobacter pylori infection activates NF-kappa B in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 1997;4: 1099-1109

Keiser MJ, Setola V, Irwin JJ, Laggner C, Abbas AI, Hufeisen SJ, Jensen NH, Kuijter MB, Matos RC, Tran TB, Whaley R, Glennon RA, Hert J, Thomas KL, Edwards DD, Shoichet BK, Roth BL. Predicting new molecular targets for known drugs. *Nature* 2009; 462: 175-181

Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M. Modification of Proteins by

- Ubiquitin and ubiquitin-Like Proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006; 22: 159-80
- Kim CH, Kim JH, Moon SH, Hsu CH, Seo JT, Ahn YS. Biphasic effects of dithiocarbamates on the activity of nuclear factor- κ B. *Eur J Pharmacol.* 2000 392 133-136
- Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates *Chemistry & Biology* 2001;8: 739-758
- Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S. A Novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 1999 ;96:635-644
- Kohlmann S, Schäfer A, Wolf DH. Ubiquitin ligase Hul5 is required for fragment-specific substrate degradation in endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biol Chem.* 2008; 283:16374-16383
- Kona RF, Buac D, Burger MA. Disulfiram, and disulfiram derivatives as novel potential anticancer drugs targeting the ubiquitin-proteasome system in both preclinical and clinical studies. *Curr Cancer Drug Targets.* 2011;11: 338-46
- Kuhn DJ, Chen Q, Voorhees PM, Strader JS, Shenk KD, Sun CM, Demo SD, Bennett MK, van Leeuwen FWB, Chanan-Khan AA, Orlowski RZ. Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *Blood* 2007; 9: 3281-3290
- Kupryjańczyk J, Thor AD, Beauchamp R, Merritt V, Edgerton SM, Bell DA, Yandell DW. p53 gene mutations and protein accumulation in human ovarian cancer. *PNAS* 1993; 90: 4961-4965
- Knox KS, Adams JR, Djulbegovic B, Stinson TJ, Tomori C, Bennett CL. Reporting and dissemination of industry *versus* non-profit sponsored economic analyses of six novel drugs used in oncology. *Ann Oncol.* 2000; 11: 1591-1595
- Kona FR, Buac D, Burger AM. Disulfiram and disulfiram derivatives as a novel potential anticancer drug targeting the ubiquitin-proteasome system in both preclinical and clinical studies. *Curr Cancer Drug Targets.* 2011; 11:338-346
- Larsen CN, Krantz BA, Wilkinson KD. Substrate specificity of deubiquitinating enzymes: ubiquitin c-terminal hydrolases. *Biochemistry* 1998; 37: 3358-3368
- Laubach JP, Mahindra A, Mitsiades CS, Schlossman RL, Munshi NC, Ghobrial IM, Carreau N, Hideshima T, Anderson KC, Richardson PG. The use of novel agents in the treatment of relapsed and refractory multiple myeloma. *Leukemia* 2009; 23: 2222-2232
- Lee DH, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol.* 1998; 10: 397-403
- Lewis EF. Spontaneous regression of breast cancer. *Prog Clin Biol Res.* 1977; 12: 47-53

Li C, Wu D, Sun A, Miao M, Liu Y, Zhao Y, Hu X, Daoping Sun Primary clinical study on treatment with velcade for multiple myeloma. *Chin Ger J Clin Oncol.* 2007; 6/6: 579-581

Liu L, Yang C, Herzog C, Seth R, Kaushal GP. Proteasome inhibitors prevent cisplatin-induced mitochondrial release of apoptosis-inducing factor and markedly ameliorate cisplatin nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol.* 2010; 79:137-46.

Loo TW, Clarke DM. Blockage of drug resistance *in vitro* by disulfiram, a drug used to treat alcoholism. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92: 898-902.

Lövborg H, Oberg F, Rickardson L, Gullbo J, Nygren P, Larsson R, Inhibition of proteasome activity, nuclear factor-KappaB translocation and cell survival by the antialcoholism drug disulfiram. *Int J Cancer* 2006; 118:1577-1580

Lü S, Yang J, Song X, Gong S, Zhou H, Guo L, Song N, Bao X, Chen P, Wang J. Point Mutation of the Proteasome $\beta 5$ Subunit Gene Is an Important Mechanism of Bortezomib Resistance in Bortezomib-Selected Variants of Jurkat T Cell Lymphoblastic Lymphoma/Leukemia Line. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008; 326: 423-431

San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, Dimopoulos MA, Shpilberg O, Kropff M, Spicka I, Petrucci MT, Palumbo A, Samoilova OS, Dmoszynska A, Abdulkadyrov KM, Schots R, Jiang B, Mateos MV, Anderson KC, Esseltine DL, Liu K, Andrew Cakana A, Helgi van de Velde H, Richardson PG. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med* 2008; 359: 906-917.

Sauna ZE, Peng XH, Nandigama K, Tekle S, Ambudkar SV. The molecular basis of the action of disulfiram as a modulator of the multidrug resistance-linked ATP binding cassette transporters MDR1 (ABCB1) and MRP1 (ABCC1). *Mol Pharmacol.* 2004; 65: 675-684

Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences *Cell.* 1986; 46: 705-716

Schildkraut JM, Halabi S, Bastos E, Marchbanks PA, McDonald JA, Berchuck A. Prognostic factors in early-onset epithelial ovarian cancer: a population-based study. *Obstetrics & Gynecology.* 2000; 1: 119-127

Schubert U, Ott DE, Chertova EN, Welker R, Tessmer U, Princiotta MF, Binnick JR, Kräusslich HG, Yewdell JW. Proteasome inhibition interferes with Gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2. *PNAS* 2000; 24: 13057–13062

Sharon M, Taverner T, Ambroggio XI, Deshaies RJ, Robinson CV. Structural Organization of the 19S Proteasome Lid: Insights from MS of Intact Complexes. *PLoS Biol.* 2006; 4: 1314-1323a

Sharon M, Witt S, Felderer K, Rockel B, Baumeister W, Robinson CV, et al. 20S proteasomes have the potential to keep substrates in store for continual degradation. *J Biol Chem.* 2006; 281: 9569-9575b

Shembade N, Ma A, Harhaj EW. Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes.

I. Science 2010; 327: 1135-1139

Shiah SG, Kao YR, Wu FY, Wu CW. Inhibition of invasion and angiogenesis by zinc-chelating agent disulfiram. *Mol Pharmacol*. 2003; 64: 1076-1086.

Shirane M, Hatakeyama S, Hattori K, Nakayama K, Nakayama KI. Common pathway for the ubiquitination of I κ B α , I κ B β , and I κ B ϵ Mediated by the F-Box Protein FWD1. *J Biol Chem*. 1999; 274: 28169-28174

Shukla S, Sauna ZE, Prasad R, Ambudkar SV. Disulfiram is a potent modulator of multidrug transporter Cdr1p of *Candida albicans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004; 322: 520-525

Simon MM, Aragane Y, Schwarz A, Luger TA, Schwarz T. UVB Light Induces Nuclear Factor κ B (NF- κ B) Activity Independently from Chromosomal DNA Damage in Cell-Free Cytosolic Extracts. *Journal of investigative dermatology* 1994; 102: 422-427

Solomon VR, Lee H. Chloroquine and its analogs: A new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *European Journal of Pharmacology* 2009; 625: 220-233

Suh JJ, Pettinati HM, Kampman KM, O'Brien ChP. The status of disulfiram a half of a century later. *J Clin Psychopharmacol*. 2006; 3: 290-302

Suzuki Y, Fujii S, Tominaga T, Yoshimoto T, Yoshimura T, Kamada H. The origin of an EPR signal observed in dithiocarbamate-loaded tissues. Copper(II)-dithiocarbamate complexes account for the narrow hyperfine lines. *Biochim Biophys Acta*. 1997 ; 1335: 242-245.

Marchetti S, Schellens JHM. The impact of FDA and EMEA guidelines on drug development in relation to Phase 0 trials. *BJC* 2007; 97: 577-581

Marín I. Ancient origin of animal U-box ubiquitin ligases. *BMC Evol Biol*. 2010; 10:331doi:10.1186/1471-2148-10-331

Nagendra SN, Faiman MD, Davis K, Wu JY, Newby X, Schloss JV. Carbamoylation of brain glutamate receptors by a disulfiram metabolite. *J Biol Chem*. 1997; 272: 24247-24251

Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor- κ B inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nature reviews cancer* 2005; 5: 297-309

Nicoli SP, deFeudis P, Streponi I, Roato I, Ferracini R, Bussolati B, Camussi G, Jones-Bolin S, Hunter K, Zhao H, Neri A, Palumbo A, Berkers C, Ovaia H, Bernareggi A, Inghirami G. CEP-18770: A novel, orally active proteasome inhibitor with a tumor-selective pharmacologic profile competitive with bortezomib. *Blood* 2008; 5: 2765-2775

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108

Partidge EE, Barnes MN. Epithelial Ovarian Cancer: Prevention, Diagnosis, and Treatment. *CA Cancer J Clin*. 1999; 5: 297-320

Patel MB, Majetschak M. Distribution and interrelationship of ubiquitin proteasome pathway component activities and ubiquitin pools in various porcine tissues. *Physiol Res*. 2007; 56: 341-350

Piva R, Ruggeri B, Williams M, Costa G, Tamagno I, Ferrero D, Gai V, Coscia M, Peola S, Massaia M, Pezzoni G, Allievi C, Pescalli N, Cassin M, diGiovine Popat R, Oakervee H, Williams C, Cook M, Craddock C, Basu S, Singer C, Harding S, Foot N, Hallam S, Odeh L, Joel S, Cavenagh J. Bortezomib, low-dose intravenous melphalan, and dexamethasone for patients with relapsed multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2009; 144: 887-894

Potts BC, Albitar MX, Anderson KC, Baritaki S, Berkers C, Bonavida B, Chandra J, Chauhan D, Cusack JC, Fenical W, Ghobrial IM, Groll M, Jensen PR, Lam KS, Lloyd GK, McBride W, McConkey DJ, Miller CP, Neuteboom STC, Oki Y, Ovaa H, Pajonk F, Richardson PG, Roccaro AM, Sloss CM, Spear MA, Valashi E, Younes A, Palladino MA. Marizomib, a proteasome inhibitor for all seasons: preclinical profile and a framework for clinical trials. *Curr Cancer Drug Targets*. 2011; 11: 254-284

Tarcsa E, Szymanska G, Lecker S, O'Connor CM, Goldberg AL. Ca^{2+} -free calmodulin and calmodulin damaged by in vitro aging are selectively degraded by 26 S proteasomes without ubiquitination. *J Biol Chem*. 2000; 275: 20295-20301

Tasaki T, Mulder LCF, Iwamatsu A, Lee MJ, Davydov IV, Varshavsky A, Muesing M, Kwon YT. A Family of mammalian E3 ubiquitin ligases that contain the UBR box motif and recognize N-degrons. *Mol Cell Biol*. 2005;16: 7120-7136

Tung KH, Goodman MT, Wu AH, McDuffie K, Wilkens LR, Kolonel LN, Nomura AMY, Terada KY, Carney ME, Sobin LH. Reproductive Factors and Epithelial Ovarian Cancer Risk by Histologic Type: A Multiethnic Case-Control Study. *Am. J. Epidemiol*. 2003; 7: 629-638

Rabinowitz M, Fisher JM. Characteristic of inhibition of hemoglobin synthesis in rabbit reticulocytes by threo-alpha-amino-betachlorobutyric acid. *Biochim. Biophys. Acta* 1964; 91: 313-322

Ramirez PT, Landen CN, Coleman RL, Milam MR, Levenback C, Johnston TA, Gershenson DM. Phase I trial of the proteasome inhibitor bortezomib in combination with carboplatin in patients with platinum- and taxane-resistant ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2008; 1: 68-71

Reuther, J, Reuther, G, Cortez, D, Pendergast, AM, Baldwin, A. A requirement for NF- κ B activation in Bcr-Abl-mediated transformation. *Genes Development* 1998; 12: 968-981

Velde H, Richardson PG. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med* 2008; 359: 906-917

Verma U, Sharma R, Gupta P, Kapoor B, Bano G, Sawhney V. New uses for old drugs: Novel therapeutic options. *Indian J Pharmacol* 2005; 5: 279-287

Vissers JHA, Nicassio F, van Lohuizen M, Di Fiore PP, Citterio E The many faces of ubiquitinated histone H2A: insights from the DUBs. *Cell Div*. 2008; 3: 8doi:10.1186/1747-1028-3-8

Wagenblast J, Hambek M, Baghi M, Gstöttner W, Strebhardt K, Ackermann H, Knecht R. Antiproliferative activity of bortezomib alone and in combination with cisplatin or docetaxel in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008; 134:323–330

Wang J, Maldonado MA. The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol*. 2006; 3: 255–261

Welsh PL, King MC. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet*. 2001; 10/ 7: 705-713

Wickström M, Danielsson K, Rickardson L, Gullbo J, Nygren P, Isaksson A, Larsson R, Lövborg H. Pharmacological profiling of disulfiram using human tumor cell lines and human tumor cells from patients. *Biochem Pharmacol*. 2007; 1: 25-33

Wilkinson KD, Tashayev VL, O'Connor LB, Larsen CN, Kasperek E, Pickarts CM. Metabolism of the polyubiquitin degradation signal: structure, mechanism, and role of isopeptidase T. *Biochemistry* 1995; 34: 14535-14546

Wolf DH. From lysosome to proteasome: the power of yeast in the dissection of proteinase function in cellular regulation and waste disposal. *Cell Mol Life Sci*. 2004; 61: 1601-1614

Wollenberg K, Swaffield JC. Evolution of Proteasomal ATPases. *Mol Biol Evol*. 2001; 18: 962-974

Xia YF, Li-Ping Liu LP, Zhong CP, Geng JG. NF- κ B activation for constitutive expression of VCAM-1 and ICAM-1 on B lymphocytes and plasma cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2001; 289: 851-856

Yip NC, Fombon IS, Liu P, Brown S1, Kannappan V, Armesilla AL1, Xu B, Cassidy J, Darling JL, Wang W. Disulfiram modulated ROS–MAPK and NF κ B pathways and targeted breast cancer cells with cancer stem cell-like properties. *Br J Cancer*. 2011; 104: 1564 –1574

Zhang Z, Zhang R. Proteasome activator PA28c regulates p53 by enhancing its MDM2-mediated degradation. *EMBO J*. 2008; 27: 852-64

Zhu P, Zhou W, Wang J, Puc J, A. Ohgi KA, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Glass CK, Rosenfeld MG. A Histone H2A Deubiquitinase complex coordinating histone acetylation and H1 dissociation in transcriptional regulation. *Mol Cell*. 2007; 27: 609-621

Zorn KK, Tian C, McGuire WP, Hoskins WJ, Markman M, Muggia FM, Rose PG, Ozols RF, Spriggs D, Armstrong DK. The prognostic value of pretreatment CA 125 in patients with advanced ovarian carcinoma. *Cancer* 2009; 5: 1028-1035

14 WEBOVÉ ODKAZY

Nobelprize.org [online]. 6,10,2004 [cit. 2011-04-09]. The Nobel Prize in Chemistry 2004.

Dostupné z WWW:

<http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2004/press.html#>.