



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Laboratoř růstových regulátorů**

**Příprava reportérové buněčné eseje pro vysokokapacitní  
testování malých molekul jako potenciálních inhibitorů  
receptoru pro produkty pokročilé glykace proteinů**

## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

<b>Autor:</b>	<b>Ivana Reiterová</b>
<b>Studijní program:</b>	<b>B1501 Experimentální biologie</b>
<b>Studijní obor:</b>	<b>Experimentální biologie</b>
<b>Forma studia:</b>	<b>Prezenční</b>
<b>Vedoucí práce:</b>	<b>Mgr. Ivo Frydrych, Ph.D.</b>
<b>Termín odevzdání práce:</b>	<b>2017</b>

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora	Ivana Reiterová
Název práce	Příprava reportérové buněčné eseje pro vysokokapacitní testování malých molekul jako potenciálních inhibitorů receptoru pro produkty pokročilé glykace proteinů
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav molekulární a translační medicíny
Vedoucí práce	Mgr. Ivo Frydrych, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2017
Klíčová slova	RAGE receptor, RAGE signalizace, A549 buňky, transdukce, vysokokapacitní skríníng
Počet stran	69
Počet příloh	1 (CD)
Jazyk	Český

## **Abstrakt**

Jednou z nejnovějších technik pro objevování nových léků ve farmaceutickém průmyslu je vysokokapacitní skríníng. Mezi jeho přednosti oproti jiným metodám patří reprodukovatelnost, jednoduchost, miniaturizace, automatizace a vysoká účinnost. V této práci byly připraveny NF- $\kappa$ Ba FLuc responsivní reportérové buněčné eseje odvozené od linie lidského plicního karcinomu pro testování potenciálních inhibitorů receptoru pro produkty pokročilé glykace proteinů (RAGE). Byly testovány nízkomolekulární látky z komerčně dostupné chemické knihovny Lopac90. Literárně popsané inhibitory RAGE, Azeliragon a FPS-ZM1, byly použity jako pozitivní kontroly. RAGE signalizace je zapojena do některých patologických onemocnění, ve kterých bývá exprese receptoru výrazně zvýšená. RAGE tak představuje atraktivní terapeutický cíl.

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname	Ivana Reiterová
Title of thesis	Preparation of cell-based reporter assay for high-throughput screening of small molecules as potential receptor for advanced glycation endproducts inhibitors
Type of thesis	Master
Department	Institute of molecular and translational medicine
Supervisor	Mgr. Ivo Frydrych, Ph.D.
The year of presentation	2017
Keywords	RAGE receptor, RAGE signaling, A549 cells, transduction, high-throughput screening
Number of pages	69
Number of appendices	1 (CD)
Language	Czech

## **Abstract**

High-throughput screening (HTS) is one of the latest techniques commonly used for drug discovery in the pharmaceutical industry. Compared with other methods of drug screening HTS has as its advantages reproducibility, simplicity, miniaturization, automation and high efficiency. This thesis deals with the preparation of NF- $\kappa$ B and FLuc cell-based reporter assay derived from the lung carcinoma cell line for testing potential inhibitors of receptor for advanced glycation end products (RAGE). Small molecules from a commercially available chemical library, Lopac90 have been tested. A previously described RAGE inhibitors, Azeliragon and FPS-ZM1, have been used as positive controls in the study. RAGE signaling is involved in some pathogenic diseases in which the receptor is over expressed. This makes RAGE an attractive therapeutic target.

“Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením Mgr. Ivem Frydrychem, Ph.D. s použitím citované literatury.“

V Olomouci dne

#### Poděkování:

Ráda bych poděkovala především mému vedoucímu diplomové práce Mgr. Ivovi Frydrychovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a zvláště za trpělivost a čas, který mi při řešení této práce věnoval. Dále bych chtěla poděkovat zaměstnancům Laboratoře experimentální medicíny při Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské Fakulty v Olomouci.

„Práce byla podpořena projektem MŠMT (Národní program udržitelnosti, LO1304)“

## Obsah

Seznam zkratk	8
1 ÚVOD	10
2 CÍLE	11
3 TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1 RAGE	12
3.1.1 Struktura	12
3.1.2 Izoformy RAGE	13
3.1.4 RAGE signální dráhy	16
3.1.5 RAGE v patogenezi onemocnění a zánětu	18
3.1.6 Regulace a funkce RAGE v nádorech	21
3.1.7 Inhibitory RAGE	22
3.1.8 RNA interference	25
3.2 Reportérové geny	26
3.2.1 Světlušková luciferáza	27
3.3 Vysokokapacitní skrínig (high-throughput screening)	27
3.4 Reprofilování léčiv	28
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
4.1 Materiál	30
4.1.1 Seznam přístrojů a vybavení	30
4.1.2 Použité chemikálie	30
4.1.3 Použité roztoky	31
4.1.4 Kultivační média	32
4.1.5 Použitý biologický materiál	32
4.1.6 Protilátky	32
4.1.7 RAGE ligandy	33
4.1.8 Testované látky	33

4.2	Metody .....	34
4.2.1	Kultivace buněčných linií .....	34
4.2.2	Western blot .....	35
4.2.3	Detekce RAGE metodou průtokové cytometrie .....	36
4.2.4	Transdukce linie A549 lentivirovými reportéry (NF- $\kappa$ B-FLuc a FLuc) ... .....	37
4.2.5	Selekce transdukovaných buněk a příprava klonů .....	38
4.2.6	Validace klonů .....	39
4.2.7	Testování RAGE ligandů v koncentrační a časové závislosti.....	39
4.2.8	Testování komerčních RAGE inhibitorů .....	40
4.2.9	Testování knihovny Lopac90 na NF- $\kappa$ B responsivní reportérové buněčné eseji .....	40
4.2.10	Testování knihovny Lopac90 na FLuc responsivní reportérové buněčné eseji .....	41
4.2.11	Luciferasová enzymatická <i>in vitro</i> esej.....	41
5	VÝSLEDKY .....	42
5.1	Vyhodnocení western blotu.....	42
5.2	Vyhodnocení průtokové cytometrie .....	43
5.3	Výsledky testování RAGE ligandů v časové a koncentrační závislosti.....	44
5.4	Vyhodnocení komerčních RAGE inhibitorů.....	47
5.5	Vyhodnocení testování knihovny Lopac90 na NF- $\kappa$ B responsivní reportérové buněčné eseji.....	49
5.6	Testování knihovny Lopac90 na FLuc responsivní reportérové buněčné eseji .....	51
5.7	Luciferasová enzymatická <i>in vitro</i> esej .....	53
6	DISKUZE .....	55
7	ZÁVĚR.....	57
8	LITERATURA .....	58

## Seznam zkratek

A $\beta$	$\beta$ -amyloid
AGEs	advanced glycation end products; produkty pokročilé glykace proteinů
AMP	adenosin monophosphate; adenosinmonofosfát
AP-1	activator protein 1; proteinový aktivátor 1
APS	ammonium persulfate; persíran amonný
ATP	adenosine triphosphate, adenosintriosfát
Bcl-2	B-cell lymphoma 2; anti-apoptický gen
BSA	bovine serum albumine; hovězí sérový albumin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
Erk1/2	extracellular signal-regulated kinase 1/2; extracelulární signál regulující kináza 1/2
FCS	fetal calf serum, fetální hovězí sérum
FLuc	reporter firefly luciferase from <i>Photinus pyralis</i> ; reportér světluškové luciferázy z <i>Photinus pyralis</i>
HIF-1 $\alpha$	hypoxia-inducible factor 1; hypoxií indukovaný faktor 1
HMGB1	High Mobility Group Box, amfoterin
JAK	Janus kinase; Janusova kináza
LPS	lipopolysacharid
LUC	světlušková luciferáza
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase, mitogenem aktivovaná protein Kinasa
MEM	Minimum Essential Medium
MFI	medián intenzity fluorescence
m-RNA	messenger RNA, mediátorová RNA
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor Kappa B, nukleární faktor kappa B
NK buňky	Natural Killer Cells, přirození zabíječi
PBS	Phosphate Buffered Saline, fosfátový pufr
RAGE	Receptor for Advanced Glycation End Products, receptory pro AGEs



RIPA buffer	Radioimmunoprecipitation assay buffer; lyzační pufr pro Western blot
RLA	relativní luciferásová aktivita
SDS -PAGE	sodium dodecyl sulphate- $\gamma$ lyacrylamide gel electrophoresis; elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS
sRAGE	soluble RAGE; rozpustná forma RAGE
Stat3	signal transducer and activator of transcription 3; přenašeč signálu a aktivátor transkripce 3
TBS	Tris-Buffered saline; Tris pufr obsahující chlorid sodný
TEMED	tetramethylethyldiamin
TLR9	Toll-like receptor 9

## 1 ÚVOD

Tato diplomová práce se v teoretické části zabývá problematikou RAGE receptoru. Tento multiligandový receptor je zapojen nejen ve fyziologických procesech podílejících se na udržení homeostázy, ale také hraje také důležitou roli v mnoha patologických stavech jako je např. Alzheimerova choroba, cukrovka, rakovina apod. Jeho exprese v postižených tkáních je velmi vysoká. Mnohá studie dokazují, že zamezení interakce RAGE s jeho ligandy vede ke zmírnění či utlumení příznaků onemocnění. RAGE receptor proto představuje poměrně atraktivní terapeutický cíl.

Předmětem experimentální části bylo připravit reportérovou buněčnou esej odvozenou od linie lidského plicního karcinomu pro HTS testování potenciálních RAGE inhibitorů.

## 2 CÍLE

- Vypracování literární rešerše na danou problematiku.
- Osvojení základních technik práce v laboratoři tkáňových kultur a vybraných molekulárně biologických metod.
- Transdukce vybrané nádorové buněčné linie lentivirovým reportérovým vektorem.
- Selektce a validace klonů.
- Testování komerční knihovny Lopac90 na vybraném klonu.
- Zpracování výsledků a sepsání diplomové práce.

### 3 TEORETICKÁ ČÁST

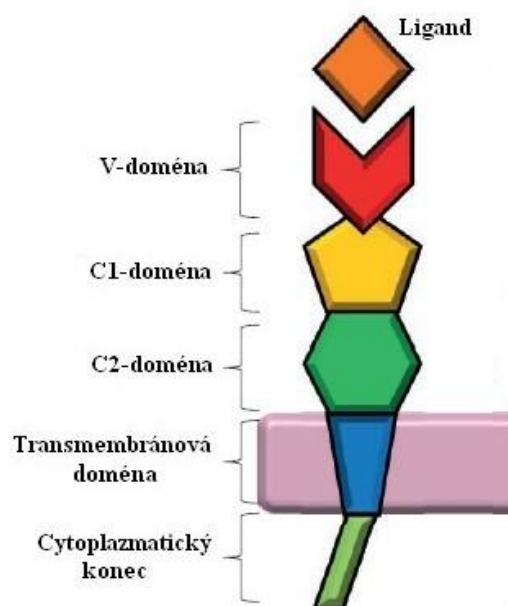
#### 3.1 RAGE

RAGE (receptor for advanced glycation end product) je transmembránový receptor, patřící k nadčeledi imunoglobulinových receptorů, kterou poprvé popsal v roce 1992 Neeper *et al.* RAGE váže produkty pokročilé glykace (AGEs) (Chuah *et al.* 2013) a je tak klíčovou molekulou v celé řadě patologických stavů včetně diabetes mellitus, chronických zánětů, aterosklerózy či rakoviny.

RAGE je během vývoje organismu vysoce exprimován a to zejména v mozku. V dospělosti je však jeho exprese regulována a indukována kumulací ligandů a zánětlivých mediátorů (Huttunen *et al.* 1999). Nízká úroveň exprese byla nalezena v neuronech, buňkách hladkého svalstva, mononukleárních fagocytech, hepatocytech a srdečních myocytech (Brett *et al.* 1993). Výjimkou je plicní tkáň, kde dochází v dospělosti k vysoké expresi, ale přesná funkce zatím není známa.

##### 3.1.1 Struktura

Tento multiligandový receptor seskládá z jedné hydrofóbní transmembránové domény, cytosolické domény, nezbytné pro intracelulární signalizaci (Schmidt *et al.* 2001) a extracelulární části. Extracelulární oblast RAGE receptoru se skládá z C1, V domény, které jsou hlavním místem interakce mezi RAGE a potenciálními ligandy a jedné C2 domény (Dattilo *et al.* 2007; Ostendorp *et al.* 2007). Schéma RAGE je zobrazeno na obrázku 1.

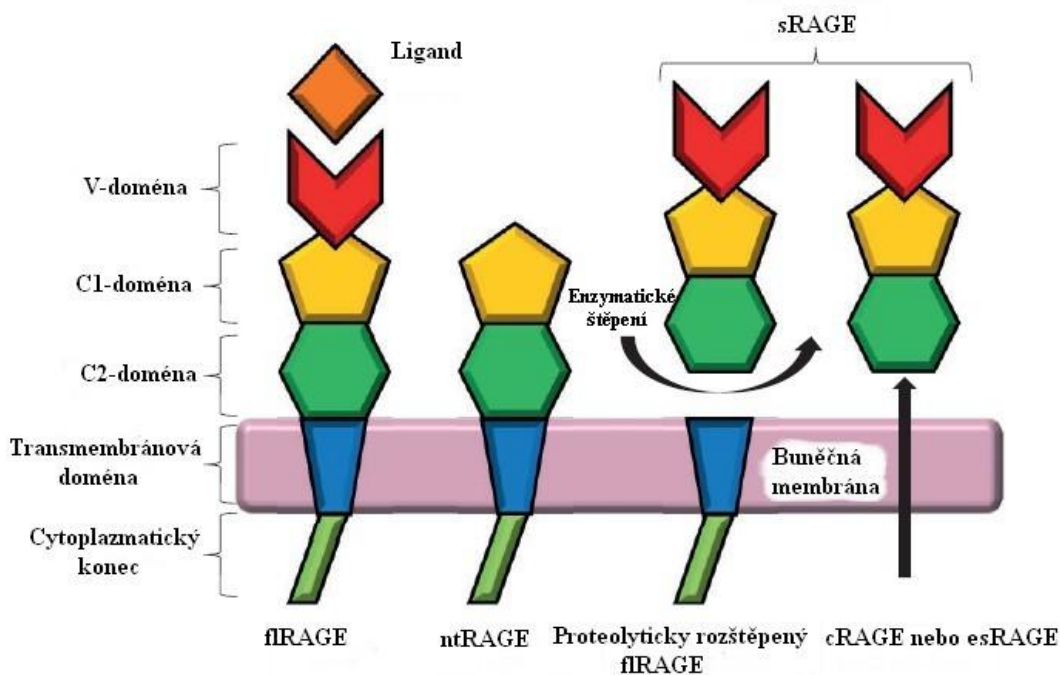


**Obr 1:** Schéma RAGE receptoru. C: konstantní; V: variabilní. Převzato a upraveno podle Chuah *et al.* 2013.

### 3.1.2 Izoformy RAGE

RAGE receptor se skládá z extracelulární, transmembránové a cytosolové domény, takovému se říká full-length RAGE (fl-RAGE). Na úrovni DNA se gen RAGE skládá z 11 intronů/exonů, které mohou alternativním sestřihem vytvářet různé varianty (Sugaya *et al.* 1994). Celkem existuje devatenáct přirozeně se vyskytujících sestřihových variant pro lidský RAGE, identifikovaných na úrovni proteinů a mRNA (Sterenczak *et al.* 2013).

Izoformy se vyznačují zkrácením N nebo C-konce. Endogenní sekreční RAGE (esRAGE, RAGEv1) nebo cRAGE jsou rozpustné formy, označované jako sRAGE (soluble RAGE). Mají stejné V a C typy extracelulární oblasti jako fl-RAGE, ale chybí jim cytosolová a transmembránová doména (Hanford *et al.* 2004). Alternativním sestřihem mRNA v exonu 9 vzniká esRAGE a proteolytickým štěpením fl-RAGE na povrchu buněk cRAGE. Izoformy jsou znázorněny na obr. 2 a dále popsány v textu.



**Obr. 2:** Schematické znázornění flRAGE a jeho sestřihových variant. Převzato a upraveno podle Chuah *et al.* 2013.

#### 3.1.1.1 esRAGE

esRAGE je rozpustná izoforma genu RAGE a postrádá tak transmembránovou doménu. esRAGE může interagovat s ligandy RAGE. Zvýšená sRAGE se vyskytuje u bronchoalveolární laváže v plazmě a poškozené plicní tkáni (Mukherjee *et al.* 2008).

### 3.1.2.2 cRAGE

cRAGE vzniká proteolytickým štěpením fl-RAGE prostřednictvím metaloproteinázy nazvané ADAM 10 (Raucci *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2008).

### 3.1.2.3 ntRAGE (N-truncated RAGE)

ntRAGE obsahuje intron 1, nový stop kodon stejně jako intron 9, což vede ke ztrátě obou exonů. Tato izoforma je identická s fl-RAGE, jen postrádá V typ extracelulární domény a tím je výrazně snížena schopnost vázat RAGE ligandy (Yonekura *et al.* 2003). ntRAGE může komunikovat s jinými molekulami a zasahovat do normálních funkcí, které mohou být nezávisle na signalizaci zprostředkované typickými RAGE ligandy.

### 3.1.3 RAGE ligandy

RAGE patří do skupiny receptorů rozeznávající molekulární vzory (pattern-recognition receptor), takže lépe rozeznává společné rysy jako je  $\alpha$ -helix nebo  $\beta$ -struktura než specifickou primární sekvenci (Schmidt *et al.* 2001). RAGE byl objeven jako receptor pro AGEs, později se však zjistilo, že váže i jiné ligandy jako jsou S100 proteiny, Amyloid  $\beta$  a HMGB1. Aktivace RAGE spouští celou řadu buněčných signálních drah, které regulují důležité buněčné funkce, včetně proliferace, přežití, migrace, pohyblivosti, a invazivité. Z tohoto důvodu jsou RAGE a RAGE ligandy potenciálními cíli pro léčbu rakoviny.

#### 3.1.3.1 AGEs (produkty pokročilé glykace proteinů)

AGEs je heterogenní skupina RAGE ligandů odvozených od kondenzačních a oxidačních procesů mezi proteiny/peptidy s cukry (Garlick *et al.* 1984). Prvním krokem při tvorbě AGEs je nespecifická reakce cukru pomocí jejich funkční aldehydové skupiny a aminové nebo guanidinové skupiny lyzinových nebo argininových zbytků proteinu. Tento nespecifický a neenzymatický proces se nazývá glykace. Zvýšené hladiny glykovaných bílkovin jsou pozorovány u stárnoucích osob a pacientů s diabetem (Toth *et al.* 2006).

AGEs se k RAGE váží s vysokou afinitou a zahajují tak aktivaci prozánětlivé signalizační kaskády. Aktivace RAGE pomocí AGEs je příčinou závažných komplikací diabetu včetně aterosklerózy, kardiovaskulárních onemocnění (Yan *et al.* 2009), nefropatie (Penfold *et al.* 2010) a chronického zánětu (Riehl *et al.* 2010).

#### 3.1.3.2 S100 proteiny

U lidí existuje až 25 různých ligandů patřící mezi S100 proteiny. Jedná se o malé molekuly s kyselým charakterem a se dvěma místy schopnými vázat vápník. Většina S100 proteinů tvoří homodimery, ale existují i ve formě heterodimerů a oligomerů (Ostendorp *et al.*

2007). Skupina S100 proteinů je charakterizována širokou diverzifikací, která se odráží v různých funkcích, expresi a časoprostorovém rozložení v buňce. Většina S100 proteinů je lokalizováno v cytoplazmě buněk, kde působí jako citlivé senzory vápníku. Existují však i typy, které se výhradně vyskytují v extracelulárním prostoru a mají vlastnosti podobné cytokininů. Vazba vápníku na S100 proteiny indukuje konformační změnu, mění se dostupnost hydrofobních zbytků a povrchový náboj. V extracelulárním prostoru jsou vysoké koncentrace vápníku vedoucí k vazbě na S 100 a to je nezbytným předpokladem pro vazbu na RAGE (Leclerc *et al.* 2009). Extracelulární S100 proteiny tvoří oligomery, které jsou považovány za zásadní pro jejich vlastnosti podobné cytokinům. *In vivo* nebo *in vitro* interagují s RAGE tyto proteiny: S100B, S100P, S100A1, S100A2, S100A4, S100A5, S100A6, S100A7, S100A8/A9, S100A12 a S100A13. Vykazují různou afinitu a vyvolávají různé buněčné odpovědi např. S100A5, S100A6 a S100P může podporovat růst nádoru (Fritz *et al.* 2011).

### 3.1.3.3 Amyloid $\beta$

Charakteristickým znakem v iniciaci a progresi Alzheimerovy choroby je extracelulární depozice nerozpustných extracelulárních agregátů amyloidních  $\beta$  peptidů v mozkové tkáni. K tvorbě těchto plaků dochází proteolytickým štěpením prekursoru amyloidu ve dvou isoformách o velikosti 40 a 42 aminokyselinových zbytků, kdy obě mají sklon k agregaci a tvorbě amyloidových vláken a později plaků (Haupt *et al.* 2011)

### 3.1.3.4 HMGB1

Nedávný výzkum ukázal, že HMGB1 má extracelulární regulační funkci a působí jako prozánětlivý aktivátor (Bianchi, Manfredi 2007). HMGB1 se skládá ze dvou N-koncových domén, které se podílejí na vazbě DNA a jedné C-koncové domény na kterou se váže RAGE (Banerjee *et al.* 2010).

HMGB1 se podílí na různých biologicky důležitých procesech včetně transkripce, opravy DNA, diferenciaci, nervového vývoje a extracelulární signalizace. Jeho potenciální role v rakovině byly nedávno přezkoumány. HMGB1 jako jaderný protein se váže k vedlejšímu žlábků DNA a usnadňuje tak vazbu specifických DNA proteinů, jako je p53, v jejich přirozených vazebných místech v chromatinu (Thomas 2001). HMGB1 může být také secernován aktivovanými zánětlivými buňkami nebo může být uvolněn z nekrotických či apoptických buněk (Scaffidi *et al.* 2002) a může působit jako extracelulární cytokin (Lotze, Tracey 2005). Po uvolnění z poškozených buněk, bylo zjištěno, že HMGB1 působí jako "nekrotický marker" používaný imunitním systémem

k rozpoznání poškozené tkáně, iniciaci reparativní odpovědi a podpoření maturace lymfocytů (Ulloa, Messmer 2006). Extracelulární HMGB1 tak působí jako silný prozánětlivý cytokin, čímž přispívá k patogenezi celé řady zánětlivých onemocnění.

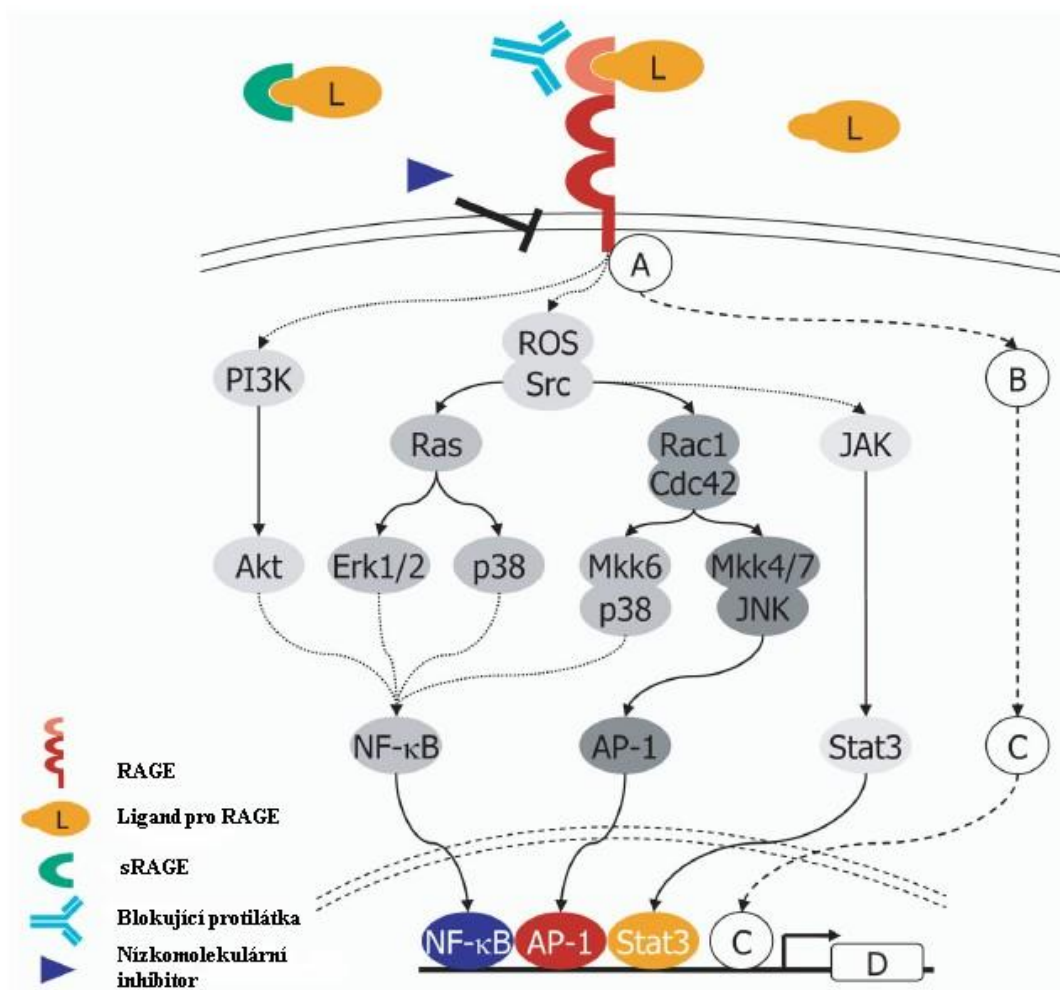
HMGB1 má několik efektů, které zvyšují agresivitu rakoviny. Je zapojen do účinku metastatické kaskády, čímž stimuluje metastáze (Evans *et al.* 2004) dále bylo zjištěno, že jeho nadměrná exprese je spojena s nižší úrovní pro-apoptotických genů a zvýšenou hladinou anti-apoptotických genů a tím ovlivňuje přežití rakovinných buněk (Brezniceanu *et al.* 2003).

RAGE byl první známý receptor pro HMGB1, bylo pozorováno, že tyto dvě molekuly ko-lokalizují ve vyvíjejícím se mozku potkanů a jejich interakce zprostředkovává růst neuritů (Hori *et al.* 1995). Nedávná studie prokázaly, že blokování signalizační kaskády mezi HMGB1 a RAGE snižuje růst nádor a metastáz v buňkách gliomu (Taguchi *et al.* 2000) V této studii byly buňky krysího glioblastomu (C6) stabilně transfekované s mutovanými RAGE konstrukty a injektovány do bezsrstých myší. *In vitro* byl zřetelně snížen růst nádorů a metastáz, *in vivo* bylo ukázáno, že blokování HMGB1-RAGE interakce snižuje buněčnou proliferaci, migraci a invazi.

#### **3.1.4 RAGE signální dráhy**

RAGE je multifunkční receptor, který interaguje s celou řadou ligandů a zprostředkovává tak odpověď na poškození buněk a stresové podmínky. Aktivuje programy odpovědné za akutní a chronický zánět, je zapojen do řady patologických onemocnění, včetně diabetických komplikací, mrtvice, aterosklerózy, artritidy a neurodegenerativních poruch. RAGE signalizace je poměrně komplexní a zahrnuje např. JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription), Erk 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2), Cdc42/Rac1 (Cell Division Cycle 42/Ras Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1), SAPK/JNK (Stress Activated Protein Kinase/c-Jun NH2-Terminal Kinase), MAPK (p38 Mitogen-Activated Protein Kinase) (Fritz *et al.* 2011). Signální dráhy vedou k aktivaci cílových transkripčních faktorů (NF- $\kappa$ B, AP-1, STAT3), které spouští expresi genů podílejících se na regulaci proliferace, zánětu nebo buněčné smrti. Jak je patrné ze schématu signalizace (Obr. 3), velká část signálních drah konverguje na úrovni transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B, který patrně sehrává klíčovou úlohu v odpovědi buňky na vazbu RAGE ligandů.





**Obr. 3:** RAGE signalizace. Plná čára signalizuje přímou aktivaci, přerušovaná čára nepřímou aktivaci. Převzato a upraveno podle Riehl *et al.* 2009.

Legenda: AP-1 – proteinový aktivátor 1, Cdc42 – protein regulující dělení buněk, Erk 1/2 – extracelulární signál-regulující kináza 1/2, JAK – Janusova kináza, JNK – c-Jun N-terminální kináza, MAPK – mitogenem aktivovaná protein kináza, MKK – mitogenem aktivovaná protein kináza kináza, NF-κB – nukleární faktor kappa B, PI3K – fosfatidylinositol-3-kináza, Rac1 – Ras-příbuzný C3 botulotoxin substrát 1, ROS – reaktivní formy kyslíku, Stat3 – přenašeč signálu a aktivátor transkripce 3. pro translaci extracelulárního signálu do transkripční odpovědi. (Rawlings *et al.* 2005).

### 3.1.4.1 Signální dráha NF-κB

Nukleární faktor kappa B (NF-κB) je skupina transkripčních faktorů, které se váží na promotory RNA polymerázy II a tím ovlivňují expresi genů důležitých pro imunitu, zánětlivou odpověď, buněčný růst a buněčnou smrt, embryonální vývoj a další procesy. Bylo zjištěno, že NF-κB dráha může být aktivována extracelulárně ligandy,

prostřednictvím členů TNFR (receptor for tumor necrosis factor), TLR (Toll-like receptor) a IL-1R (interleukin-1 receptor) nebo intracelulárně a to reakcí na poškozenou DNA, reaktivními formami kyslíku či rozpoznáním intracelulárních patogenů zprostředkované NOD a RIG-I-like (NLR) proteiny.

Základní prvky NF- $\kappa$ B dráhy jsou IKK komplex, I $\kappa$ B proteiny a NF- $\kappa$ B dimery. Řada meziproductů, rodina RIP a TRAF proteinů, které slouží pro aktivaci IKK komplexu jsou společné pro odlišné dráhy. TRAF proteiny se účastní kanonické a nonkanonické dráhy, zatímco RIP proteiny se účastní v NEMO-závislých kanoických drahách. Nárok pro RIP proteiny vyzdvihuje dvě zcela odlišné mechanismy zahájení NF- $\kappa$ B signalizace: asociativní a agregátní.

Inaktivace dráhy vyžaduje deaktivaci IKK komplexu, resyntézu I $\kappa$ B proteinů a přemístění NF- $\kappa$ B dimerů z obou stran DNA a transkripční koaktivátory.

Intracelulární signalizace RAGE vede k aktivaci prozánětlivého transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B, později aktivován jako část obrany první buněčné linie (Bierhaus *et al.* 2001). Za normálních okolností je NF- $\kappa$ B umístěn v cytoplazmě v neaktivní formě vázaný s molekulou inhibitoru I $\kappa$ B $\alpha$ . Po aktivaci je I $\kappa$ B $\alpha$  rychle fosforylován a degradován, to vede k uvolnění a translokaci NF- $\kappa$ B (přednostně NF- $\kappa$ B-heterodimer p50/p65) do jádra. V návaznosti na nukleární translokaci se NF- $\kappa$ B váže na decamerickou DNA sekvenci a aktivuje transkripci NF- $\kappa$ B regulované cílovými geny, jako jsou cytokiny, adhezní molekuly, protrombotické a vazokonstrikční genové produkty, dále aktivuje RAGE a I $\kappa$ B $\alpha$  (Barnes, Karin 1997). Pod kontrolou transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B je také řada anti-apoptických genů, včetně Bcl-XL, Bcl-2 a Bcl-2 homology A1 (Li, Schmidt 1997). Proto aktivace NF- $\kappa$ B umožňuje rychlou a citlivou buněčnou odpověď v nepřítomnosti syntézy nových proteinů, které podporují přežití buněk. Jednou z unikátních vlastností aktivace RAGE prostřednictvím NF- $\kappa$ B je prodloužení doby dráhy, což přemůže endogenní autoregulační inhibici zpětné vazby. Aktivace NF- $\kappa$ B po ligaci RAGE je zahájena degradací I $\kappa$ B $\alpha$  a I $\kappa$ B $\beta$ , následuje nová syntéza NF- $\kappa$ Bp65 v přítomnosti nově syntetizované I $\kappa$ B $\beta$  (Bierhaus *et al.* 2001).

### **3.1.5 RAGE v patogenezi onemocnění a zánětu**

Vzestup exprese RAGE byl pozorován v celé řadě akutních a chronických zánětlivých onemocnění jako jsou ateroskleróza (arterioskleróza), revmatoidní artritida, vaskulitida, chronické renální onemocnění a mnoho dalších (Bierhaus *et al.* 2006).

RAGE se exprimuje ve většině buněk imunitního systému například v monocytech, makrofázích, neutrofilech, dendritických buňkách a T a B lymfocytech (Collison *et al.* 2002). RAGE je také exprimován v endotelových buňkách, kde působí jako adhezni receptor pro leukocyty k interakci s  $\beta 2$  integrinem Mac-1. Tato interakce je indukována prozánětlivými RAGE ligandy (Chavakis *et al.* 2003). Většina extracelulárních ligandů, jež aktivují signalizaci RAGE jsou funkčně spojeny s akutní a chronickou imunitní odpovědí (Gebhardt *et al.* 2006). Zapojení RAGE indukuje aktivaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B a některé z jeho cílových genů, které jsou dobře známé jako regulátory adaptivního a vrozeného imunitního systému (Bierhaus *et al.* 2005). U normálních dospělých tkání s výjimkou plic je exprese RAGE velice nízká až žádná, kdežto v případě stresových a patologických stavů se exprese tohoto receptorů výrazně zvyšuje (Brett *et al.* 1993). To je dáno tím, že RAGE vykazuje vazebné místo NF- $\kappa$ B v jeho proximálním promotoru a je přímým cílovým genem v NF- $\kappa$ B signalizaci (Li, Schmidt 1997). Bylo prokázáno, že v místě poškození a zánětu se RAGE ligandy hromadí a způsobují intracelulární aktivaci NF- $\kappa$ B (Schmidt *et al.* 2000), to umožňuje prodloužení buněčné odpovědi na vytváření chronických změn tkání (Bierhaus *et al.* 2005).

### **3.1.5.1 Ateroskleróza**

Ateroskleróza je zánětlivé onemocnění vyznačující se hromaděním cholesterolového plaku na vnitřní straně tepen. RAGE se vyskytuje na povrchu buněk podílejících se na aterogenezi a progresi aterosklerózy jako jsou například endotelové buňky, lymfocyty, buňky hladkého svalstva (Goldin *et al.* 2006). V místě cévního poranění dojde prostřednictvím interakce RAGE s ligandy (AGEs, S100 a amphoterin) k vytvoření oxidačního prostředí, což vede ke zvýšené intracelulární tvorbě reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) a jejich hromadění spustí redox-senzitivní transkripční faktor NF- $\kappa$ B, který vede k transkripční aktivaci celé řady genů vedoucích k rozvoji zánětu a aterosklerózy, jako jsou tumor nekrotizující faktory (TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ), interleukiny (IL-1, IL-6, IL-8) interferon (IFN- $\gamma$ ) a buněčné adhezni molekuly (Siebenlist *et al.* 1994). Z tohoto důvodu lze říci, že oxidační stres je klíčovým mediátorem aterogenních změn v cévách.

### **3.1.5.2 Alzheimerova choroba**

Alzheimerova choroba (AD) je progresivní neurodegenerativní onemocnění mozku, kdy dochází k postupnému poklesu kognitivních funkcí a je nejčastější příčinou demence u starších lidí (Hebert *et al.* 2003).

U AD dochází ke kumulaci neurotoxického peptidu A $\beta$  ( $\beta$ -amyloidu) a to způsobuje buněčné poškození. RAGE zde funguje jako membránový receptor pro A $\beta$ . Jejich interakcí dochází k zesílení škodlivých efektů na nervovou soustavu, kdy RAGE zprostředkovává transport A $\beta$  do mozku přes BBB (blood-brain barrier) a tím zvyšuje koncentraci A $\beta$  v mozkové tkáni a následnou tvorbu plaků. Interakce RAGE a A $\beta$  indukují oxidativní stres, tím stimuluje aktivaci NF- $\kappa$ B a ten indukují uvolňování různých cytosinů v BBB. Aktivace NF- $\kappa$ B je zapojena do neuronální plasticity a buněčné odpovědi na neurodegeneraci (Mattson *et al.* 2001), zatímco prodloužená exprese RAGE může vést k buněčné dysfunkci (Bierhaus *et al.* 2009). Zvýšená exprese RAGE, AGEs a abeta ligandy byly identifikovány v AD v hipokampu, kde způsobují neuronální dysfunkci a tím ztrátu krátkodobé paměti (Vallente *et al.* 2010).

### 3.1.5.3 Artritida

Artritida je zánětlivé onemocnění, které se projevuje především zánětem a bolestivostí kloubů a jejich postupným poškozením. Mezi dva nejběžnější typy patří osteoartritida (OA) a revmatoidní artritida (RA), přičemž obě formy mají stejné dysfunkce.

RAGE byl detekován v synoviální tkáni, makrofázích, T, B a dalších buňkách poškozených kloubů u pacientů s OA i RA, přičemž všechny tyto buňky se podílejí na rozvoji synoviálního zánětu u OA i RA, což naznačuje úlohu RAGE u artritidy (Drinda *et al.* 2005). Přítomnost RAGE a AGEs ligandů byla potvrzena v synoviální tkáni, endotelu a zvýšená koncentrace těchto ligandů nalezena v séru, synoviální tekutině a také moči u OA pacientů (Chen *et al.* 1999). Akumulace AGEs ligandů byla nalezena také v kolagenu chrupavky (Verzijl *et al.* 2000), kde mohou měnit mechanické vlastnosti a metabolismus chrupavky pomocí RAGE signalizace (Bank *et al.* 1998). Také bylo zjištěno, že akumulace AGEs snižuje syntézu molekul matrice kloubních chondrocytů, což má za následek snížení přeměny kolagenu a míry syntézy proteoglykanu (DeGroot *et al.* 1999).

Zvýšená hladina HMGB-1 a některých S100 ligandů je spojena s osteoartrózou chrupavky. Vazba S100A11 s RAGE spouští hypertrofii chondrocytů (Cecil *et al.* 2005), kdežto HMGB-1, S100A4 a S100B stimulují kloubní chondrocyty k produkci matrix metaloproteinázy 13 a to způsobuje zvýšenou degradaci chrupavek (Loeser *et al.* 2005).

### 3.1.5.4 Plicní onemocnění

Většina plicní tkáně vykazuje ve fyziologickém stavu relativně nízkou expresi RAGE. Výjimku tvoří alveolární pneumocyty typu I (Mukherjee *et al.* 2008). Změny exprese RAGE a interakce RAGE a ligandů mají významnou roli u některých plicních chorob,

mezi které patří akutní poranění plic, syndrom akutní respirační tísně (ARDS), syndrom akutního respiračního selhání, narušení alveolárního clearance tekutiny a poškození alveolárních pneumocytů typu I (Bernard *et al.* 1994).

Zvýšená hladina RAGE byla prokázána v bronchoalveolární laváži v různých modelech plic poškozených oddělením intratracheálním vštípením kyseliny chlorovodíkové, lipopolysacharidu či *Escherichii coli* nebo hyperoxií (Su *et al.* 2009).

Zesílení exprese plicního S100A12 byla prokázána u pacientů s ARDS (Wittkowski *et al.* 2009). RAGE ligand HMGB-1 způsobuje neutrofilní zánět dýchacích cest a může tak hrát roli v neutrofilním astmatu (Watanabe *et al.* 2011). Mnoho studií ukázalo, že ztráta RAGE může přispět k patogenezi plicní fibrózy.

V modelu hlodavce s astmatem bylo prokázáno, že delece RAGE chrání myši tím, že eliminuje remodelaci dýchacích cest, eozinofilní zánět a přecitlivělost dýchacích cest a to bez ohledu na typy zapojených alergenů. Stejná studie také ukázala, že inhibice RAGE u myší může výrazně snížit zánět při astmatu (Milutinovic *et al.* 2012). Všechny tyto výsledky ukazují, že RAGE-ligand osa hraje roli v neutrofilním zánětu dýchacích cest, stejně tak jako v patogenezi astmatu.

Přesná role RAGE v patogenezi plicních chorob zůstává nejasná vzhledem k protichůdným výsledkům z různých současných studií. Nicméně, RAGE nepochybně hraje důležitou roli ve fyziologii a patologii plic.

### **3.1.5.5 Seps**

Seps je systémová zánětlivá odpověď vyvolána infekcí. RAGE se na patogenezi seps podílí díky své roli v přenosu signálu ze substrátu patogenů k aktivaci buněk v průběhu zánětu. U septických pacientů byly prokázány zvýšené hodnoty S100 a HMGB-1 ligandů (Wang *et al.* 1999), avšak přesná role RAGE stále zůstává nezjištěna.

### **3.1.6 Regulace a funkce RAGE v nádorech**

Zvýšená exprese RAGE byla zjištěna v lidských nádorech mozku, prsa, tlustého střeva, plic, prostaty, orálních dlaždicových buněk, melanomu a lymfomu vaječníku. Funkce RAGE během neoplastické transformace a maligní progresu na molekulární úrovni není ještě úplně prostudována, ale nedávná experimentální data *in vitro* analýz na myších modelech potvrzují přímé spojení mezi aktivací RAGE a proliferací, přežitím, migrací a invazivitou nádorových buněk (Logsdon *et al.* 2007). Studie genové exprese na lidských a myších vzorcích prokázaly nadměrnou expresi RAGE ligandů u solidních nádorů (Gebhardt *et al.* 2006).

Taguchi a jeho kolegové zjistili, že blokáda osy HMGB-1-RAGE potlačila růst nádoru ve dvou nezávislých myších modelech a tím poskytly první in vivo experimentální informace o funkci RAGE během vývoje rakoviny (Taguchi *et al.* 2000). Na druhou stranu RAGE jako potenciální stimul růstu nádoru a maligní konverzor má také nádorově supresivní funkce a to například u rakoviny alveolárního epitelu plicní tkáně, kde exprese je významně snížena (Schraml *et al.* 1997). To naznačuje, že progresu u rakoviny plic může být podpořena ztrátou funkce RAGE a tím pádem reexprese RAGE v plicních nádorových buňkách, snižuje jejich proliferaci, což snížilo růst nádoru u myši (Bartling *et al.* 2005). Kromě toho, funkční inaktivace RAGE v myoblastech má za následek sníženou myogenesi a zvýšenou proliferaci a invazi in vitro a zvýšený nádorový růst in vivo (Riuzzi *et al.* 2006). Nicméně tkáňově specifické rozdíly v RAGE expresi, sestřihové varianty a ligandy dávají prostor pro spekulace, že RAGE může vykazovat nádorově supresivní funkce v tkáních charakterizované konstitutivní expresi RAGE, i když splňuje nádorovou propagační roli ve tkáních se schopností vyvolávat expresi RAGE.

### **3.1.7 Inhibitory RAGE**

O sloučeniny schopné blokovat interakci RAGE-ligand je čím dál větší zájem. Takové sloučeniny by mohly inaktivovat buď ligand nebo RAGE a tím zabránit jejich interakci nebo po jejich interakci inhibovat signální kaskádu. Existují dvě skupiny inhibitorů RAGE. První z nich jsou proteinové, kam patří sRAGE a protilátky proti RAGE. Druhou skupinou jsou nízkomolekulární inhibitory, z nichž dva (PF-04494700, FPS-ZM1) dosáhly druhé fáze klinického testování (Alexiou *et al.* 2010).

#### **3.1.7.1 sRAGE**

sRAGE je rozpustná izoforma RAGE receptoru, která se přirozeně vykytuje u lidí a vzniká alternativním sestřihem intronu 9 nebo exonu 10 genu RAGE. sRAGE působí nejen jako biomarker, ale zdá se být atraktivním farmaceutickým cílem. sRAGE může fungovat jako „decoy“ receptor a zabraňovat vazbě ligandů k RAGE (Hudson *et al.*, 2008). Nedávné studie na zvířecích modelech prokázaly, že podávání sRAGE vedlo k řadě úspěšných výsledků, například zabránění cévním komplikacím u diabetu, ochrana proti růstu nádoru a tvorby metastáz či potlačení rozvoje Alzheimerovy choroby. V řadě patologických onemocnění byla prokázána snížená koncentrace sRAGE a cílená léčba by tak mohla být provedena buď přímým podáním rekombinantního lidského sRAGE nebo za pomoci sRAGE modulačních léků. V klinické praxi se již používají některá léčiva ke zvýšení koncentrace sRAGE například pioglitazon u diabetes mellitus 2 (Alexiou *et al.* 2010).

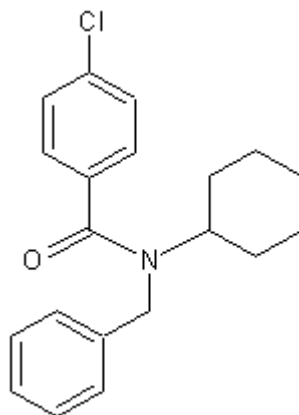
### 3.1.7.2 Protilátky proti RAGE

Jiným typem inhibitoru RAGE-ligand interakce je použití protilátek proti RAGE. Abe a jeho kolegové prokázali na lidských kultivovaných buňkách melanomu, že použití anti-RAGE protilátek vedlo k inhibici tvorby nádoru a metastáz (Abe *et al.* 2004).

Použití myších monoklonálních protilátek pro léčbu lidských onemocnění je však omezené a to z důvodu krátké životnosti, neschopnosti vyvolat efekt v lidském organismu a indukci lidské anti-myší imunitní odpovědi a tak humanizace těchto protilátek by mohla zlepšit jejich terapeutický potenciál (Alexiou *et al.* 2010).

### 3.1.7.3 FPS-ZM1

FPS-ZM1 (N-Benzyl-4-chloro-N-cyclohexylbenzamid) je vysoce afinitní inhibitor RAGE, který se specificky váže k jeho V doméně, prochází hematoencefalitickou bariérou a inhibuje buněčný stres zprostředkovaný A $\beta$ 40 A $\beta$ 42 v buňkách exprimujících RAGE *in vitro* a *in vivo* v myším mozku. Testováním na myších bylo prokázáno, že FPS-ZM1 je vysoce efektivní inhibitor u onemocnění mozku způsobených akumulací A $\beta$  a že to může pomoci v léčbě Alzheimerovy choroby. (Deaene *et al.* 2012). Z důvodu vysoké toxicity byly studie inhibitoru FPS-ZM1 ukončeny v druhé fázi klinického testování.

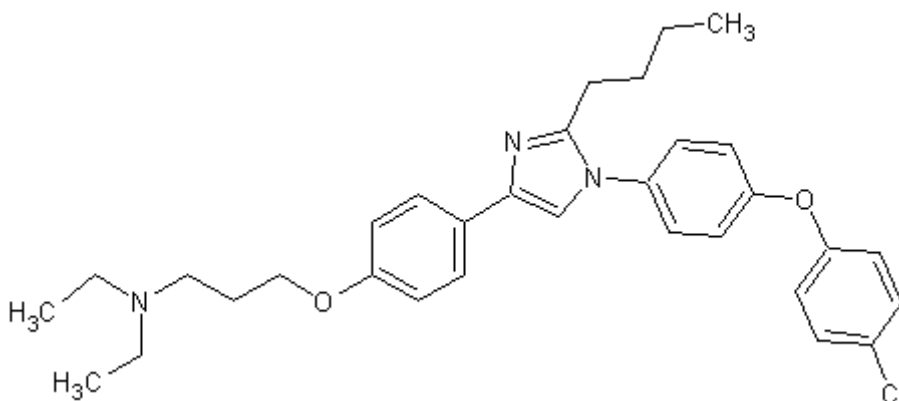


**Obr. 4:** Chemická struktura N-Benzyl-4-chloro-N-cyclohexylbenzamidu. Převzato a upraveno podle Ross *et al.* 2013.

### 3.1.7.4 PF-04494700 (Azeliragon)

PF-04494700 jehož chemická struktura je zobrazena na obr. 5., je inhibitor, který je považován za potenciální lék Alzheimerovy choroby. Inhibuje RAGE tím, že blokuje interakci receptoru s ligandy A $\beta$ , S100, AGEs a HMGB1 (Sabbagh *et al.* 2011). Douglas Galasko a jeho kolegové testovali účinnost PF-04494700 u Alzheimerovy choroby. Pacienti byli rozděleni do tří skupin, kdy jedna dostávala vysokou dávku terapeutické látky

(20 mg/den), druhá skupina dostávala placebo a třetí skupina nižší dávku účinné látky (5 mg/den). Po dvanácti měsících byla však studie ukončena z důvodu vedlejších účinků u vyšších terapeutických dávek. Později bylo však prokázáno, že nižší dávka účinné látky měla pozitivní efekt na kognitivní funkce pacientů (Perrone *et al.* 2012).



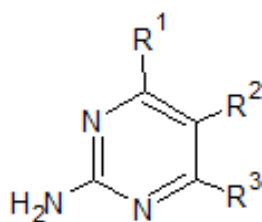
**Obr. 5:** Chemická struktura 3-(4-(2-butyl-1-(4-(4-chlorofenoxy)fenyl)-1H-imidazol-4-yl)fenoxy)-N,N-diethylpropan-1-aminu. Převzato a upraveno z MedKoo Biosciences.

### 3.1.7.5 Deriváty pyrimidinu

Další nadějnou skupinu potenciálních inhibitorů RAGE představují deriváty pyrimidinu. Korejští vědci ve svých studiích nasyntetizovali 60 derivátů pyrimidinu (4, 6-distribuovaných 2-aminopyrimidiny). Pro *in vivo* testování vybrali tři, kteří měli nejlepší inhibiční účinek *in vitro* a označili je čísly 53, 59, 60. Testování proběhlo na myších modelech, kdy nejdříve byl intraperitoneálně podán jeden z inhibitorů RAGE a poté injektován lidský A $\beta$ . Hladina A $\beta$  byla sledována z extraktu mozkové tkáně a následně byl stanoven inhibiční účinek testovaných inhibitorů. Všechny tři analogy vykazovaly snížení hladiny A $\beta$  bez významné změny množství periferní A $\beta$ . Toto pozorování bylo podpořeno tím, že snížení hladiny A $\beta$  bylo způsobeno inhibicí RAGE receptoru interakcí s pyrimidinovými deriváty (Han *et al.* 2012).

Další studie využily pro svoje testování myší modely s vyvolanou Alzheimerovou chorobou pro ověření požadovaných léčebných účinků pyrimidinových analogů. Nejlepšího inhibičního účinku dosáhl analog 59. Po orálním podání po dobu 3 měsíců bylo pozorováno, že snižuje akumulaci A $\beta$  v mozku a zlepšuje kognitivní funkce bez významných vedlejších účinků (Han *et al.* 2012).





**Obr 6:** Obecná struktura derivátů pyrimidinu.

### 3.1.8 RNA interference

RNA interference (RNAi) je přirozený proces, kterým můžeme s vysokou specifičností a selektivitou regulovat expresi cíleného genu, což představuje cenný nástroj pro personalizovanou léčbu nádorů. Mechanismus umlčování genů probíhá pomocí malých interferujících molekul, které na základě komplementarity nasedají na transkripty mRNA a brání jejich přepisu do proteinů. Způsob umlčování genů probíhá na základě interakce dsRNA s RNázou III enzymů Drosha (pro miRNA) a Dicer (pro miRNA, siRNA) a vzniku malých siRNA, ty tvoří ribnukleoproteinový komplex RISC, který nejprve způsobí rozdělení krátké dvoušroubovice siRNA na jednotlivá vlákna a s jedním vláknem, k němuž zůstane navázán, se specificky naváže na cílovou mRNA a způsobí její degradaci (Ichim *et al.* 2004). Preklinické studie potvrzují, že techniky RNAi mohou být použity pro cílené umlčování genů souvisejících s rakovinou (Martinez *et al.* 2002). *In vivo* studie ukázaly příznivé výsledky RNAi zacílení komponent kritických pro růst nádorových buněk (Brummelkamp *et al.* 2002), metastázy (Salisbury *et al.* 2003), angiogenezi (Filleur *et al.* 2003) a chemorezistenci (Lakka *et al.* 2004).

Aplikace RNAi může být zprostředkována dvěma typy molekul. Buď chemicky syntetizovanými dvouvláknovými malými interferujícími RNA (siRNA) nebo krátkou vlásečkou RNA (shRNA). Jedná se o různé molekuly a tak mechanismy působení jsou odlišné.

#### 3.1.8.1 siRNA vs. shRNA

siRNA se svojí délkou 19-21 nt a přesahem 2 až 3 nt se zdá být vhodná pro zapojení do RISC komplexu pro správnou funkci RNAi bez interakce s enzymem Dicer, TRBP nebo PACT. Nicméně tento proces je 10 x méně efektivní než u shRNA avšak zvětšením délky siRNA duplexu na 29-30 nt s 2-3 nukleotidovým přesahem pouze na jednom konci (konkrétně antisense (Sano *et al.* 2008)) má zlepšovat účinnost. Zvětšená délka siRNA s přesahem na jednom konci vede k termodynamické nestabilitě a tím lepší spojení

s DICER/TRBP/PACT komplexem pro efektivnější zapojení do RLC (Kim *et al.* 2005). shRNA asimiluje do endogenní miRNA dráhy a tím je podstatně účinnější (Siolas *et al.* 2005).

Pochopení mechanismu siRNA a shRNA na buněčné a molekulární úrovni přispěla k výraznému zvýšení úsilí při výrobě terapeutických siRNA k různým chorobám. Modifikace mohou být provedeny s cílem zlepšit účinnost a stabilitu RNAi činitelů. Chemicky syntetizované siRNA je mnohem snazší upravovat než velké komplexy modifikované sRNA. Vektorovou shRNA je obtížné upravit, protože závisí na mechanismu exprese hostitelské buňky, modifikace je zde možná jen prostřednictvím manipulační expresní strategie, přepracováním shRNA struktury nebo změnou regulace promotoru.

RNAi léčiva jsou dobře tolerovatelné zvířecími modely umožňující přechod na kliniku. Aktuálně nejméně deset RNAi léčiv je v rané fázi klinického testování (Breakdown of RNAi-Based Drugs in the Clinic, RNAi News, 2008.), z nichž 2 souvisí s rakovinou. První je namířen proti M2 jednotce ribonukleotidové reduktázy (RRM2), kdy studie na zvířatech s inhibitory siRNA pro RRM2 jsou účinné a bezpečné pro nehumánní primáty (Heidel *et al.* 2007). Druhý je namířen proti tenascin-C (Zuikel *et al.* 2006). Pro klinické studie u FDA byla také schválena shRNA po léčbu hepatitidy B.

### 3.2 Reportérové geny

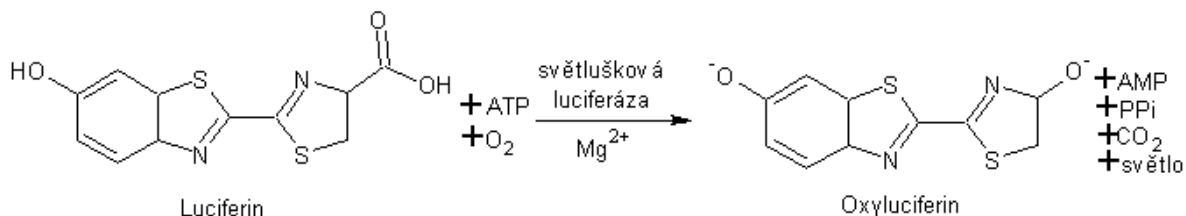
Reportérové geny jsou důležitým nástrojem pro sledování změn genové exprese na základě kvantifikace finálního produktu genu (mRNA, protein).

*Reporter gene assay* je systém informující o genové expresi. Jedná se o molekulárně biologickou techniku využívající mnoho nástrojů pro studium regulačních sekvencí promotorů, enhancerů a transkripčních faktorů, zejména u eukaryotních nádorových buněk, ty jsou přechodně či stabilně přeneseny reportérovým plasmidem. Reportérový plasmid obsahuje DNA sekvenci poskytující informaci o proteinu, který je produkován a specifickou vazebnou promotorovou sekvencí pro studovaný gen.

Ideální reportérový gen je takový, který je inertní vůči hostitelské buňce, je předmětem zájmu a je přístupný pro testy, které jsou citlivé, kvantitativní, rychlé, jednoduché, reprodukovatelné a bezpečné. Nejvíce se používají geny pro světluškovou luciferázu. Reportérové proteiny mohou být testovány na základě detekce inherentních charakteristik, jako je enzymatická aktivita, spektrofotometrické aktivity, nebo nepřímo s testy na bázi protilátek (Promega, Luciferase Assay Systém).

### 3.2.1 Světlušková luciferáza

Hlavním používaným bioluminiscenčním reportérem je světlušková luciferáza odvozená ze severoamerické světlušky (*Photinus pyralis*) a protože nevyžaduje posttranslační modifikace je snadno a rychle detekovatelný ihned po translaci. Tento 61kDa monomerní enzym katalyzuje dvoustupňovou reakci. Prvním krokem je aktivace luciferinu s ATP za vzniku luciferin-adenylátu a pyrofosfátu. Ve druhém kroku reaguje luciferin-adenyl se vzdušným kyslíkem za vzniku oxyluciferinu v elektronicky excitovaném stavu a  $\text{CO}_2$ . Excitovaný luciferin se pak vrátí do základního stavu se současným uvolněním světla v rozmezí vlnových délek 550 – 570 nm (tj. oblast od zelené k žluté). Intenzita emitovaného světla je přímo úměrná koncentraci luciferázy (Promega, Luciferase Assay System)



**Obr 7:** Bioluminiscenční reakce katalyzovaná světluškovou luciferázou za přítomnosti co-substrátu ATP a kyslíku. Převzato a upraveno podle Promega, Luciferase Assay System.

### 3.3 Vysokokapacitní skrining (high-throughput screening)

Vysokokapacitní skrining (HTS) je proces, který je od roku 1900 široce využívaný ve farmaceutickém průmyslu pro objev nových léků. HTS umožňuje skrining velkých chemických knihoven proti vybraným cílům. Mezi základní znaky HTS patří: miniaturizace, robotika a citlivá metoda pro detekci signálu (Mayr *et Boyanic* 2009).

K miniaturizaci HTS testů vedla potřeba zvýšení počtu chemických sloučenin a s tím související zvýšení počtu molekulárních cílů. Na začátku devadesátých let byly hlavním skriningovým formátem mikrotitrační destičky s 96 jamkami (Sittampalam *et al* 1997). Ty však byly v posledních letech nahrazeny 384 destičkami a v některých případech dokonce 1536 destičkami. Všechny tyto destičky mají stejnou velikost, ale vyšší kapacitu a nižší pracovní objem, tím umožňují miniaturizaci testů (Mayr *et Boyanic* 2009).

Pomocí HTS lze otestovat desetitisíce až statisíce sloučenin za den. Z tohoto důvodu je potřeba zařízení, které umožní otestovat takové množství látek za krátký časový úsek, to je umožněno díky automatizaci systému (Shaffer 2005). Automatizace zahrnuje přesné pipetovací zařízení, robotický systém, citlivý detektor a software (Hong *et al.* 2009).

LOPAC (Library Of Pharmacologically Active Compounds) je jedna z typů komerčních chemických knihoven. LOPAC knihovny obsahují hodně léků, které jsou dnes ve stádiu klinického testování nebo dokonce na trhu. LOPAC90 působí buď jako samostatná knihovna, nebo k doplnění knihovny LOPAC1280, která obsahuje 1280 farmakologicky účinných látek (Sigma-Aldrich 2014).

### 3.4 Reprofilování léčiv

Jeden z přístupů využívajících se pro hledání nových léčiv se nazývá reprofilování. Díky tomuto přístupu byla řada léčiv používaných jako antidiabetika či antiepileptika a další reprofilována pro léčbu nádorových onemocnění a naopak.

*De novo* identifikace je klasický způsob vývoje nového léku, avšak tento postup je finančně i časově velice náročný (Kato *et al.* 2015). Využití známých léčiv je jeden ze způsobů jak je možné zmenšit náklady i čas na vývoj nových onkologických léčiv. Výhodou tohoto přístupu je znalost mechanismů účinků, toxikologický a farmakologický profil již u schválených léčiv. Lze buď použít zavedené léčivo proti novým terapeutickým cílům, nebo hledat léčivo s dosud nepopsaným mechanismem účinku u již existujících látek (Geetharamani *et al.* 2015). Využívá se zde „knihoven“ léčiv u kterých byla zahájeno nebo už ukončeno klinické testování. Často se stává, že použití léčiva je hodně vzdálené od původní indikace. Příkladem může být fentolamin, u kterého byla původní indikace léčba akutní hypertenze a koronárního syndromu. U této látky bylo zjištěno, že v nádorových buňkách prostaty způsobuje blok buněčného cyklu v mitóze, indukci hyperdiploidních buněk a díky stabilizaci či polymerizaci tubulinu aktivuje apoptózu (Ho *et al.* 2015).

Cílení nádorových kmenových buněk, které mají rezistenci ke standardní chemoterapii a způsobují relapse a metastázy po ukončení terapie je další zajímavou aplikací. Některá antidiabetika či antimalarika účinně blokují specifické signální dráhy nádorových kmenových buněk a tím dochází k jejich eradikaci, příkladem je niclosamid či chlorochin (Lv *et al.* 2015; Patel *et al.* 2015).

Mnoho látek je takto testováno v nových indikacích v probíhajících klinických studiích a dnes už existuje i pár „léčiv“ mající uplatnění v klinické praxi viz tab 1.

**Tab. 1:** Příklady reprofilovaných léčiv v souvislosti s protinádorovou terapií.

<b>Léčivo</b>	<b>Původní indikace</b>	<b>Nová indikace</b>	<b>Reference</b>
<i>Thalidomid</i>	Ranní nevolnost v těhotenství, hypnotikum.	Terapie mnohočetného myelomu, imunomodulační účinky, terapie erythema nodosum leprosum.	(Geetharam ani <i>et al.</i> 2015).
<i>Kyselina valproová</i>	Epilepsie, stabilizace nálad u bipolární poruchy, migréna.	Protinádorová terapie.	(Gupta <i>et al.</i> 2013; Sun <i>et al.</i> 2015)
<i>Metformin</i>	Inhibitor 5-AMP-aktivované proteinkinázy, antidiabetikum.	Protinádorová terapie.	(Lv <i>et al.</i> 2015; Patel <i>et al.</i> 2015)
<i>Celecoxib</i>	Inhibitor cyklooxygenázy 2, antiflogistikum.	Protinádorová terapie, inhibitor STAT3.	(Geetharam ani <i>et al.</i> 2015).
<i>Ketorolac</i>	Inhibitor cyklooxygenázy 1 a 2, nesteroidní antiflogistiku, analgetikum.	Inhibitor komplexu Rac1/Cdc42, protinádorová terapie.	(Oprea <i>et al.</i> 2011)
<i>Fentolamin</i>	A-andrenergní antagonist, hypertenze, akutní koronární syndrom.	Protinádorová terapie	(Ho <i>et al.</i> 2015)
<i>Chlorochin</i>	Antimalarikum.	Protinádorová terapie.	(Lv <i>et al.</i> 2015)
<i>Itrakonazol</i>	Inhibitor 14- $\alpha$ -demethylázy, antimykotikum.	Protinádorová terapie.	(Pantziarka <i>et al.</i> 2014)
<i>Mebendazol</i>	Inhibitor polymerizace tubulinu, antiparazitikum.	Protinádorová terapie.	(Pantziarka <i>et al.</i> 2014)

## **4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **4.1 Materiál**

#### **4.1.1 Seznam přístrojů a vybavení**

- automatický čítač buněk ViCell XR – Beckman Coulter, USA
- automatické pipety – Eppendorf, Německo
- blotovací zařízení Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell – Bio-Rad, USA
- centrifuga Rotina 420 R – Hettich, Německo
- gel dokumantační systém Odyssey Fc – Li-Cor, USA
- flowbox s laminárním prouděním MSC-Advantage – ThermoScientific, USA
- inkubátor s atmosférou CO<sub>2</sub> HERAcell 150i – ThermoScientific, USA
- multikanálové pipety – Eppendorf, Německo
- sestava pro elektroforézu mini-PROTEAN Tetra Cell – Bio-Rad, USA
- světelný mikroskop – Olympus, Japonsko
- termoblok Bio TDB-100 – BioSan, Lotyšsko
- třepačka orbitální Unimax 1010 – Heidolph, Německo
- vortex V-1 plus – BioSan, Lotyšsko
- zdroj pro elektroforézu a western blot PowerPac HC – Bio-Rad, USA
- Echo 550 – LabCyte, USA
- FACS Calibur flow cytometr – BD, USA
- FACS AriaII – BD, USA
- Multidrop – Thermo Fisher Scientific, USA

#### **4.1.2 Použité chemikálie**

- DTT (dithiotreitol) – Sigma-Aldrich, USA
- APS (persíran amonný) - Sigma-Aldrich, USA
- BSA (hovězí sérový albumin) - Sigma-Aldrich, USA
- Coomassie Brilliant Blue – Bio-Rad
- DMSO (Dimethylsulfoxid) - Sigma-Aldrich, USA
- FCS (fetální telecí sérum) - Sigma-Aldrich, USA
- L-glutamin – Sigma-Aldrich, USA
- chemiluminiscenční substrát (ECL) – Amersham, UK
- luciferasový substrát - PerkinElmer, USA
- luciferasový pufr - PerkinElmer, USA

- proteinový marker (Full Range Rainbow Recombinant Protein) – Bio-Rad, USA
- ACRYL/BIS 37,5:1 (30:0,8) – Bio-Rad, USA
- methanol – Lach-Ner, ČR
- Ponceau S - Sigma-Aldrich, USA
- Puromycin - Sigma-Aldrich, USA
- SDS (dodecylsulfát sodný) - Sigma-Aldrich, USA
- TEMED Ultra pured – Life Technologies, USA
- Tryple – Gibco, Life Technologies, USA
- Tris - Sigma-Aldrich, USA
- Tween 20 - Sigma-Aldrich, USA
- ECL Prime reagentie - Amersham, USA
- SureENTRY reagentie - SA Bioscience, USA

#### **4.1.3 Použité roztoky**

- 1 x PBS (1000 ml): v 800 ml H<sub>2</sub>O rozpustit 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; upravit pH na 7,4; doplnit do 1000 ml H<sub>2</sub>O
- 1 x TBS + 0,1% Tween (1001 ml): 100 ml 10 x TBS + 900 ml H<sub>2</sub>O + 1 ml Tween 20, dát míchat na magnetickou míchačku
- 10 x TBS (1000 ml): v 800 ml H<sub>2</sub>O rozpustit 60,6 g Tris; 87,6 g NaCl; pomocí 1 mmol/HCl upravit pH na 7,6 a doplnit do 1000 ml H<sub>2</sub>O
- 10 x TG: 25 mmol/l Tris; 192 mmol/l glycin; pH 8,3 – Bio-Rad
- 10 x TGS: 25 mmol/l Tris; 192 mmol/l glycin; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,3 – Bio-Rad
- 4 x TRIS/SDS pH = 6,8: 45,5 g 1,5 mol/l Tris + 1 g 0,4% SDS rozpustit v neionizované H<sub>2</sub>O, upravit pH a doplnit do 250 ml
- 4 x TRIS/SDS pH = 8,8: 15,13 g 0,5 mol/Tris + 1 g 0,4% SDS rozpustit v neionizované H<sub>2</sub>O, upravit pH a doplnit do 250 ml
- APS 10%: 0,1 g APS + 1 ml H<sub>2</sub>O
- blokovací pufr (5% roztok odtučněného sušeného mléka): 95 ml roztoku 1 x TBS + 0,1% Tween + 5 g sušeného mléka, dát míchat na magnetickou míchačku
- blotovací pufr (500 ml): 50 ml 10 x TG smíchat s trochou H<sub>2</sub>O, poté přidat 100 ml metanolu a doplnit do 500 ml H<sub>2</sub>O
- elektroforetický pufr (1000 ml): 100 ml 10 x TGS + 900 ml H<sub>2</sub>O
- 4 x Laemmli pufr: 277,8 mmol/l TRIS-HCl, pH 6,8; 44,4% glycerol; 4,4% LDS; 0,02% bromfenolová modř – Bio-Rad

- RIPA lyzační pufr: 1% NP-40; 0,1% SDS; 50 mmol/l Tris-HCl pH 8,0; 150 mmol/l NaCl; 0,5% deoxycholát sodný
- zamrazovací médium (40 ml): 37,2 ml FCS + 2,8 ml DMSO, přefiltrovat
- promývací pufr: 20 ml promývacího roztoku Cell Wash + 100 mg BSA + 20  $\mu$ l NP-40
- blokovací roztok: 100 ml promývacího roztoku Cell Wash + 500 mg BSA
- roztok FC receptor saturační reagentie: 10  $\mu$ l činidla pro FC receptor + 30  $\mu$ l blokovacího pufru na jeden vzorek
- roztok izotypové kontroly: 16  $\mu$ l izotypové kontroly IgG + 1000  $\mu$ l blokovacího roztoku

#### 4.1.4 Kultivační média

- F12 HAM's (Hyclone): 900 ml médium + 100 ml 10% FCI + L-glutamin o výsledné koncentraci 2 mM, sterilně zfiltrvat
- RPMI 1640 (Sigma-Aldrich): 450 ml média + 50 ml FCS, sterilně zfiltrvat
- MEM (Minimum Essential Medium; Sigma-Aldrich): 450 ml média + 50 ml FCS, sterilně zfiltrvat

#### 4.1.5 Použitý biologický materiál

K experimentům v této práci byly použity následující buněčné linie: A549 odvozená z lidského karcinomu plic, HeLa linie odvozená z lidského cervikálního karcinomu, leukemická buněčná linie Jurkat a buněčná linie CHO odvozena z epiteliálních buněk vaječníku křečka čínské ( *Cricetulus griseus* ). Všechny buněčné linie pocházejí z americké sbírky tkáňových a buněčných kultur (ATCC).

Lentivirové částice použité v této práci byly zakoupeny od SABiosciences a rekombinantní světlušková luciferasa (FLuc) od Sigma-Aldrich.

#### 4.1.6 Protilátky

Primární protilátky anti-RAGE (Tab. 2) použité v metodě Western blot byly ředěny roztokem 5% BSA v TBS s 1% TWEENem. K vizualizaci primárních protilátek byly použity sekundární protilátky anti-rabbit a anti-mouse konjugované s křenovou peroxidázou. Sekundární protilátky byly ředěny v roztoku 5% BSA v TBS s 1% TWEENem, viz. tab. 2.

Pro detekci exprese RAGE pomocí průtokové cytometrie byla použita primární protilátka anti-RAGE (Abcam) ředěná v koncentraci 1  $\mu$ g/10<sup>6</sup> buněk a sekundární protilátka ALEXA 488 (ThermoFisher) ředěná 1:250 v blokovacím pufru.



**Tab. 2:** Popis a ředění protilátek použitých pro Western blot.

<b>Primární protilátka</b>	<b>Ředění</b>	<b>Firma</b>
<b>Rabbit anti-RAGE</b>	1:1000	Abcam
<b>Rabbit anti-RAGE</b>	1:2000	Sigma-Aldrich
<b>Rabbit anti-RAGE</b>	1:5000	Origene, TA327041
<b>Rabbit anti-RAGE</b>	1:250	Life Technologies
<b>Rabbit anti-RAGE</b>	1:1000	Cell Signaling
<b>Mouse anti-GAPDH</b>	1:5000	OriGene

<b>Sekundární protilátka</b>	<b>Ředění</b>	<b>Popis</b>
<b>Anti-rabbit</b>	1:10 000	Sigma-Aldrich
<b>Anti-mouse</b>	1:10 000	Sigma-Aldrich

#### 4.1.7 RAGE ligandy

Pro stimulaci RAGE byly použity následující ligandy: AGE-BSA (Merck Millipore), S100B (Sigma-Aldrich),  $\beta$ -amyloid (AnalytikJena), LPS (Sigma-Aldrich). Koncentrace zásobních roztoků jsou uvedeny v tab. 3.

**Tab. 3:** Koncentrace zásobních roztoků použitých ligandů.

<b>Ligand</b>	<b>Koncentrace</b>
<b>AGE-BSA</b>	10 mg/ml ve sterilním PBS
<b>S100B</b>	10 mg/ml (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 100 $\mu$ M DTT)
<b><math>\beta</math>-amyloid</b>	1 mM v DMSO
<b>LPS</b>	1 mg/ml v RPMI1640 mediu

#### 4.1.8 Testované látky

Připravená reportérova buněčná esej byla využita k testování látek z knihovny LOPAC90 (Library Of Pharmacologically Active Compounds; Sigma-Aldrich). Jedná se o komerční knihovnu, která obsahuje 90 farmakologicky aktivních látek, z nichž více jak 25 je volně prodávaných léků. Látky jsou prezentovány pod kódovým označením LEM.

Jako pozitivní kontroly k ověření funkčnosti připravené NF- $\kappa$ B reportérové buněčné eseje byly využity komerčně dostupné, literárně popsání inhibitory RAGE, 3-(4-(2-butyl-1-(4-(4-chlorofenoxy)fenyl)-1H-imidazol-4-yl)fenoxy)-N,N-diethylpropan-1-amin (Azeliagon; Cayman chemical) a RAGE antagonist FPS-ZM1 (Calbiochem).

## **4.2 Metody**

### **4.2.1 Kultivace buněčných linií**

Všechny buněčné linie byly kultivovány v inkubátoru v atmosféře 5% CO<sub>2</sub> při 37°C. Buněčné linie A549 a CHO byly kultivovány ve standardním médiu F12 HAM's, pro kultivaci HeLa buněk bylo použito médium MEM a pro linii Jurkat RPMI1640. Média byla doplněna o 10 % fetálního telecího séra.

#### **4.2.1.1 Pasážování, počítání buněk**

Buněčné linie byly kultivovány v kultivačních lahvích s růstovou plochou 75 cm<sup>2</sup>. Pro experimenty byly použity tři adherentní (A549, CHO, HeLa) a jedna suspenzní (Jurkat) buněčná linie.

Adherentní buňky postupně porůstají dno kultivačních lahví a aby nedocházelo k 100% konfluenci, byly buňky pravidelně jednou za 2 – 3 dny pasážovány na přibližnou hustotu  $5 \times 10^4$  na ml.

Médium ze střední kultivační láhve bylo slito, buňky 2 x opláchnuty roztokem PBS a byl přidán 1 ml Tryple reagentie. Nakláněním láhve bylo dosaženo rovnoměrného rozprostření Tryple po celé ploše láhve. Po inkubaci v CO<sub>2</sub> inkubátoru, byla láhev zkontrolována pod mikroskopem, zda jsou buňky uvolněny ze dna. Následně bylo nadbytkem média zastaveno působení Tryplu. Ke stanovení hustoty a viability buněk byl využíván elektronický čítač částic *ViCell*. Podle zjištěné koncentrace byly buňky následně vyředěny na požadovanou koncentraci čerstvým kultivačním médiem.

Pasážování suspenzních Jurkat buněk probíhalo 2 - 3 x týdně prostým naředěním buněk na požadovanou hustotu.

#### **4.2.1.2 Zamražování**

Pro zamražování buněčných suspenzí bylo použito zamrazovací médium, které se skládalo z čistého fetálního séra (FCS) a dimethylsulfoxidu (DMSO) v poměru 93:7.

Po dosažení téměř 80% konfluencie byly buňky promyty PBS a pomocí Tryplu přeneseny do 5 ml média. Buněčná suspenze byla následně přenesena do falkony a centrifugována při laboratorní teplotě po dobu 5 minut, 1500 rpm. Supernatant byl slit do

odpadu a peleta rozsuspendována v zamrazovacím médiu na výslednou hustotu 3 - 5 x 10<sup>6</sup>/ml, následně rozpipetována po 1 ml do kryozkumavek a uložena do kapalného dusíku.

#### **4.2.1.3 Rozmrazování**

Kryozkumavka se zamraženou buněčnou suspenzí byla vyjmuta z kapalného dusíku a rychle rozpuštěna v dlani nebo v 37°C vodní lázni, následně byla suspenze přenesena do falkony s 10 ml přehřátého média a centrifugována 5 minut při 1500 rpm. Supernatant byl slit do odpadu a peleta rozsuspendována v přehřátém médiu, vzniklá suspenze byla přenesena do nadbytku média ve střední kultivační láhvi a vložena do CO<sub>2</sub> inkubátoru.

#### **4.2.2 Western blot**

SDS-PAGE a následný Western blotting se používají k separaci proteinů z buněčných lyzátů na základě jejich rozdílné molekulové hmotnosti a detekci proteinů pomocí specifických protilátek.

##### **4.2.2.1 Příprava lyzátu**

Médium z kultivační misky (80 - 90% konfluence) bylo slito, 2 x opláchnuta roztokem PBS, byl přidán 1 ml Tryple reagentie a vložena do inkubátoru. Působení Tryplu bylo zastaveno 10 ml média. Buněčná suspenze byla přenesena do falkony a centrifugována 4°C, 1600 rpm, 5 minuty. Médium bylo odsáto a buňky byly 2 x promyty 5 ml vychlazeného PBS. Supernatant byl odpipetován, k peletě bylo přidáno 140 µl směsi RIPA lyzačního pufru s koktejlem inhibitorů proteas (Roche). Po 30-ti minutové inkubaci na ledu za občasného vortexování byla směs přenesena do vychlazených mikrozkuavek a centrifugována 20 minut při 4°C, 14 000 rpm. Bylo odebráno 100 µl supernatantu do nové mikrozkuavky přidáno 33,3 µl 4 x Laemmli pufru s DTT o konečné koncentraci 50 mM a povařeno 5 minut při 95°C.

##### **4.2.2.2 SDS-PAGE elektroforéza, Western blot**

Elektroforéza byla provedena na polyakrylamidovém gelu o tloušťce 1 mm. Byl použit 4% zaostřovací gel a 10% separační gel (viz. Tab. 4) Po zatuhnutí byly gely vloženy do elektroforetické vany a zality elektroforetickým pufrem. Do jamky bylo nanášeno 5 µl markeru a 8 µl vzorku. Elektroforéza nejdříve probíhala při 50 V a po přechodu vzorků do separačního gelu bylo napětí zvýšeno na 150 V na přibližně 60 minut. Po skončení elektroforézy byly proteiny metodou western blot přeneseny na nitrocelulózovou membránu o velikosti pórů 0,2 µm (Bio-Rad). Přenos probíhal 15 minut při konstantním proudu 0,15 A na jednu membránu.

**Tab. 4:** Složení gelů pro elektroforézu.

Zaostřovací gel	4% (10 ml)	Separační gel	10% (16 ml)
H <sub>2</sub> O	6	H <sub>2</sub> O	6,3
Akrylamid (30%)	1,33	Akrylamid (30%)	5,33
0,5 M Tris pH = 6,8	2,5	1,5 M Tris pH = 8,8	4
10 % SDS	0,1	10 % SDS	0,16
10 % APS	0,1	10 % APS	0,16
TEMED	0,01	TEMED	0,016

#### 4.2.2.3 Imunodetekce na membráně

Membrány s přenesenými proteiny byly blokovány v 5% roztoku sušeného mléka v TBS/T po dobu 60 minut na třepačce. Následně opláchnuty TBST/T a přeneseny do Petriho misky s 10 ml primární protilátky (viz tab. 3) ředěné roztokem 5% BSA v TBS/T a inkubovány přes noc na kývačce při 4°C. Po inkubaci byly membrány promyty 3 x 5 minut TBS/T a poté 1 x 5 minut TBS. Následně byly membrány inkubovány se sekundárními protilátky v roztoku 5% sušeného mléka v TBS/T po dobu 60 minut. Po následném promytí stejným způsobem jako po inkubaci primárních protilátek byl nanesen substrát pro peroxidázu a po 5 minutách byla membrána vysušena buničinou a chemiluminiscenční signál detekován přístrojem Odyssey Fc (Li-Cor). Doba expozice byla 10 minut.

#### 4.2.3 Detekce RAGE metodou průtokové cytometrie

Buněčné kultury byly fixovány metanolem na výslednou hustotu  $1 \times 10^6$ /ml a uloženy přes noc na -20°C. Odpovídající objem fixovaných buněk ( $1 \times 10^6$  buněk/analýzu) byl centrifugován 5 min při pokojové teplotě, 1 500 rpm a promyt promývacím pufrem. K peletám bylo přidáno 0,5 ml 1 x permeabilizačního roztoku a buňky byly inkubovány 10 minut při pokojové teplotě. Poté zcentrifugovány za stejných podmínek a promyty 2 ml promývacího pufru. Následovala opět centrifugace a odsátí. Ke každé peletě bylo přidáno 40  $\mu$ l roztoku činidla pro FC receptor v blokačním pufru. Po 10-ti minutové inkubaci při pokojové teplotě byly přidány 2 ml promývacího pufru a buňky byly rozděleny do dvou sad. K první sadě centrifugovaných pelet bylo přidáno 100  $\mu$ l naředěné primární protilátky ( $1 \mu$ g/ $10^6$  buněk) a k druhé sadě 100  $\mu$ l roztoku isotypové kontroly IgG o stejné koncentraci jako roztok primární protilátky. Po 30 minutové inkubaci při pokojové teplotě bylo k buňkám přidáno 2 ml promývacího pufru. Následovala centrifugace a odsátí

supernatantu. Do všech zkumavek bylo přidáno 100 µl naředěné (1:250) sekundární protilátky anti-rabbit a vzorky byly inkubovány 30 minut při pokojové teplotě. Buňky byly promyty 2 ml promývacího pufru, po centrifugaci a odstátí supernatantu bylo přidáno 500 µl blokovacího roztok a uloženo na 15 minut při 4°C. Nakonec byly vzorky měřeny na průtokovém cytometru při 488/525 (excitace/emise) nm. V každém vzorku bylo načteno 20 000 buněk.

#### **4.2.4 Transdukce linie A549 lentivirovými reportéry (NF-κB-FLuc a FLuc)**

Pro transdukci byly použity komerčně dostupné lentivirové částice (Cignal Lenti Reporter Assay; SABiosciences). Pro přípravu buněčné eseje k monitorování RAGE-spřažené aktivace NF-κB byly použity lentivirové částice kódující inducibilní NF-κB responsivní konstrukt exprimující světluškovou luciferasu jako reportér. Schéma lentivirového vektoru použitého k vytvoření reporterové eseje znázorňuje obr. 8.

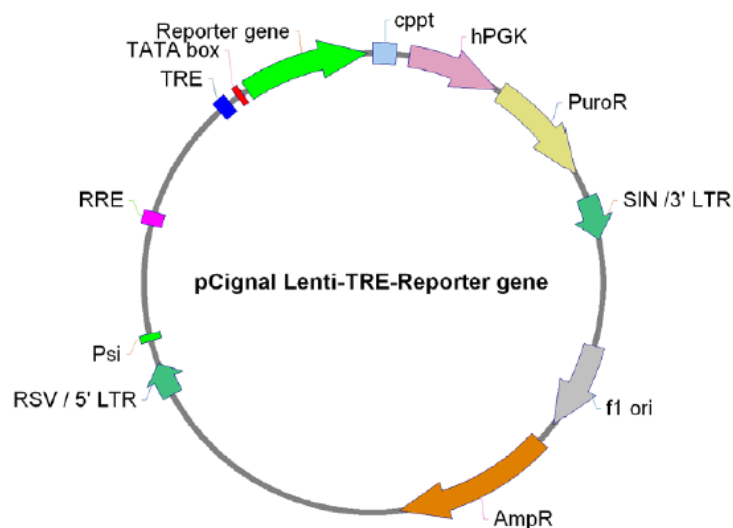
K vytvoření reportérové linie stabilně exprimující FLuc byly použity lentivirové částice konstitutivně exprimující FLuc (obecná struktura vektoru viz obr. 9).

K přípravě obou výše zmíněných reportérových buněčných esejí byl použit stejný, dále uvedený obecný postup. Do každé jamky 12-ti jamkového panelu byl napipetován 1 ml suspenze A549 buněk o hustotě 5 000 /ml. Panel byl následně vložen do inkubátoru.

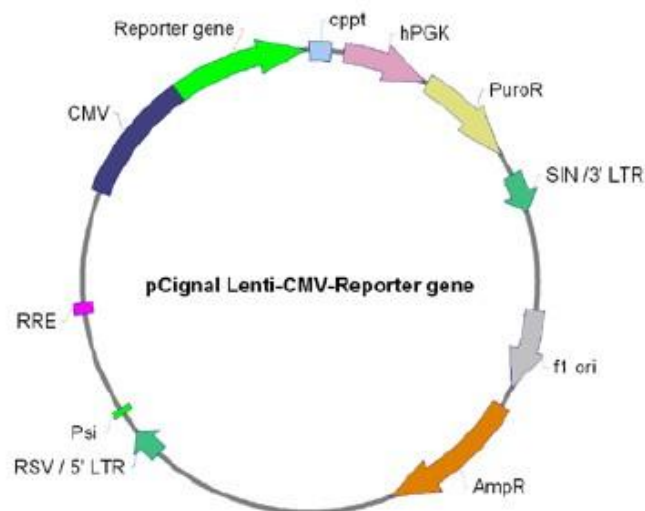
Další den bylo z jamek médium odsáto a byla přidána suspenze lentivirových partikulí v objemech odpovídajících MOI (Multiplicity Of Infection) 10 a 20 a předem vypočítaných z titrů uvedených výrobcem (kalkulace MOI viz níže).

$$\text{MOI} = \frac{\text{počet transdukujících částic}}{\text{počet cílových buněk}}$$

Dále bylo do jamek přidáno 0,5 ml přehřátého média bez antibiotik a sureENTRY reagentie o konečné koncentraci 8 µg/ml pro zvýšení účinnosti transdukce. Přibližně 17-20 hodin po transdukci bylo médium obsahující lentivirové částice odsáto a nahrazeno standardním kultivačním médiem.



**Obr. 8:** Struktura lentivirového reportéru, který byl použit k přípravě NF- $\kappa$ B reportérové buněčné eseje. Převzato a upraveno podle Cignal Lenti Reporter Handbook, 2012.



**Obr. 9:** Obecná struktura vektoru použitého pro přípravu FLuc exprimující linie. Převzato a upraveno podle Cignal Lenti Reporter Handbook, 2012.

#### 4.2.5 Selektce transdukovaných buněk a příprava klonů

Po třech dnech od transdukce byla provedena selektce transdukovaných buněk pomocí puromycinu o konečné koncentraci 3  $\mu$ mol/l (koncentrace dříve zjištěná z testů citlivosti buněk A549 vůči koncentrační řadě puromycinu). Buňky byly kultivovány pod tlakem puromycinu pod dobu 3 - 5 dnů a následně využitím sorteru FACS Aria II (BD)

roztříděny do 5-ti 96-jamkových panelů po 1 buňce na jamku. Panely s rozsortovanými buňkami byly ponechány v inkubátoru 10 - 14 dnů a následně mikroskopovány pro nalezení individuálních klonů. Klony s minimálně 50% konfluencí v jamce byly nejdříve přeneseny z 96-jamkového panelu na 12-jamkové panely a poté do malých kultivačních lahví.

#### **4.2.6 Validace klonů**

Jednotlivé klony pocházející z buněk transdukovaných částicemi kódujícími NF- $\kappa$ B-FLuc konstrukt byly průběžně testovány na citlivost vůči 4 různým RAGE ligandům – AGE-BSA,  $\beta$ -amyloid, LPS, S100B. Jednotlivé buněčné klony byly vysety na 384-jamkové bílé panely v koncentraci 70 000 buněk/ml (20  $\mu$ l na jamku).

Druhý den byly pomocí přístroje Echo 550 přidány jednotlivé ligandy ve finálních koncentracích – 2,5  $\mu$ mol/l  $\beta$ -amyloid; 1 ng/ml LPS; 0,05 mg/ml S100B; 0,05 mg/ml AGE-BSA. Všechny treatmenty byly provedeny v triplicátech. Trojice jamek byla ponechána bez přídavku ligandu jako kontrola. Po 6-ti hodinové inkubaci bylo do jamek pomocí automatického pipetoru Multidrop přidáno 20  $\mu$ l luciferasového substrátu Britelite (PerkinElmer), následně byly panely ponechány 1-2 minuty na třepače a poté změřena luminiscence na analyzátoru EnSpire Multimode Plate Reader. Takto bylo postupně vybráno a otestováno cca 100 klonů. Klony u kterých byl zaznamenán vůči kontrole minimálně 4-násobný nárůst luminiscence po působení alespoň jednoho z testovaných ligandů byly dále expandovány do množství potřebného k zamražení.

Klony pocházející z buněk transdukovaných částicemi exprimujícími FLuc byly testovány na citlivost vůči Resveratrolu, literárně popsanému inhibitoru FLuc. Pro každý klon byl použit Resveratrol v koncentracích 1 a 10  $\mu$ M a inkubace probíhala 6 a 24 hodin. Vysetí buněk a detekce luminiscence bylo provedeno, jak je uvedeno výše. Bylo vybráno a otestováno cca 20 klonů. Klon nejvíce senzitivní vůči Resveratrolu byl expandován do množství potřebného k zamražení.

#### **4.2.7 Testování RAGE ligandů v koncentrační a časové závislosti**

Klon nejlépe odpovídající na všechny 4 testované RAGE ligandy byl podroben detailnější analýze. Všechny ligandy byly testovány v koncentrační škále (tab. 5; dvojkové ředění) pro nastavení vhodné koncentrace k testování potenciálních RAGE inhibitorů. Vzhledem k různé kinetice působení testovaných ligandů byly zvoleny 2 časové intervaly – 6 a 24 hodin. Vysetí buněk do panelů, treatment a detekce byly provedeny stejně, jak je popsáno v předešlé podkapitole.

**Tab. 5:** Koncentrační rozmezí testovaných RAGE ligandů.

Ligand	Koncentrační rozmezí
AGE-BSA	$1,56 \cdot 10^{-3} - 5 \cdot 10^{-2}$ mg/ml
S100-B	$1,56 \cdot 10^{-3} - 2 \cdot 10^{-1}$ mg/ml
$\beta$ -amyloid	$7,8 \cdot 10^{-2} - 5$ $\mu$ M
LPS	$1,6 \cdot 10^{-1} - 5$ ng/ml

#### 4.2.8 Testování komerčních RAGE inhibitorů

Pro ověření funkčnosti připravené s RAGE spřezené NF- $\kappa$ B reportérové eseje byly využity komerčně dostupné, literárně popsané RAGE inhibitory FPS-ZM1 a Azeliragon. Testování bylo provedeno na 384-jamkových panelech v koncentrační škále inhibitorů, které byly přeneseny k buňkám 30 minut po přidavku jednotlivých RAGE ligandů (koncentrace zvolené na základě výsledků 4.2.7). Po 6-ti hodinách byla provedena detekce luminiscence (viz 4.2.6).

#### 4.2.9 Testování knihovny Lopac90 na NF- $\kappa$ B responsivní reportérové buněčné eseji

Lopac90 je jednou z komerčních experimentálních knihoven využívaných pro vysokokapacitní testování na různých reportérových systémech za účelem reprofilování léčiv nebo hledání nových buněčných cílů. Tato knihovna obsahuje 90 farmakologicky aktivních látek, z nichž více jak 25 je volně prodávaných léků. Mnohé z nich jsou protinádorová léčiva s různými mechanismy účinku.

Buněčná suspenze A549 NF- $\kappa$ B-Fluc odvozeného senzitivního klonu byla nasazena na 384-jamkové destičky. Do každé jamky bylo nanášeno 25  $\mu$ l buněčné suspenze a destičky byly vloženy do inkubátoru.

Na druhý den byly látky z Lopac90 (10 mM roztoky v DMSO) přeneseny ze zdrojových destiček na panely s připravenými buňkami a to ve dvou různých koncentracích – 1 a 10  $\mu$ M. Po 30 minutách byly přidány ligandy ve vhodných koncentracích (4.2.7) a zároveň byly vytvořeny kontroly s přidavkem samotného ligandu, samotných Lopac90 látek a samotné neovlivněné buňky. Po 6-ti hodinách byla provedena detekce luminiscence dle postupu popsaného v 4.2.6.



#### **4.2.10 Testování knihovny Lopac90 na FLuc responsivní reportérové buněčné eseji**

Interakce malých molekul s FLuc může vést k falešně pozitivním výsledkům u buněčných esejí s Fluc reportérem.

Buněčná suspenze A549-Fluc odvozeného senzitivního klonu byla nasazena na 384-jamkové destičky. Do každé jamky bylo nanášeno 25  $\mu$ l buněčné suspenze (70 000/ml) a destičky byly vloženy do inkubátoru.

Následující den byly vybrané látky z Lopac90 (10 mM roztoky v DMSO) přeneseny pomocí Echo 550 ze zdrojových destiček na panely s připravenými buňkami a to ve dvou různých koncentracích – 1 a 10  $\mu$ M. Jako pozitivní kontrola byl použit Resveratrol v identických koncentracích a samotné neovlivněné buňky sloužily jako negativní kontrola. Všechny treatmenty byly provedeny v triplikátech. Detekce luminiscence byla provedena v časech 6 a 24 hodin po treatmentu dle postupu popsáno v 4.2.6.

#### **4.2.11 Luciferasová enzymatická *in vitro* esej**

Pro ověření možné interakce látek z Lopac90 s Fluc byla využita *in vitro* luciferasová esej.

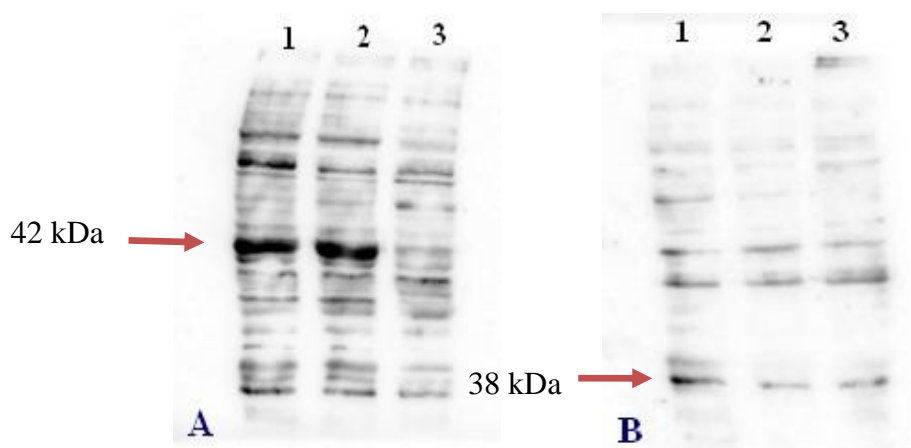
Byl připraven pracovní roztok luciferasy v PBS + 0,1 % BSA o výsledné koncentraci 0,01  $\mu$ g/ml. Tento roztok byl rozpipetován po 25  $\mu$ l do 384-jamkové destičky a do jamek byly následně pomocí přístroje Echo 550 přeneseny vybrané látky z Lopac90 ve výsledných koncentracích 1 a 10  $\mu$ M a jako pozitivní kontrola Resveratrol v koncentracích 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M a 100  $\mu$ M. Panely byly krátce stočeny a inkubovány 30 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Po uplynutí inkubační doby bylo do jamek přidáno 25  $\mu$ l luciferasového substrátu a ihned změřena luminiscence na EnSpire přístroji.

## 5 VÝSLEDKY

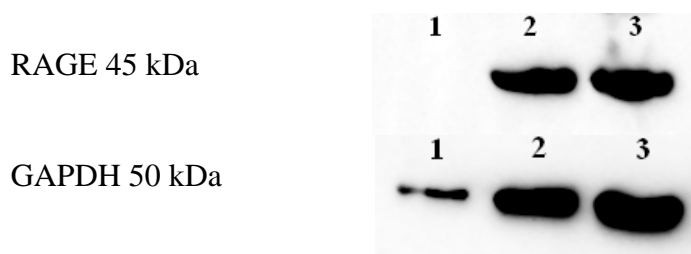
### 5.1 Vyhodnocení western blotu

Pro ověření exprese RAGE v buněčných liniích A549 a HeLa byla použita metoda Western blot. Byla provedena optimalizace detekce využitím anti-RAGE primárních protilátek od různých výrobců (tab. 3) a nejlepších výsledků bylo dosaženo s protilátkou od firmy Origene v ředění 1:5000 (obr. 10). Na gel byly nanášeny lyzáty připravené z buněčných linií A549, A549 klon 32, HeLa a jako negativní kontrola byla použita RAGE neexprimující linie CHO. Jako normalizační protein byl použit GAPDH.

Protilátky od firmy Sigma (1:1000) a Abcam (1:1000) se v ředěních doporučených výrobcem vážaly velmi nespecificky (Obr. 9), v případě protilátek od Life Technologies (1:250) a Cell Signaling (1:1000) nebyl na membráně po detekci zaznamenán žádný signál.



**Obr. 9:** Výsledky Western blotu při použití primárních protilátek od různých výrobců. A – Abcam, B – Sigma-Aldrich; 1 - A549, 2 - A549 klon 32, 3 – HeLa.

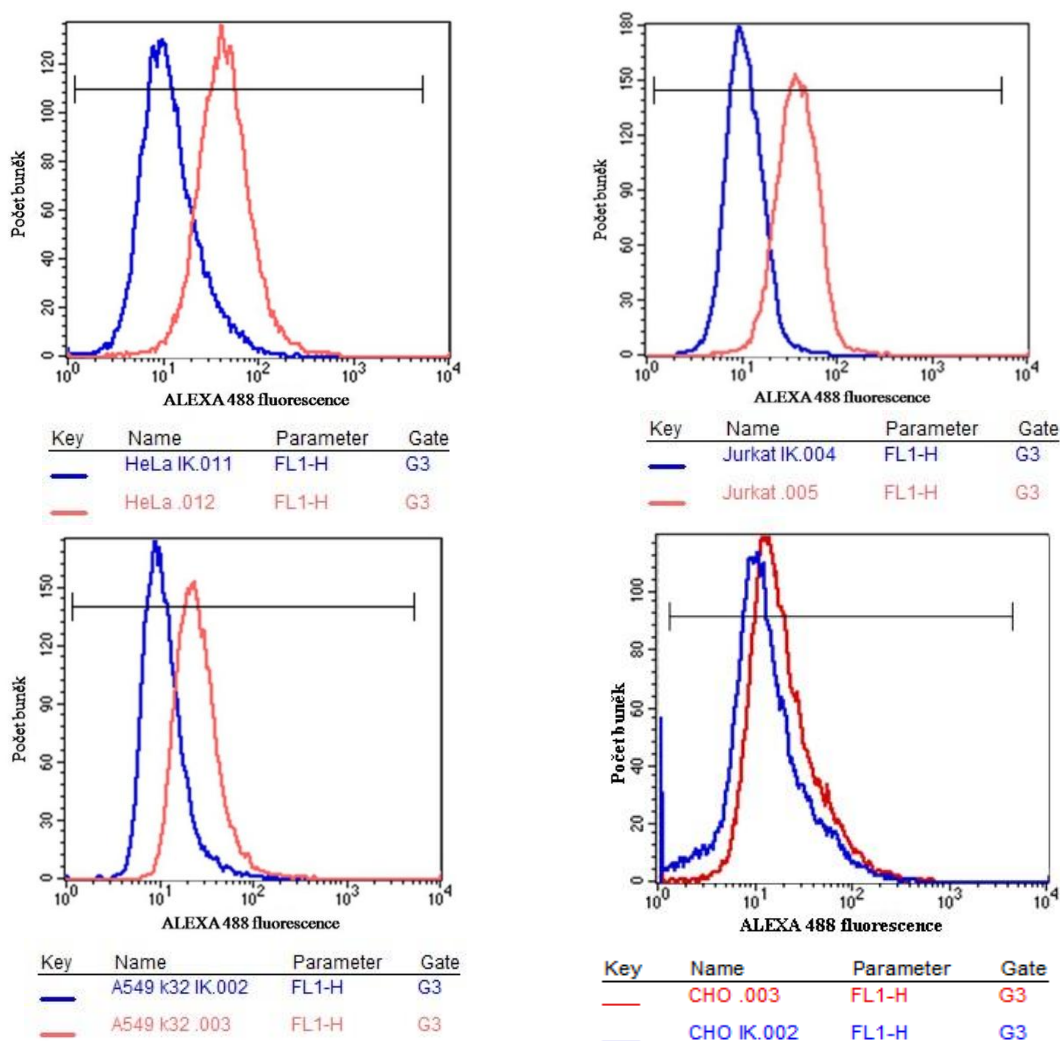


**Obr. 10:** Exprese proteinu RAGE v buněčných lyzátech detekovaná protilátkou od Origene. 1 – CHO, 2 – A549 klon 32, 3 – A549.

Výsledky potvrdily vysokou expresi RAGE v A549 buňkách a to jak mateřské linii, tak v odvozeném klonu 32 (obr. 10).

## 5.2 Vyhodnocení průtokové cytometrie

Míra exprese RAGE u různých buněčných linií odvozených od solidních nádorů (HeLa, A549) a rovněž hematologických malignit (Jurkat) byla rovněž analyzována metodou průtokové cytometrie. Pro tuto metodu detekce byly testovány protilátky od 2 různých výrobců, kdy nejlepších výsledků bylo dosaženo s protilátkou od firmy Abcam (obr. 11). Porovnání vzorku a odpovídající izotypové kontroly sloužící k eliminaci nespecifických vazeb protilátky bylo provedeno pomocí programu CellQuest (BD). Výstupem měření na průtokovém cytometru jsou histogramy s vypočtenými hodnotami mediánů fluorescenční intenzity (MFI; obr. 11; tab. 6). Pro každou analyzovanou buněčnou linii bylo provedeno porovnání MFI příslušné izotypové kontroly a vzorku a stanoven poměr vyjadřující míru exprese (tab. 6). MFI izotypových kontrol byl vždy softwarově nastaven na hodnotu 10.



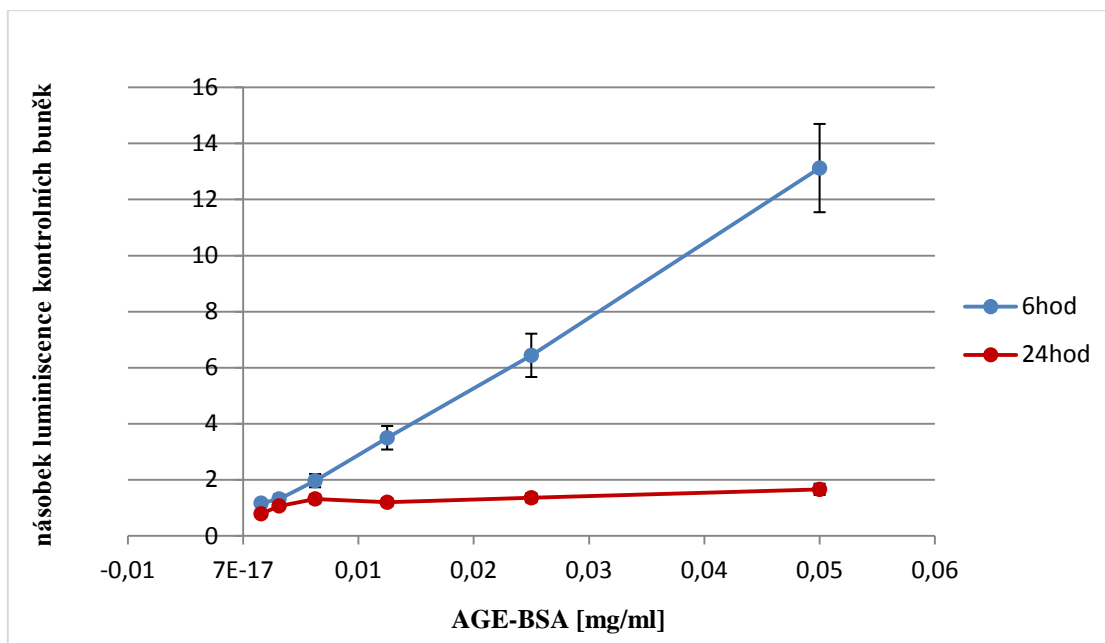
**Obr. 11:** Reprezentativní histogramy exprese RAGE ve vybraných buněčných liniích. Modrá barva reprezentuje histogram izotypové kontroly, červená barva histogram vzorku.

**Tab. 6:** Vyhodnocení míry exprese RAGE v různých buněčných liniích metodou průtokové cytometrie. MFI IK = medián fluorescenční intenzity izotypové kontroly

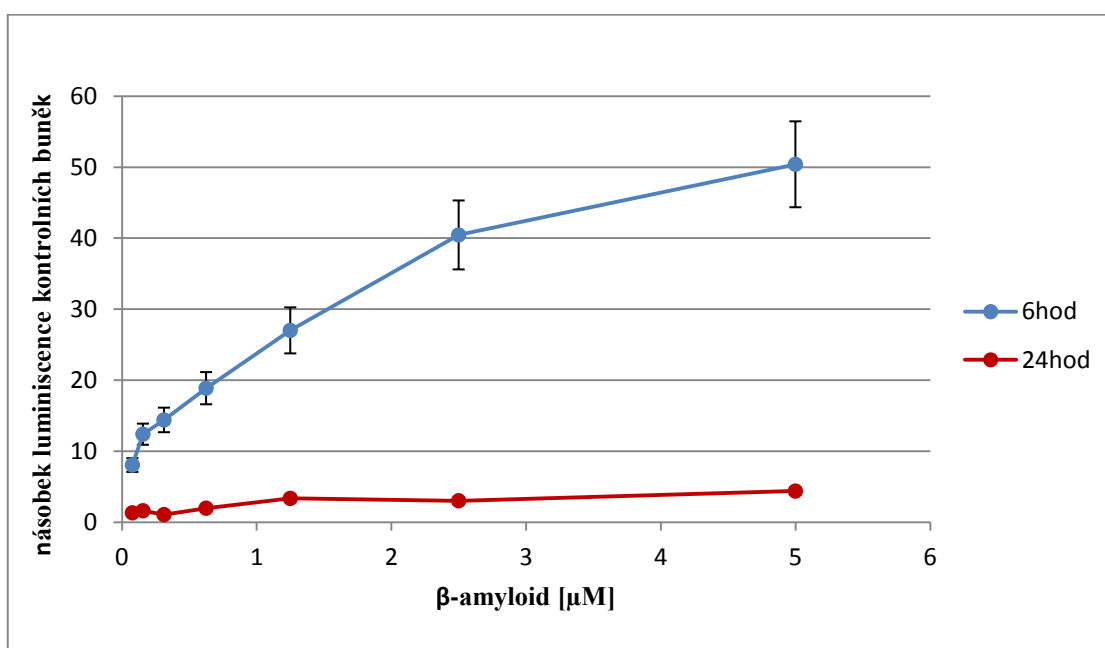
Buněčná linie	MFI IK	MFI vzorek	Poměr MFI vzorek/MFI IK
HeLa	10,46	41,79	4
Jurkat	10,00	36,19	3,6
A549-k32	9,65	50,03	5,2
CHO	10,75	12,86	1,2

### 5.3 Výsledky testování RAGE ligandů v časové a koncentrační závislosti

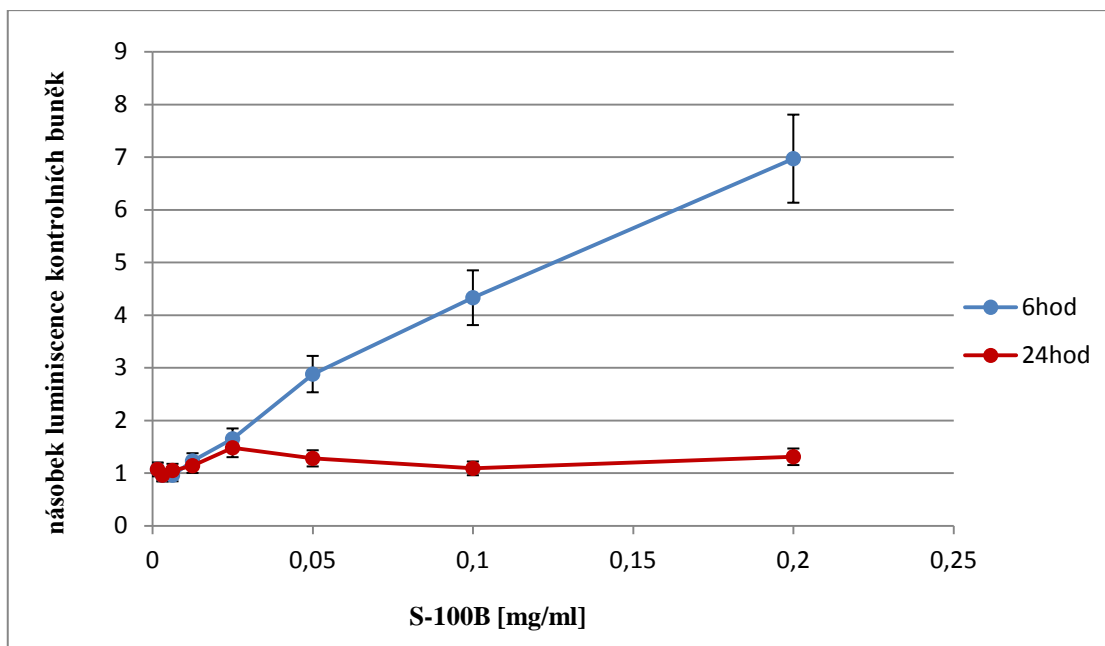
V rámci postupné validace cca 100 klonů pocházejících z A549 buněk transdukovaných lentivirovým NF- $\kappa$ B-Fluc vektorem byla cca u 10 klonů zjištěna senzitivita vůči 1 nebo více RAGE ligandům, vyjádřená schopností aktivovat NF- $\kappa$ B. Pro další experimenty byl vybrán klon s označením „A549-klon 32“, který vykazoval po 6-ti hodinové inkubaci s jednotlivými RAGE ligandy významný nárůst aktivace NF- $\kappa$ B proti kontrole, a to u všech 4 použitých ligandů. Pro detailnější analýzu byly zvoleny 2 časové intervaly – 6 a 24 hodin a zároveň byly všechny ligandy testovány v koncentrační škále (tab. 5). Každá koncentrace byla měřena ve 4 opakováních. Z hodnot luminiscence byly pro každou koncentraci a časový interval vypočítány průměrné hodnoty a směrodatné odchylky a stanoveny násobky nárůstů luminiscence vůči průměrné hodnotě luminiscence kontroly (neovlivněných buněk) a vloženy do grafů (obr. 12-15). Míra nárůstu luminiscence odpovídá nárůstu s RAGE spřažené aktivace NF- $\kappa$ B.



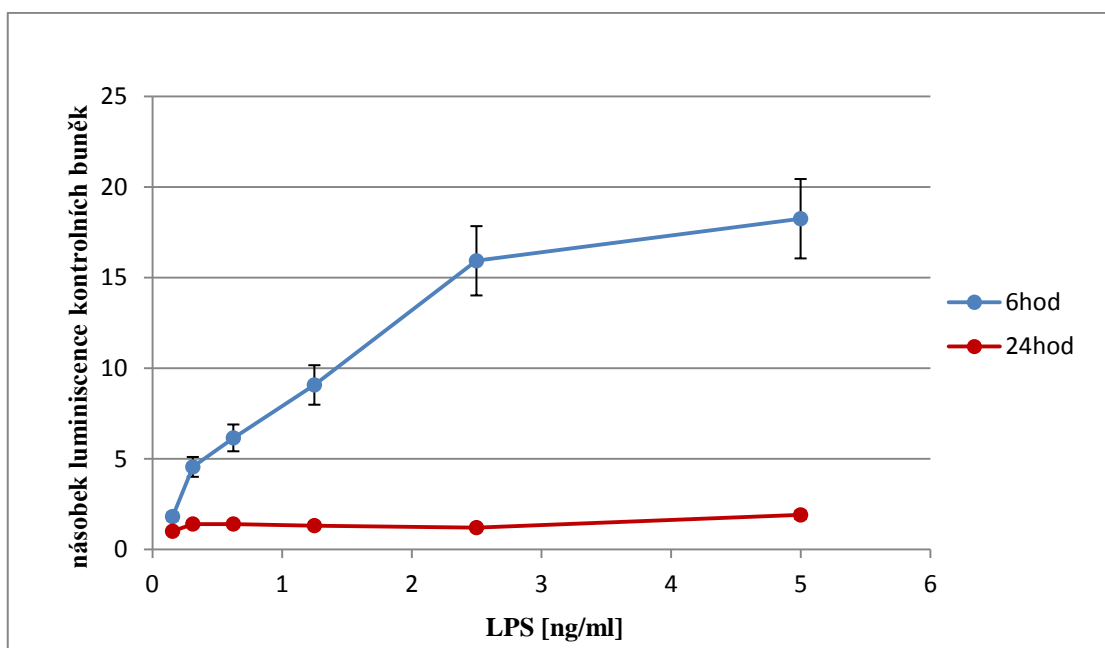
**Obr. 12:** Graf časové a koncentrační závislosti stimulace buněk A549-klonu 32 použitím AGE-BSA. Jednotlivé body křivek vyjadřují násobky průměrné hodnoty luminiscence stimulovaných buněk vůči buňkám kontrolním (hodnota 1). AGE-BSA byl použit v koncentračním rozmezí 0,0015625 – 0,05 mg/ml.



**Obr. 13:** Graf časové a koncentrační závislosti stimulace buněk A549 klonu-32 použitím β-amyloidu. Jednotlivé body křivek vyjadřují násobky průměrné hodnoty luminiscence stimulovaných buněk vůči buňkám kontrolním (hodnota 1). β-amyloid byl použit v koncentračním rozmezí 0,078 – 5 μM.



**Obr. 14:** Graf časové a koncentrační závislosti stimulace buněk A549-klonu 32 použitím S-100B. Jednotlivé body křivek vyjadřují násobky průměrné hodnoty luminescence stimulovaných buněk vůči buňkám kontrolním (hodnota 1). S-100B byl použit v koncentračním rozmezí 0,0015625 – 0,2 mg/ml.

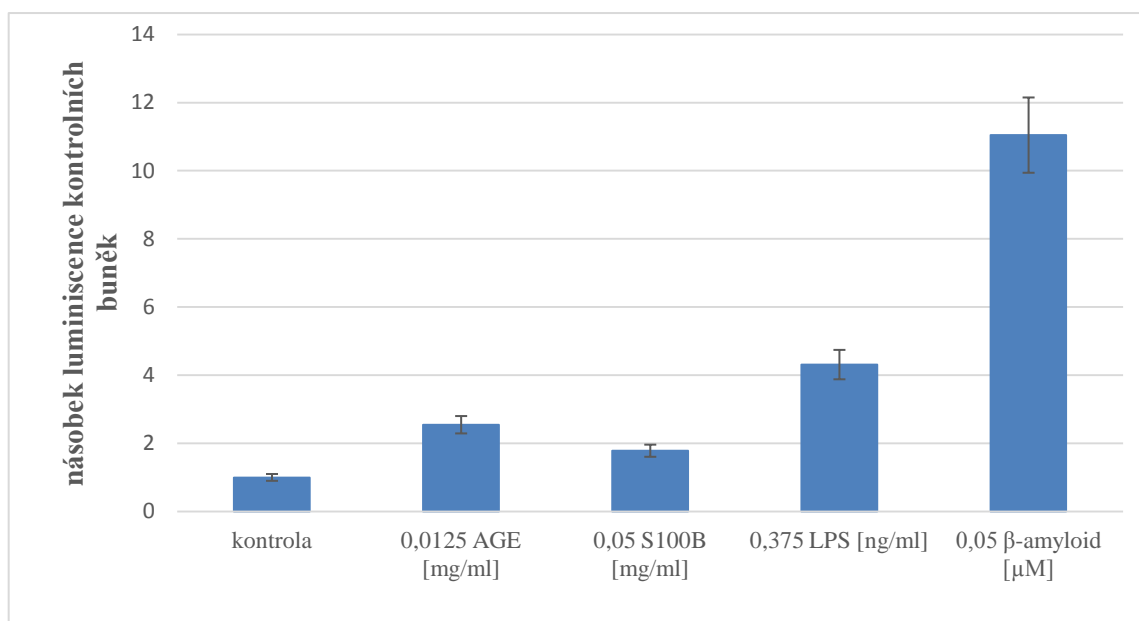


**Obr. 15:** Graf časové a koncentrační závislosti stimulace buněk A549 klonu-32 použitím LPS. Jednotlivé body křivek vyjadřují násobky průměrné hodnoty luminescence stimulovaných buněk vůči buňkám kontrolním (hodnota 1). LPS byl použit v koncentračním rozmezí 0,15625 – 5 ng/ml.

Z grafů je patrné, že zatímco po 6 hodinové inkubaci dochází u všech ligandů k výraznému, koncentračně závislému nárůstu luminiscence vůči kontrole, po 24 hodinách je stimulace buněk AGE-BSA a S100B pouze minimální a pro  $\beta$ -amyloid a LPS dosahuje více než 2-násobného nárůstu pouze u nejvyšších testovaných koncentrací. Na základě těchto výsledků byly další experimenty omezeny pouze na časový interval 6 hodin.

#### 5.4 Vyhodnocení komerčních RAGE inhibitorů

Jako pozitivní kontroly pro ověření funkčnosti připravené, s RAGE spřažené, NF- $\kappa$ B reportérové buněčné eseje byly použity dva komerční, literárně popsané inhibitory – FPS-ZM1 a Azeliragon, které byly testovány v koncentrační škále. Koncentrace jednotlivých ligandů byly zvoleny na základě výsledků z předešlé kapitoly tak, aby očekávané násobky nárůstu luminiscence proti kontrole (hodnota 1) byly v rozmezí 2-4. Jak je patrné z obr. 16, koncentrace ligandů pro tento experiment byly zvoleny optimálně, s výjimkou  $\beta$ -amyloidu, kde došlo k neočekávaně vysokému nárůstu, patrně v důsledku použití nové šarže ligandu.

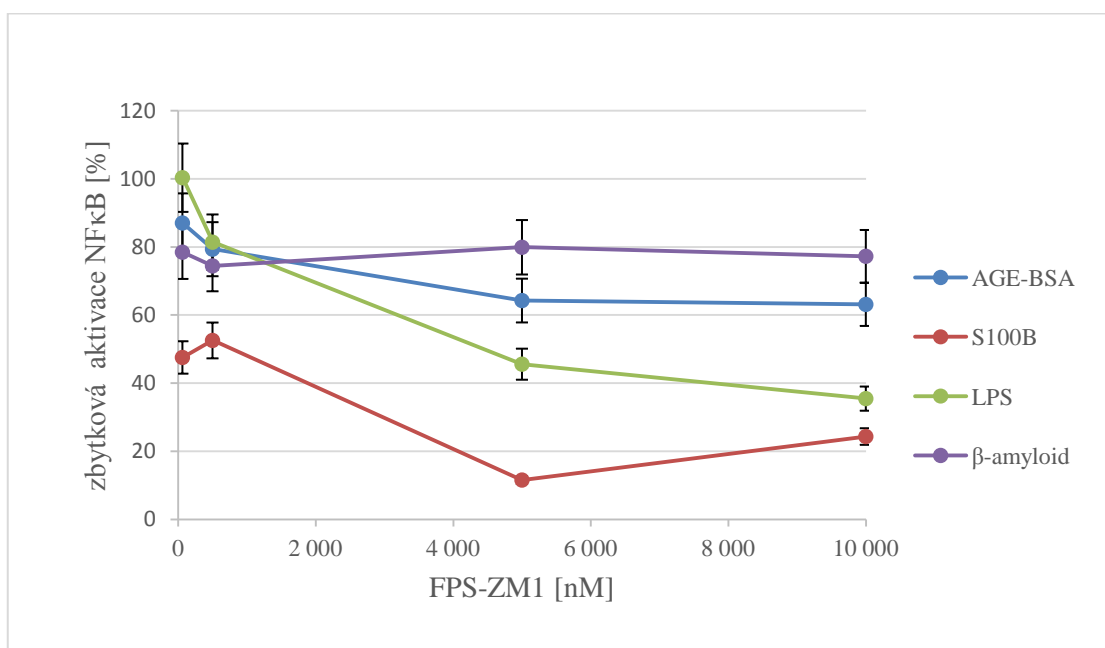


**Obr. 16:** Míra aktivace NF- $\kappa$ B RAGE ligandy ve zvolených koncentracích po 6,5 hodinách inkubace.

Inhibiční účinek testovaných komerčních inhibitorů je prezentován ve formě zbytkové aktivace NF- $\kappa$ B v buněčném klonu 32 (obr. 17 a 18). Hodnoty uvedené v grafech byly kalkulovány podle následujícího vzorce kde Lum (lig.+inh.) vyjadřuje průměrnou hodnotu luminiscence v buňkách ovlivněných inhibitorem v přítomnosti RAGE ligandu, Lum (inh.) představuje průměrnou hodnotu luminiscence v jamkách ovlivněných

samotným inhibítozem, Lum (lig.) je průměrná hodnota luminiscence buněk stimulovaných ligandem a Lum (kontrola) představuje průměrnou luminiscenci neovlivněných buněk.

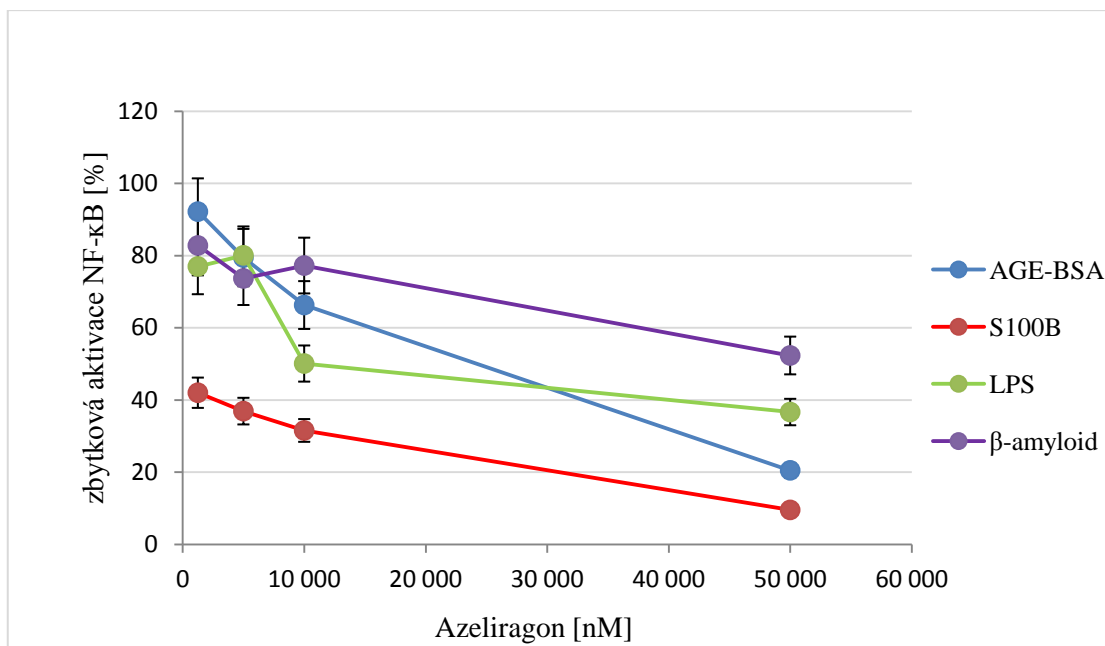
$$\text{zbytková aktivace NF}\kappa\text{B [\%]} = \frac{\text{Lum (lig.+inh.)} - \text{Lum (inh)}}{\text{Lum(lig.)} - \text{Lum(kontrola)}} \times 100$$



**Obr. 17:** Graf inhibičního účinku FPS-ZM1 na, s RAGE spřaženou, aktivaci NF-κB po 6-ti hodinách inkubace. Koncentrační rozmezí FPS-ZM1 bylo 0,062 – 10 μM, koncentrace ligandů viz obr. 16.

Z Obr. 17 je zřejmé, že nejmenší inhibiční účinek FPS-ZM1 byl u buněk stimulovaných β-amyloidem. Za jeho působení byla zbytková aktivace NF-κB v rozmezí 70 – 80 %, což odpovídá inhibičnímu efektu 20 – 30 %. Nejvyššího inhibičního efektu bylo dosaženo u buněk aktivovaných S100B ligandem a to v rozmezí 47 – 88 %. U buněk stimulovaných LPS dosahoval inhibiční efekt rozmezí 1 – 65 % a u buněk stimulovaných AGE-BSA 13 – 37 %.





**Obr. 18:** Graf inhibičního účinku Azeliragonu na, s RAGE spřaženou, aktivaci NF-κB po 6-ti hodinách inkubace. Koncentrační rozmezí Azeliragonu bylo 1,25 – 50 μM, koncentrace ligandů viz Obr. 16.

Z obr. 18 pro Azeliragon je patrné, že nejvýraznější inhibiční efekt byl u buněk stimulovaných S100B ligandem. Za jeho působení byla zbytková aktivace NF-κB v rozmezí 10 – 42 %, tudíž inhibiční efekt byl 58 – 90 %. Nejmenšího inhibičního efektu bylo dosaženo u buněk stimulovaných β-amyloidem a to 17 – 48 %. U buněk aktivovaných ligandem LPS byl inhibiční efekt v rozmezí 20 – 63 % a u AGE-BSA 8 – 80%.

### 5.5 Vyhodnocení testování knihovny Lopac90 na NF-κB responsivní reportérové buněčné esaji

Látky z knihovny Lopac90 byly testovány na klonu 32 odvozeném z A549 buněk v koncentracích 1 a 10 μM. Koncentrace ligandů byly zvoleny stejně jako v případě testování komerčních inhibitorů. Evaluace naměřených hodnot luminiscence byla provedena podle vzorce uvedeného v předešlé kapitole a hodnoty byly prezentovány jako „zbytková aktivace NF-κB“. Jako aktivní látky, tj. s významným inhibičním účinkem na RAGE byly vybrány a prezentovány takové, u nichž byla při 1 nebo 10 μM koncentraci alespoň pro jeden ligand zbytková aktivace NF-κB 40 % a méně (tab. 7).

**Tab.7:** Souhrnná tabulka aktivních sloučenin z knihovny Lopac90. Prezentovaná čísla vyjadřují procento zbytkové aktivace NF-κB. Hodnoty označené hvězdičkou vyjadřují efekt zatížený cytotoxicitou testované látky v použité koncentraci. Z důvodu ochrany dosud nepublikovaných dat jsou látky prezentovány pod LEM kódy a nejsou uvedeny jejich struktury.

	A549-NF-κB; 1 μM				A549 NF-κB; 10 μM			
	AGE-BSA	S-100B	β-amyloid	LPS	AGE-BSA	S-100B	β-amyloid	LPS
LEM7281		55,8	21					
LEM7294			15					
LEM7330			28,6					
LEM7342		58,2	4,3					
LEM7366					46,6			
LEM7283			13,7				3,9	
LEM7343			34					
LEM7296					26,3		6,6	
LEM7332					18,5			28,8
LEM7356					54,9		31,3	
LEM7333								55,7
LEM7345					34,7*		4,5*	
LEM7357	41,4*	33,6*	1*	46,2*	2*	17,9*	1,5*	2,9*
LEM7286					31,7	29,9		
LEM7311					55,4	46,2	23,1	56,1
LEM7326	50,5	51,1	42,5		44		38,5	
LEM7364		43,6			30,1*		0*	60,1*

Jak je patrné z tab. 7 z 90 látek knihovny Lopac90 vykazovalo celkem 17 významný inhibiční účinek na, s RAGE spřažené, NF-κB reportérové buněčné eseji. V případě 1 μM koncentrace měly u buněk aktivovaných AGE-BSA inhibiční efekt pouze látky LEM7357 58,6 % a LEM7326 49,5 %. U buněk stimulovaných S100B ligandem byl nejvyšší inhibiční efekt u látky LEM7357 a to 66,4 %. U buněk aktivovaných β-amyloidem byl vysoký inhibiční efekt u 8 látek, z nichž nejlépe dopadla LEM7357 s inhibicí 99 %. U buněk stimulovaných LPS ligandem měla inhibiční efekt pouze jedna látka LEM7357 a to 53,8 %.

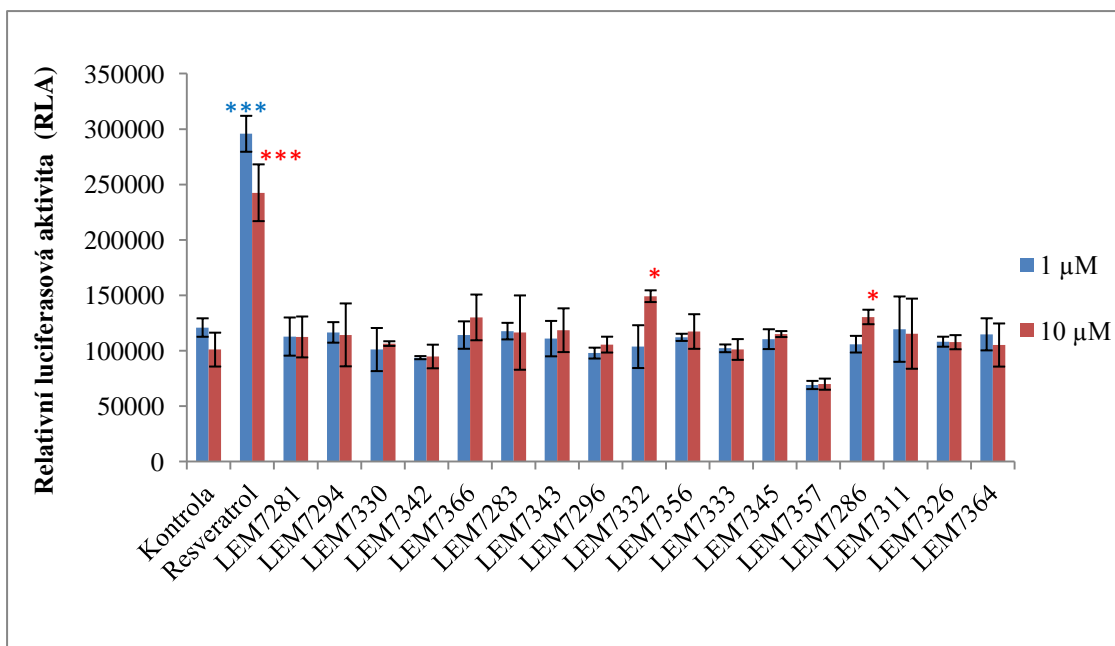
Jak je vidět u koncentrace 10 μM byl pozorován větší inhibiční efekt u mnoha látek. U buněk stimulovaných AGE-BSA ligandem se inhibice projevila celkem u 10 látek. 92 % inhibičního efektu dosáhla látka LEM7357. V případě buněk stimulovaných S100B nejvíce

inhibovala látka LEM7357 82,1 %. Nejvyššího inhibičního efektu bylo dosaženo u buněk aktivovaných  $\beta$ -amyloidem. Látka LEM7345 způsobila 95,5 %, LEM7357 98,5 % a LEM7364 dokonce inhibici na úroveň nestimulovaných buněk. U buněk stimulovaných LPS ligandem byl prokázán inhibiční efekt u 5 látek, z nichž nejlépe dopadla látka LEM7357 s inhibicí 97,1 %. Nejzajímavější látkou mezi všemi aktivními je nepochybně látka LEM7357, která vykazovala významný inhibiční efekt u buněk stimulovaných všemi RAGE ligandy, a to i v koncentraci 1  $\mu$ M. Výsledky dosažené u 10  $\mu$ M koncentrace je potřeba brát s rezervou neboť při této koncentraci byly po 6-ti hodinách inkubace v mikroskopu pozorovatelné známky mírné cytotoxicity. Podobně tomu bylo rovněž u látek LEM7345 a LEM7364.

### **5.6 Testování knihovny Lopac90 na FLuc responsivní reportérové buněčné eseji**

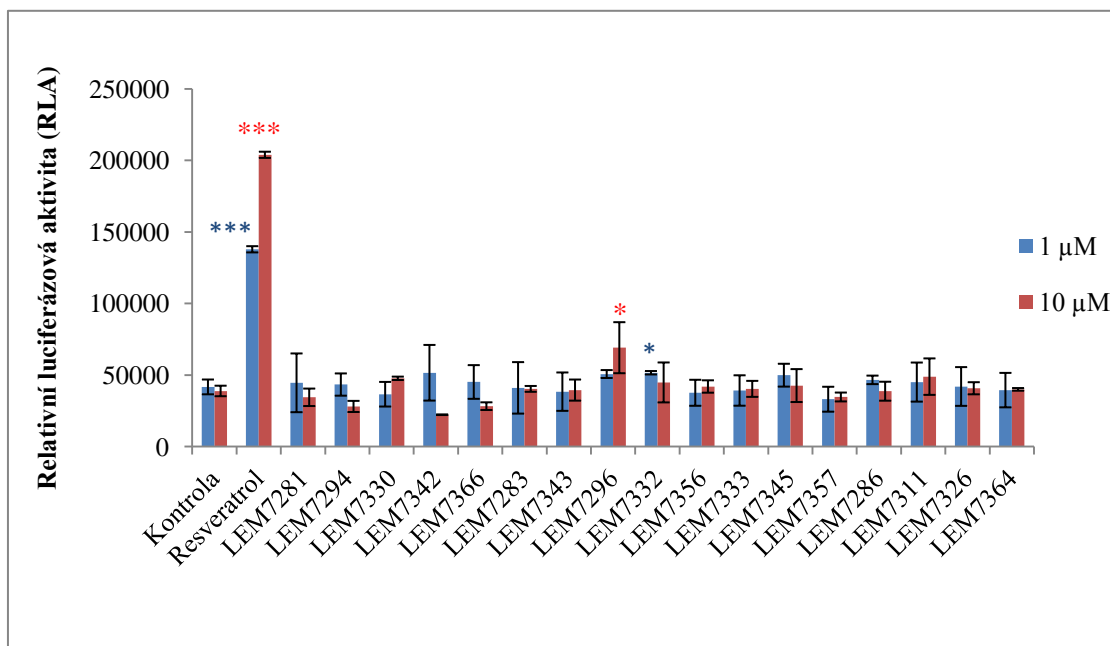
V rámci postupné validace cca 20 klonů odvozených z A549 buněk transdukovaných lentivirovým Fluc vektorem byl pro testování aktivních látek z knihovny Lopac90 vybrán klon s označením „klon 8“, který vykazoval nejvyšší citlivost vůči Resveratrolu.

Na A549 Fluc responsivní reportérové buněčné eseji (klon 8) byl sledován účinek celkem 17 aktivních látek z knihovny Lopac90 při dvou koncentracích – 1  $\mu$ M a 10  $\mu$ M a ve dvou časových intervalech – 6 a 24 hodin. Testování probíhalo na 384-jamkových destičkách a každá látka byla měřena ve 4 opakováních pro každou koncentraci. Relativní luciferasová aktivita (RLA) odpovídá průměrným hodnotám luminiscence naměřeným na spektrofotometru EnSpire (obr. 19 a 20).



**Obr. 19:** Relativní luciferasová aktivita FLuc responsivního klonu 8 po 6-ti hodinové inkubaci s aktivními látkami z Lopac90. Hvězdičkami označené látky vykazují v porovnání s kontrolou statisticky významný efekt.

Po 6-ti hodinové inkubaci v případě 10 μM koncentrace v porovnání s kontrolou mají statisticky významný efekt látky LEM7332 a LEM7286. V případě 1 μM koncentrace nebyl zaznamenán významný efekt u žádné z vybraných látek. Pokles RLA u látky LEM7357 je způsoben její cytotoxicitou, jak již bylo dříve zmíněno

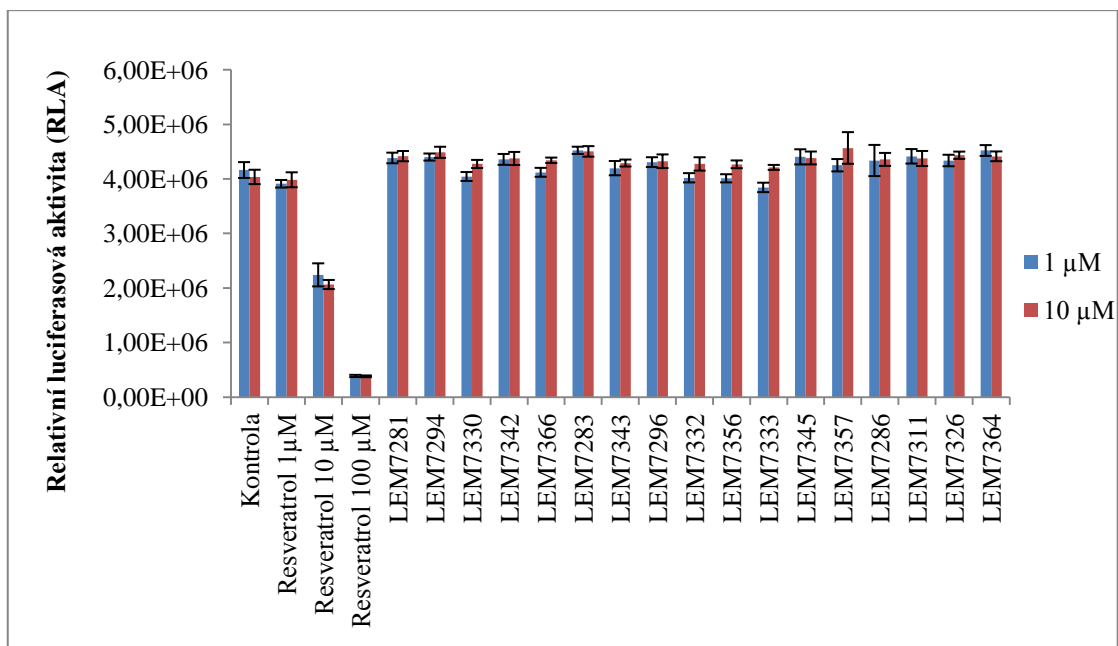


**Obr. 20:** Relativní luciferasová aktivita FLuc responsivního klonu 8 po 24-ti hodinové inkubaci s aktivními látkami z Lopac90. Hvězdičkami označené látky vykazují v porovnání s kontrolou statisticky významný efekt.

Z výsledků po 24-ti hodinové inkubaci s aktivními látkami z Lopac90 knihovny je patrné, že v případě 1 μM koncentrace byl vyšší nárůst RLA oproti kontrole pouze u látky LEM7332. V případě 10 μM koncentrace byl statisticky významný efekt u látek LEM7330 a LEM7296.

### 5.7 Luciferasová enzymatická *in vitro* esej

Testování bylo provedeno na 17 látkách z Lopac90, které byly aktivní na základě výsledků z NF-κB-Fluc reportérové buněčné eseje (viz tab. 7). Každá látka byla testována v koncentracích 1 a 10 μM ve 4 opakováních. Na spektrofotometru EnSpire byly naměřeny hodnoty luminiscence odpovídající relativní luciferasové aktivitě. Z hodnot luminiscence byly pro každou látku a koncentraci vypočítané průměrné hodnoty a směrodatné odchylky a vloženy do grafu (obr. 21).



**Obr. 21:** Graf závislosti RLA na koncentraci vybraných aktivních látek z Lopac90 ve směsi s rekombinantní luciferasou. Výsledky měření možné interakce aktivních látek z knihovny Lopac90 s rekombinantní luciferasou.

Výsledky z obr. 21 naznačují, že žádná z testovaných látek nevykazovala v koncentracích 1 ani 10 μM proti kontrole statisticky významnou inhibici RLA, čímž lze vyloučit jejich možnou interakci s rekombinantní FLuc. Resveratrol naproti tomu vykazuje očekávanou koncentračně závislou inhibici RLA prokazující jeho interakci s FLuc.

## 6 DISKUZE

RAGE patří do skupiny „pattern-recognition“ receptorů a váže tak mnoho ligandů, které se účastní chronických zánětlivých a imunitních odpovědí a s nimi spojených onemocnění. Řada vědeckých publikací dokazuje, že zamezení interakce mezi RAGE a jeho ligandy může projevy onemocnění zmírnit či dokonce zcela utlumit. O potenciální inhibitory schopné blokovat interakci RAGE-ligand je tak stále větší zájem. Dosud jsou však literárně popsané pouze dva, které dosáhly druhé fáze klinického testování.

V rámci této diplomové práce byla připravena reportérová buněčná esej odvozená od RAGE exprimující linie A549 pro vysokokapacitní testování potenciálních RAGE inhibitorů. Principem eseje je monitorování aktivace NF- $\kappa$ B, který představuje klíčový transkripční faktor RAGE signalizace. Komerční lentivirové částice použité k přípravě eseje kódují inducibilní NF- $\kappa$ B responsivní konstrukt exprimující světluškovou luciferasu jako reportér a tím je umožněna snadná kvantifikovatelnost míry aktivace NF- $\kappa$ B, spřažené s RAGE signalizací. V rámci validace klonů byl vybrán „klon 32“, který výborně odpovídal na přítomnost všech RAGE ligandů v testované koncentrační škále. Funkčnost připravené eseje byla prokázána použitím dvou komerčních RAGE inhibitorů - Azeliragonu a FPS-ZM1.

Funkčně ověřená esej byla následně využita k testování chemické knihovny nízkomolekulárních látek Lopac90. Počet nalezených aktivních látek, které z více než 60 % snižovaly NF- $\kappa$ B aktivaci v buňkách stimulovaných alespoň jedním z testovaných RAGE ligandů byl překvapivě vysoký (17). Lze tedy usuzovat, že výsledný pozorovaný efekt nemusí u všech látek nutně souviset s jejich interakcí s RAGE, ale dalšími buněčnými cíli zapojenými v signálních drahách končících aktivací NF- $\kappa$ B

Použití světluškové luciferasy (FLuc) jako reportéru je široce využívané v molekulární biologii a ve vysokokapacitním skrínungu malých molekul (HTS). Enzym FLuc katalyzuje oxidaci luciferinu za vzniku oxyluciferinu a ATP. Jistou nevýhodou použití FLuc jako reportéru v HTS je možnost její přímé interakce s testovanými nízkomolekulárními látkami vedoucí k falešně pozitivním výsledkům. Z tohoto důvodu byla připravena reportérová esej konstitutivně exprimující FLuc odvozená rovněž od buněčné linie A549. Pro validaci klonů byl použit literárně popsaný inhibitor FLuc Resveratrol a pro HTS testování byl vybrán klon nejvíce senzitivní vůči Resveratrolu. Namísto očekávaného snížení RLA vůči kontrole byl pozorován opačný efekt, kdy buňky ovlivněné Resveratrolem paradoxně vykazovaly koncentračně závislé zvýšení RLA. Vysvětlení lze nalézt v literatuře. Bylo

zjištěno, že existují inhibitory, které mohou fungovat uvnitř buňky, to vede k prodloužení poločasu rozpadu ektopicky exprimovaného enzymu FLuc a tím ke zvýšení aktivity luciferasy (Thompson *et al.* 1991). Testování aktivních látek z Lopac90 prokázalo u 5 ze 17 látek statisticky významný nárůst RLA vůči kontrole, avšak tento nárůst byl v porovnání s Resveratolem pouze nepatrný. Možná interakce aktivních látek s FLuc byla dále ověřována v *in vitro* podmínkách využitím rekombinantní FLuc. Efekt pozorovaný u 5 látek na FLuc reportérové buňčné eseji v *in vitro* podmínkách však prokázán nebyl



## **7 ZÁVĚR**

Cílem této práce bylo testování komerční knihovny Lopac90 na připravených buněčných esejích. Buněčné linie A549 byly transdukovány komerčními lentivirovými částicemi. Pro přípravu buněčného systému k monitorování aktivace NF- $\kappa$ B byly použity lentivirové částice kódující inducibilní NF- $\kappa$ B responsivní konstrukt exprimující světluškovou luciferázu jako reportér. K vytvoření reportérové linie exprimující FLuc byly použity lentivirové částice konstitutivně exprimující FLuc. Následně byla provedena selekce a validace klonů za pomoci RAGE ligandů. Byl vybrán klon, který vykazoval nejvyšší nárůst aktivace po stimulaci ligandy a ten byl použit pro podrobnější testování. Byl prokázán inhibiční vliv komerčních inhibitorů i několika látek z knihovny Lopac90. Cíle vytyčené v rámci této diplomové práce byly splněny.

## 8 LITERATURA

Abe R., Shimizu, T., Sugawara H., Watanabe H., Nakamura H., Choei H., Sasaki N., Yamagishi S., Takeuchi M., Shimizu H. (2004). Regulation of human melanoma growth and metastasis by AGEAGE receptor interactions. *Journal of Investigative Dermatology*, 122, 461-467.

Alexiou P., Chatzopoulou M., Pegklidou K., Demopoulos V. J. (2010). RAGE: A Multi-Ligand Receptor Unveiling Novel Insights in Health and Disease. *Current Medicinal Chemistry*, 21, 2232-52.

Banerjee S., Friggeri A., Liu G., Abraham E. (2010). The C-terminal acidic tail is responsible for the inhibitory effects of HMGB1 on efferocytosis. *Journal of Leukocyte Biology*, 88, 973–979.

Bank R. A., Bayliss M. T., Lafeber F. P. J. G, Maroudas A., Tekoppele J. M., (1998). Ageing and zonal variation in post-translational modification of collagen in normal human articular cartilage: the age-related increase in Non-Enzymatic Glycation affects biomechanical properties of cartilage. *Biochemical Journal*, 330, 345-351.

Barnes P. J., Karin M. (1997). Nuclear factor- $\kappa$ B-a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *The New England Journal of Medicine*, 336, 1066-1071.

Bartling B., Hofmann H. S., Weigle B., Silber R.E., Simm A (2005). Down-regulation of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) supports non-small cell lung carcinoma. *Carcinogenesis*, 26, 293-301.

Basta G., Lazzarini G., Massaro M. (2002). Advanced glycation end products activate endothelium through signal transduction receptor RAGE a mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation*, 105, 816-822.

Bernard G. R., Artigas A., Brigham K. L., Carlet J., Falke K., Hudson L., Lamy M., Legall J. R., Morris A., Spragg R. (1994). The American- European consensus conference

on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 149, 818-824.

Bianchi M. E. and Manfredi A. A. (2007). High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunology Review*, 220, 35-46.

Bierhaus A., Humpert P. M., Morcos M., Wendt T., Chavakis T., Arnold B., Stern D. M., Nawroth P. P. (2005). Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *The Journal of Molecular Medicine*, 83, 876-886.

*Bierhaus A., Stern D. M., Nawroth P. P. (2006). RAGE in inflammation: a new therapeutic target? Current Opin Investigatagion Drugs*, 7, 985-991

Bierhaus A., Schiekofer S., Schwaninger M., Andrassy M., Humpert P., Chen J., Hong M., Luther T., Henle T., Klötting I., Morcos M., Hofmann M., Tritschler H., Weigle B., Kasper M., Smith M. A., Perry G., Schmidt A. M., Stern D. M., Häring H. U., Schleicher E., Nawroth P. P. (2001). Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Diabetes*, 50, 2792-2809.

Brett J., Schmidt A. M., Yan S. D., Zou Y. S., Weidman E., Pinsky D., Nowygrod R., Nepper M., Przysiecki C., Shaw A, Migheli A., Stern D. (1993). Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *The American Journal of Pathology*, 143, 1699-1712.

Brezniceanu M. L., Volp K., Bosser S., Solbach C., Lichter P., Joos S. and Zornig M. (2003). HMGB1 inhibits cell dech in yeastand mammalian cells and is abundantly expressed in human breast carcinoma. *The FASEB Journal*, 17, 1295-1297.

Brummelkamp T. R., Bernards R., Agami R. (2002). Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cells*, 2, 243-247.

Cecil D. L., Johnson K., Rediske J., Lotz M., Schmidt A. M., Terkeltaub R. (2005). Inflammation-induced chondrocyte hypertrophy is driven by receptor for advanced glycation end products. *Journal of Immunology*, 175, 8296-8302.

Chavakis T., Bierhaus A., Al-Fakhri N., Schneider D., Witte S., Linn T., Nagashima M., Morser J, Arnold B., Preissner K. T., Nawroth P. P. (2003). The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *The Journal of Experimental Medicine*, 198, 1507-1515.

Chen J. R., Takahashi M., Suzuki M., Kushida K., Miyamoto S., Inoue T. (1999). Comparison of the concentrations of pentosidine in the synovial fluid, serum and urine of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatology*, 38, 1275-1278.

Collison K. S., Parhar R. S., Saleh S. S., Meyer B. F., Kwaasi A. A., Hammami M. M., Schmidt A. M., Stern D. M., Al-Mohanna F. A. (2002.) RAGE-mediated neutrophil dysfunction is evoked by advanced glycation end products (AGEs). *Journal of Leukocyte Biology*, 71, 433-444.

Dattilo B. D., Fritz G., Leclerc E., Vander Kooi C. W., Heizmann C. W., Chazin W. J. (2007). The extracellular region of the receptor for advanced glycation end products is composed of two independent structural units. *Biochemistry*, 46, 6957-6970.

Deane R., Singh I., Sagare A. P., Bell R. D., Ross N. T., Larue B., Love R., Perry S., Paquette N., Deane R. J., Thiagarajan M., Zarcone T., Fritz G., Friedman A. E., Miller B. J., Zlokovic B. V. (2012). A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid  $\beta$ -mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 122, 1377-1392.

DeGroot J., Verzijl N., Bank R. A., Lafeber F. P., Bijlsma J. W., TeKoppele J. M. (1999). Age-related decrease in proteoglycan synthesis of human articular chondrocytes: the role of nonenzymatic glycation. *Arthritis and Rheumatism*, 42, 1003-1009.

Drinda S., Franke S., Ruster M. (2005). Identification of the receptor for advanced glycation end products in synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis, *Rheumatology International*, 25, 411-413.

Evans A., Lennard T. W. and Davies B. R. (2004). High-mobility group protein 1(Y): Metastasis-associated or metastasis-inducing? *Journal of Surgical Oncology*, 88, 86-99.

Filleur S., Courtin A., Ait-Si-Ali S., Guglielmi J., Merle C., Harel-Bellan A., Clezardin P., Cabon F. (2003). SiRNA-mediated inhibition of vascular endothelial growth factor severely limits tumor resistance to antiangiogenic thrombospondin-1 and slows tumor vascularization and growth. *Cancer Research*, 63, 3919-3922.

Fritz G. (2011) RAGE: a single receptor fits multiple ligands. *Trends in Biochemical Sciences*, 36, 625-632.

Fritz, G., Botelho H. M., Morozova-Roche L. A., Gomes C. M. (2010). Natural and amyloid self-assembly of S100 proteins: structural basis of functional diversity. *FEBS Journal*, 277, 4578-4590.

Garlick R. L., Mazer J. S., Chylack L. T. Jr., Tung W. H., Bunn H. F. (1984). Nonenzymatic glycation of human lens crystallin. Effect of aging and diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigation*, 74, 1742-1749.

Gebhardt C., Nemeth J., Angel P., Hess J. (2006). S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. *Biochemical Pharmacology*, 72, 1622-1631.

Geetharaman G., Padma M., Pandian J. A. (2015). A new therapeutic applications for drug repositioning on the cloud computing. *International Conference on Inter Disciplinary Research in Engineering and Technology*, 119-129.

Goldin J. A., Beckman A. M., Schmidt M. A. Creager A. (2006). Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury, *Circulation*, 114, 597-605.

Gupta S. C., Sung B., Prasad S., Webb L. J., Aggarwal B. B. (2013). Cancer drug discovery by repurposing teaching new tricks to old dogs. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34, 508-517.

Han Y. T., Choi G. I., Son D., Kim N. J., Yun H., Lee S., Chang D. J., Hong H. S., Kim H., Ha H. J., Kim Y. H., Park H. J., Lee J., Suh Y. G. (2012). Ligand-Based Design, Synthesis, and Biological Evaluation of 2-Aminopyrimidines, a Novel Series of Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 21, 9120-9135.

Hanford L. E., Enghild J. J., Valnickova Z., Petersen S. V., Schaefer L. M., Schaefer T. M., Reinart T. A., Oury T. D. (2004). Purification and characterization of mouse soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE). *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 50019-50024.

Haupt C., Bereza M., Kumar S. T., Kieninger B., Morgado I., Hortschansky P., Fritz G., Récken C., Horn U., Fandrich M. (2011). Pattern recognition with a fibril-specific antibody fragment reveals the surface variability of natural amyloid fibrils. *Journal of Molecular Biology*, 408, 529-540.

Hebert L. E., Scherr P. A., Bienias J. L., Bennett D. A., Evans D. A. (2003). Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Archives of Neurology*, 60, 1119-1122.

Heidel J. D., Liu J. Y., Yen Y., Zhou B., Heale B. S., Rossi J. J., Bartlett D. W., Davis M. E. (2007). Potent siRNA inhibitors of ribonucleotide reductase subunit RRM2 reduce cell proliferation in vitro and in vivo. *Clinical Cancer Research*, 13, 2207-2215.

Heidel J. D., Yu Z., Liu J. Y., Rele S. M., Liang Y., Zeidan R. K., Kornbrust D. J., Davis M. E. (2007). Administration in non-human primates of escalating intravenous doses of targeted nanoparticles containing ribonucleotide reductase subunit M2 siRNA. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 104, 5715-5721

Huttunen H. J., Fages C., Rauvala H. (1999). Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF- $\kappa$ B require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 19919-19924.

Ho C. H., Hsu, J. L., Liu S. P., Hsu L. C., Chang W. L., Chao C. K. C., Guh J. H. (2015). Repurposing of phentolamine as a potential anticancer agent against human castration-resistant prostate cancer: A central role on microtubule stabilization and mitochondrial apoptosis pathway. *The Prostate*, 75, 1454-1466.

Hong J., Edel J. B., DeMello A. J. (2009). Micro- and nanofluidic systems for high-throughput biological screening. *Drug Discovery Today*, 14, 134-146.

Hori O., Brett J., Slattery T., Cao R., Zhang J., Chen J. X., Nagashima M., Lundh E. R., Vijay S., Nitecki D., Morser J., Stern D, Schmidt A. M. (1995). *The Journal of Biology Chemistry*, 270, 25752-25761.

Ichim T. E., Li M., Qian H., Popov I. A., Rycerz K., Zheng X., White D., Zhong R., Min W. P. (2004). RNA interference: a potent tool for gene-specific therapeutics. *American Journal of Transplantation*, 4, 1227-1236.

Lakka S. S., Gondi C. S., Yanamandra N., Olivero W. C., Dinh D.H., Gujrati M., Rao J.S. (2004). Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis, *Oncogene*, 23, 4681-4689.

Leclerc, E., Fritz G., Vetter S. W., Heizmann C. W. (2009). Binding of S100 proteins to RAGE: an update. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793, 993-1007.

Logsdon C. D., Fuentes M. K., Huang E. H., Arumugam T. (2007). RAGE and RAGE ligands in cancer. *Current Molecular Medicine*, 7, 777-789.

Loeser R. F., Yammani R. R., Carlson C. S., Chen H., Cole A., Im H. J., Bursch L. S., Yan S. D. (2005). Articular chondrocytes express the receptor for advanced glycation end products: potential role in osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 52, 2376-2385.

Lotze M. T., Tracey K. J. (2005). *Nature Reviews Immunology*, 5, 331-342.

Li J., Schmidt A. M. (1997). Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 6498-6506.

Lv J., Shim J. S. (2015). Existing drugs and their application in drug discovery targeting cancer stem cells. *Archives of Pharmacal Research*, 38, 1617-1626.

Kato S., Moulder S. L., Ueno N. T., Wheler J. J., Bernstam F. M., Kurzrock R., Janku F. (2015). Challenges and perspective of drug repurposing strategies in early phase clinical trials. *Oncoscience*, 2, 576-580.

Kim D. H., Behlke M. A., Rose S. D., Chang M. S., Choi S., Rossi J. J. (2005). Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nature Biotechnology*, 23, 222-226.

Martinez L. A., Naguibneva I., Lehrmann H., Vervisch A., Tchenio T., Lozano G., Harel-Bellan A. (2002). Synthetic small inhibiting RNAs: efficient tools to inactivate oncogenic mutations and restore p53 pathways. *Proceedings of the National Academy of Science United States of America*, 99, 849-14,854.

Mattson M. P., Camandola S. (2001). NF- $\kappa$ B in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Journal of Clinical Investigation*, 107, 247-254.

Mukherjee T. K., Mukhopadhyay S., Hoidal J. R. (2008). Implication of receptor for advanced glycation end product (RAGE) in pulmonary health and pathophysiology, *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 162, 210-215.

Milutinovic P. S., Alcorn J. F., Englert J. M., Crum L. T., Oury T. D. (2012). The receptor for advanced glycation end products is a central mediator of asthma pathogenesis. *The American Journal of Pathology*, 181, 1215-1225.



Neeper M., Schmidt A. M., Brett J., Yan S. D., Wang F., Pan Y. C., Elliston K., Stern D., Shaw A. (1992). Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 14998-15004.

Oprea T. I., Bauman, J. E., Bologa, C. G., Buranda T., Chigaev A., Edwards B. S., Jarvik J. W., Gresham H. D., Haynes M. K. (2011). Drug repurposing from an academic perspective. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 8, 61-69.

Ostendorp, T., Leclerc E., Galichet A., Koch M., Demling N., Weigle B., Heizmann C. W., Kroneck P. M. H., Fritz G. (2007). Structural and functional insights into RAGE activation by multimeric S100B. *The EMBO Journal*, 26, 3868-3878.

Patel S., Kumar L., Singh N. (2015). Metformin and epithelial ovarian cancer therapeutics. *Cellular Oncology*. 38, 365-375.

Pantziarka P., Bouche G., Meheus L., Sukhatme V., Sukhatme V. P. (2014). The repurposing drugs in oncology (ReDO) project. *eCancer Medicinal Science*, 8, 442.

Perrone L., Sbai O., Nawroth P. P., Bierhaus A. (2012). The Complexity of Sporadic Alzheimer's Disease Pathogenesis: The Role of RAGE as Therapeutic Target to Promote Neuroprotection by Inhibiting Neurovascular Dysfunction. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 122, 1377-1392.

Rawlings J. S., Rosler K. M., Harrison D. A. (2004). The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science*, 117, 1281-1283.

Riehl A., Bauer T., Brors H., Busch H., Mark R., Németh J., Gebhardt C., Bierhaus A., Nawroth P., Eils R., König R., Angel P., Hess J. (2010). Identification of the RAGE-dependent gene regulatory network in a mouse model of skin inflammation. *BMC Genomics*, 11, 537.

Ross N. T., Deane R., Perr, S., Miller B. L. (2013). Structure-activity relationships of small molecule inhibitors of RAGE- $\text{A}\beta$  binding. *Tetrahedron*, 69, 7653-7658.

Sabbagh M. N., Agro A., Bell J., Aisen P. S., Schweizer E., Galasko D. (2011). PF-04494700, an oral inhibitor of receptor for advanced glycation end products (RAGE), in Alzheimer disease. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*, 25, 206-212.

Salisbury A. J., Macaulay V. M. (2003). Development of molecular agents for IGF receptor targeting. *Hormonal Metabolism Research*, 35 843-849

Sano M., Sierant M., Miyagishi M., Nakanishi M., Takagi Y., Sutou S. (2008). Effect of asymmetric terminal structures of short RNA duplexes on the RNA interference activity and strand selection. *Nucleic Acids Research*, 36, 5812-5821.

Scaffidi P., Misteli T., Bianchi M. E. (2002). *Nature*, 418, 191-195.

Schmidt A. M., Yan S. D., Yan S. F., Stern D. M. (2000). The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1498, 99-111.

Schmidt A. M., Yan S. D., Yan S. F., Stern D. M. (2001). The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *Journal of Clinical Investigation*, 108, 949-955.

Schraml P., Bendik I., Ludwig C. U. (1997). Differential messenger RNA and protein expression of the receptor for advanced glycosylated end products in normal lung and non-small cell lung carcinoma. *Cancer Research*, 57, 3669-3671.

Shaffer C. (2005). Automating compound management systems, *Drug Discovery & Development*, 8, 36-41.

Siebenlist U., Franzoso G., Brown K. (1994). Structure, regulation and function of NF- $\kappa$ B, *Annual Review of Cell Biology*, 10, 405-455.

Siolas D., Lerner C., Burchard J., Ge W., Linsley P. S., Paddison P. J., Hannon G. J., Cleary M. A. (2005). Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nature Biotechnology*, 23, 227-231.

Sittampalam G. S., Kahl S. D., Janzen W. P. (1997). High-throughput screening: advances in assay technologies. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1, 384-391.

Sterenczak K. A., Nolte I., Murua E. H. (2013). RAGE splicing variants in mammals. *Methods in Molecular Biology*, 963, 265-276.

Sugaya C., Fukagawa T., Matsumoto K., Mita K., Takahashi E., Ando A., Inoko H., Ikemura T. (1994). Three genes in the human MHC class III region near the junction with the class II: gene for receptor of advanced glycosylation end products, PBX2 homeobox gene and a notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3. *Genomics*, 23, 408-419.

Su X., Looney M. R., Gupta N., Matthay M. A. (2009). Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is an indicator of direct lung injury in models of experimental lung injury. *The American Journal of Physiology*, 297, 519-576.

Sun G., Mackey L. V., Coy, D. H., Yu C. Y., Sun L. (2015). The histone deacetylase inhibitor vaproic acid induces cell growth arrest in hepatocellular carcinoma cells via suppressing notch signaling. *Journal of Cancer*, 6, 996-1004.

Taguchi A., Blood D. C., del Toro G., Canet A., Lee D. C., Qu W., Tanji N., Lu Y., Lalla E., Fu C., Hofmann M. A., Kislinger T., Ingram M., Lu A., Tanaka H., Hori O., Ogawa S., Stern D. M., Schmidt A. M. (2000). Blockade of RAGE/amyloid signaling suppresses tumour growth and metastases. *Nature*, 405, 354-360.

Thomas J. O. (2001). HMG1 and 2: architectural DNA-binding proteins. *Biochemical Society Transactions*, 29, 395-401.

Thompson J. F., Hayes L. S., and Lloyd D. B. (1991). Modulation of firefly luciferase stability and impact on studies of gene regulation. *Gene*, 103, 171-177.

Toth, C., Schmidt A. M., Tuor U. I., Francis G., Foniok T., Brussee V., Kaur J., Yan S. F., Martinez J. A., Barber P. A., Buchan A. (2006). Diabetes, leukoencephalopathy and RAGE. *Neurobiology of Disease*, 23, 445-461.

Ulloa L., Messmer D. (2006), *Cytokine Growth Factor Review*, 17, 189-201.

Verzijl N., DeGroot J., Oldehinkel E., Bank R. A., Thorpe S. R., Baynes J. W., Bayliss M. T., Bijlsma J. W. J., Lafeber F. P. J. G., Tekoppele J. M. (2000). Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. *Biochemical Journal*, 350, 381-387.

Yan S. F., Ramasamy R., Schmidt A. M. (2009). The receptor for advanced glycation end products (RAGE) and cardiovascular disease. *Expert Review of Molecular Medicine*, 11, e9.

Yonekura H., Yamamoto Y., Sakurai S., Petrova R. G., Abedin M. J., Li H., Yasui K., Takeuchi M., Makita Z., Takasawa S., Okamoto H., Watanabe T., Yamamoto H. (2003). Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochemical Journal*, 370, 1097-1109.

Wang H., Bloom O., Zhang M., Vishnubhakat J. M., Ombrelino M., Che J., Frazier A., Yang H., Ivanovna S., Borovikova L., Manouge K. R., Abraham E., Andresson J., Andresson U., Molina P. E., Abumrad N. N., Sama A., Tracey K. J. (1999). HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*, 285, 5425, 248-251.

Watanabe T., Asai K., Fujimoto H., Tanaka H., Kanazawa H., Hirata K. (2011). Increased levels of HMGB-1 and endogenous secretory RAGE in induced sputum from asthmatic patients. *Respiratory Medicine*, 105, 519-525.

Wittkowski H., Sturrock A., Van Zoelen M. A. D., Viemann D., van der Poll T., Hoidal J. R., Roth J., Foell D. (2007). Neutrophil-derived S100A12 in acute lung injury and respiratory distress syndrome. *Critical Care Medicine*, 35, 1369-1375.

**Internetové zdroje:**

<https://worldwide.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/bioluminescent-reporters/>

<http://www.medkoo.com/products/7802>.

<http://www.sigmaldrich.com/life-science/cell-biology/bioactive-small-molecules/lopac1280-navigator.html>