



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

Proteomický profil buněčné linie CCRF-CEM
ošetřené cisplatinou

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Jarmila Stanková
Studijní program:	N1501- Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Tomáš Oždian
Termín odevzdání práce:	2016

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Jarmila Stanková
Název práce:	Proteomický profil buněčné linie CCRF-CEM ošetřené cisplatinou
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Ústav molekulární a translační medicíny LF UP
Vedoucí práce:	Mgr. Tomáš Oždian
Rok obhajoby práce:	2016
Abstrakt:	<p>Cisplatina je jedním z nejvíce využívaných protinádorových léčiv. Její cytostatické působení je nejčastěji spojováno s tvorbou crosslinků v molekule DNA. Nicméně stále častěji se prokazuje přímý vliv cisplatin na proteiny zapojené do regulace buněčných pochodů. V teoretické části byla vypracována literární rešerše o cisplatině. V experimentální části byla provedena LC-MS analýza buněčné linie CCRF-CEM po ošetření cisplatinou. Na základě této analýzy byl sestaven proteomický profil signifikantně změněných proteinů. Nejčastějšími skupinami proteinů s detekovanou změnou abundance v důsledku ošetření cisplatinou byly cytoskeletální proteiny (gamma aktin), proteiny regulující buněčný cyklus a proliferaci (claspin, geminin) a proteiny zodpovědné za reakce na poškození DNA a buněčný stres (SOX4, FRA2 a jun).</p>
Klíčová slova:	cisplatina, proteomický profil, LC-MS, CCRF-CEM
Počet stran:	74
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Jarmila Stanková
Title of thesis:	Proteomic profile of CCRF-CEM cell line treated by cisplatina
Type of thesis:	Master
Department:	Institute of Molecular and Translational Medicine
Supervisor:	Mgr. Tomáš Oždian
The year of presentation:	2016
Abstract:	<p>Cisplatin is widely used for cancer treatment. Its cytostatic effect is mostly linked to its ability to crosslink with DNA molecule. However, it is demonstrated more often that cisplatin has a direct effect on the cell regulating proteins. The theoretical part contains a review of literature dealing with cisplatin. In the experimental part, a proteomic profile of the CCRF-CEM line treated by cisplatin was drawn up using the high resolution LC-MS analysis. Significantly changed proteins were mostly cytoskeletal proteins (gamma actin), cell cycle regulating proteins (claspin, geminin) and DNA damage response and cell stress response proteins (SOX4, FRA2 and jun).</p>
Keywords:	cisplatin, proteomic profile, LC-MS, CCRF-CEM
Number of pages:	74
Number of appendices:	0
Language:	Czech

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

V Olomouci dne 15. 8. 2016

Především děkuji Mgr. Tomáši Oždianovi za odborné vedení mé diplomové práce, za poskytnutí cenných rad a odborných konzultací potřebných k vypracování této práce. Děkuji Mgr. Janě Václavkové za rady nejen při laboratorní práci, za psychickou podporu a skvělou náladu v laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat kolektivu pracoviště Ústavu molekulární a translační medicíny za ochotu pomoci při řešení experimentální části.

Práce byla financována z projektu MŠMT (Národní program udržitelnosti, LO1304).

Obsah

1 Úvod a cíle práce	8
2 Teoretická část	9
2.1 Obecná charakteristika cytostatik.....	9
2.2 Cisplatina jako cytostatikum	14
2.3 Mechanismus působení cisplatiny	18
2.3.1 Vazba cisplatiny na nukleové kyseliny.....	18
2.3.2 Oxidativní stres	19
2.3.3 Aktivace DDR mechanismů	20
2.3.4 Indukovaná buněčná smrt	20
2.3.5 Signální dráhy pro růstové faktory a cisplatina	23
2.4 Rezistence na působení cisplatiny	25
2.5 Toxicita cisplatiny	27
2.6 Proteomika	28
2.6.1 Proteomické profilování	28
2.6.2 Hmotnostní spektrometrie a její spojení s kapalinovou chromatografií.....	29
2.6.3 Kvantifikace pomocí MS analýzy	31
3 Experimentální část	32
3. 1 Materiál	32
3.1.1 Použité chemikálie	32
3.1.2 Použité roztoky	33
3.1.3 Biologický materiál	34
3.1.4 Použité přístroje	34
3.1.5 Software	34
3.2 Metodika	35
3.2.1 Stanovení inhibiční konstanty IC ₅₀	35
3.2.1.1 Ovlivnění buněk cisplatinou.....	35
3.2.1.2 XTT test.....	36

3.2.1.3 MTT test	36
3.2.2 Stanovení času do apoptózy	36
3.2.3 SILAC kultivace.....	37
3.2.4 Ošetření SILAC značených buněk cisplatinou	37
3.2.5 FASP lyzační protokol.....	37
3.2.6 FASP a SAX příprava vzorků pro LC-MS	37
3.2.7 LC-MS analýza.....	39
4 Výsledky	41
4.1 Stanovení konstanty IC ₅₀	41
4.2 Stanovení času do apoptózy	43
4.3 Výsledky LC-MS analýzy	44
4.3.1 Počet identifikovaných proteinů v ošetřených lehkých buňkách..	44
4.3.2 Počet kvantifikovaných proteinů v ošetřených lehkých buňkách .	45
4.3.3 Počet B signifikantních proteinů v ošetřených lehkých buňkách..	45
4.3.4 Vyhodnocení pomocí bioinformatických programů	50
4.3.5 Počet identifikovaných proteinů v ošetřených těžkých buňkách..	53
4.3.6 Počet kvantifikovaných proteinů v ošetřených těžkých buňkách .	53
4.3.7 Počet B signifikantních proteinů v ošetřených těžkých buňkách ..	54
4.3.8 Vyhodnocení pomocí bioinformatických programů	60
5 Diskuze	62
6 Závěr	65
Seznam zkratk	66
Seznam citací.....	68

1 Úvod a cíle práce

Personalizovaná medicína je forma medicíny, která využívá informace o lidských genech, proteinech a životním prostředí k prevenci, diagnóze a léčbě nemocí. V onkologii je využíváno specifických informací o nádorech pro lepší diagnózu, plánování léčby a určení úspěšnosti léčby. Využívá se cílených terapií kvůli specifickým typům nádorových buněk (NCI Dictionary of Cancer Terms, 2016). Pro získání specifických informací o nádorech byl vyvinut koncept biomarkerů, biologických molekul, které se nachází v krvi, tělesných tekutinách, nebo tkáni a jsou znakem normálních, či patologických procesů spojených s nemocí (Paul a kolektiv, 2013). Poznatky z oblasti farmakokinetiky a farmakodynamiky přináší znalosti o faktorech, jež ovlivňují drug response – účinek léků. Celostní přístup k individualizaci terapie je založen na několika způsobech: sledování a preventivní testování biomarkerů, měření koncentrací léčiv pro úpravu dávek, a v neposlední řadě molekulárního profilování pro zlepšení benefitů léčiva a potlačení rizika výskytu nežádoucích účinků (Pacanowski a Huang, 2016). Proteomické profilování je jedním z možných přístupů k objevení nových biomarkerů, cílových molekul v léčbě a mechanismů rezistence na léčiva (Paul a kolektiv, 2013).

Tématem této diplomové práce bylo vypracování proteomického profilu buněčné linie CCRF-CEM ošetřené protinádorovým léčivem cisplatinou. Součástí je vypracování teoretické rešerše, která se zabývá mechanismy působení cisplatiny, možností vzniku rezistence léčby a v neposlední řadě metodikou použitou v části praktické. Cisplatina byla prvně syntetizována M. Peyronem v roce 1844. První na možnost jejího využití jako protinádorového léčiva upozornil Rosenberg a kolektiv v roce 1965 publikováním studie o inhibici buněčného dělení u bakterií *Escherichia Coli* (Rosenberg, 1985).

V praktické části byly nejprve stanoveny inhibiční konstanty IC_{50} pro cisplatinu, dále byl stanoven čas do apoptózy a poté tyto údaje sloužili jako kritéria při přípravě buněčných lyzátů. Lyzáty se připravovali z buněčné linie kultivované pro metodu SILAC. Následně byly vzorky lyzátů zpracovány metodami FASP a SAX, které jsou optimální pro použití LC/MS analýzy. Data získaná touto analýzou sloužila k sestavení proteomického profilu.

2 Teoretická část

2.1 Obecná charakteristika cytostatik

Zákon definuje léčivý přípravek jako „látku nebo kombinaci látek, kterou lze použít u lidí či zvířat nebo podat lidem či zvířatům, a to za účelem obnovy, úpravy nebo ovlivnění jejich fyziologických funkcí prostřednictvím farmakologického, imunologického nebo metabolického účinku, za účelem stanovení lékařské diagnózy.“ (Zákon č. 378/2007 Sb., o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů. § 2, odst. 4, písm. a). Účinná látka neboli léčivo je pacientovi podáváno vnitřně (např. ve formě tablet, injekcí) nebo zevně (např. ve formě mastí). Léčiva využívaná při protinádorové terapii patří nejčastěji do kategorie cytostatik, což jsou látky tlumící růst tkání s vysokou proliferační rychlostí. Cytostatika nejvíce postihují nádorovou tkáň, vedlejšími účinky je postižení tkání s vysokou rychlostí proliferace, například sliznice a kostní dřeň (Lüllmann, Mohr a Wehling, 2004).

2.1.1 Mechanismus působení cytostatik

Cytostatika fungují na principu ovlivnění cílových enzymů, receptorů či kovalentní vazbě na DNA. V případě ovlivnění enzymů může jít o jejich aktivaci, nebo naopak inhibici jejich působení. Ovlivnění receptorů je zprostředkováno agonisty (antagonisty) pro signální látky tělu vlastní (Lüllmann, Mohr a Wehling, 2004).

Enzymy fungují jako biokatalyzátory, které svým působením řídí biochemické reakce probíhající v těle. Jejich vliv je jak na úrovni buněčného metabolismu, tak i na úrovni regulace buněčného cyklu a dějů s tím spojených. Proliferace a buněčný metabolismus jsou provázané děje, proto jsou nádorově transformované buňky charakterizované změnami v regulaci buněčného cyklu i metabolismu buňky. Mutované enzymy představují potencionální cíl léčiv inhibující onkogenní proteiny s funkcí kontroly metabolismu. Příkladem může být inhibice pyruvátkinázy isoformy 2, která vykazuje zvýšenou aktivitu v buňkách karcinomu plic, čímž tyto buňky chrání proti oxidativnímu poškození. Nádory s výraznou onkogenní transformací více odpovídají

na léčbu pomocí přípravků působící na změněné metabolické dráhy (Teicher, Linehan a Helman, 2012).

Regulace proliferace buněk je komplikovaný děj řízený kaskádami enzymů. Ztráta kontroly je základem vzniku nádorového bujení, proto je velká část léků zaměřena na inhibici těchto důležitých enzymů, jako jsou cyklin-dependentní kinázy, telomerázy a topoisomerázy. Další možností je aktivace kontrolních bodů, pomocí poškození DNA, které vedou k zastavení buněčného dělení, aktivaci systémů opravy DNA, či k apoptóze (Roskoski, 2016; Shin a kolektiv, 2016).

Receptory jsou proteiny, které po vazbě ligandu změny konformaci a tím vyvolají buněčnou odpověď. Hlavní skupinou v léčbě nádorů jsou receptory regulující transkripci DNA (Lüllmann, Mohr a Wehling, 2004). Do této skupiny můžeme zařadit receptory pro růstové faktory, jako jsou EGFR (Epidermal growth factor receptor), IGFR (Insuline-like growth factor receptor), VEGFR (Vascular endothelial growth factor receptor), FGFR (Fibroblast growth factor receptor), atd. Tyto receptory pro růstové faktory patří do skupiny tyrosinkinázových receptorů, léčba je tedy potom zaměřena na inhibici tyrosinkinázové aktivity (Höpfner, Schuppan a Scherübl, 2008). Další skupinou jsou receptory pro steroidní pohlavní hormony, například estrogen. Expres estrogenních receptorů je v maligních buňkách nevyrovnaná, a proto je léčba karcinomů ovaria, prsu, děložního hrdla, apod. zaměřena na tyto receptory (Jeon, Hwang a Choi, 2016).

Léčiva poškozující DNA mohou fungovat na principu kovalentní vazby na DNA, to je společné pro alkylující látky, platinová léčiva a interkalátory. Další možností je inkorporace antimetabolitů purinu a pyrimidinu do DNA. Vazba těchto látek způsobuje poškození DNA, které vede k apoptóze buňky (Dasari a Tchounwou, 2014).

Cílem protinádorových léčiv je na základě principu svého působení vyvolat apoptózu. Spuštění mechanismů buněčné smrti, ale nejprve předchází odpověď na poškození DNA (DDR, DNA Damage Response) vyvolané nádorovými léčivy první volby, jako je například cisplatina. Aktivované mechanismy DDR u somatických buněk vedou k zastavení buněčného cyklu, opravě DNA, buněčnému stárnutí či apoptóze. U dospělých kmenových buněk může docházet ještě i k úplné buněčné diferenciaci. Efektorovými proteiny kaskády DDR jsou fosforylované proteiny p53 a cdc25, tyto proteiny fungují

jako transkripční faktory genů regulujících zastavení buněčného cyklu, opravy DNA, apoptózy, či stárnutí (Matt a Hofmann, 2016).

2.1.2 Farmakokinetika léčiva

Intenzita účinku léčiva závisí na jeho koncentraci v těle a jeho dostupnosti k cílovým tkáním. Koncentraci v místech účinku je obtížné měřit, proto se stanovuje koncentrace léčiva v krvi. Ta je v čase ovlivněna fázemi absorpce, distribuce a eliminace, kterými léčivo v těle prochází. Absorpce popisuje přechod léčiva z místa aplikace do krevního řečiště, je závislá na fyzikálních vlastnostech farmaka, difúzi a transportních proteinech. K distribuci dochází z krevního řečiště do cílových tkání a orgánů. Léčivo se distribuuje rozpuštěné ve vodném prostředí krevní plazmy, intersticiální tekutiny či intracelulární tekutiny, anebo ve formě vázané na plazmatické proteiny, erytrocyty, receptory ve tkáních a deponované do tukové a kostní tkáně. Aby byl vyvolán požadovaný účinek, musí být léčivo uvolněno do volně dostupné volby. Eliminace představuje všechny pochody nutné pro vyloučení xenobiotika z organismu, tedy biotransformaci léčiva a jeho exkreci. Hlavním výkonným orgánem jsou játra, hlavními enzymy zabezpečující biotransformaci jsou enzymy skupiny cytochrom P450 (CYP450; Lüllmann, Mohr a Wehling, 2004). Epigenetická regulace genů zapojených do absorpce, distribuce, metabolismu a exkrece léčiv je také důležitým prvkem podílejícím se na účinku léčiva. Rozdíly exprese a funkčnosti těchto genů mezi jedinci způsobují individuální účinek terapie, ale také se podílejí na vzniku nežádoucích účinků, proto je sledování těchto faktorů významným krokem v personalizované medicíně (Fisel, Schaeffeler a Schwab, 2016).

Membránový transport hraje kritickou roli v distribuci a biologické dostupnosti protinádorových léčiv, určuje účinnost terapie a její případnou toxicitu. Prostupnost léčiv do nádorové buňky je výsledkem efluxních a influxních transportérů. Hlavními efluxovými transportéry jsou ATP-vázající kazetové proteiny (ABC, ATP-binding cassette), které se z velké části podílejí na chemorezistenci léčiv. Základem působení ABC transportérů je hydrolýza ATP, kterou získávají energii na přesun látek z buňky i proti elektrochemickému gradientu. Mezi influxní transportéry jsou řazeny „solute carriers“ (SLC), jejichž dopad na terapii je také významný. Importové SLC transportéry působí na základě difúze po koncentračním spádu, antiportu nebo symportu. Jejich exprese je především v tenkém střevě, játrech a

ledvinách, proto ovlivňují distribuci léčiv. Rozdíly v aktivitě mezi jedinci mohou způsobovat změny farmakokinetických profilů protinádorových léčiv vedoucích k změnám účinku těchto léčiv (Li a Shu, 2014).

Ačkoliv cisplatina je eliminována neenzymaticky, u většiny léčiv dochází k enzymatické eliminaci enzymy první a druhé fáze (SÚKL, 2016). Cytochrom P450 je zapojený do metabolismu xenobiotik jako enzymy první fáze-oxigenační krok biotransformace. Nicméně rodina CYP450 se účastní i eliminace látek tělu vlastních jako jsou steroidní látky, arachidonová kyselina, apod. Všechny enzymy z rodiny CYP450 mají oxidativní účinek a jsou schopny katalyzovat hydroxylaci vazeb uhlíku a vodíku, epoxidaci dvojných vazeb, oxidaci heteroatomů, dealkylační reakce, oxidaci aromatických kruhů atd. Na redoxní reakce jsou spotřebovávány elektrony z kofaktorů NAD(P)H. Tyto enzymy se také účastní přeměny proléčiv na účinné substance v těle. Farmakogenomické studie prokázaly rozdíly v expresy, které jsou příčinou možné přecitlivělosti některých jedinců na farmaka, nebo naopak neúčinnosti farmak. Největší rozdíl je patrný u CYP2D6 a CYP2C9, kde bylo prokázáno několik polymorfismů (Meunier, Visser a Shaik, 2004; Kirchheiner a Seeringer, 2007).

Reakce druhé fáze jsou enzymaticky katalyzovány arylsulfatasou, UDP-glutathiontransferasou a glutathion-S-transferasou. Tyto přeměny způsobují lepší rozpustnost látek ve vodě a tedy jejich snazší vylučování ledvinami. Některá farmaka se mohou ve vylučovacích orgánech ukládat, tím zvyšovat jejich lokální koncentraci a působit na tyto orgány toxicky. Tento mechanismus představuje jednu z příčin vzniku nežádoucích účinků (Lüllmann, Mohr a Wehling, 2004).

2.1.3 Obecné nežádoucí účinky léčiv

Většina léčiv kromě účinků nutných pro terapii vyvolává i nežádoucí účinky, které jsou patologické pro organismus a mohou být příčinou hospitalizace, či další terapie. Hlavními nežádoucími účinky je toxicita, která může být systémová či lokalizovaná na orgány. Antineoplastická terapie je často komplikovaná kardiotoxicitou, kardiovaskulární komplikace mohou způsobit až srdeční selhání, ischemie myokardu, hypertenze, trombózu či embolii. Každá komplikace je charakteristická pro určitou skupinu léčiv. Dalšími nežádoucími účinky jsou alergické reakce všech typů, které mohou vyústit až

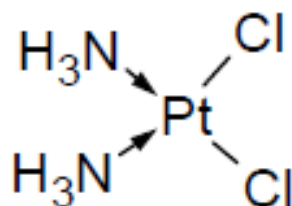
v anafylaktický šok. Velmi důležitými jsou také změny krevního obrazu vyvolané cytostatiky, tyto změny mohou být jak anémie, trombocytopenie, tak neutropenie a toxické poškození kostní dřeně (Lüllmann, Mohr a Wehling, 2004; Yeh a Bickford, 2009).

2.1.4 Mechanismus mnohačetné rezistence léčiv

Mnohačetná léková rezistence je problém hlavně u terapie metastazujících onkologických onemocnění. Tato rezistence může být dědičná, určená genetickými vlastnostmi nádorů, anebo získaná po kontaktu s léčivem. Mechanismy rezistence jsou redukce vychytávání farmaka nádorovou buňkou, podněcování DDR, potlačování apoptózy, zvyšování efluxu farmaka nádorovou buňkou a alterace v metabolismu léčiv a v buněčném cyklu. Zvyšování efluxu farmaka je společný mechanismus pro nádorové buňky, a tak byl studován více než ostatní mechanismy. Odpovědné jsou za něj především ABC transportéry, z nichž je možno jmenovat ABCB1 (MDR1) a ABCC1 (MRP1), jejich exprese je zvýšená u většiny nádorových buněk. Zvyšování metabolismu farmaka, katalyzovaného enzymy glutathion-S-transferasami, je charakteristické zvláště pro platinová léčiva. V neposlední řadě je mnohačetná léková rezistence způsobena změnami v genech regulujících zastavení buněčného cyklu a apoptózu. Alterované jsou například proteiny p53, což znemožňuje léčbu alkylujícími látkami, a proteiny bcl-2 rodiny s charakteristickou změnou u karcinomu prsu a ovaria (Kachalaki a kolektiv, 2016; Pan a kolektiv, 2016).

2.2 Cisplatina jako cytostatikum

Cisplatina je lék ze skupiny platinových léčiv užívaný k protinádorové terapii s účinností u celé řady maligních onemocnění. Cisplatina účinkuje jako selektivní a trvalý inhibitor DNA syntézy v buňkách různého typu, váže DNA a tím vytváří nitrořetězcové i meziřetězcové vazby. Avšak její antineoplastické působení je dáno i dalšími mechanismy. Mezi ostatní vlastnosti cisplatiny patří imunosupresivní, radiosenzitizační a antimikrobiální účinky (SÚKL, 2016). Cytostatický efekt cisplatiny objevil B. Rosenberg v rámci testu vlivu elektrického pole na růst buněk. Při tomto testu objevil, že zasažené buňky *Escherichia Coli* při platinových elektrodách sice pokračují v růstu, ale jejich buněčný cyklus je zastaven. Tento efekt byl způsoben produktem vzniklým elektrolýzou chloridu amonného a jeho reakcí s platinovou elektrodou. Později bylo objeveno, že tato látka se systematickým názvem *cis*-diammin-dichlorido-platnatý komplex, $\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ (obr. 1), již byla syntetizovaná M. Peyronem na konci 19. století (Rosenberg, 1985).

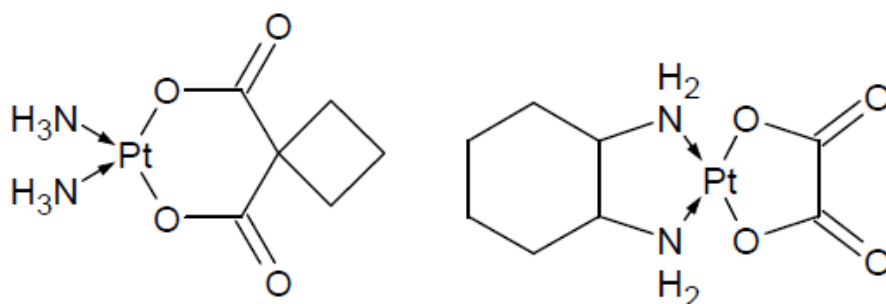


Obr. 1: Chemická struktura cisplatiny, *cis*-diammin-dichlorido-platnatý komplex, $\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$.

2.2.1 Platinová cytostatika

Platinová léčiva tvoří důležitou skupinu anorganických látek s cytostatickým účinkem. Látky vytvořené v prvních třech generacích – cisplatina, karboplatina a oxaliplatina jsou celosvětově schválené pro léčbu maligních onemocnění. I přes fakt, že tyto látky byly uvedeny na trh před více než 40 lety, jsou stále jedny z nejvíce používaných látek k léčbě rakoviny. Cisplatina tvoří první generaci platinových léčiv, postupně byly vyvinuty další tři generace s cílem zvýšit antineoplastický účinek a naopak snížit nežádoucí účinky (Johnstone, Suntharalingam a Lippard, 2016).

Do druhé generace platinových léčiv se řadí karboplatina, diammin-[1,1-cyklobutandikarboxylato(2-)]-O,O'-platnatý komplex (obr. 2), která byla vyvinuta s účelem snížit toxicitu limitující dávky cisplatiny. Mechanismus účinku karboplatiny je podobný cisplatině, nicméně nedosahuje takové rozpustnosti ve vodném prostředí kvůli dvojvazným cyklobutanovým ligandům. Snížením reaktivity byly potlačeny neurotoxické a ototoxické účinky cisplatiny, takže karboplatina je vhodná pro více agresivní léčbu vysokými dávkami. Karboplatina se využívá například v kombinované terapii pro léčbu karcinomu ovaria. Dalším léčivem z druhé generace je nedaplatina, schválená pro léčbu nemalobuněčného karcinomu plic v Japonsku (Dilruba a Kalayda, 2016).



Obr. 2: Chemická struktura karboplatiny (vlevo) a chemická struktura oxaliplatin (vpravo).

Třetí generace platinových léčiv byla vyvinuta z důvodů vzniku rezistence na cisplatinu a karboplatinu. Do této kategorie patří oxaliplatin, 1R,2R-diammin-cyklohexan-oxalátplatnatý komplex (obr. 2). Ligandy tvořící oxaliplatinu výrazně snižují reaktivitu molekuly a tím potlačují toxické vedlejší účinky. Mechanismem působení oxaliplatin je tvorba DNA aduktů, které znemožňují DNA syntézu. Využívá se zejména v kombinované léčbě metastazujícího karcinomu kolorekta spolu s 5-fluorouracilem (5-FU) a foláty. Lobaplatina, další zástupce této generace, je schválený v Číně pro léčbu metastazujícího karcinomu prsu (Dilruba a Kalayda, 2016).

Čtvrtá generace léčiv tvoří více rozptýlenou skupinu, jejím příkladem mohou být léčiva, kde je centrální atom platiny s oxidačním číslem IV. Čtyřmocná platinová prolečiva mají další ligandy v axiálních pozicích. Tyto ligandy mohou, či nemusí mít bioaktivní účinek. Jejich hlavními výhodami jsou možnost orálního podávání, zmenšení nežádoucích účinků a axiální ligandy mohou být modifikovány pro vylepšení farmakologických vlastností.

Mechanismus účinku se odvíjí od vlastností dané skupiny, ligandů aj. (Johnstone, Suntharalingam a Lippard, 2016).

2.2.2 Terapeutické indikace a dávkování cisplatiny

Cisplatina se používá k léčbě pokročilých metastazujících karcinomů varlat, ovárií, močového měchýře, spinocelulárního karcinomu hlavy a krku, malobuněčného a nemalobuněčného karcinomu plic. V kombinaci s radioterapií je cisplatina indikována k léčbě cervikálního karcinomu. Její využití je možné v monoterapii i v kombinované léčbě. Dávkování se odvíjí od původu primárního onemocnění, očekávané odezvy, použití v monoterapii či jako součást kombinované léčby (SÚKL, 2016).

Dávkování se řídí dvěma režimy, dávka se vypočítává z tělesného povrchu a snižuje se pro kombinované terapie. K úpravám také musí docházet u pacientů s renální insuficiencí a útlumem kostní dřeně. Před samotným podáním cisplatiny musí dojít k hydrataci pacientů, která následuje i po podání. Případně je možné i podávat diuretika, aby se zabezpečilo vylučování cisplatiny. Při opakovaném podávání je nutné sledovat hladinu sérového kreatininu, krevní obraz a je nutné provést audiometrické vyšetření sluchu (SÚKL, 2016).

Karcinom ovárií je jedna z hlavních příčin úmrtí způsobených maligním onemocněním u žen. Jeho diagnóza bývá stanovena až v pokročilých stádiích, což významně zhoršuje podmínky léčby. Chemoterapie cisplatinou doplňuje operativní zákroky. Karcinomy ovárií jsou jedny z nejvíce senzitivních pevných tumorů s účinností léčby mezi 60 až 80 % i u pacientek s pokročilým stádiem. Bohužel u velkého počtu pacientek dochází k rekurenci onemocnění a vývoji chemorezistence (Kigawa, 2013).

Karcinom varlat je maligní onemocnění s vysokou úspěšností léčby, v Evropě bylo dosaženo až 97 % úspěšnosti pro všechny stadia nemoci. U pacientů s raným stádiem je hlavním cílem potlačit dlouhodobé následky toxicity způsobené léčbou. Chemoterapii pokročilých stádií předchází chirurgická léčba, která je později doplněna o radioterapii. Chemoterapie je prováděna cisplatinou, či karboplatinou (Albers a kolektiv, 2011).

Chirurgická léčba a radioterapie je doplněna o antineoplastickou terapii ve standartních režimech léčby karcinomů hlavy a krku. Při paliativní léčbě je

chemoterapie jediná léčebná metoda. Podávají se platinová léčiva cisplatina a karboplatina, je možná i kombinace s 5-FU a taxany (Schuler a kolektiv, 2010).

Karcinom plic je jednou z hlavních příčin úmrtí způsobených nádory u mužů i žen. Karcinomy plic dělíme na malobuněčné (15 %) a nemalobuněčné (85 %). Malobuněčný karcinom plic je velmi agresivní forma, která je spojena s nepříznivou prognózou. Vzniku onemocnění často předchází dlouhodobé kouření. Pacienti s nepokročilým onemocněním jsou léčeni kombinovanou terapií cisplatiny a radioterapie, pacienti s pokročilým onemocněním jsou léčeni pouze chemoterapií (Arcaro, 2015). Do skupiny nemalobuněčných karcinomů plic spadají adenokarcinomy, spinocelulární karcinomy a velkobuněčný karcinom plic. I u těchto typů nádorů je doporučena terapie cisplatinou (Matsumoto a kolektiv, 2016).

Cervikální karcinom je celosvětově druhé nejčastější nádorové onemocnění u žen. Patientky s metastázujícím onemocněním mají špatnou prognózu, v 15 až 20 % dochází k jednoročnímu přežití. Úloha chemoterapie cisplatinou v těchto případech je spíše paliativní (Pectasides a kolektiv, 2008).

2.2.3 Léčebné kombinace s cisplatinou

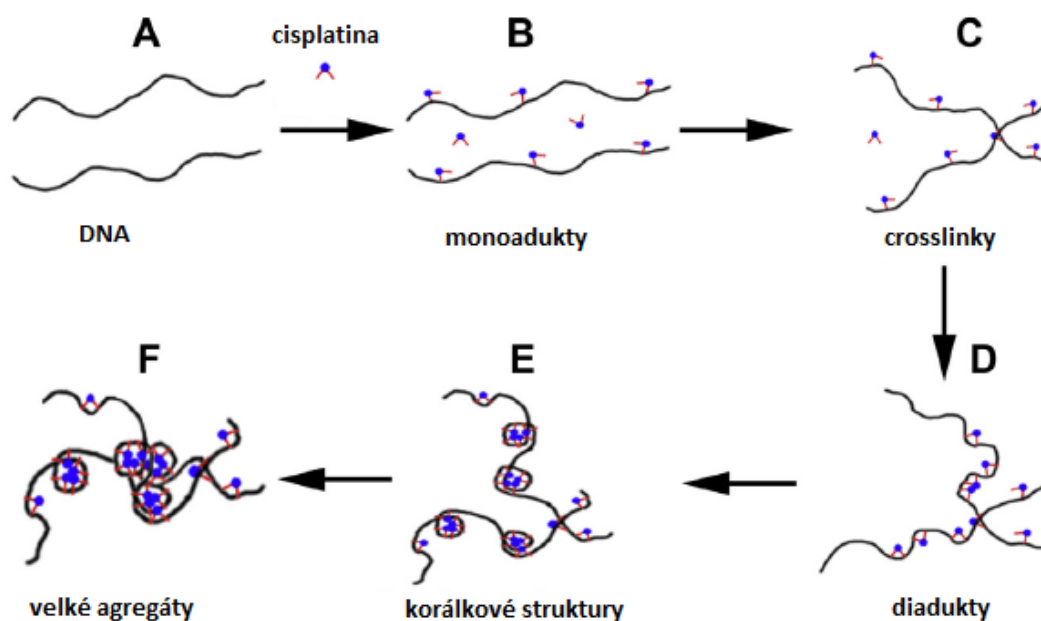
Kombinovaná chemoterapie s cisplatinou je základem léčby mnoha nádorů. Prvotní odezva na cisplatinu je vysoká, ale častým problémem bývá u pacientů výskyt relapsu a chemorezistence. Pro překonání rezistence byly zavedeny kombinované léčebné režimy s paclitaxelem, 5-FU, doxorubicinem a gemcitabinem. Paclitaxel působí při mitóze, kdy váže mikrotubuly a inhibuje tím jejich reorganizace. Kombinovaných režimů cisplatiny a paclitaxelu se využívá především v léčbě karcinomů ovaria, plic a hlavy a krku. Analog pyrimidinů 5-FU se v kombinaci s cisplatinou využívá k léčbě pokročilých cervikálních karcinomů. Trojkombinace cisplatina, 5-FU a doxorubicin je využívána k léčbě karcinomů slinných žláz. Cisplatina zlepšuje účinnost léčby gemcitabinem v kombinované terapii pokročilých karcinomů žlučníku. Další možnosti jsou kombinace cisplatiny a přírodních látek, jako je například jed včely medonosné, což bylo testováno na buněčných liniích odvozených od karcinomu ovárií (Dasari a Tchounwou, 2014; Valle a kolektiv, 2010; Sol a kolektiv, 2009)

2.3 Mechanismus působení cisplatiny

Cisplatina se stává aktivovanou po vstupu do buňky, v cytoplazmě jsou chloridové atomy hydrolyzované molekulami vody. Tím se z komplexu cisplatiny stává elektrofil, který může reagovat s jakýmkoliv nukleofilem, včetně sulfoskupin proteinů a donorových dusíkových atomů v nukleových kyselinách (Beck a Brubaker, 1973). Dalšími molekulárními mechanismy působení je vyvolání oxidativního stresu, indukovaná buněčná smrt pomocí Bax a Bak signálních drah. Ovlivňuje enzymy účastnící se regulace buněčného cyklu, jako jsou mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK) a c-jun-N-terminální kinázy (JNK). Dalším z účinků cisplatiny na buňky je ovlivnění jejich genové exprese (Dasari a Tchounwou, 2014).

2.3.1 Vazba cisplatiny na nukleové kyseliny

Cisplatina váže N7 reaktivní centra purinů a tím způsobuje poškození DNA v nádorových buňkách. Nejvíce časté jsou 1,2- d(GpG) a 1,2- d(ApG) vnitřní crosslinky purinů s cisplatinou, které vyvolávají DDR, zastavení buněčného cyklu a následně apoptózu. Méně časté 1,3- d(GpXpG) vnitřní adukty a další souvisí s toxicitou cisplatiny (Dasari a Tchounwou, 2014). Bylo zjištěno, že strukturální změny DNA po vazbě cisplatiny jsou komplexní a jsou ovlivněné koncentrací cisplatiny, délkou fragmentů a reakčním časem. Předpokládá se, že strukturální změny dvojřetězcové DNA vyvolané cisplatinou probíhají mechanismem znázorněným na obr. 3. Elektrostatické repulze mezi sousedními molekulami DNA jsou překonány přítomností aktivované cisplatiny, ta potom může formovat energické můstky mezi negativně nabitými řetězci rozdílných DNA. S prodlužujícím se reakčním časem se monoadukty mohou vyvíjet na meziřetězcové diadukty, což způsobuje ohýbání a motání místních úseků DNA, až vzniknou smyčky a postupně velké agregáty. Během těchto procesů jsou aktivovány mechanismy DDR, které následně spouští apoptózu (Liu a kolektiv, 2015).



Obr. 3: Strukturální změny DNA vyvolané působením cisplatiny. Vystavení DNA působení cisplatiny způsobuje vznik monoaduktů, které v čase mění až na velké agregáty DNA a cisplatiny. Převzato z Liu a kolektiv, 2015..

Molekula RNA je tvořena stejnými purinovými bázemi, které jsou v DNA. Proto obdobným mechanismem dochází k platinování RNA, což může mít vliv na chod buňky. Platinové adukty byly prokázány v ribozimální RNA (rRNA), transferové RNA i mediátorové RNA (mRNA). Tyto adukty mohou být příčinami toxicity cisplatiny. Testy in vitro bylo prokázáno, že cisplatin má vliv na funkčnost mRNA, což představuje nové cíle zkoumání (Becker, Weiss a Theile, 2014). Její vliv na funkčnost rRNA platinací molekuly byl vyvrácen jako nepravděpodobný (Theile a Kos, 2016).

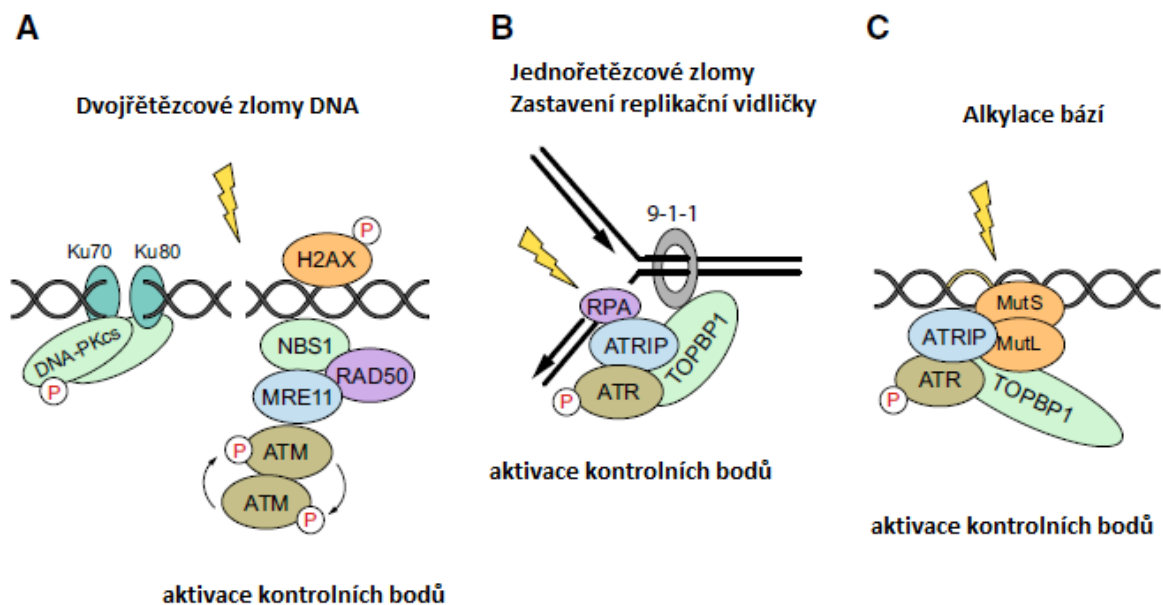
2.3.2 Oxidativní stres

Bylo prokázáno, že cisplatin zvyšuje kumulaci reaktivních forem kyslíku (ROS, Reactive oxygen species). Tyto formy kyslíku jsou produktem běžného buněčného metabolismu, nicméně při výskytu vysokých koncentrací je jejich účinek škodlivý. Zejména proto, že ROS jsou důležitý faktor v apoptických drahách. Zvýšení jejich koncentrace ovlivňuje mitochondriální membránový potenciál, poškozují dýchací řetězec, což spouští apoptické procesy. Dále ROS poškozují buněčné proteiny, lipidy a DNA. Studie dokázaly, že látky potlačující kumulaci ROS inhibují cytostatický účinek cisplatiny (Choi a kolektiv, 2015). Poškození DNA, které vzniká jak přímým působením cisplatin na DNA, tak

prostřednictvím ROS aktivuje DDR. Z tohoto vyplývá, že účinek cisplatiny je závislý na funkčních mechanismech DDR (Dasari a Tchounwou, 2015).

2.3.3 Aktivace DDR mechanismů

Buňky lidského těla jsou neustále vystaveny vlivům, které způsobují léze v DNA. Takovéto poškození DNA může být vyvoláno vnitřně například ROS, či vnějšími zdroji například ionizujícím zářením. Navíc léze v DNA vznikají i spontánně deaminací bází nebo vznikem AP míst. Pro zachování integrity genomu je tedy nezbytný systém DDR, který se skládá ze tří kroků rozpoznání poškození DNA, signalizace poškození DNA a aktivace buněčné odpovědi. Aktivování serin/threonin kinázy ATM, ATR a nebo DNA-dependentní protein kinázy je společné pro všechny druhy poškození DNA. Tyto kinázy aktivují kontrolní body, které jsou zodpovědné za zastavení buněčného cyklu, opravu DNA nebo spuštění apoptózy. Mechanismy DDR jsou shrnuty na obr. 4 (Matt a Hoffman, 2016).

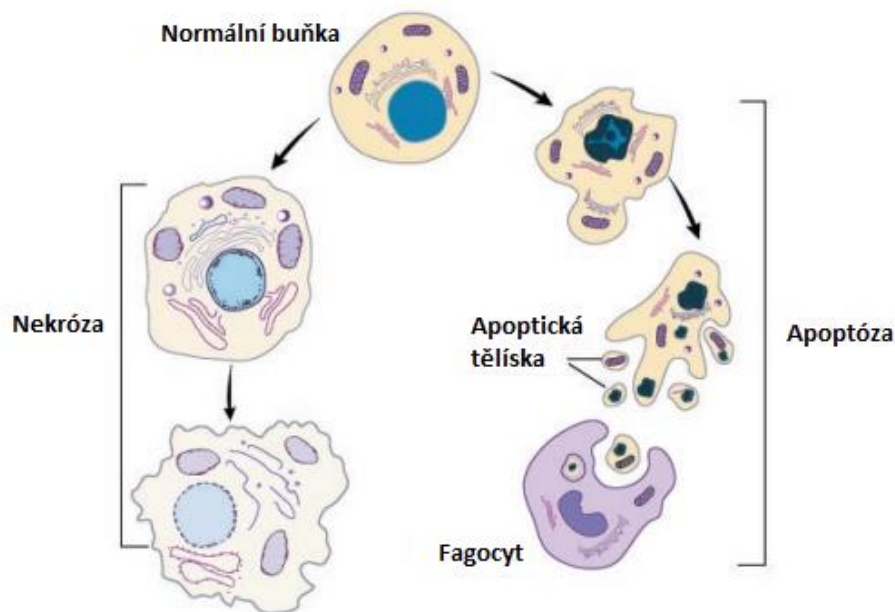


Obr. 4: Možnosti poškození DNA a systém odpovědi na poškození DNA. Převzato z Matt a Hoffman, 2016.

2.3.4 Indukovaná buněčná smrt

Apoptóza má důležitou biologickou roli ve vývoji organismu a homeostáze buněčné populace, ale také v patogenních procesech. Poškozené mechanismy apoptózy mají za následek četná onemocnění, jako jsou ischemie,

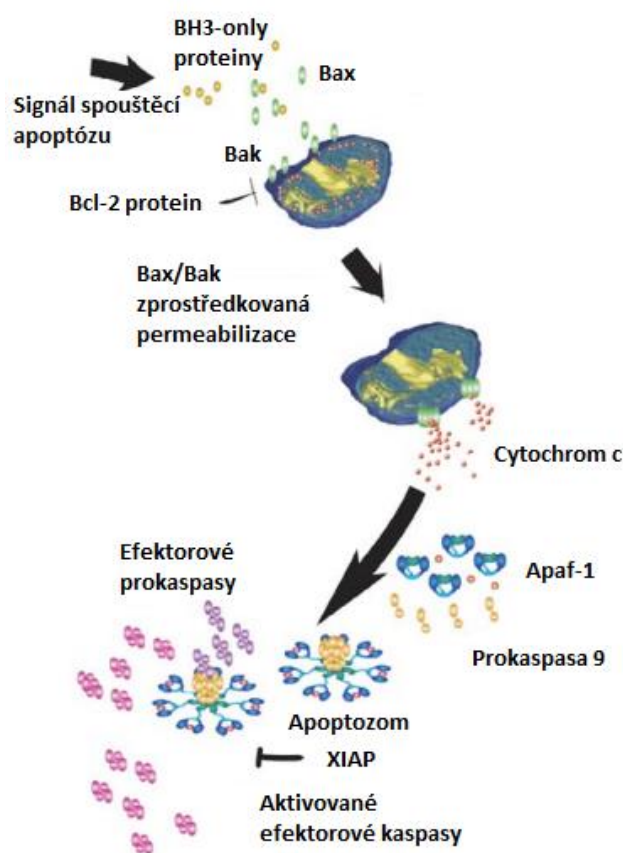
neurodegenerativní onemocnění, autoimunitní onemocnění a v neposlední řadě růst a rozšíření tumorů. Apoptóza probíhá rozdílnými mechanismy než buněčná nekróza, kdy dochází k narušení membrán, lyzování chromatinu a nakonec vylití buněčného obsahu do extracelulárního prostoru. Nekróza tím vyvolává zánětlivé procesy v tkáních, na rozdíl od apoptózy. Rozdíl je graficky znázorněn na obr. 5. Během apoptózy dochází ke kondenzaci chromatinu, pučení membrán a vzniku apoptických tělísek, které jsou následně pohlceny fagocyty. Důležitým rozdílem mezi těmito dvěma pochody je nutnost zdrojů energie pro mechanismus apoptózy (Saikumar a kolektiv, 1999).



Obr. 5: Rozdíl mezi apoptózou a nekrózou. Převzato z Saikumar a kolektiv, 1999.

Poškození DNA a mechanismy DDR vyvolávají spuštění apoptózy vnitřní cestou. Molekulárním znakem apoptózy je aktivování kaspáz, specifických proteáz zodpovědných za štěpení cílových proteinů. Vnitřní cesta je specifická porušením mitochondriálních membrán, které je způsobeno vychýlením rovnováhy mezi proteiny bcl-2 rodiny s funkcí proapoptickou i antiapoptickou. Do cytoplazmy se tak po porušení mitochondriálních membrán dostávají aktivátory kaspáz, ale i cytochrom c, který je nezbytný pro vytvoření apoptozomu. Aktivovaná kaspáza 9 tvoří s apaf-1 proteinem komplex apoptozom, při tvorbě jsou nutné kofaktory cytochrom c a ATP. Apoptozom je nezbytný pro aktivování efektorových kaspáz 3 a 7. Ty potom štěpí proteiny nezbytné pro existenci buňky, jako je cytoskelet, proteiny DDR, apod. Mechanismus apoptózy vnitřní cestou je shrnut na obr. 6 (Bao a Shi, 2007; Tait a Green, 2010).

Pro působení cisplatiny jsou klíčové proteiny rodiny bcl-2 regulující spuštění apoptózy. Tyto proteiny mají velmi konzervované domény BH, které je klasifikují jako multidoménné a „BH3-only“ proteiny. Proapoptické proteiny bax a bak odpovídají za spuštění apoptózy vnitřní cestou na základě podmětů jako je například poškození DNA. Antiapoptické proteiny bcl-2, bcl-XL a mcl-1 inhibují působení bax a bak proteinů. Bax a bak proteiny jsou aktivovány „BH3-only“ proteiny bim, bid, puma a noxa. Bim, bid, puma a noxa zároveň inhibují působení antiapoptických proteinů. Jejich exprese je aktivována proteinem p53 a FOXO3 jako odpověď na poškození DNA, které jsou nefunkční u většiny nádorů (Green, 2005).



Obr. 6: Mechanismus apoptózy aktivované vnitřní cestou mitochondriemi. Převzato z Green, 2005.

Bylo prokázáno, že cisplatinu spouští apoptózu pomocí aktivování noxa proteinu a také aktivováním kaspázy 3. Na spuštění apoptózy působením cisplatinou, má ale větší vliv aktivace bax a bak proteinů. Zvýšení koncentrace proteinů bax a bak i jejich mRNA po ošetření cisplatinou bylo prokázáno in vitro testy. Indukce exprese bak proteinu po ošetření buněk cisplatinou byla potlačena umlčením proteinu p53, je tedy závislá na jeho funkčnosti.

Při umlčení proteinu p53 nebyla také pozorována aktivace kaspasy 3 a dalších proapoptických proteinů. Indukce exprese proteinu bax po ošetření buněk cisplatinou nebyla potlačena umlčením p53, je tedy na jeho funkci nezávislá. Při aktivování bax cisplatinou může fungovat jako transkripční faktor p73. Antiapoptotický protein mcl-1, jehož exprese je zvýšená u většiny nádorů, nemá vliv na spuštění apoptózy působením cisplatinou (Matsumoto a kolektiv, 2016).

2.3.5 Signální dráhy pro růstové faktory a cisplatinu

Mitogenem aktivované proteinkinázy jsou rodina strukturně podobných serin/threonin proteinkináz, která řídí odpověď na různé extracelulární signály pro buněčný růst a přežití. Řídí genovou expresi, mitózu, metabolismus a programovanou buněčnou smrt. Proteiny jsou fosforylované MAPK a tím získávají svoji funkci, nebo naopak ji ztrácí. Substráty MAPK mohou být další proteinkinázy, fosfolipázy, transkripční faktory a proteiny cytoskeletu. Mitogenem aktivované proteinkinázy jsou systémem tří kaskádovitě aktivovaných kináz a stejně jako jejich substráty jsou regulované fosforylací. U mnohobuněčných organismů byly identifikovány tři podrodiny MAPK, jsou to extracelulárním signálem regulované kinázy, c-jun-N-terminální kinázy a p38 kinázy (Johnson a Lapadat, 2002).

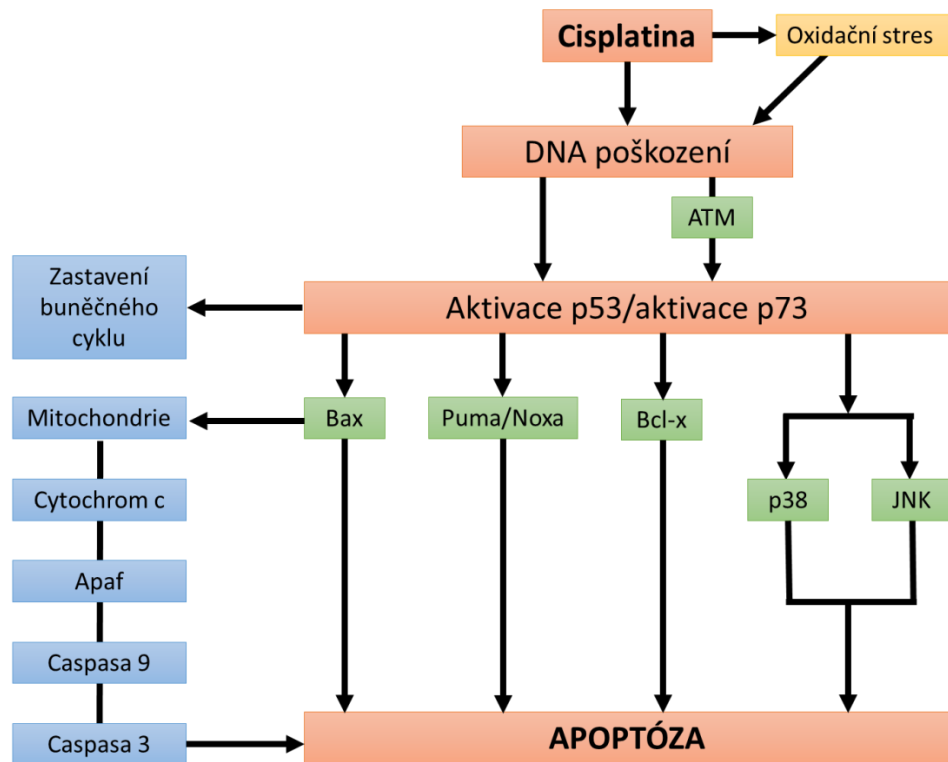
C-jun-N-terminální kinázy zprostředkovávají apoptózu jako odpověď na buněčný stres, například genotoxiny jako je cisplatinu. Jako DDR mechanismus JNK fosforylují a stabilizují p53 a p73, p53 je fosforylován na threoninovém zbytku, zatímco p73 je fosforylován několika násobně. Bylo dokázáno, že tato fosforylace proteinu p73 stabilizuje, což vede k expresi proteinu puma a aktivaci kaspáz (Jones, Dickman a Whitmarsh, 2007).

Další z MAPK kináz, která je aktivovaná působením cisplatinou je dráha p38 kinázy. Kináza p38 aktivuje různé substráty s funkcemi regulujícími buněčný růst a buněčnou smrt. Jedním z možných substrátů je EGFR, který je p38 fosforylován a tím inhibován po působení cisplatinou (Winograd-Katz a Levitzki, 2006).

Savčí cíl rapamycinu (mTOR, the mammalian target of rapamycin) je jeden z proteinů s výrazně aktivovanou funkcí v četných druzích maligně transformovaných buněk. Jeho přirozenou funkcí je kladná regulace buněčného přežití, udržení homeostázy v buňkách, odstranění poškozených

organel apod. Při inhibici mTOR dochází k spuštění autofagie v nádorových buňkách. Toho může být docíleno působením rapamycinu, nebo cisplatiny. Bylo dokázáno, že působení cisplatiny na nádorové buněčné linie snižuje expresi mTOR (Leischinga a kolektiv, 2015).

Mechanismy působení cisplatiny, její aktivace apoptózy jsou graficky shrnuty na obr. 7.



Obr. 7: Mechanismy působení cisplatiny na nádorovou buňku. Inspirováno Dasari a Tchounwou, 2014.

2.4 Rezistence na působení cisplatiny

Léčbu maligních onemocnění cisplatinou komplikují dva základní problémy. Jedním z těchto problémů je rezistence na cisplatinu vznikající během relapsu onemocnění. Klinicky byly ověřeny dvě formy rezistence, jsou to získaná a vrozená forma. Vrozená forma rezistence vzniká bez kontaktu organismu s cisplatinou či jinými platinovými léčivy, zatím co získaná forma vzniká na základě předchozího léčení těmito látkami. Molekulární rozdíly mezi vrozenou a získanou formou nejsou zatím známy, ale je obecný předpoklad, že každá působí rozdílnou signální dráhou. Klinicky se pacient považuje za citlivého na léčbu cisplatinou, pokud uplynou dva roky od poslední dávky. Potom je 70% možnost, že pacient odpoví na terapii platinovými léčivy. Se zkracující se dobou, dochází ke snižování procentuální šance. Pokud dojde k rekurenci onemocnění první měsíce od skončení terapie cisplatinou, je možnost odpovědi na další léčbu nízká a pacient se považuje za rezistentního (Amable, 2016).

Potom co je cisplatinu transportována do buňky může dojít k několika skutečnostem. Může být odčerpána ven transmembránovým transportním systémem, dále může být chemicky neutralizovaná navázáním thioskupinami proteinů jako je glutation. V neposlední řadě dochází k vazbě na cílové molekuly a vyvolání léčebných účinků. Rezistence může být vyvolána opravením poškozené DNA, změněnými mechanismy transportu, inaktivací v cytosolu, potlačením apoptózy a aktivací epiteliálně-mesenchymální tranzice (Zhu a kolektiv, 2016).

Snížení akumulace cisplatinu v buňkách představuje jednu z hlavních příčin cisplatinové rezistence. Snížení influxu, zvýšení efluxu a inaktivace thioskupinami proteinů vede k snížení nitrobuněčné koncentrace aktivního komplexu cisplatinu a tím k potlačení účinku. Předpokládá se, že cisplatinu jako lipofilní látka vstupuje do buňky prostou difúzí. Nedávno bylo zjištěno, že transportér mědi 1 (CTR1) reguluje influx cisplatinu. In vitro testy prokázaly, že CTR1 je inhibován u většiny buněčných linií rezistentních na cisplatinu. Molekulární mechanismus efluxu cisplatinu je spjatý s ABC transportéry, které jsou zodpovědné i za mnohočetnou lékovou rezistenci. Lysozym-asociovaný protein je transmembránový protein se zvýšenou expresí v nádorových buňkách. Jeho zvýšená exprese koreluje s nízkou prognózou u cervikálních karcinomů. Nedávné studie dokázaly, že tento protein aktivuje dráhy

zodpovědné za inhibici apoptózy a rezistenci na léčbu cisplatinou, doxorubicinem a paklitaxelem u cervikálních karcinomů (Zhu a kolektiv, 2016).

Inaktivace cisplatin v cytozolu je primárně způsobena konjugací cisplatin s glutathionem. Glutathion-S-transferázy, enzymy fáze dvě metabolismu léčiv, katalyzují konjugaci glutathionu a cisplatin. Konjugáty jsou více rozpustné a tím se zvyšuje jejich exkrece. Dále může být cisplatin inaktivována vazbou s metalothioneinem. Metalotioneiny jsou proteiny bohaté na cysteiny s nízkou molekulární hmotností a funkcí vázat těžké kovy, jakou jsou měď, zinek, kadmium a rtuť. Jejich zvýšená exprese byla pozorována u několika buněčných linií s cisplatinovou rezistencí (Amable, 2016).

Proteinkináza C je rodina úzce spjatých fosfolipid-dependentních enzymů ovlivňujících signální transdukcí a buněčnou regulaci. Dráhy signální transdukcí proteinkinázy C ovlivňují citlivost buněk na cisplatinu. Jejich aktivita a zvýšená exprese z nich dělají potencionální onkoproteiny s účastí na chemorezistenci ovariálních nádorových buněk na cisplatinu. Bylo prokázáno, že jejich působením je inhibována p38 kinázová dráha zodpovědná za spuštění apoptózy (Basu a Krishnamurthy, 2010).

Hlavním mechanismem působení cisplatin je její vazba s DNA a tvorba aduktů. Zkroucené struktury jsou rozpoznány mechanismy DDR. Jedním z enzymů katalyzujících kroky DDR je ERCC1, který je nejvíce studovaným biomarkerem cisplatinové rezistence. Vysoké koncentrace tohoto enzymu jsou spjaty se zvýšeným odstraněním DNA-platinových aduktů a tím zvýšení rezistence na cisplatinu. Testy in vitro a in vivo byla prokázána jeho zvýšená exprese u všech cisplatin-rezistentních forem malignit. Dalším z možných markerů cisplatinové rezistence může být protein XPF, jehož funkcí je dimerizovat spolu s ERCC1 a tvořit tím stabilní funkční komplex. Byla prokázána také korelace mezi zvýšenou expresí helikázy XPD a cisplatinovou rezistencí. Roli markerů XPF a XPD jako markerů rezistence na cisplatinu je nutné ověřit klinickými studiemi (Amable, 2016).

2.5 Toxicita cisplatiny

Jak bylo zmíněno, léčbu maligních onemocnění cisplatinou komplikují dva základní problémy. První z nich, chemorezistence, byl shrnut v předchozí kapitole. Dalším problémem jsou vedlejší účinky cisplatiny. Nejvíce zmiňovány jsou toxické účinky cisplatiny, ale mezi další nežádoucí účinky patří teratogenita a účinky na fertilitu a reprodukci. Až u 75 % pacientů se vyskytuje nefrotoxicita, ototoxicita a vliv na kostní dřeň (SÚKL, 2016).

Nefrotoxicita byla hlášena již při začátcích klinických testů chemoterapie cisplatinou. Nyní je nefrotoxicita nejvíce hlášeným nežádoucím účinkem, až jeden ze tří pacientů s cisplatinovým léčebným režimem. Klinicky se nefrotoxicita po léčbě cisplatinou objeví desátý den po podání a je manifestována sníženou glomerulární filtrací, zvýšeným sérovým kreatininem a sníženou hladinou magnesia a draslíku. Molekulárním mechanismem nefrotoxicity indukované cisplatinou je spuštění signálních drah po kontaktu tubulárních buněk s aktivovaným komplexem cisplatiny. Jedná se o stejné signální dráhy jako v nádorových buňkách. Dochází k apoptóze způsobené poškozením DNA navíc, ale i spuštění vnější cesty pomocí receptorů smrti TNF a Fas. Apoptóza tubulárních buněk způsobuje poškození ledvinných tubulů. Zároveň jsou započaty zánětlivé procesy, které ještě prohlubují renální poškození. Cisplatinou může také způsobovat poškození krevních cév ledviny, což způsobuje snížení krevního průtoku a ischemické poškození ledvin. Poškození ledvin může vyústit až v renální selhání (Pabla a Dong, 2008; Miller a kolektiv, 2010).

Ototoxicita způsobená cisplatinou je dalším nejčastějším nežádoucím účinkem léčby. Studie ukázaly, že až 88 % pacientů po léčbě cisplatinou má měřitelně zhoršený sluch a až 49% z nich potřebovalo kompenzační sluchové pomůcky. Dále je možno pozorovat horší účinky na mladší populaci, nejvíce zasaženi jsou lidé do 23 let. Ototoxicita indukovaná cisplatinou se projevuje jako zvonění v uších a percepční ztráta sluchu, která začíná na vyšších frekvencích a prohlubuje se k nižším frekvencím, které jsou potřebné pro vnímání mluvené řeči. Toto zhoršení sluchu je závislé na dávce, kumulativní, oboustranné a obvykle permanentní. Molekulárním mechanismem je apoptóza vláskových buněk způsobená vznikem ROS (Hill, Morest a Parham, 2008)

2.6 Proteomika

Moderní studie jsou zaměřeny na zkoumání vlivu cisplatinu na proteiny. Jak bylo popsáno v kapitole mechanismus účinku, její působení jako cytostatika je hlavně tvorbou aduktů s DNA. Nicméně i vliv na proteiny je významný, ať už ovlivňuje jejich exprese, tvoří adukty přímo s nimi či aktivuje signální dráhy. Proto tyto cílové proteiny mohou představovat molekulární biomarkery působení cisplatinu, její rezistence a toxicity. Studiu proteinů, jejich struktury a funkci se věnuje obor proteomika.

Na pozadí obrovského vývoje genomiky, studia proteinů zůstávala zaměřena delší dobu na jednotlivé proteiny. Později byly založeny první proteomické laboratoře, které ke studiu proteinů přistupovaly již celostně, avšak stále využívaly klasických laboratorních metod. Za rozvojem proteomiky v 90. letech stál vývoj 2-D elektroforézy a myšlenka využívat hmotnostní spektrometr k identifikaci tryptických peptidů získaných digescí čistých proteinů. K měření peptidů byl vyvinut přístroj MALDI-TOF. Identifikace probíhala skrínováním naměřených molekulových hmotností peptidových digestů oproti molekulovým hmotnostem získaným in silico digescí DNA sekvence. V roce 1994 Marc Wilkins prvně použil označení proteomika jako souhrnný název pro studium proteinů (PROTEin a genOM – proteom, veškerý soubor proteinů vzniklý expresí genomu). Existuje několik přístupů jak studovat proteiny, jednou z nejčastějších high-throughput metod je proteomické profilování (Williams a kolektiv, 2014).

2.6.1 Proteomické profilování

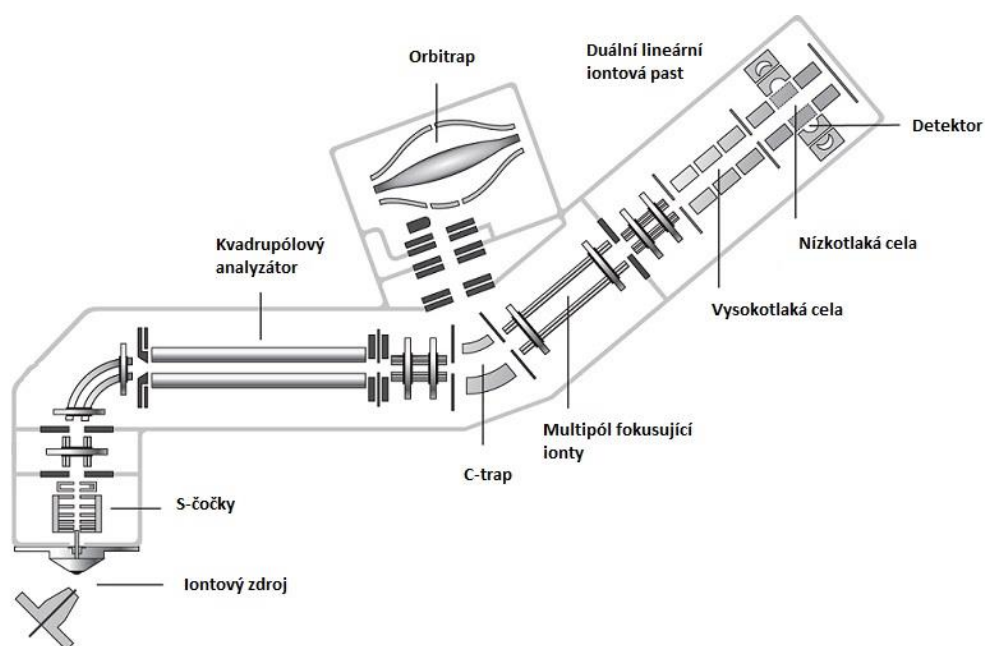
High-throughput proteomika se zaměřuje na získání velkého množství dat, které se využívají hlavně pro skríninkové účely zdravotnictví a výzkumu (Chmelík, 2005). Exprese genů v buňkách se neustále mění, což má za následek neustálou změnu profilů proteinů obsažených buňce. Tato změna je na proteinové úrovni ještě více posílena alternativními sestřihy, posttranslačními modifikacemi, apod. Některé z těchto molekulárních změn jsou nezbytné pro život buňky, některé jsou způsobeny environmentálními vlivy, jako jsou chemikálie a léky. Proteomické profilování spočívá v měření exprimovaných proteinů ve dvou sadách vzorků a v jejich vzájemném porovnávání. K tomuto je potřeba metoda, která bude detekovat a

identifikovat stejné proteiny ve dvou vzorcích a porovnávat jejich hladiny. Jednou ze dvou metod komparativní proteomiky je 2D-SDS elektroforéza a porovnání dvou spotů, druhou metodou je měření izotopově značených proteinů pomocí spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC-MS, liquid chromatography a mass spectrometry; Liebler, 2002).

2.6.2 Hmotnostní spektrometrie a její spojení s kapalinovou chromatografií

Hmotnostní spektrometrie (MS) a tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) jsou hlavní metody v identifikaci proteinů. Hmotnostní spektrometrie měří podíl molekulové hmoty a náboje (m/z) iontů v plynné fázi. Analyty při proteomickém profilování jsou peptidy získané enzymatickým štěpením. Hmotnostní spektrometr sestává z iontového zdroje, který přeměňuje molekuly analytu na ionty plynné fáze, hmotnostního analyzátoru, který separuje ionty analytu podle m/z a detektoru, který zachycuje počty iontů v dané m/z hodnotě. Ionizace je umožněna dvěma tzv. měkkými ionizačními technikami, ionizace laserem za pomoci matrice (MALDI; Karas a Hillenkamp, 1988) nebo ionizace elektrosprejem (ESI; Fenn a kolektiv, 1989). Hmotnostní analyzátor je centrem technologie MS, pro proteomické účely se obvykle užívají čtyři typy analyzátorů. Jsou to kvadrupól, iontová past (sférická či lineární), analyzátor doby letu (time of flight, TOF) a iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací. Tyto analyzátoři jsou rozdílné v jejich fyzikálních principech a analytickém použití. Hybridní neboli tandemové hmotnostní spektrometry byly navrženy, tak aby kombinovali schopnosti rozdílných hmotnostních analyzátorů (Han, Aslanian a Yates, 2008).

Relativně novým typem analyzátoru je Orbitrap, vyvinut Makarovem v roce 1999 a prvně publikován jako nástroj pro proteomický výzkum Hu a kolektivem v roce 2005. V Orbitrapu jsou ionty chyceny, obíhají kolem centrální elektrody ve tvaru vřetena a oscilují harmonicky podél jejich os s frekvencí charakteristickou pro jejich m/z hodnoty. Měřený je ionty indukovaný proud na vnějších elektrodách, který je Fourierovou transformací převeden na hmotnostní spektra. Orbitrap umožnil vznik novým hybridním hmotnostním spektrometrům kombinujícím lineární iontovou past, C-trap a Orbitrap, což zvyšuje robustnost, senzitivitu a MS/MS schopnosti (Makarov a kolektiv, 2006). Na obr. 8 je uvedeno schéma přístroje Orbitrap Fusion používaného pro účely této diplomové práce.



Obr. 8: Orbitrap Fusion, ThermoFisher Scientific, převzato z Thermo, 2016.

Kapalinová chromatografie, především tedy její modifikace v podobě vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC, High pressure liquid chromatography) je nejrozšířenější separační technikou. Je to analytická metoda založena na principu rozdílné distribuce dělených látek ve směsi mezi dvě nemísitelné fáze – mobilní a stacionární. Kapalinový chromatograf se skládá z vysokotlakého čerpadla přivádějícího mobilní fázi na kolonu s fází stacionární, kde probíhá dělení analytu rozpuštěného v mobilní fázi. Po eluci analytů jsou separované zóny vycházející z kolony zachyceny detektorem a převedeny na chromatografický záznam (Nováková a Douša, 2013).

Hmotnostní spektrometr je efektivní nástroj pro identifikování proteinů a peptidů, ale i nejvíce výkonné spektrometry mají svoje limity v dynamickém rozsahu spektra. Kvalita dat může být ovlivněna, když příliš mnoho rozdílných iontů je analyzováno v jednom kroku. Doplnění metody o LC před MS analýzou může zmírnit tento problém snížením počtu analytů vstupujících do hmotnostního spektrometru v jeden čas, což pomáhá zvýšit ionizaci u iontů, které jsou pod dynamickým rozsahem detektorů. Navíc analyty mohou být soustředěny do úzkých píků během LC separace, což ještě zvyšuje MS senzitivitu detekce. V proteomice se uplatňují především kapilární formy LC, které separují na základě fyzikálně-chemických vlastností, např. náboj, velikost, hydrofobicita (Xie, Smith a Shen, 2012).

2.6.3 Kvantifikace pomocí MS analýzy

Hmotnostní spektrometrie je nekvantitativní metoda, protože proteolytické peptidy mají rozdílnou MS odpověď kvůli jejich fyzikálně-chemickým vlastnostem, jako jsou velikost, náboj, hydrofobicita. Proto je nemožné relativně kvantifikovat změny abundance mezi rozdílnými experimentálními vzorky ve stejné MS analýze. Proto byly zavedeny izotopové značky, které jsou inkorporovány do proteinů a peptidů, aby byla možná jejich kvantifikace v rozdílných vzorcích v jedné MS analýze. Na základě vztahu k použití izotopových značek jsou kvantitativní MS metody rozděleny na tři druhy, chemické/enzymatické značení, metabolické značení a label-free metody. Chemické a enzymatické značení využívá značek ICAT, iTRAQ, TMT, dimethylové značení a značení pomocí ^{18}O izotopů (Chen a kolektiv, 2015).

Metabolické značení využívá značení pomocí ^{15}N izotopů a metodu SILAC (Stable isotope labeling by amino acids in cell culture). Principem SILAC metody je metabolická inkorporace izotopově značených aminokyselin, jako jsou ^{13}C nebo ^{15}N arginin nebo lysin do celého proteomu během buněčného metabolismu při kultivaci buněk. Dvě populace buněk jsou kultivovány na rozdílných mediích, jedna populace je kultivována s „lehkým“ aminokyselinami (obsahují pouze přírodní izotopy) a druhá je kultivována na „těžkém“ mediu (obsahuje aminokyseliny značené izotopy). Při buněčných procesech dochází k inkorporaci aminokyselin do vznikajících proteinů. Je potřeba minimálně pěti pasáží, aby došlo k naznačení celého proteomu. Potom je možné s buněčnou linií experimentálně pracovat. Značená a neznačená buněčná linie se smíchá v poměru jedna ku jedné, vzorky se zpracují a provede se LC-MS analýza. Kvantifikace metodou SILAC je na základě poměru izotopově značených a neznačených peptidů (Ong a kolektiv, 2002).

3 Experimentální část

3.1 Materiál

3.1.1 Použité chemikálie

- 2,3bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxy anilid (XTT) – Sigma Aldrich, USA
- 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl-tetrazolium bromid (MTT) – Sigma Aldrich, USA
- Acetonitril (ACN) – J.T.Baker, USA
- Arginin – Sigma Aldrich, USA
- Arginin $^{13}\text{C}_6$ – Sigma Aldrich, USA
- Boritá kyselina (H_3BO_3) – Sigma Aldrich, USA
- Cisplatina – Sandoz, Německo
- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4) – Sigma Aldrich, USA
- Dimethylsulfoxid (DMSO) – Sigma Aldrich, USA
- Dithiothreitol (DTT) – Sigma Aldrich, USA
- Dodecylsulfát sodný (SDS) – Sigma Aldrich, USA
- Fenazin methyl sulfát (PMS) – Sigma Aldrich, USA
- Fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF) – Sigma Aldrich, USA
- Fluorid sodný (NaF) – Sigma Aldrich, USA
- Fosforečná kyselina (H_3PO_4) – Sigma Aldrich, USA
- Hovězí fetální sérum (FCS) – Biotek, USA
- Hovězí fetální sérum dialyzované (FCSd) – Sigma Aldrich, USA
- Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát ($\text{NaHPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) – Lach-Ner, ČR
- Hydrogenuhličitan amonný (NH_4HCO_3) – Sigma Aldrich, USA
- Hydroxid sodný (NaOH) – Lach-Ner, ČR
- Chlorid draselný (KCl) – Sigma Aldrich, USA
- Chlorid sodný (NaCl) – Sigma Aldrich, USA
- Jodacetamid (IAA) – Sigma Aldrich, USA
- Lysin – Sigma Aldrich, USA
- Lysin $^{13}\text{C}_6$ – Sigma Aldrich, USA
- Methanol – Merck, Německo
- Močovina (UA) – Sigma Aldrich, USA

- Mravenčí kyselina (FA) – Sigma Aldrich, USA
- MS voda Milli Q – Merck, Německo
- Octová kyselina (AA) – Fluka, USA
- Ortovanadičnan sodný (Na_3VO_4) – Sigma Aldrich, USA
- Pyrofosfát sodný ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) – Sigma Aldrich, USA
- RPMI 1640 médium – Sigma Aldrich, USA
- RPMI 1640 medium bez fenolové červeni – Sigma Aldrich, USA
- RPMI 1640 SILAC medium – Sigma Aldrich, USA
- Trifluoroctová kyselina (TFA) – Sigma Aldrich, USA
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid (TRIS/HCl) – Sigma Aldrich, USA
- Trypsin – Promega, Německo

3.1.2 Použité roztoky

- BCA protein assay kit – Thermo Scientific, USA
- BRUB pufr – 0,1M AA, 0,1M H_3BO_3 , 0,1M H_3PO_4 , úprava pomocí NaOH na pH 3, 4, 5, 6, 8 a 11
- Eluční pufr – 0,5% AA
- FASP lyzační pufr – 0,1M DTT; 0,1M TRIS/HCl; 4% SDS; deionizovaná voda, pH= 7,6
- IAA – 0,05M IAA v roztoku UA
- Kondičionální pufr – 0,5% AA, 80% ACN
- Mobilní fáze pro LC – roztok A – 0,1% FA, 100% voda; roztok B – 0,08% FA, 20% voda, 80% ACN; loadovací roztok – 0,1% TFA, 100% voda
- MTT roztok – 2,2 μM MTT, RPMI medium bez fenolové červeni
- PBS pufr – 0,14M NaCl; 3 μM KCl; 9 μM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$; 1 μM KH_2PO_4 ; pH=7,4
- PBS pufr s inhibitory – 5 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$; 1mM Na_3VO_4 ; 5mM NaF; 1mM PMSF v PBS pufru
- RPMI médium – k základnímu RPMI 1640 médiu se přidalo 10% FCS
- RPMI medium s „lehkými“ aminokyselinami – SILAC RPMI 1640, 10% FCSd a aminokyseliny Arginin v koncentraci 1,1 μM a Lysin v koncentraci 0,27 μM
- RPMI medium s „těžkými“ aminokyselinami – SILAC RPMI 1640, 10% FCSd a aminokyseliny Arginin $^{13}\text{C}_6$ v koncentraci 1,1 μM a Lysin $^{13}\text{C}_6$ v koncentraci 0,27 μM

- UA – 8M močovina v 0,1M TRIS/HCl
- XTT roztok – XTT sůl koncentrace 1.13 μ M, RPMI média bez fenolové červeni, PMS koncentrace 0.07 μ M

3.1.3 Biologický materiál

Pro experimenty byla použita buněčná linie CCRF-CEM. Tato linie je odvozena od akutní T-lymfoblastické leukémie. Buněčná linie byla získána od společnosti American Tissue Culture Collection. Dále byla použita buněčná linie CCRF-CEM Casper s vloženým plazmidem Casper (Casper-3GR – Evrogen, Rusko) připravená Mgr. Ivem Frydrychem, PhD. Mezi experimenty byly buňky kultivovány v inkubátoru při 37 °C, 5% CO₂ v RPMI médiu.

3.1.4 Použité přístroje

- Cell voyager cv7000 – Yokogawa, Nizozemsko
- Centrifuga 5810 R – Eppendorf, Německo
- Concentrator 5301 – Eppendorf, Německo
- Dionex Ultimate 3000 – Thermo Scientific, USA
- Inkubátor Innova co-170 - Biotech, USA
- Microplate washer dispensor EL 406 – Biotek, USA
- Multidrop Combi – Thermo Scientific, USA
- Multilabel plate readers Envision – Perkin Elmer, USA
- MS inkubátor – Biotech, USA
- Orbitrap Fusion – Thermo Scientific, USA
- pH metr – P-lab a.s., USA
- Sonifikátor – Branson, Nizozemsko
- Vi-Cell XR – Beckman Coulter, USA
- Vodní lázeň Sub Aqua 12 – P-lab a.s., USA

3.1.5 Software

- Program R verze 3.03 s balíčkem ic50
- Columbus verze 2.6
- Max Quant verze 1.5.2.8, algoritmus Andromeda
- Perseus verze 1.5.1.6
- Venn Diagram Plotter verze 1.5.5228.29250
- DAVID Bioinformatics Resources verze 6.7
- STRING verze 10.0

3.2 Metodika

3.2.1 Stanovení inhibiční konstanty IC₅₀

3.2.1.1 Ovlivnění buněk cisplatinou

Nejprve byla vytvořena koncentrační řada cisplatin v DMSO rozpipetovaná na 96 jamkové desce. Nevyšší koncentrace cisplatin odpovídala zásobnímu roztoku (0,5 mg/ml). Celkem bylo vytvořeno 16 bodů řady s faktorem ředění 2 (Tab. 1). Na zdrojovou 384 jamkovou desku pro pipetor ECHO bylo přeneseno v objemu 10 µl roztoku koncentrační řady léčiva Do cílové 384 jamkové desky bylo napipetováno 30 µl média do prvního sloupce, který sloužil jako blank. Dále bylo napipetováno 30 µl buněčné suspenze o koncentraci 2000 buněk na jamku. Médium a buňky byly napipetovány pipetorem EL 406. Pomocí přístroje ECHO bylo ze zdrojové 384 jamkové desky nanášeno 75 nl léčiva v daných koncentracích na cílovou 384 jamkovou desku s buňkami. Buňky ošetřené cisplatinou byly kultivovány 72 hodin v inkubátoru při 37 °C, 5% CO₂.

Tab. 1 : Koncentrační řada cisplatin. Koncentrace shrnuté v této tabulce tvořili koncentrační řadu, která byla nanášena na 384 jamkovou cílovou desku při stanovování inhibiční konstanty IC₅₀.

Pořadí v koncentrační řadě	koncentrace cisplatin (mg/ml)	koncentrace cisplatin v jamce cílové desky (µg/ml)
1.	0,5	1,25
2.	0,25	6,23·10 ⁻¹
3.	12,5·10 ⁻²	3,12·10 ⁻¹
4.	6,25·10 ⁻²	1,56·10 ⁻¹
5.	3,13·10 ⁻²	7,79·10 ⁻²
6.	1,56·10 ⁻²	3,90·10 ⁻²
7.	7,81·10 ⁻³	1,95·10 ⁻²
8.	3,91·10 ⁻³	9,74·10 ⁻³
9.	1,95·10 ⁻³	4,87·10 ⁻³
10.	9,77·10 ⁻⁴	2,44·10 ⁻³
11.	4,88·10 ⁻⁴	1,22·10 ⁻³
12.	2,44·10 ⁻⁴	6,09·10 ⁻⁴
13.	1,22·10 ⁻⁴	3,04·10 ⁻⁴
14.	6,10·10 ⁻⁵	1,52·10 ⁻⁴
15.	3,05·10 ⁻⁵	7,61·10 ⁻⁵
16.	1,53·10 ⁻⁵	3,81·10 ⁻⁵

3.2.1.2 XTT test

Po skončení inkubace ošetřených buněk bylo pomocí přístroje Multidrop Combi přidáno 15 μ l roztoku XTT. Po přidání XTT byly buňky kultivovány 3 hodiny v inkubátoru při 37 °C, 5% CO₂ a poté byla změřena absorbance vzorků při 490 nm na přístroji Envision.

Data získaná měřením absorbancí byla vyhodnocena pomocí programu R 3.03 s balíčkem IC₅₀.

3.2.1.3 MTT test

Po skončení inkubace ošetřených buněk bylo pomocí přístroje Multidrop Combi přidáno 15 μ l MTT roztoku. Ošetřené buňky s přidaným MTT roztokem byly inkubovány 3 hodiny při 37 °C, 5% CO₂, byl přidán 10% roztok SDS v objemu 10 μ l a buňky byly kultivovány do druhého dne při 37 °C, 5% CO₂. Poté byla změřena absorbance při 540 nm na přístroji Envision.

Data získaná měřením absorbancí byla vyhodnocena pomocí programu R s balíčkem IC₅₀.

3.2.2 Stanovení času do apoptózy

Buněčná linie CCRF-CEM Casper byla napipetována na 96 jamkovou desku v koncentraci 2 tisíce buněk na jamku a objemu 50 μ l. Jedna z jamek sloužila jako kontrola, další byly ošetřeny koncentrací 1x IC₅₀ (1,54 nM), 5x IC₅₀ (7,70 nM) a 10x IC₅₀ (15,40 nM). Jamky s ošetřenými buňkami a kontrolou poté byly snímkovány mikroskopem Cell Voyager cv7000. Snímkování probíhalo nejméně po dobu 24 hodin.

Snímky byly pomocí programu Columbus převedeny na fluorescenční signály GFP (Green fluorescein protein) a RFP (Red fluorescein protein). Tyto signály byly dány do poměru a zaznamenány na časovou osu. Pomocí poměru signálu GFP ku RFP bylo sledováno zvýšení apoptózy v buňkách. Pro vyhodnocení experimentu byl odečten 10% nárůst poměru GFP ku RFP v čase.

3.2.3 SILAC kultivace

Buněčná linie CCRF-CEM byla kultivována na mediu RPMI s „těžkými“ aminokyselinami a další buněčná linie CCRF-CEM byla kultivována na mediu RPMI s „lehkými“ aminokyselinami po dobu pěti pasáží. Poté bylo provedeno kontrolní měření inkorporace aminokyselin pomocí Orbitrapu Fusion. Takto byla vytvořena CCRF-CEM $^{12}\text{C}_6$ linie (lehká buněčná linie) a CCRF-CEM $^{13}\text{C}_6$ značená linie (těžká buněčná linie).

3.2.4 Ošetření SILAC značených buněk cisplatinou

Obě SILAC značené buněčné linie v počtu 10 milionů buněk byly ošetřena cisplatinou v koncentraci $5 \times \text{IC}_{50}$ (7,5 nM) po dobu 5 hodin a 22 minut (polovina času do apoptózy). Dále obě SILAC značené buněčné linie v počtu 10 milionů buněk sloužili jako kontrola. Bylo získáno ve 4 opakování celkem 8 biologických replikátů.

3.2.5 FASP lyzační protokol

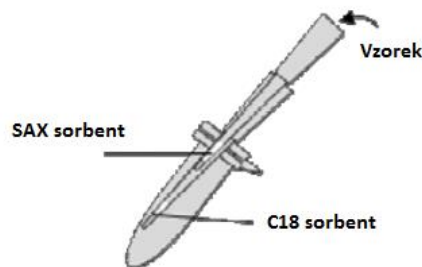
Po ukončení inkubace byly ošetřené a kontrolní SILAC značené buňky centrifugovány při 290x g po dobu 5 minut za pokojové teploty. Supernatant byl odstraněn a k peletě byl přidán PBS pufr s inhibitory v objemu 15 ml. Opět byla suspenze centrifugována při 290x g po dobu 5 minut za pokojové teploty. Propláchnutí pufrům PBS s inhibitory bylo celkem opakováno dvakrát. Při propláchnutí 15 ml PBS pufru byly smíchány kontrolní a ošetřené buňky v poměru 1:1 ($^{12}\text{C}_6$ kontrola : $^{13}\text{C}_6$ ošetřené, a naopak také $^{13}\text{C}_6$ kontrola : $^{12}\text{C}_6$ ošetřené) a opět byly centrifugovány při 290x g po dobu 5 minut. Dále se k peletě přidal FASP lyzační pufr v objemu 200 μl . Suspenze s lyzačním pufrům se sonifikovala 30 sekund s amplitudou 15 % a pulzem délky 0,5 s. Poté byla přenesena do mikrozkušavek a centrifugována při 290x g po dobu 5 minut.

3.2.6 FASP a SAX příprava vzorků pro LC-MS

Buněčné lyzáty byly přeneseny na kolonku pro FASP protokol (Microcon YM-30 – Merck, Německo) spolu s 200 μl UA, poté byly centrifugovány po dobu 15 minut při 14 000x g. K lyzátoům bylo přidáno 100 μl roztoku IAA a

proběhla inkubace 20 minut. Kolonky s lyzáty poté byly centrifugovány při 14 000x g po dobu 10 minut. Bylo přidáno 100 µl roztoku UA a centrifugováno při 14 000x g po dobu 15 minut, tento krok byl opakován celkem dvakrát. Poté bylo přidáno 100 µl 0,05M NH₄HCO₃ a centrifugováno při 14 000x g po dobu 10 minut, tento krok byl opakován celkem třikrát. K buněčným lyzátům na kolonce bylo přidáno 40 µl 0,05M NH₄HCO₃ s trypsinem v poměru 1:100. Filtrační kolonky byly přesunuty do nových mikrozkuvek a inkubovány při 37 °C 12 hodin, poté byly centrifugovány při 14 000x g po dobu 10 minut. Na kolonky bylo nanášeno 100 µl 0,05M NH₄HCO₃ a byly centrifugovány při 14 000x g po dobu 10 minut. Na závěr FASP protokolu byla změřena koncentrace proteinů pomocí BCA assay.

Stage tipy se sorbenty SAX (Anion-SR extraction disk, 47 mm 3M Empore – Sigma Aldrich, USA) byly promyty 100 µl methanolu a centrifugovány při 3000x g 3 minuty. Poté byly promyty 100 µl 1M NaOH a dvakrát 100 µl BRUB pufru s pH 11. Stage tipy se sorbentem C18 (SPE extraction disk, 47 mm 3M Empore – Sigma Aldrich, USA) byly promyty 100 µl methanolu a centrifugovány při 3000x g 3 minuty. Poté byly promyty 100 µl kondičionálního pufru a dvakrát 100 µl elučního pufru. Stage tipy byly umístěny do mikrozkuvky podle obr. 9. Na takto připravené stage tipy byl nanášen vzorek o koncentraci proteinů 100 mg/ml.



Obr. 9: Stage tipy umístěné do mikrozkuvky. Převzato z Wiśniewski, Zougman a Mann, 2009.

Vzorek byl postupně promýván 100 µl BRUB pufru s pH 11, 8, 6, 5, 4 a 3. Po promytí následovala centrifugace při 3000x g po dobu 5 minut. Mezi každým promytím byl stage tip s nanášeným vzorkem umístěn do nové mikrozkuvky se stage tipem obsahujícím sorbent C18. Stage tipy se sorbentem C18 a frakcionovaným vzorkem byly na závěr promyty 100 µl elučního pufru a centrifugovány při 3000x g po dobu 5 minut. Takto získané proteolytické frakcionované peptidy byly zakoncentrovány a poté rozpuštěny v 50 µl TFA.

3.2.7 LC-MS analýza

Připravené vzorky byly použity na analýzu pomocí kapalinového chromatografu Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific) spojeném s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Fusion (Thermo Scientific).

Vzorky byly nanášeny v objemu 10 µl na prekolonu Acclaim PepMap 100 o rozměrech 100 µm x 2 cm a velikosti částic 5 µm. Byl nastaven izokratický gradient mobilní fáze a průtok 5 µl/min. Mobilní fází byl loadovací roztok (0,7% TFA). Separace probíhala na koloně EASY-Spray Column PepMap o rozměrech 50 cm x 75 µm a velikosti částic 3 µm při průtoku mobilní fáze 0,275 µl/min. Mobilní fáze se skládala z roztoku A (2% ACN, 0,1% FA) a roztoku B (80% ACN, 10% TFE, 0,08% FA). Gradient trval 285 min a při separaci docházelo ke zvyšování procenta organické fáze (Tab. 2). Teplota na prekoloně i koloně byla 35 °C.

Tab. 2: Gradient mobilní fáze během chromatografické separace.

Retenční čas (min)	%B
0	5
10	5
245	30
250	95
255	95
257	5
285	5

Doba MS analýzy byla nastavena na 285 minut. Jako MS1 analyzátor byl nastaven Orbitrap (FTMS) a byly na něm nastaveny následující hodnoty: rozsah 400-1600 m/z, rozlišení 120 000, počet mikroskenů 1, sběr dat typu profile a hmotnostní rozsah normal.

Jako MS2 analyzátor byl nastaven izolační mód kvadrupól s typem detektoru iontová past, na které byly nastaveny následující hodnoty: rychlost skenování rapid, hmotnostní rozsah normal, sběr dat typu centroid, typ aktivace HCD, šířka izolace 1,6 m/z, normalizovaná kolizní energie 28 %, TOP speed s výběrem prekurzorů s největší intenzitou.

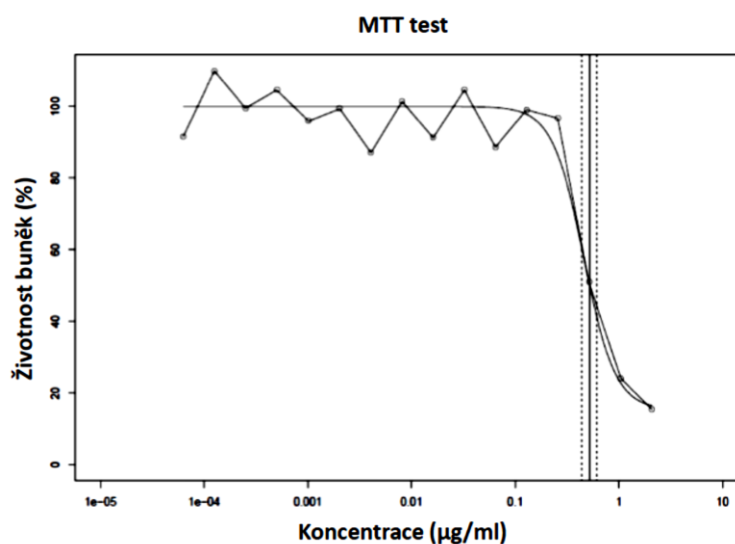
Získaná hmotnostní spektra byla zpracována v softwaru MaxQuant využívajícího vyhledávací algoritmus Andromeda (Cox a Mann, 2008). Pro detekci bylo zadáno nastavení: multiplicita 2, těžké značky Arg6 a Lys6, variabilní modifikace acetylace N konce proteinu a oxidace metioninu, fixní modifikace karbamidomethylace, specifické štěpení trypsinem, maximálně 2 chybná štěpení, minimální délka peptidů 6 aminokyselin, minimální počet peptidů 1, hmotnostní tolerance pro MS1 20 ppm, hmotnostní tolerance pro MS2 0,5 Da, byla použita databáze Uniprot.

Pro zpracování dat byl použit software Perseus. Vennovy diagramy byly vytvořeny pomocí programu Venn Diagram Plotter. Byla provedena analýza buněčných procesů programy DAVID a STRING.

4 Výsledky

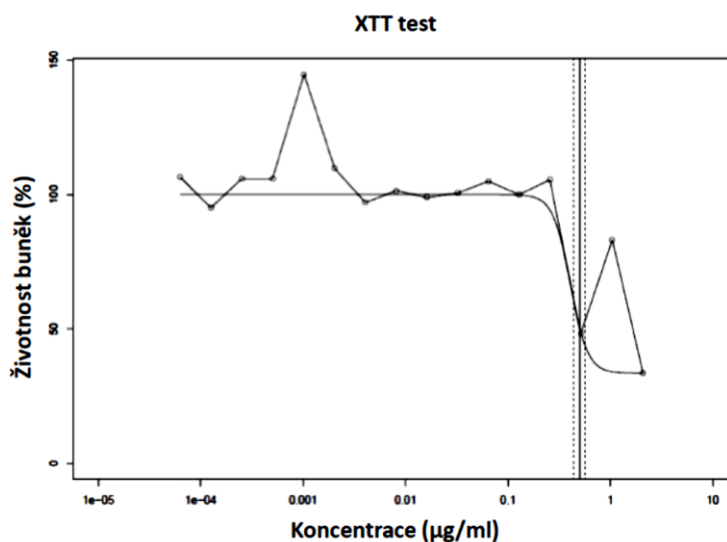
4.1 Stanovení konstanty IC_{50}

Dle popisu metodiky byla získána a vyhodnocena data, kterými byla stanovena konstanta IC_{50} pro cisplatinu u buněčné linie CCRF-CEM. Tato konstanta byla stanovena pomocí testů MTT ve 4 biologických opakováních. Výsledky těchto opakování jsou shrnuty v tab. 3 a na obr. 10. Stanovila se průměrná hodnota v $\mu\text{g/ml}$, které byly následně přepočítány na nM, tab. 3. Pomocí MTT testu byla stanovena průměrná hodnota 0,26125 $\mu\text{g/ml}$ (0,870 nM).



Obr. 10: Graf závislosti životnosti buněk (%) na koncentraci cisplatinu ($\mu\text{g/ml}$) stanovený pomocí MTT testu. Pomocí MTT testu byla stanovena průměrná hodnota konstanty IC_{50} 0,26125 $\mu\text{g/ml}$ (0,870 nM).

Dále byla pro buněčnou linii CCRF-CEM stanovena konstanta IC_{50} pomocí testů XTT ve 4 biologických opakováních. Výsledky těchto opakování jsou shrnuty v tab. 3 a na obr. 11. Stanovila se průměrná hodnota v $\mu\text{g/ml}$, které byly následně přepočítány na nM, tab. 3. Pomocí XTT testu byla stanovena průměrná hodnota 0,463 $\mu\text{g/ml}$ (1,543 nM).



Obr. 11: Graf závislosti životnosti buněk (%) na koncentraci cisplatiny ($\mu\text{g/ml}$) stanovený XTT testu. Pomocí XTT testu byla stanovena průměrná hodnota konstanty IC_{50} 0,463 $\mu\text{g/ml}$ (1,543 nM).

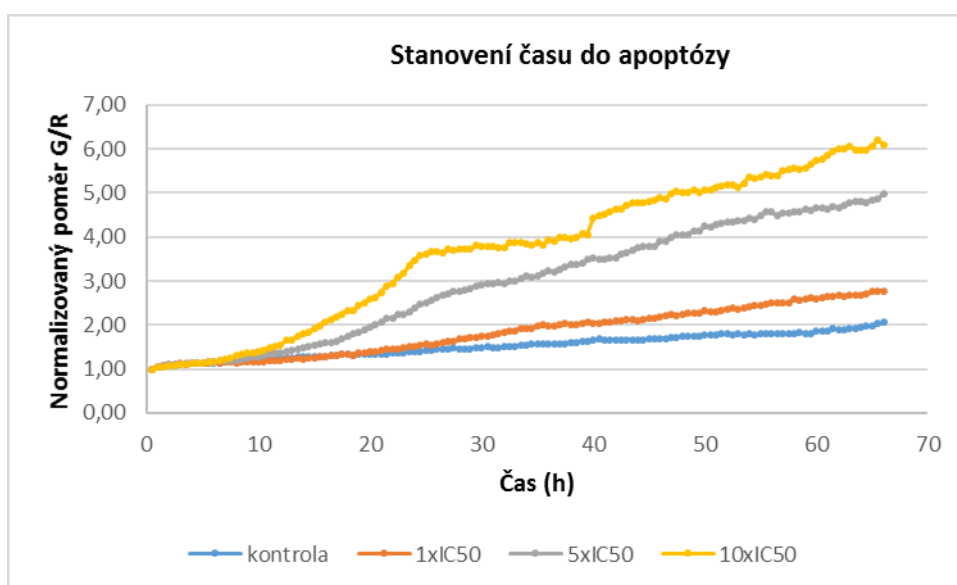
Tab. 3: Hodnoty konstanty IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) u buněčné linie CCRF-CEM stanovené testy MTT a XTT ve 4 opakováních, průměrná hodnota IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$ a nM) a její směrodatná odchylka (SD; $\mu\text{g/ml}$).

	1. IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	2. IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	3. IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	4. IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Průměrná hodnota IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	SD ($\mu\text{g/ml}$)	IC_{50} (nM)
MTT	0,520	0,060	0,204	0,261	0,261	0,166	0,870
XTT	0,499	0,475	0,451	0,427	0,463	0,027	1,543

Stanovená konstanta IC_{50} XTT testem vykazuje menší směrodatnou odchylku oproti konstantě IC_{50} stanovené MTT testem. Proto byla pro další experimenty použita hodnota 1,54 nM určená XTT testem jako konstanta IC_{50} .

4.2 Stanovení času do apoptózy

Dle metodiky byly získány a vyhodnoceny data, ze kterých byl stanoven čas do apoptózy. Ten byl stanoven pro hodnoty IC_{50} (1,54 nM), $5x IC_{50}$ (7,70 nM) a $10x IC_{50}$ (15,40 nM) pomocí 4 opakování. Čas do apoptózy se stanovil odečtením 10% nárůstu poměru G/R v čase, což je graficky znázorněno na obr. 12. Hodnoty získané pro všechny koncentrace a opakování jsou shrnuty v tab. 4. Pro další experimenty bylo počítáno s koncentrací $5x IC_{50}$ (7,70 nM) a polovinou času do apoptózy tedy 5 hodinami a 22 minutami.



Obr. 12: Grafické znázornění nárůstu poměru G/R v čase. Modrou barvou je znázorněna kontrola s nejmenším nárůstem, šedou barvou je znázorněn nárůst poměru G/R u buněk ošetřených cisplatinou v koncentraci $5x IC_{50}$ (7,70 nM).

Tab. 4: Stanovené časy do apoptózy pro cisplatinu u buněčné linie CCRF-CEM pro koncentrace $1x IC_{50}$ (1,54 nM), $5x IC_{50}$ (7,70 nM) a $10x IC_{50}$ (15,40 nM) s jejich směrodatnými odchylkami (SD). Časy byly stanoveny ve 4 opakováních.

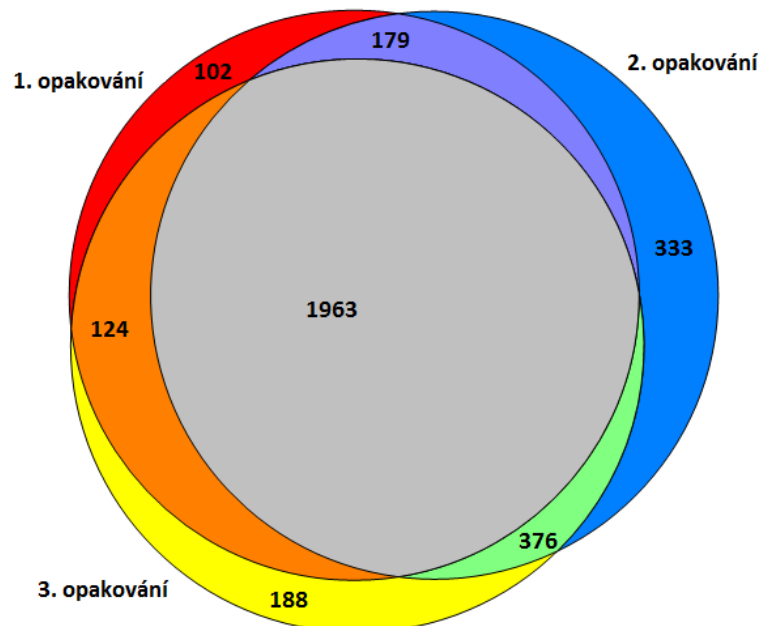
Cisplatin (nM)	1. ČdA (h)	2. ČdA (h)	3. ČdA (h)	4. ČdA (h)	Čas do apoptózy (h)	SD (h)	Polovina času do apoptózy (h)
1,54	23	26,5	25	17	22,88	3,61	11,44
7,70	8	14	11	10	10,75	2,17	5,37
15,40	7,5	10,5	8	6,5	8,13	1,47	4,07

4.3 Výsledky LC-MS analýzy

Data získaná LC-MS analýzou byla vyhledána a zpracována dle popsané metodiky. Data byla zpracovávána zvláště pro cisplatinou ošetřené lehké buňky a kontrolní těžké buňky a pro cisplatinou ošetřené těžké buňky a kontrolní lehké buňky. Programem Perseus byly zjištěny počty identifikovaných proteinů, kvantifikovaných proteinů a B signifikantně změněných proteinů. Tyto signifikantně změněné proteiny byly následně bioinformaticky zpracovány pomocí programů DAVID a STRING.

4.3.1 Počet identifikovaných proteinů v ošetřených lehkých buňkách

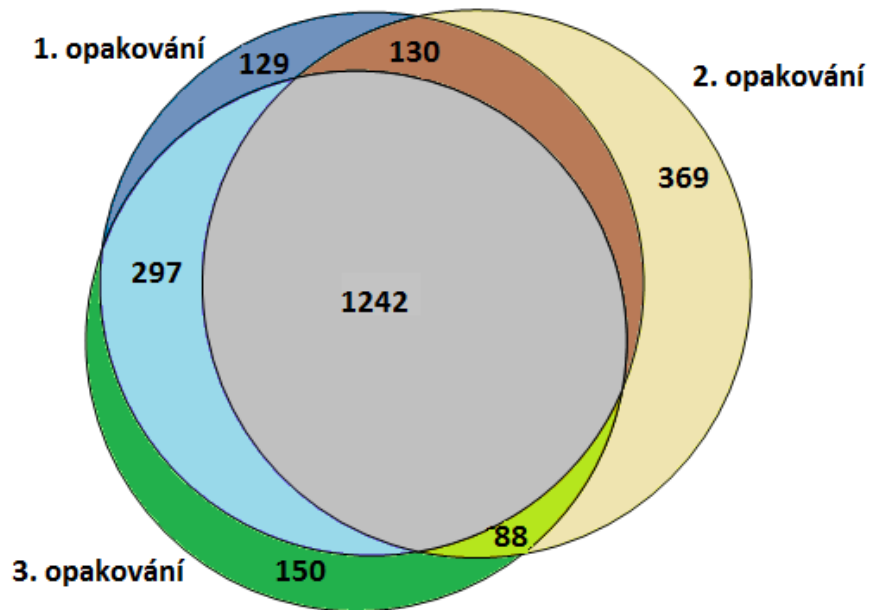
V prvním opakování bylo identifikováno 2620 proteinů, ve druhém opakování 2599 proteinů a ve třetím opakování 2651 proteinů. Společně bylo pro všechna tři opakování identifikováno 1963 proteinů. Počty identifikovaných proteinů v cisplatinou ošetřených lehkých buňkách jsou uvedeny na obr. 13.



Obr. 13: Počet identifikovaných proteinů v cisplatinou ošetřených lehkých buňkách pro opakování 1 – 3 znázorněný Vennovým diagramem.

4.3.2 Počet kvantifikovaných proteinů v ošetřených lehkých buňkách

V prvním opakování bylo kvantifikováno 1501 proteinů, ve druhém opakování 1829 proteinů a ve třetím opakování 1777 proteinů. Společně bylo pro všechna tři opakování kvantifikováno 1242 proteinů. Počty kvantifikovaných proteinů v cisplatinou ošetřených lehkých buňkách jsou uvedeny na obr. 14.



Obr. 14: Počet kvantifikovaných proteinů v cisplatinou ošetřených lehkých buňkách pro opakování 1 – 3 znázorněný Vennovým diagramem.

4.3.3 Počet B signifikantních proteinů v ošetřených lehkých buňkách

Bylo určeno 109 B signifikantně změněných proteinů v ošetřených lehkých buňkách. Jejich seznam s abecedním pořadím symbolů genů, názvy proteinů a poměry lehkých a těžkých značených proteinů (ošetřené : kontrola) a B signifikantním skóre jsou uvedeny v tab. 5.

Tab. 5: B Signifikantně změněné proteiny v ošetřených lehkých buňkách. V tabulce jsou uvedeny abecedně symboly genů, název proteinů, poměry proteinů z ošetřených buněk ke kontrole a skóre signifikance B. Zvýrazněno je skóre menší než 0,05, které značí signifikantní změnu.

Geny	Proteiny	Poměr lehké/těžké			Signifikance B skóre		
ACTG1	Actin, cytoplasmic 2	0,91	NaN	0,82	7,4E-02	1,0E+00	1,2E-07
ACTR2	Actin-related protein 2	0,95	0,79	0,87	3,2E-01	4,1E-12	1,1E-02
AHNAK	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	0,84	1,20	1,29	4,9E-04	3,1E-05	3,9E-14
AK2	Adenylate kinase 2, mitochondrial	0,99	0,76	1,02	7,2E-01	1,0E-16	7,6E-01
ANXA1	Annexin A1	1,09	1,23	1,29	3,8E-01	2,0E-06	1,3E-03
ARHGAP4	Rho GTPase-activating protein 4	NaN	1,30	NaN	1,0E+00	6,6E-04	1,0E+00
ARPP21	cAMP-regulated phosphoprotein 21	0,85	0,81	0,90	4,9E-03	4,8E-10	7,5E-03
ATF7	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-7	1,12	NaN	1,32	2,8E-01	1,0E+00	1,3E-07
ATP5C1	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	0,80	0,99	0,90	2,3E-04	6,9E-01	5,2E-02
B2M	Beta-2-microglobulin form pI 5.3	0,80	0,91	1,02	6,6E-05	3,5E-03	6,3E-01
BAG3	BAG family molecular chaperone regulator 3	0,96	0,86	0,88	3,6E-01	9,4E-06	8,1E-04
BOLA2	Bola-like protein 2	0,73	NaN	0,91	9,0E-05	1,0E+00	1,1E-02
C12orf57	Protein C10	0,76	0,99	0,91	1,3E-08	3,9E-01	1,4E-03
C1orf52	UPF0690 protein C1orf52	1,03	1,23	1,01	9,0E-01	1,5E-04	9,8E-01
CANX	Calnexin	1,06	0,99	1,48	6,7E-01	6,4E-01	4,0E-05
CAT	Catalase	0,88	1,08	1,35	3,9E-02	3,7E-01	1,9E-04
CCDC86	Coiled-coil domain-containing protein 86	1,06	1,18	1,10	3,6E-01	1,6E-04	4,6E-03
CCDC88B	Coiled-coil domain-containing protein 88B	NaN	0,82	NaN	1,0E+00	1,8E-06	1,0E+00
CEBPB	CCAAT/enhancer-binding protein beta	NaN	NaN	0,87	1,0E+00	1,0E+00	2,6E-04
CENPF	Centromere protein F	0,72	0,87	0,97	5,8E-12	2,4E-11	2,0E-01
CETN2	Centrin-2	0,98	0,75	1,10	5,8E-01	1,2E-12	6,0E-02
CETN3	Centrin-3	0,91	1,20	1,09	2,4E-01	7,2E-04	3,1E-01
CIRBP	Cold-inducible RNA-binding protein	1,30	1,01	0,98	3,0E-05	9,5E-01	4,3E-01
CLSPN	Claspin	1,17	1,13	1,23	1,1E-02	5,7E-03	6,2E-10
CREBBP	CREB-binding protein	1,10	1,34	0,94	4,8E-01	2,2E-04	2,7E-01
CSTB	Cystatin-B	0,99	1,17	1,04	7,5E-01	2,7E-04	3,4E-01

Tab. 5: pokračování

Geny	Proteiny	Poměr lehké/těžké			Signifikance B skóre		
DDX18	ATP-dependent RNA helicase DDX18	1,43	0,89	1,00	5,6E-04	1,1E-01	8,4E-01
DHPS	Deoxyhypusine synthase	NaN	0,42	NaN	1,0E+00	1,3E-194	1,0E+00
DKFZ	Myotrophin	0,98	1,30	1,02	5,7E-01	5,1E-09	8,6E-01
DLGAP5	Disks large-associated protein 5	0,98	0,82	0,89	5,7E-01	3,2E-09	1,9E-01
DNAJC17	DnaJ homolog subfamily C member 17	1,12	1,32	1,05	2,1E-01	3,4E-04	3,3E-01
EIF5B	Eukaryotic translation initiation factor 5B	1,25	0,99	0,92	3,8E-04	3,7E-01	4,0E-02
EMB	Embigin	1,14	0,76	0,93	2,2E-01	1,3E-04	4,5E-01
EPST11	Epithelial-stromal interaction protein 1	0,51	0,88	1,06	1,6E-23	8,3E-02	4,6E-01
FAM117A	Protein FAM117A	0,74	0,91	1,04	2,3E-04	2,1E-02	6,2E-01
FHL3	Four and a half LIM domains protein 3	0,73	NaN	0,97	8,8E-05	1,0E+00	5,6E-01
FOSL2	Fos-related antigen 2	1,47	1,03	0,98	1,7E-05	5,7E-01	6,2E-01
GAPD	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	NaN	NaN	0,59	1,0E+00	1,0E+00	1,8E-13
GLRX3	Glutaredoxin-3	1,34	1,39	1,14	2,2E-02	8,5E-09	8,6E-02
GLTSCR2	Glioma tumor suppressor candidate region gene 2 protein	0,81	0,97	NaN	1,6E-04	4,7E-01	1,0E+00
GMNN	Geminin	1,12	1,11	1,20	6,4E-02	6,0E-05	3,8E-08
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2	0,82	0,99	0,99	2,7E-04	6,5E-01	8,4E-01
GTSE1	G2 and S phase-expressed protein 1	0,76	0,87	0,97	1,0E-06	1,3E-03	4,9E-01
H1F0	Histone H1.0	1,01	0,77	0,85	8,9E-01	7,7E-11	3,1E-03
H1FX	Histone H1x	0,94	0,89	0,89	2,2E-01	6,8E-04	9,0E-05
HADH	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	0,69	1,02	NaN	1,2E-06	8,0E-01	1,0E+00
HCTP4	Targeting protein for Xklp2	0,83	0,90	0,98	1,5E-04	1,1E-07	4,4E-01
HELS103	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	0,79	1,06	1,10	1,5E-04	1,7E-01	2,2E-01
HGS	Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	1,84	1,06	1,00	2,1E-05	2,5E-01	1,0E+00

Tab. 5: Pokračování

Geny	Proteiny	Poměr lehké/těžké			Signifikance B skóre		
HHEX	Hematopoietically-expressed homeobox protein HHEX	0,72	NaN	NaN	2,3E-08	1,0E+00	1,0E+00
HIST1H1E	Histone H1.4	1,01	0,92	0,95	9,2E-01	1,3E-05	6,2E-02
HLA-A	HLA class I histocompatibility antigen, A-31 alpha chain	0,75	0,96	0,99	2,3E-07	1,6E-01	7,7E-01
HMGCS1	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	0,60	1,30	1,43	1,2E-19	2,3E-06	1,5E-04
ICT1	Peptidyl-tRNA hydrolase ICT1, mitochondrial	0,81	NaN	0,80	1,1E-04	1,0E+00	5,5E-10
IL16	Pro-interleukin-16	0,83	0,99	1,01	2,2E-04	4,7E-01	9,7E-01
JUN	Transcription factor AP-1	1,47	NaN	NaN	2,4E-04	1,0E+00	1,0E+00
KIAA0101	PCNA-associated factor	1,03	1,08	1,23	6,9E-01	6,5E-03	2,0E-10
LAT	Linker for activation of T-cells family member 1	NaN	1,33	1,09	1,0E+00	2,8E-04	2,5E-01
LGALS1	Galectin-1	1,00	1,12	1,01	8,3E-01	2,3E-05	9,2E-01
LRRC59	Leucine-rich repeat-containing protein 59	1,08	0,96	0,85	4,5E-01	3,7E-01	3,0E-05
MAGED2	Melanoma-associated antigen D2	NaN	1,04	0,79	1,0E+00	5,2E-01	9,8E-06
MARCKS	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	0,83	1,03	1,08	2,4E-04	4,3E-01	2,0E-02
MCAM	Cell surface glycoprotein MUC18	0,97	0,65	NaN	4,4E-01	1,3E-30	1,0E+00
MED1	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1	1,06	0,84	0,99	6,9E-01	2,3E-05	7,2E-01
MIER1	Mesoderm induction early response protein 1	NaN	0,64	0,98	1,0E+00	3,7E-12	6,0E-01
MKI67	Antigen KI-67	1,03	0,92	0,91	7,4E-01	1,7E-05	3,1E-03
MYL12A	Myosin regulatory light chain 12A	0,67	NaN	1,02	1,9E-07	1,0E+00	7,4E-01
MZT1	Mitotic-spindle organizing protein 1	NaN	NaN	0,76	1,0E+00	1,0E+00	1,0E-07
NCBP1	Nuclear cap-binding protein subunit 1	4,36	0,99	NaN	2,0E-13	7,4E-01	1,0E+00
NHP2L1	NHP2-like protein 1	1,06	0,91	1,00	3,7E-01	1,6E-06	6,7E-01

Tab. 5: pokračování

Geny	Proteiny	Poměr lehké/těžké			Signifikance B skóre		
NIT2	Omega-amidase NIT2	NaN	1,31	NaN	1,0E+00	6,0E-04	1,0E+00
NOL7	Nucleolar protein 7	1,09	0,86	0,96	3,7E-01	5,2E-06	3,1E-01
NUFIP2	Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 2	1,24	1,00	0,99	5,7E-04	8,1E-01	5,8E-01
NUSAP1	Nucleolar and spindle-associated protein 1	0,88	0,85	0,86	9,2E-03	9,2E-16	3,8E-05
ODF2	Outer dense fiber protein 2	0,78	0,93	1,00	9,3E-06	4,0E-02	9,3E-01
PDCD5	Programmed cell death protein 5	0,97	1,04	1,13	4,9E-01	4,2E-01	1,7E-04
PDLIM1	PDZ and LIM domain protein 1	1,06	1,17	1,46	7,1E-01	4,5E-02	8,0E-05
PHF2	Lysine-specific demethylase PHF2	1,05	NaN	0,64	7,5E-01	1,0E+00	1,2E-20
PIP4K2A	Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type-2 alpha	NaN	0,78	NaN	1,0E+00	4,2E-04	1,0E+00
POLR2K	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC4	0,88	NaN	0,73	1,1E-01	1,0E+00	9,6E-05
PPIB	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	1,10	1,18	1,05	2,7E-01	9,4E-05	3,2E-01
PRRC2B	Protein PRRC2B	1,33	0,98	0,91	8,4E-06	4,9E-01	1,7E-02
PSAP	Prosaposin;Saposin-A	0,82	1,02	1,04	6,6E-05	5,6E-01	3,8E-01
PTMS	Parathyrosin	0,84	NaN	0,89	5,4E-04	1,0E+00	1,6E-03
PTPRK	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa	1,80	NaN	0,96	3,2E-05	1,0E+00	6,4E-01
QKI	Protein quaking	NaN	1,32	NaN	1,0E+00	3,5E-04	1,0E+00
RBM22	Pre-mRNA-splicing factor RBM22	NaN	0,66	NaN	1,0E+00	7,8E-28	1,0E+00
RGPD1	RANBP2-like and GRIP domain-containing protein 1	NaN	NaN	0,69	1,0E+00	1,0E+00	1,5E-14
S100A11	Protein S100-A11	1,02	1,16	1,00	9,9E-01	5,6E-04	8,7E-01
SELH	Selenoprotein H	0,84	0,93	1,01	3,3E-04	3,7E-02	8,7E-01
SGTB	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein beta	NaN	1,54	NaN	1,0E+00	1,2E-07	1,0E+00
SOX4	Transcription factor SOX-4	1,44	0,98	0,93	4,7E-04	5,5E-01	1,7E-01
SPTAN1	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	0,59	0,99	0,97	1,1E-12	7,6E-01	7,3E-01

Tab. 5: pokračování

Geny	Proteiny	Poměr lehké/těžké			Signifikance B skóre		
SSRP1	FACT complex subunit SSRP1	1,30	1,03	1,27	2,5E-03	5,7E-01	5,7E-06
STOML2	Stomatin-like protein 2, mitochondrial	NaN	1,04	1,37	1,0E+00	4,5E-01	1,1E-04
SUGP2	SURP and G-patch domain-containing protein 2	NaN	1,51	NaN	1,0E+00	3,7E-07	1,0E+00
SZRD1	SUZ domain-containing protein 1	NaN	NaN	1,23	1,0E+00	1,0E+00	4,5E-05
TACC3	Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3	0,82	0,93	1,09	1,0E-04	3,9E-04	8,0E-03
TFRC	Transferrin receptor protein 1	1,29	1,08	1,08	6,4E-05	2,4E-03	1,0E-01
TOP2A	DNA topoisomerase 2-alpha	0,89	0,92	0,94	2,7E-02	3,7E-05	1,4E-01
TP53	Cellular tumor antigen p53	NaN	1,35	NaN	1,0E+00	1,5E-04	1,0E+00
TRAFD1	TRAF-type zinc finger domain-containing protein 1	0,90	0,76	1,01	7,9E-02	6,4E-12	8,8E-01
UBE2C	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C	0,82	0,85	0,95	3,1E-04	1,7E-06	2,2E-01
VAPB	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	NaN	0,84	NaN	1,0E+00	3,6E-05	1,0E+00
VARS	Valine--tRNA ligase	0,92	0,89	NaN	2,5E-01	6,3E-04	1,0E+00
ZFAND5	AN1-type zinc finger protein 5	1,37	1,11	1,09	2,8E-04	2,1E-02	8,0E-02
ZMAT3	Zinc finger matrin-type protein 3	0,83	0,93	0,78	6,6E-04	2,6E-01	3,2E-06
ZNF124	Zinc finger protein 124	0,58	NaN	NaN	6,9E-14	1,0E+00	1,0E+00

4.3.4 Vyhodnocení pomocí bioinformatických programů

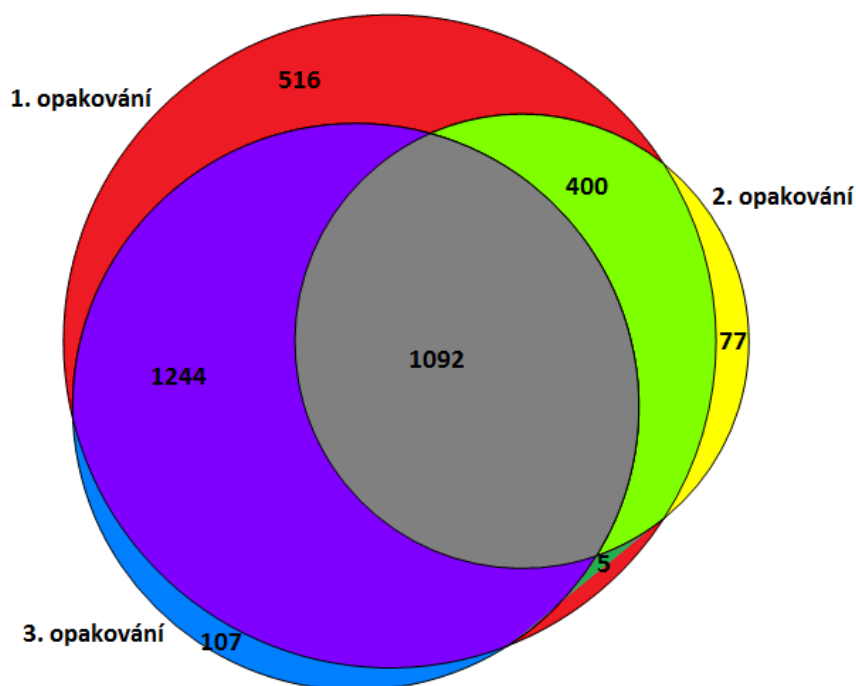
Signifikantně změněné proteiny v cisplatinou ošetřených lehkých buňkách byly vyhodnoceny pomocí programů DAVID (tab. 6) a STRING (obr. 15). Data vyhodnocená programem DAVID ukázala, že cisplatina ovlivňuje buněčné procesy související s lumenem buněčných organel, cytoskeletem a buněčným cyklem. Program STRING vyhodnocuje protein-proteinové interakce, v tomto případě byly nejvíce zastoupeny interakce mezi proteiny p53, jun, fos related antigen 2 a SOX4.

Tab. 6: Buněčné procesy zapojené do odpovědi na ošetření cisplatinou na základě experimentu s ošetřenou lehkou buněčnou linií vyhodnocené programem DAVID.

Skóre: 6,291		
Název klastru	Počet	P hodnota
membrane-enclosed lumen	33	8,90E-10
intracellular organelle lumen	31	6,91E-09
organelle lumen	31	1,19E-08
nuclear lumen	26	1,45E-07
nucleolus	13	4,79E-04
nucleoplasm	13	3,56E-03
Skóre: 6,118		
Název klastru	Počet	P hodnota
non-membrane-bounded organelle	37	1,77E-08
intracellular non-membrane-bounded organelle	37	1,77E-08
cytoskeleton	18	1,41E-03
Skóre: 2,177		
Název klastru	Počet	P hodnota
cytoskeleton	12	3,91E-04
centriole	4	6,88E-04
cytoskeleton	18	1,41E-03
microtubule organizing center part	4	3,84E-03
cytoskeletal part	13	6,53E-03
centrosome	6	8,54E-03
Skóre: 2,156		
Název klastru	Počet	P hodnota
regulation of cell cycle	10	7,69E-05
cell cycle	14	2,66E-04
cytoskeleton	12	3,91E-04
cell cycle	10	5,76E-04
regulation of mitotic cell cycle	6	1,45E-03
cell cycle phase	9	1,85E-03

4.3.5 Počet identifikovaných proteinů v ošetřených těžkých buňkách

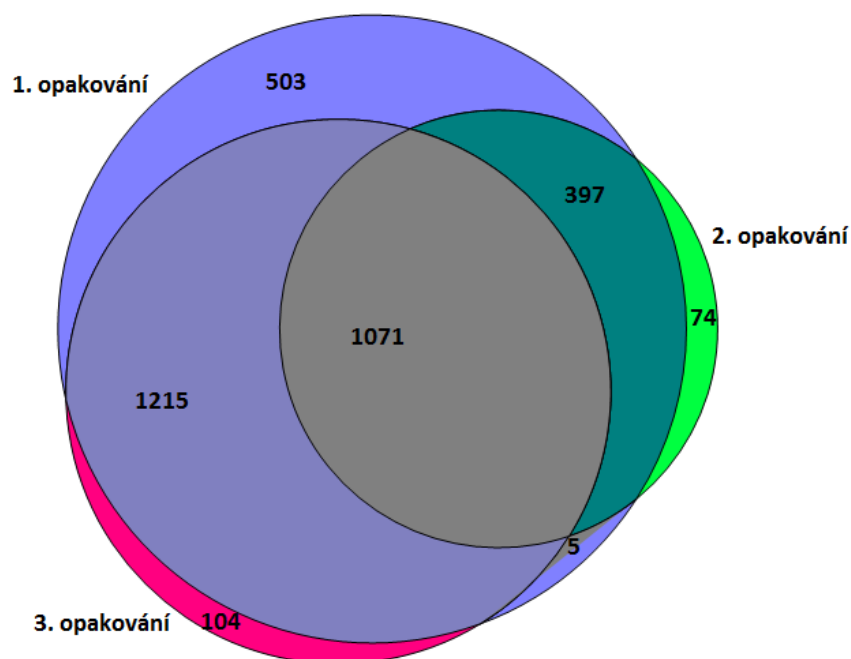
V prvním opakování bylo identifikováno 3252 proteinů, ve druhém opakování 1574 proteinů a ve třetím opakování 2448 proteinů. Společně bylo pro všechna tři opakování identifikováno 1092 proteinů. Počty identifikovaných proteinů v cisplatinou ošetřených těžkých buňkách jsou uvedeny na obr. 16.



Obr. 16: Počet identifikovaných proteinů v cisplatinou ošetřených těžkých buňkách pro opakování 1 – 3 znázorněný Vennovým diagramem.

4.3.6 Počet kvantifikovaných proteinů v ošetřených těžkých buňkách

V prvním opakování bylo kvantifikováno 3186 proteinů, ve druhém opakování 1547 proteinů a ve třetím opakování 2395 proteinů. Společně bylo pro všechna tři opakování kvantifikováno 1071 proteinů. Počty kvantifikovaných proteinů v cisplatinou ošetřených těžkých buňkách jsou uvedeny na obr. 17.



Obr. 17: Počet kvantifikovaných proteinů v cisplatinou ošetřených těžkých buňkách pro opakování 1 – 3 znázorněny Vennovým diagramem.

4.3.7 Počet B signifikantních proteinů v ošetřených těžkých buňkách

Bylo určeno 96 B signifikantně změněných proteinů v cisplatinou ošetřených těžkých buňkách. Jejich seznam se jmény proteinů, genů a poměry těžkých a lehkých proteinů (ošetřené : kontrola) a B signifikantním skóre jsou uvedeny v tab. 7.

Tab. 7: B Signifikantně změněné proteiny v ošetřených těžkých buňkách. V tabulce jsou uvedeny abecedně symboly genů, název proteinů, poměry proteinů z ošetřených buněk ke kontrole a skóre signifikance B. Zvýrazněno je skóre menší než 0,05, které značí signifikantní změnu.

Geny	Proteiny	Poměr těžké/lehké			Signifikance B skóre		
ABHD10	Mycophenolic acid acyl-glucuronide esterase, mitochondrial	1,27	NaN	NaN	4,8E-08	1,0E+00	1,0E+00
ACO2	Aconitate hydratase, mitochondrial	1,23	1,03	NaN	1,3E-06	6,6E-01	1,0E+00
ACTG1	Actin, cytoplasmic 2	0,86	NaN	NaN	1,4E-07	1,0E+00	1,0E+00
AHNAK	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	0,86	0,97	0,77	2,7E-07	7,4E-01	2,4E-12
AKIRIN2	Akirin-2	NaN	NaN	1,25	1,0E+00	1,0E+00	3,5E-04
ANKRD17	Ankyrin repeat domain-containing protein 17	1,30	NaN	NaN	1,3E-04	1,0E+00	1,0E+00
ANXA1	Annexin	0,79	0,89	0,83	2,4E-07	2,2E-01	2,8E-02
ANXA2	Annexin A2	0,95	0,69	0,92	3,1E-01	4,9E-06	3,2E-01
ATF7	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-7	0,74	NaN	0,73	1,5E-03	1,0E+00	2,0E-07
ATP5D	ATP synthase subunit delta, mitochondrial	0,91	1,03	0,84	2,6E-03	6,7E-01	3,8E-06
BRD2	Bromodomain-containing protein 2	1,07	NaN	1,26	1,1E-01	1,0E+00	9,7E-08
BST2	Bone marrow stromal antigen 2	1,34	NaN	NaN	1,4E-05	1,0E+00	1,0E+00
C10orf28	Coiled-coil domain-containing protein R3HCC1L	0,65	NaN	0,94	2,2E-05	1,0E+00	4,8E-01
C12orf57	Protein C10	1,06	NaN	1,11	8,9E-03	1,0E+00	3,6E-04
C1orf50	Uncharacterized protein C1orf50	1,28	NaN	NaN	7,3E-09	1,0E+00	1,0E+00
CAB39	Calcium-binding protein 39	1,05	1,21	NaN	5,3E-01	2,4E-05	1,0E+00
CAT	Catalase	1,01	0,64	NaN	4,6E-01	2,0E-05	1,0E+00
CCDC23	Coiled-coil domain-containing protein 23	NaN	NaN	1,27	1,0E+00	1,0E+00	1,2E-04
CCDC86	Coiled-coil domain-containing protein 86	0,90	0,87	0,88	6,3E-04	1,3E-01	3,3E-04
CCNT1	Cyclin-T1	1,10	NaN	1,05	9,4E-05	1,0E+00	6,9E-02
CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	1,22	NaN	1,36	5,6E-06	1,0E+00	1,4E-12

Tab. 7: pokračování

Geny	Proteiny	Poměr těžké/lehké			Signifikance B skóre		
CLSPN	Claspin	1,10	1,00	0,94	5,4E-05	9,3E-01	8,2E-02
CNPY4	Protein canopy homolog 4	1,91	NaN	0,96	1,3E-30	1,0E+00	6,3E-01
COX17	Cytochrome c oxidase copper chaperone	1,17	NaN	1,09	2,8E-04	1,0E+00	3,9E-02
CRYZ	Quinone oxidoreductase	0,74	NaN	NaN	1,5E-06	1,0E+00	1,0E+00
CYC1	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	1,31	NaN	NaN	6,5E-05	1,0E+00	1,0E+00
DKFZp686L20222	Cyclin-dependent kinase 1	0,72	0,98	NaN	7,7E-04	1,0E+00	1,0E+00
DKFZp762G2015	Calcineurin-binding protein cabin-1	NaN	NaN	1,27	1,0E+00	1,0E+00	1,7E-04
EAPP	E2F-associated phosphoprotein	NaN	NaN	1,30	1,0E+00	1,0E+00	2,7E-05
EIF4G2	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2	1,08	1,48	NaN	3,1E-01	1,1E-08	1,0E+00
ERAP2	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 2	0,65	0,95	NaN	1,6E-05	5,7E-01	1,0E+00
ERGIC1	Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 1	1,05	1,23	NaN	5,0E-01	3,6E-06	1,0E+00
FAM168B	Myelin-associated neurite-outgrowth inhibitor	1,13	NaN	1,19	5,8E-03	1,0E+00	4,3E-05
FERMT3	Fermitin family homolog 3	1,22	1,08	NaN	3,3E-06	7,2E-02	1,0E+00
FOSL2	Fos-related antigen 2	1,21	NaN	1,25	6,0E-11	1,0E+00	2,8E-07
GKAP1	G kinase-anchoring protein 1	1,04	NaN	1,42	5,9E-01	1,0E+00	5,2E-09
GLRX3	Glutaredoxin-3	1,21	NaN	NaN	2,0E-05	1,0E+00	1,0E+00
GLTSCR2	Glioma tumor suppressor candidate region gene 2 protein	0,85	NaN	NaN	2,6E-04	1,0E+00	1,0E+00
GMNN	Geminin	1,13	NaN	0,10	3,5E-07	1,0E+00	7,9E-01

Tab. 7: pokračování

Geny	Proteiny	Poměr těžké/lehké			Signifikance B skóre		
GNAS	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short	1,01	0,98	1,26	6,5E-01	9,4E-01	2,3E-04
GOLGA8N	Golgin subfamily A member 8N	0,85	NaN	0,81	7,8E-02	1,0E+00	3,0E-04
GTF2B	Transcription initiation factor IIB	1,14	1,35	NaN	6,8E-02	3,1E-05	1,0E+00
GTF2E1	General transcription factor IIE subunit 1	0,44	NaN	NaN	7,3E-12	1,0E+00	1,0E+00
H1FO	Histone H1.0	1,18	NaN	1,14	1,2E-04	1,0E+00	3,9E-02
HBLD2	Iron-sulfur cluster assembly 1 homolog, mitochondrial	0,69	NaN	0,90	4,9E-09	1,0E+00	6,9E-02
hCG_23833	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2	1,26	1,00	NaN	8,2E-08	9,7E-01	1,0E+00
HEL-S-103	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	1,05	1,47	0,84	2,2E-01	1,7E-08	3,1E-02
HLA-A	HLA class I histocompatibility antigen, A-31 alpha chain	1,06	1,44	0,94	3,7E-02	1,4E-17	3,7E-01
HLA-B	HLA class I histocompatibility antigen, B-81 alpha chain	NaN	1,61	NaN	1,0E+00	2,2E-13	1,0E+00
HMGCS1	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	0,78	NaN	NaN	4,8E-05	1,0E+00	1,0E+00
CHAF1A	Chromatin assembly factor 1 subunit A	1,12	1,33	1,03	9,0E-03	8,4E-05	4,2E-01
JUNB	Transcription factor jun-B	1,36	NaN	1,24	1,4E-13	1,0E+00	5,2E-04
KIFC1	Kinesin-like protein KIFC1	1,07	1,06	0,78	1,9E-02	4,5E-01	1,3E-05
KLC2	Kinesin light chain 2	1,32	NaN	NaN	4,4E-05	1,0E+00	1,0E+00
KLC4	Kinesin light chain 4	NaN	NaN	1,26	1,0E+00	1,0E+00	2,3E-04
KNSTRN	Small kinetochore-associated protein	0,80	NaN	0,90	2,7E-04	1,0E+00	9,7E-02
KRAS	GTPase KRas	1,01	0,69	0,98	4,2E-01	4,3E-06	7,8E-01

Tab. 7: pokračování

Geny	Proteiny	Poměr těžké/lehké			Signifikance B skóre		
LAMP2	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	0,65	NaN	0,96	4,4E-18	1,0E+00	4,3E-01
LEF1	Lymphoid enhancer-binding factor 1	1,11	NaN	NaN	4,9E-04	1,0E+00	1,0E+00
LGALS1	Galectin-1	0,85	1,01	0,96	2,0E-08	6,3E-01	3,8E-01
LMAN1	Protein ERGIC-53	1,02	1,32	NaN	5,1E-01	1,3E-04	1,0E+00
MACF1	Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5	0,98	0,91	0,80	8,4E-01	3,1E-01	2,3E-04
MAP1A	Microtubule-associated protein 1A	1,09	NaN	1,06	4,5E-04	1,0E+00	3,6E-02
MAPK1IP1L	MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein-like	1,18	NaN	1,12	2,4E-12	1,0E+00	9,1E-03
MED28	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 28	0,79	NaN	0,94	8,8E-05	1,0E+00	3,2E-01
NACAP1	Putative nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein	0,67	NaN	0,92	5,0E-05	1,0E+00	3,2E-01
NAF1	TNFAIP3-interacting protein 1	0,85	NaN	0,91	2,6E-04	1,0E+00	1,2E-01
NCBP1	Nuclear cap-binding protein subunit 1	0,28	NaN	NaN	1,2E-46	1,0E+00	1,0E+00
NNT	NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial	0,64	0,84	NaN	9,2E-06	7,1E-02	1,0E+00
NOL8	Nucleolar protein 8	1,00	NaN	1,3	9,0E-01	1,0E+00	1,9E-04
PCBD2	Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase 2	0,83	NaN	0,99	7,2E-05	1,0E+00	9,9E-01
PDLIM1	PDZ and LIM domain protein 1	0,67	NaN	NaN	5,6E-05	1,0E+00	1,0E+00
POF1B	Protein POF1B	1,27	NaN	1,00	4,6E-04	1,0E+00	9,6E-01
POMP	Proteasome maturation protein	1,04	NaN	1,19	5,9E-01	1,0E+00	7,9E-05
PPIB	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	0,84	0,99	0,91	1,4E-04	9,6E-01	1,2E-01

Tab. 7: pokračování

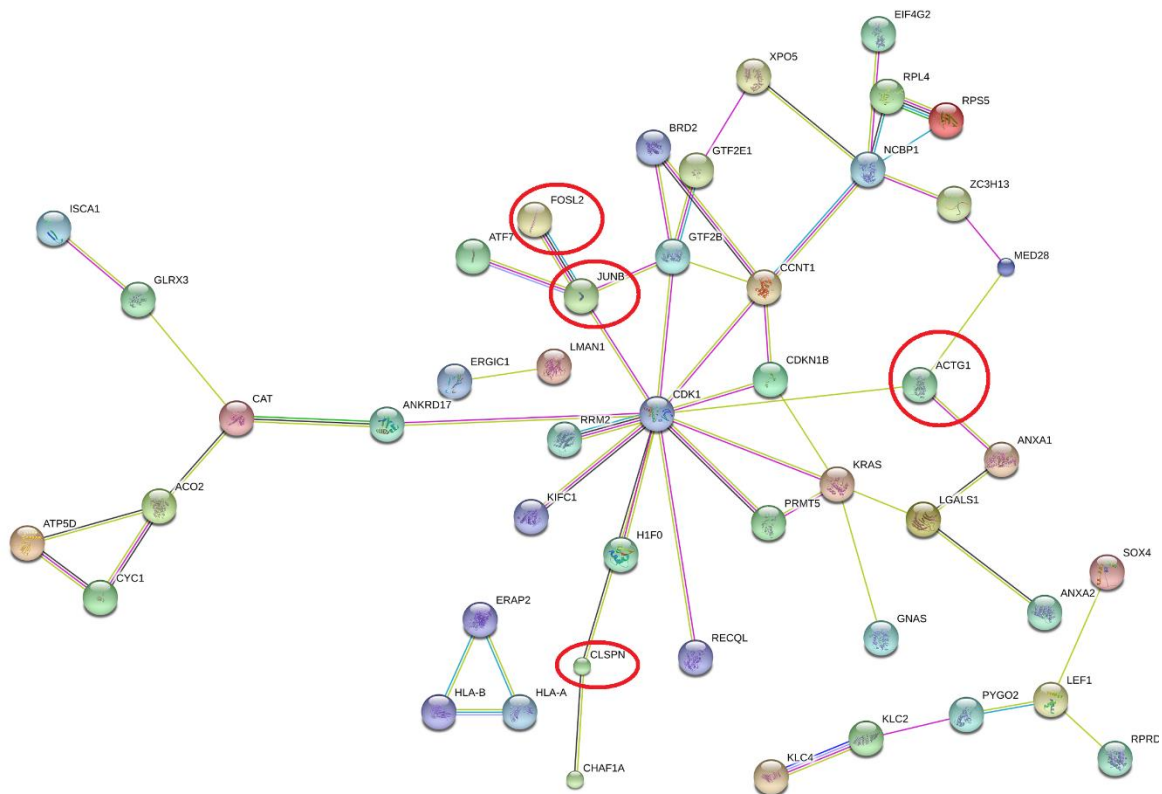
Geny	Proteiny	Poměr těžké/lehké			Signifikance B skóre		
PPP2R5E	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit epsilon isoform	0,70	NaN	NaN	2,8E-04	1,0E+00	1,0E+00
PRMT5	Protein arginine N-methyltransferase 5	1,00	0,47	NaN	8,4E-01	9,2E-16	1,0E+00
PSAP	Prosaposin	1,09	1,22	0,97	4,8E-01	9,8E-06	5,8E-01
PTMS	Parathyrosin	1,10	NaN	1,08	3,0E-05	1,0E+00	1,2E-02
PYGO2	Pygopus homolog 2	1,12	NaN	1,04	1,1E-04	1,0E+00	2,8E-01
RBM4	RNA-binding protein 4	1,09	NaN	1,06	2,6E-04	1,0E+00	4,6E-02
RBM4B	Serine/threonine-protein kinase MST4	1,35	1,07	NaN	9,8E-13	3,5E-01	1,0E+00
RECQL	ATP-dependent DNA helicase Q1	0,68	NaN	NaN	8,4E-05	1,0E+00	1,0E+00
RPL4	60S ribosomal protein L4	0,97	0,91	0,71	3,4E-01	3,1E-01	1,2E-08
RPRD1A	Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 1A	0,96	NaN	1,27	6,6E-01	1,0E+00	1,1E-04
RPS5	40S ribosomal protein S5	0,79	NaN	NaN	8,2E-05	1,0E+00	1,0E+00
SAMSN1	SAM domain-containing protein SAMSN-1	0,88	NaN	0,90	2,8E-05	1,0E+00	7,5E-02
SMIM24	Small integral membrane protein 24	0,88	NaN	NaN	1,2E-05	1,0E+00	1,0E+00
SOX4	Transcription factor SOX-4	NaN	NaN	1,20	1,0E+00	1,0E+00	2,3E-05
UBE2N	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	0,96	NaN	0,76	4,3E-01	1,0E+00	3,8E-06
UBE2T	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 T	0,58	NaN	NaN	4,7E-15	1,0E+00	1,0E+00
XPO5	Exportin-5	1,28	0,89	NaN	3,6E-04	2,3E-01	1,0E+00
ZC3H13	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	0,95	NaN	1,42	2,7E-01	1,0E+00	9,8E-18
ZFAND5	AN1-type zinc finger protein 5	1,21	NaN	1,24	7,8E-11	1,0E+00	1,2E-12
ZWINT	ZW10 interactor	0,67	NaN	0,95	4,5E-05	1,0E+00	5,3E-01

4.3.8 Vyhodnocení pomocí bioinformatických programů

Signifikantně změněné proteiny byly vyhodnoceny pomocí bioinformatických programů DAVID (tab. 8) a STRING (obr. 18). Data vyhodnocená programem DAVID ukázala, že cisplatina ovlivňuje buněčné procesy související se lumenem organel, cytoskeletem a poškozením DNA. Program STRING vyhodnocuje protein-proteinové interakce, v tomto případě byly nejvíce zastoupeny interakce mezi proteiny regulující buněčný cyklus.

Tab. 8: Buněčné procesy zapojené do odpovědi na ošetření cisplatinou na základě experimentu s ošetřenou těžkou buněčnou linií.

skóre: 2,151		
Název klastru	Počet	P hodnota
membrane-enclosed lumen	22	7,89E-05
nucleolus	8	4,76E-02
intracellular organelle lumen	20	4,22E-04
organelle lumen	20	5,64E-04
nuclear lumen	15	7,29E-03
nucleoplasm	10	2,32E-02
skóre: 1,660		
Název klastru	Počet	P Hodnota
non-membrane-bounded organelle	22	7,06E-03
intracellular non-membrane-bounded organelle	22	7,06E-03
cytoskeleton	10	2,09E-01
skóre: 1,592		
Název klastru	Počet	P hodnota
regulation of microtubule polymerization or depolymerization	3	9,66E-03
regulation of microtubule cytoskeleton organization	3	1,73E-02
regulation of organelle organization	5	2,04E-02
regulation of microtubule-based process	3	2,31E-02
regulation of cytoskeleton organization	3	1,39E-01
skóre: 1,435		
Název klastru	Počet	P hodnota
DNA metabolic process	8	1,05E-02
DNA repair	6	1,17E-02
DNA replication	5	1,31E-02
response to DNA damage stimulus	6	3,33E-02
cellular response to stress	7	5,39E-02
dna repair	4	5,42E-02



Obr. 18: Signifikantně změněné proteiny v cisplatinou ošetřených těžkých buňkách vyhodnocené programem STRING. Označey jsou proteiny se signifikantní změnou i v obráceném experimentu, protein claspin, actin 1, fos related antigen 2 a jun.

5 Diskuze

Mechanismem působení cisplatiny je vznik elektrofilních komplexů po vstupu do buňky. Tyto cisplatinové elektrofilní komplexy poté vyhledávají nukleofilní místa, jakými jsou DNA oblasti bohaté na puriny, ale také proteiny obsahující thioskupiny, např. cytoskeletální proteiny (Dasari a Tchounwou, 2014). Program DAVID vyhodnotil cytoskeletální buněčné procesy jako nejvíce zastoupené u signifikantně změněných proteinů. Těchto procesů se účastní mj. i protein gama aktin (actin, cytoplasmatic 2), který byl down regulován v cisplatinou ošetřených lehkých i těžkých buňkách. Dalšími z cytoskeletálních proteinů s down regulací detekovanou v těžkých buňkách byly actin related protein, nucleolar and spindle associated protein a outer dense fiber protein. V těžkých buňkách byla pozorována up regulace proteinu kinesin light chain.

Aktiny jsou rodina vysoce konzervovaných cytoskeletálních proteinů. U obratlovců se vyskytuje šest isoform aktinů, čtyři se nachází v příčně pruhovaném a hladkém svalstvu a dvě jsou cytoplasmatické isoformy beta a gama aktinů. Cytoplasmatické formy aktinu jsou přítomné ve všech tkáních a jsou nezbytné pro buněčné přežití (Dugina, 2009). Nízká koncentrace gama aktinu potlačuje dynamiku interfázních mikrotubulů a urychluje jejich zkracování. Také zvyšuje výskyt mikrotubulární katastrofy, a tím způsobuje zastavení buněčného cyklu. Knockdown gama aktinu způsobuje zpomalení mitózy, částečně blokuje přechod z metafáze do anafáze a inhibuje proliferaci buněk (Pouha a kolektiv, 2013). Cisplatinou indukované změny na cytoskeletu byly prokázány na modelové buněčné linii A549 odvozené od karcinomu plic (Szczepanski a kolektiv, 2010). Gama aktin je také důležitý pro normální funkci sluchu, výskyt jeho mutantní formy byl spojen se ztrátou sluchu (Drummond a kolektiv, 2011). Je známo, že u pacientů léčených cisplatinou dochází k poškození sluchu (Hill, Morest a Parham, 2008), což může být způsobeno down regulací gama aktinu cisplatinou.

Další z buněčných procesů, na který má cisplatin vliv dle výsledků této práce, jsou regulace buněčného cyklu a odpověď na poškození DNA (DDR). Byla pozorována up regulace proteinů claspinu, gemininu, fos related antigenu 2, jun, SOX4 a zinc finger protein 5 v obou experimentech (s lehkými i těžkými ošetřenými buňkami). V lehkých ošetřených buňkách byla

detekována down regulace proteinu UBE2C, v těžkých ošetřených buňkách byla detekována down regulace proteinů UBE2N a UBE2T.

Claspin se zapojuje do DDR dráhy ATR - Chk1 kináz, která způsobuje aktivaci kontrolního bodu, a tím vede k zastavení buněčného cyklu. V této dráze funguje claspin jako adaptorový protein, jehož funkcí je zajištění interakce ATR a Chk1 (Freire a kolektiv, 2006). Geminin je inhibitor Cdt1 replikačního faktoru. Množství gemininu v buňce se během buněčného cyklu mění, v M1 fázi je tento protein degradován, postupně potom opět narůstá jeho koncentrace. Jeho degradace v M1 fázi je nutná pro vznik prereplikačních počátků, a tím je zajištěna replikace v S fázi (Ballabeni a kolektiv, 2013). Doposud nebyla publikována žádná studie týkající se přímého vlivu cisplatinu na tyto proteiny, ale vzhledem k jejich funkci lze předpokládat jejich zapojení do odpovědi na působení cisplatinu.

V lehkých i těžkých ošetřených buňkách byla prokázána up regulace proteinů fos-related antigen 2, jun a jun b. Tyto proteiny společně tvoří transkripční faktor AP-1, který reguluje buněčnou odpověď na různé stimuly včetně stresu. Byla pozorována signifikantní up regulace proteinu jun, s níž je spojena indukce cytotoxicity po ošetření buněčné linie APL cisplatinou. V experimentu na buněčné linii APL byla prokázána i aktivace proteinu p53, která vede k zastavení buněčného cyklu (Kumar a Tchounwou, 2015). Up regulace proteinu p53 byla pozorována v experimentu s lehkými ošetřenými buňkami v této diplomové práci. Pro prokázání je potřeba opakování experimentu s těžkými ošetřenými buňkami a detekovat up regulaci proteinu p53 i v nich. Výsledky této diplomové práce prokázaly up regulaci proteinu SOX4 v lehkých i těžkých ošetřených buňkách. Indukce SOX4, senzoru DNA poškození, je důležitá pro stabilizaci a aktivaci proteinu p53. Bylo prokázáno, že SOX4 zvyšuje acetylaci p53, a tím se stává klíčovým proteinem v zastavení buněčného cyklu a spuštění apoptózy pomocí p53 (Pan a kolektiv, 2009).

Byla prokázána up regulace proteinu Zinc finger 5 v těžkých i lehkých ošetřených buňkách. Zinc finger 5 protein je zapojený do degradace proteinů přes ubikvitin-proteazom systém. Jeho přesná funkce je doposud neznámá, nicméně byl prokázán inhibiční vliv na NFκB a také zapojení do vzniku atrofie kosterních svalů (Enesa a Evans, 2014).

Ubikvitin konjugující enzymy jsou nezbytné pro navazování ubikvitinových řetězců na cílové proteiny. Protein UBE2C je nezbytný

v průběhu navazování ubikvitinových řetězců na substráty anafáze podporujícího komplexu, jehož funkcí je rozestup chromozomů do dceřiných buněk během přechodu z metafáze do anafáze (Jin a kolektiv, 2008). Protein UBE2C má funkci ubikvitinovat chromatinové oblasti s poškozením DNA, a tím vytvořit místo pro faktory DNA opravy (Thorslund a kolektiv, 2015). Protein UBE2T se účastní DNA opravy, jeho overexprese ale byla spojena s onkogenním vlivem především v podobě inhibice BRCA1 (Wen a kolektiv, 2015). Přestože nebyla doposud publikována žádná studie o vlivu cisplatinu na tyto proteiny, vzhledem k jejich funkci je možná spojitost s mechanismem působení cisplatinu. Pro potvrzení jejich down regulace u cisplatinou ošetřených buněk je potřeba provést kontrolní měření a validaci ortogonální metodou.

V lehkých i těžkých ošetřených buňkách byla detekována up regulace proteinu c1orf52 a down regulace proteinu p60 (glioma tumor suppressor candidate region gene 2 protein). Oba patří do skupiny RNA-vázajících proteinů, které se vyskytují v jadérku (Castello a kolektiv, 2015). Jejich přesná funkce nebyla prozatím objasněna, ale je prokázáno, že se jadérko účastní kromě syntézy ribozomů i procesů regulace buněčného cyklu a odpovědi na buněčný stres, jako je poškození DNA, pomocí drah závislých na aktivaci p53, regulace mTOR a inhibice syntézy ribozomů (Stępiński a kolektiv, 2016).

Výsledky diplomové práce dále ukázaly, že cisplatinu může způsobovat oxidativní stres. Byla prokázána up regulace glutaredoxinu-3 v obou experimentech (s lehkými i těžkými ošetřenými buňkami). Glutaredoxin-3 je nezbytný pro udržení redoxní rovnováhy, jeho overexprese je součástí kompenzačních mechanismů při vystavení buněk oxidativnímu stresu (Pham a kolektiv, 2015). Jedním z mechanismů působení cisplatinu je vyvolání oxidativního stresu, a tím dochází k poškození DNA a ke spuštění apoptózy (Dasari a Tchounwou, 2014).

V rámci této diplomové práce byly v důsledku působení cisplatinu zjištěny cytoskeletální změny, změny v regulaci buněčného cyklu, odpovědi na poškození DNA a oxidativní stres. Některé výsledky je potřeba potvrdit kontrolními měřeními, všechny výsledky je pro potvrzení potřeba validovat ortogonálními metodami.

6 Závěr

V teoretické části byla vypracována literární rešerše zabývající se především doposud publikovanými poznatky o molekulárních mechanismech působení cisplatin, cytotoxicitě cisplatin a rezistenci buněk na cisplatinu. Také byl vypracován úvod do proteomických metod a přístupů použitých v experimentální části.

V experimentální část byla pro buněčnou linii CCRF-CEM stanovena konstanta IC_{50} pomocí MTT a XTT testů. Získaná hodnota byla dále využita pro stanovení času do apoptózy u této buněčné linie, z něhož byla odvozena doba působení cisplatin pro ošetření. Byly kultivovány SILAC značené CCRF-CEM buněčné linie, které byly poté ošetřeny cisplatinou. Ošetřené buňky byly lyzovány a zpracovány metodami FASP a SAX. Po provedení LC-MS analýzy byla získaná data vyhledána programem MaxQuant pomocí algoritmu Andromeda. Dále byla data zpracována pomocí programů Perseus, DAVID a STRING. Tímto byly získány signifikantně změněné proteiny, které tvoří proteomický profil buněčné linie CCRF-CEM ošetřené cisplatinou. Dále byly určeny proteiny s největší signifikancí v obou SILAC značených liniích, a to gama aktin, actin related protein, claspin, geminin, proteiny tvořící AP-1, SOX4, zinc finger 5, UBE2C, UBE2N, UBE2T, c1orf52, p60 a glutaredoxin-3. Tyto proteiny byly porovnány s doposud publikovanými poznatky o jejich funkci a spojení s cisplatinou.

Cílem diplomové práce bylo vypracování literární rešerše a sestavení proteomického profilu buněčné linie CCRF-CEM ošetřené cisplatinou. Stanovené cíle práce byly splněny.

V práci se bude pokračovat validací výsledků. Signifikantně změněné proteiny je nutno potvrdit vhodnou ortogonální metodou. Možné je například použití metody Western blot pro analýzu proteinů v ošetřených buňkách, případně použití mikroskopických metod.

Seznam zkratek

5-FU – 5-fluorouracil

AA - Octová kyselina

ABC- ATP-binding cassette, ATP-vázající proteiny

ACN - Acetonitril

CTR1 – transportér mědi 1

CYP450 – cytochrom P450

DDR – DNA damage response, odpověď na poškození DNA

DMSO - dimethylsulfoxid

DTT - dithiothreitol

EGFR – epidermal growth factor receptor

ESI – electrospray ionization, ionizace elektrosprejem

FA - mravenčí kyselina

FASP – filter aided sample preparation

FCS - hovězí fetální sérum

FCSd - hovězí fetální sérum dialyzované

FGFR – fibroblast growth factor receptor

GFP – green fluorescein protein, zelený fluorescenční protein

HPLC – high pressure liquid chromatography, chromatografie za vysokého tlaku

IAA - iodacetamid

IGFR – insuline-like growth factor receptor

JNK – c-jun-N-terminální kinázy

LC – liquid chromatography, kapalinová chromatografie

LC-MS – liquid chromatography – mass spectrometry, kapalinová chromatografie – hmotnostní spektrometrie

MALDI - matrix-assisted laser desorption/ionization, ionizace laserem za účasti matrice

MAPK – mitogenem aktivované proteinkinázy

mRNA – mediátorová RNA

MS – mass spectrometry, hmotnostní spektrometrie

mTOR – mammalian target of rapamycin, savčí cíl rapamycinu

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

PMS - fenazin methyl sulfát

PMSF - fenylmethylsulfonyl fluorid

RFP – red fluorescein protein, červený fluorescenční protein

ROS – reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku

rRNA – ribozomální RNA

SAX – strong anion exchange

SDS - dodecylsulfát sodný

SILAC – stable isotope labeling with amino acids in cell culture

SLC – solute carrier

TFA - trifluoroctová

UA - močovina

VEGFR – vascular endothelial growth factor receptor

XTT - 2,3bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxy anilid

Seznam citací

- Albers P., Albrecht W., Algaba F., Bokemeyer C., Cohn-Cedermark G., Fizazi K., Horwich A. (2011) EAU guidelines on testicular cancer: 2011 update. *Eur. Urol.* **60**, 304-319
- Amable L. (2016) Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. *Pharmacol. Res.* **106**, 27-36
- Arcaro A. (2015) Targeted therapies for small cell lung cancer: where do we stand? *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* **95**, 154-164
- Ballabeni A., Zamponi R., Moore J.K., Helin K., Kirschne M.W. (2013) Geminin deploys multiple mechanisms to regulate Cdt1 before cell division thus ensuring the proper execution of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **110**, E2848-E2853
- Bao Q., Shi Y. (2007) Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ.* **14**, 56-65
- Basu A., Krishnamurthy S. (2010) Cellular responses to cisplatin-induced DNA damage. *J Nucleic Acids* **2010**, 201367
- Beck D.J, Brubaker R.R. (1973) Effect of cis-platinum(II)diamminodichloride on wild type and deoxyribonucleic acid repair-deficient mutants of Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **116**, 1247-1252
- Becker J.P., Weiss J., Theile D. (2014) Cisplatin, oxaliplatin, and carboplatin unequally inhibit in vitro mRNA translation. *Toxicol. Lett.* **225**, 43-47
- Castello A., Fischer B., Eichelbaum K., Horos R., Beckmann B.M., Strein C., Davey N.E., Humphreys D.T., Preiss T., Steinmetz L., Krijgsveld J., Hentze M.W. (2015) Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell* **149**, 1393-1406
- Cox J., Mann M. (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1367-1372
- Dasari S., Tchounwou P.B. (2014) Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* **740**, 364–378

Definice pojmu biomarker: NCI Dictionary of Cancer Terms.
<http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=45618>

Staženo 7. 8. 2016

Dilruba S., Kalayda G.V. (2016) Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **77**, 1103-1124

Drummonda M.C., Belyantsevaa I.A., Fridericib K.H., Friedman T.B. (2011) Actin in hair cells and hearing loss. *Hear. Res.* **288**, 89-99

Dugina V., Zwaenepoel I., Gabbiani G., Clément S., Chaponnier Ch. (2013) β - and γ -cytoplasmic actins display distinct distribution and functional diversity. *J. Cell Sci.* **122**, 2980-2988

Enesa K., Evans P. (2014) The biology of A20-like molecules. *Adv.Exp.Med.Biol.* **809**, 33-48

Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64-71

Fisel P., Schaeffeler E., Schwab M. (2016) DNA methylation of ADME genes. *Clin. Pharmacol. Ther.* **99**:5, 512-527

Freire R., van Vugt M.A.T.M., Mamely I., Medema R. (2006) Claspin: timing the cell cycle arrest when the genome is damaged. *Cell Cycle* **5**, 2831-2834

Green D.R. (2005) Apoptotic pathways: minireview ten minutes to dead. *Cell* **121**, 671-674

Han X., Aslanian A., Yates III J.R. (2008) Mass spectrometry for proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**, 483-490

Hill G.W., Morest D.K., Parham K. (2008) Cisplatin-induced ototoxicity: effect of intratympanic dexamethasone injections. *Otol. Neurotol.* **29**, 1005-1011

Höpfner M., Schuppan D., Scherübl H. (2008) Growth factor receptors and related signalling pathways as targets for novel treatment strategies of hepatocellular cancer. *World J. Gastroenterol.* **14**, 1-14

Chen X., Wei S., Ji Y., Guo X., Yang F. (2015) Quantitative proteomics using SILAC: principles, applications, and developments. *Proteomics* **15**, 3175-3192

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

- Choi Y.M., Kim H.K., Shim W., Anwar M.A., Kwon J.W., Kwon H.K., Kim H.J., Jeong H., Kim H.M., Hwang D., Kim H.S., Choi S. (2015) Mechanism of cisplatin-induced cytotoxicity is correlated to impaired metabolism due to mitochondrial ROS generation. *PLoS One* **10**, e0135083
- Jeon SY., Hwang KA., Choi KCh. (2016) Effect of steroid hormones, estrogen and progesterone, on epithelial mesenchymal transition in ovarian cancer development. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **158**, 1–8
- Jin L., Williamson A., Banerjee S., Philipp I., Rape M. (2008) Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex. *Cell* **133**, 653-665
- Johnson G.L., Lapadat R. (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**, 1911-1912
- Johnstone T.C., Suntharalingam K., Lippard S.J. (2016) The next generation of platinum drugs: targeted Pt(II) agents, nanoparticle delivery, and Pt(IV) prodrugs. *Chem. Rev.* **116**, 3436–3486
- Jones E.V., Dickman M.J., Whitmarsh A.J. (2007) Regulation of p73-mediated apoptosis by c-Jun N-terminal kinase. *Biochem. J.* **405**, 617-623
- Kachalaki S., Ebrahimi M., Mohamed Khosroshahi L., Mohammadinejad S., Baradaran B. (2016) Cancer chemoresistance; biochemical and molecular aspects: a brief overview. *Eur. J. Pharm. Sci.* **89**, 20-30
- Karas M., Hillenkamp F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 000 daltons [1]. *Anal. Chem.* **60**, 2299-2301
- Kigawa J. (2013) New strategy for overcoming resistance to chemotherapy of ovarian cancer. *Yonago Acta Med.* **56**, 43-50
- Kirchheiner J., Seeringer A. (2007) Clinical implications of pharmacogenetics of cytochrome P450 drug metabolizing enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **1770**, 489–494
- Kumar S., Tchounwou P.B. (2015) Molecular mechanisms of cisplatin cytotoxicity in acute promyelocytic leukemia cells. *Oncotarget* **6**, 40734-40746
- Leischinga G.R., Loosa B., Bothab M.H., Engelbrechts AM. (2015) The role of mTOR during cisplatin treatment in an in vitro and ex vivo model of cervical cancer. *Toxicology* **335**, 72-78

Li Q., Shu Y. (2014) Role of solute carriers in response to anticancer drugs. *Mol. and Cell. Therapies* **2**:15

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

Liu Z., Liu R., Zhou Z., Zu Y., Xu F. (2015) Structural changes of linear DNA molecules induced by cisplatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **457**, 688-692

Lüllmann H., Mohr K., Wehling M. (2004) Farmakologie a toxikologie, 19-26, 35-49, 539-543, Grada Publishing, a.s, ČR

Makarov A., Denisov E., Kholomeev A., Balschun W., Lange O., Strupat K., Horning S. (2006) Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Anal. Chem.* **78**, 2113-2120

Matsumoto M., Nakajima W., Seike M., Gemma A., Tanaka N. (2016) Cisplatin-induced apoptosis in non-small-cell lung cancer cells is dependent on bax- and bak-induction pathway and synergistically activated by BH3-mimetic ABT-263 in p53 wild-type and mutant cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **473**, 490-496

Matt S., Hofmann T.G. (2016) The DNA damage-induced cell death response: a roadmap to kill cancer cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 2829–2850

Meunier B., de Visser S.P., Shaik S. (2004) Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chem. Rev.* **104**, 3947-3980

Miller R.P., Tadagavadi R.K., Ramesh G., Reeves W.B. (2010) Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. *Toxins* **2**, 2490-2518

Nováková L., Douša M. (2013) Moderní HPLC separace v teorii a praxi II. Europrint a.s., Praha, ČR

Ong S.E., Blagoev B., Kratchmarova I., Kristensen D.B., Steen H., Pandey A., Mann M. (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **1**, 376-386

Pabla N., Dong Z. (2008) Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int.* **73**, 994-1007

Pacanowski M., Huang SM. (2016) Precision medicine. *Clin. Pharmacol. Ther.* **99**, 124-129

- Pan ST., Li ZL., He ZX., Qiu, JX., Zhou SF. (2016) Molecular mechanisms for tumour resistance to chemotherapy. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **43**, 723–737
- Pan X., Zhao J., Zhang WN., Li HY., Mu R., Zhou T., Zhang HY., Gong WL., Yu M., Man JH., Zhang PJ., Li AL., Zhang XM. (2009) Induction of SOX4 by DNA damage is critical for p53 stabilization and function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**, 3788-3793
- Paul D., Kumar A., Gajbhiye A., Santra M.K., Srikanth R. (2013) Mass spectrometry-based proteomics in molecular diagnostics: discovery of cancer biomarkers using tissue culture. *Biomed Res. Int.* **2013**, 1-16
- Pectasides D., Kamposioras K., Papaxoinis G., Pectasides E. (2008) Chemotherapy for recurrent cervical cancer. *Cancer Treat. Rev.* **34**, 603-613
- Pham K., Pal R., Qu Y., Liu X., Yu H., Shiao S.L., Wang X., O'Brian Smith E., Cui X., Rodney G.G., Cheng N. (2014) Nuclear glutaredoxin 3 is critical for protection against oxidative stress-induced cell death. *Free Radic. Biol. Med.* **85**, 197-206
- Pouha S.T., Kavallaris M. (2013) Gamma-actin is involved in regulating centrosome function and mitotic progression in cancer cells. *Cell Cycle* **24**, 3908-3919
- Rosenberg B. (1985) Fundamental Studies With Cisplatin. *Cancer* **55**, 2303-2316
- Roskoski R. (2016) Cyclin-dependent protein kinase inhibitors including palbociclib as anticancer drugs. *Pharmacol. Res.* **107**, 249–275
- Saikumar P., Dong Z., Mikhailov V., Denton M., Weinberg J.M., Venkatachalam M.A. (1999) Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am. J. Med.* **107**, 489-506
- Shin W.S., Han J., Kumar R., Gyu Lee G., Sessler J.L., Kim JH., Kim J.S. (2016) Programmed activation of cancer cell apoptosis: A tumor-targeted phototherapeutic topoisomerase I inhibitor. *Sci Rep* **6**:29018
- Schéma Orbitrap Fusion Thermo: Schematic of the Orbitrap Fusion Tribrid MS. <http://planetorbitrap.com/orbitrap-fusion#tab:schematic> Staženo 7. 8. 2016

Schuler P.J., Trellakis S., Greve J., Bas M., Bergmann C., Bölke E., Lehnerdt G., Mattheis S., Albers E., Brandau S., Lang S., Whiteside T.L., Bier H., Hoffmann T.K. (2010) In vitro chemosensitivity of head and neck cancer cell lines. *Eur. J. Med. Res.* **15**, 337-344

Sol ES., Lee T.S., Koh S.B., Oh H.K., Ye G.W., Choi Y.S. (2009) Comparison of concurrent chemoradiotherapy with cisplatin plus 5-fluorouracil versus cisplatin plus paclitaxel in patients with locally advanced cervical carcinoma. *Gynecol. Oncol.* **20**, 28-34

Souhrn údajů o přípravku sp.zn. sukls223178/2015: Státní Ústav pro Kontrolu Léčiv. <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0189990&tab=texts> Staženo 7. 8. 2016

Stępiński D. (2016) Nucleolus-derived mediators in oncogenic stress response and activation of p53-dependent pathways. *Histochem. Cell Biol.* **146**, 119-139

Szczepański M.A., Grzanka A., Litwiniec A., Gackowska L., Kubiszewska I., Grzanka D. (2010) Cytoskeletal changes during cellular response of the A549 lung cancer cells to continuous cisplatin treatment. *Cell Biol. Int.* **34**, 197-211

Tait S.W.G., Green D.R. (2010) Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 621-632

Teicher B.A., Marston Linehan W., Helman L.J. (2012) Targeting cancer metabolism. *Clin. Cancer Res.* **18(20)**, 5537–5545

Theile D., Kos M. (2016) Structural and functional evaluation of interaction between mammalian ribosomal RNA with platinum-containing antineoplastic drugs. *Toxicol. Lett.* **242**, 47-52

Thorslund T., Ripplinger A., Hoffmann S., Wild T., Uckelmann M., Villumsen B., Narita T., Sixma T.K., Choudhary C., Bekker-Jensen S., Mailand N. (2015) Histone H1 couples initiation and amplification of ubiquitin signalling after DNA damage. *Nature* **527**, 389-393

Valle J., Wasan H., Palmer D.H., Cunningham D., Anthony A., Maraveyas A., Madhusudan S., Iveson T., Hughes S., Pereira S.P., Roughton M., Bridgewater J. (2010) Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N. Engl. J. Med.* **362**, 1273-1281

- Wen M., Kwon Y., Wang Y., Mao JH., Wei G. (2015) Elevated expression of UBE2T exhibits oncogenic properties in human prostate cancer. *Oncotarget* **6**, 25226–25239
- Williams K.L., Gooley A.A., Wilkins M.R., Packer N.H. (2014) A Sydney proteome story. *J. Proteomics* **107**, 13-23
- Winograd-Katz SE., Levitzki A. (2006) Cisplatin induces PKB/Akt activation and p38MAPK phosphorylation of the EGF receptor. *Oncogene* **25**, 7381–7390
- Wiśniewski J.R., Zougman A., Mann M. (2009) Combination of FASP and stagetip-based fractionation allows in-depth analysis of the hippocampal membrane proteome. *J. Proteome Res.* **8**, 5674–5678
- Xie F., Smith R.D., Shen Y. (2012) Advanced proteomic liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1261**, 78–90
- Yeh E.T.H., Bickford C.L. (2009) Cardiovascular complications of cancer therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **53**, 2231–2247
- Zákon č. 378/2007 Sb. Zákon o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů. § 2, odst. 4, písm. a.
- Zhu H., Luo H., Zhang W., Shen Z., Hu X., Zhu X. (2016) Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. *Drug Des. Dev. Ther.* **10**, 1885-1895