



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Buněčné aspekty působení nízkomolekulárních
inhibitorů receptoru pro transformující růstový
faktor beta**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Pavína Pospíšilová
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2016

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Pavλίna Pospíšilová
Název práce:	Buněčné aspekty působení nízkomolekulárních inhibitorů receptoru pro transformující růstový faktor beta
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2016
Abstrakt:	Bakalářská práce je zaměřena na studium vlivu transformujícího růstového faktoru beta (TGFβ) na nádorová onemocnění. Teoretická část shrnuje poznatky o TGFβ, významu jeho signalizace při patologických a fyziologických stavech a o možnostech inhibice signální dráhy TGFβ. V experimentální části byl studován vliv nových nízkomolekulárních inhibitorů receptoru pro TGFβ v buněčné linii HeLa a BJ, se zaměřením na fosforylaci proteinu SMAD2 a na lokalizaci signálních proteinů SMAD.
Klíčová slova:	Transformující růstový faktor beta (TGFβ), rakovina, SMAD proteiny, kinasy, inhibitory.
Počet stran:	52
Počet příloh:	0
Jazyk:	český

Bibliographical information

Autor's name: Pavlína Pospíšilová

Title: Cellular effects of small molecule inhibitors of transforming growth factor beta receptor

Type of thesis: Bachelor

Department: Laboratory of growth regulators

Supervisor: doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.

The year of presentation: 2016

Abstract: The bachelor thesis is focused on the study of the influence of transforming growth factor beta (TGF β) in cancer. The theoretical part summarizes the current knowledge about TGF β , signaling its importance in pathological and physiological conditions and the possibilities for inhibition of signaling pathways of TGF β . In the experimental part effects of novel small molecule inhibitors of the receptor for TGF β in HeLa and BJ cell line with focusing on phosphorylation SMAD2 and localization of signaling SMAD proteins were studied.

Keywords: Transforming growth factor beta (TGF β), cancer, SMAD proteins, kinase, inhibitors.

Number of page: 52

Number of appendices: 0

Language: czech

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

V Olomouci dne.....

Podpis.....

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu doc. RNDr. Vladimíru Kryštofovi, Ph.D. za odborné vedení práce a cenné rady. Velké díky také patří Mgr. Evě Řezníčkové za pomoc a trpělivost při vypracování experimentální části práce. Dále děkuji celému kolektivu Laboratoře růstových regulátorů Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého a Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. za vstřícnost a praktické rady.

OBSAH

1	ÚVOD A CÍL PRÁCE.....	8
2	RECEPTOROVÉ KINASY.....	9
2.1	Význam a možnosti inhibice.....	9
2.2	Onkogenní receptory.....	10
3	TRANSFORMUJÍCÍ RŮSTOVÝ FAKTOR BETA – TGF β	13
3.1	Objev a význam TGF β	13
3.2	Isoformy TGF β	14
3.3	Receptory pro TGF β	15
3.4	Signální dráha TGF β	17
3.5	Patofyziologie signalizace TGF β	18
3.5.1	Změny v receptorech pro TGF β	19
3.5.2	Změny v proteinech SMAD.....	20
3.5.3	Změny v antagonistech signální dráhy TGF β	21
3.5.4	Změny v TGF β	21
4	INHIBITORY SIGNÁLNÍ DRÁHY TGF β	22
4.1	Malé molekuly.....	22
4.2	Monoklonální protilátky, antisense oligonukleotidy, vakcíny.....	24
5	MATERIÁL A METODY.....	25
5.1	Přístroje a vybavení.....	25
5.2	Použité chemikálie.....	25
5.3	Použité roztoky.....	25
5.4	Použité protilátky.....	26
5.5	Použitá buněčná linie.....	26
5.6	Studované inhibitory ALK5.....	26
5.7	Kultivace a ovlivnění buněčné linie.....	27
5.8	Sklízení a lyzace buněk.....	27

5.9	SDS-PAGE, western blotting, imunodetekce	28
5.10	Fluorescenční vizualizace SMAD2/3	28
6	VÝSLEDKY	30
6.1	Vliv studovaných látek na fosforylaci SMAD2 v linii HeLa.....	30
6.2	Vliv studovaných látek na fosforylaci SMAD2 v linii BJ	31
6.3	Vliv studovaných látek na lokalizaci SMAD2/3 v linii HeLa	33
7	DISKUZE	36
8	ZÁVĚR	38
9	SEZNAM LITERATURY	39
10	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	51

1 ÚVOD A CÍL PRÁCE

Rakovina je jedno z nejrozšířenějších a nejzákeřnějších onemocnění, jejíž výskyt je celosvětový. Hlavním problémem v její léčbě je fakt, že se nejedná o uniformní onemocnění, ale molekulární mechanismus jejího vzniku a průběhu je mnohdy zcela odlišný, a to i u nádorů stejného typu. Neustále odhalujeme nové informace, jakým mechanismem rakovina vzniká, jak se vyvíjí a v čem tkví její jedinečnost. Poznání těchto vlastností pak může být využito k hledání nových látek, které by cíleně zastavovaly růst nádorových buněk a neovlivňovaly tkáň zdravé, nádorem nezasažené. Po objevení růstových faktorů, pochopení mechanismu jejich působení a zjištění, že existuje jasný vztah mezi nimi a vznikem rakoviny, se vědecký výzkum zaměřil na jejich studium. Dnes již dobře víme, jak velký terapeutický potenciál mají inhibitory receptorových kinas, jejichž ligandem jsou právě růstové faktory. Jedním z nich je transformující růstový faktor beta (TGF β), který se podílí na mnoha fyziologických procesech. Deregulace signální dráhy TGF β byla zjištěna u několika patologických stavů, včetně rakoviny, a proto je její inhibice významným terapeutickým cílem. Stále probíhá vývoj látek, které s touto signální dráhou interferují a které by růst nádoru zastavily, neboť u stále více lidí je nádorové onemocnění diagnostikováno.

Cílem praktické části bakalářské práce bylo zpracovat rešerši týkající se signalizace zprostředkované transformujícím růstovým faktorem beta a jejího vlivu na vznik a průběh nádorového onemocnění.

Cílem experimentální části bylo ověření biologických účinků několika nově syntetizovaných pyrrolopyrazolových derivátů na inhibici signální dráhy transformujícího růstového faktoru beta v buněčných liniích HeLa a BJ.

2 RECEPTOROVÉ KINASY

2.1 Význam a možnosti inhibice

Receptorové kinasy se skládají z extracelulární ligand-vázající domény, transmembránové domény a intracelulární domény, jejíž integrální složkou je proteinkinasa. Proteinkinasy jsou enzymy, které katalyzují přenos fosfátové skupiny z vysokoenergetické donorové molekuly na protein, konkrétně na hydroxylovou skupinu postranních řetězců aminokyselin (Tsai *et Nussinov*, 2013). Dle typu fosforylované aminokyseliny dělíme proteinkinasy na dvě základní skupiny, a to serin/threoninová a tyrosinová kinasa. Proteinkinasy tak procesem fosforylace mohou změnit funkci proteinu, a to ve smyslu stimulace, nebo inhibice. Vzhledem k velkému významu fosforylace proteinů bylo vynaloženo značné úsilí ke studiu signálních drah proteinkinas. Protože jsou extracelulárním ligandem růstové faktory, podílí se proteinkinasy významně na regulaci buněčné proliferace, diferenciaci a apoptózy (Manning *et al.*, 2002).

Deregulace receptorových kinas se vyskytuje u mnoha onemocnění, včetně rakoviny a zánětlivých chorob (Cohen, 2002). Inhibice těchto receptorů je proto považována za terapeuticky využitelný způsob potlačení růstu nádorů, přičemž je možná několika způsoby: buď blokadou vazebného místa pro ATP, nebo blokadou vazebného místa pro růstový faktor, zamezením jejich aktivace anebo exprese (Roskoski, 2015). Prvním schváleným inhibítor receptorové kinasy byl trastuzumab. Jedná se o monoklonální protilátku, která inhibuje tyrosinkinasy receptor pro lidský epidermální růstový faktor 2 (HER2), jehož zvýšená exprese byla zjištěna především u rakoviny prsu, a proto se od roku 1999 používá k její léčbě (<http://www.fda.gov>). Dnes je také indikován k léčbě žaludečního a gastroesofageálního karcinomu s pozitivním nálezem mutace tohoto receptoru. Dalšími léčivy z této skupiny jsou panitumumab, cetuximab a pertuzumab, které inhibují epidermální růstový faktor (EGFR) a jejich terapeutickou indikací je karcinom tlustého střeva, hlavy, krku a prsu (Roskoski, 2014).

Prvním léčivem ze skupiny malých molekul zaměřených na ATP vazebné místo kinas byl imatinib, vyvinutý pro léčbu chronické myeloidní leukémie (CML). Imatinib inhibuje nerekceptorovou kinasu Bcr-Abl, která je příčinou vzniku CML a některých jiných leukemií (Druker *et al.*, 1996). Kromě této kinasy inhibuje i další tyrosinkinasy, jako receptor pro růstový faktor kmenových buněk (SCFR) či receptor pro destičkový růstový faktor (PDGFR) (Klener, 2010). Nejprve nebyla v této skupině látek viděna velká úspěšnost vzhledem k velkému počtu proteinkinas a dalších enzymů vyžadujících ATP,

a z toho vyplývajícími četnými nežádoucími vedlejšími účinky. Avšak strukturální studie ukazují, že i malé rozdíly v ATP vazebném místě mohou zásadním způsobem změnit vaznost k určité struktuře a zvýšit tak specifickou (Roskoski, 2015). Na základě mechanismu ovlivnění ATP vazebného místa byly inhibitory proteinkinasy rozděleny do čtyř skupin. Inhibitory typu I se reverzibilně vážou na ATP vazebné místo proteinkinasy, jedná se tedy o kompetitivní inhibitory ATP. Do této skupiny patří schválená léčiva erlotinib, gefitinib, dasatinib a sunitinib (Dar *et* Shokat, 2011). Inhibitory typu II rozpoznávají inaktivní místo kinasy, které bývá typické polohou tzv. DFG motivu. Toto místo sousedí s aktivním místem pro ATP. Do této skupiny se řadí imatinib, sorafenib, nilotinib (Zhang *et al.*, 2009). Inhibitory typu III jsou sloučeniny, které se vážou mimo aktivní místo, na tzv. alosterické místo. Touto vazbou dochází ke změně struktury kinasy a neschopnosti vazby ATP. V zásadě existuje několik možných alosterických míst v každé proteinkinase. Léčivem této skupiny je trametinib, který je schválen pro léčbu melanomu (Dar *et* Shokat, 2011; Roskoski, 2015). Do poslední skupiny řadíme ireverzibilní inhibitory proteinkinasy, které tvoří kovalentní vazbu s cílovým enzymem (Eglen *et* Reisine, 2011). Tyto látky jsou vzhledem k bezpečnosti a obávané toxicitě poněkud neoblíbenou skupinou léčiv. I přes tuto skutečnost se v terapeutické praxi léčivo z této skupiny používá, jedná se o afatinib. Jeho terapeutickou indikací je nemalobuněčný karcinom plic s mutacemi pro epidermální růstový faktor (Singh *et al.*, 2011).

2.2 Onkogenní receptory

Protoonkogen je strukturální gen kódující protein, který se pozitivně podílí obvykle na růstu, dělení a životaschopnosti buněk. Pokud dojde ke změně exprese nebo struktury protoonkogenu, který podporuje růst, dělení a schopnost přežívání buněk, vzniká onkogen. Tento proces pak vyvolává nekontrolovanou buněčnou proliferaci. Jednou skupinou jsou právě protoonkogeny kódující receptory růstových faktorů, které mají vnitřní kinasovou doménu (Cibula *et* Petruželka, 2009). Za fyziologických podmínek vážou tyto kinasové receptory růstové faktory (mitogeny) produkované různými buňkami. Mitogenní signály jsou signálními kaskádami převedeny do jádra, kde dochází k aktivaci transkripčních faktorů, které spouštějí expresi genů nutných pro uskutečnění mitózy (Klener, 2010).

Prvním objeveným tyrosinkinásovým receptorem byl receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR). Skutečnost, že existuje vztah mezi nadměrnou expresí určitých receptorů a vznikem rakoviny, byla potvrzena právě díky EGFR (Thompson *et* Gill, 1985). Vzhledem k tomuto faktu je EGFR jedním z nejvíce studovaných kinasových receptorů,

neboť se významně podílí na regulaci proliferace, diferenciaci a přežití buněk (Roskoski, 2015). Z tohoto důvodu je specifická a selektivní inhibice EGFR považována za ideální způsob léčby rakoviny (Herbst *et Sandler*, 2004).

Dalším významným onkogenním receptorem je receptor pro vaskulární endotelový růstový faktor (VEGFR). Rodina VEGF je nadměrně exprimována různými nádory a jejich vazbou na receptor na cévním endotelu dochází k indukci angiogeneze. Angiogeneze je regulovaný proces odpovědný za vývoj nových krevních cév (Hojjat-Farsangi, 2014). Avšak neregulovaná angiogeneze je spojena s řadou patologických stavů, jako je revmatická artritida, lupénka a především nádorová onemocnění. Inhibitory VEGFR mají tak za úkol zablokovat tvorbu krevních cév a tím omezit přísun živin k nádorové (Gupta *et Qin*, 2003).

Receptor destičkového růstového faktoru (PDGFR) spolu se svým ligandem (PDGF) byl identifikován jako sérový protein stimulující růst a migraci fibroblastů, buněk hladkého svalstva plic a pericytů. Zejména se uplatňuje při hojení poraněných tkání. Zvýšená produkce PDGF buňkami nádorového mikroprostředí stimuluje růst nádorových buněk a má také výrazný proangiogenní účinek (Klener, 2010). Kromě rakoviny, deregulovaná signalizace PDGF může také podporovat rozvoj fibrózy a aterosklerózy (Andrae *et al.*, 2008).

Dalším podstatným onkogenním receptorem je receptor pro hepatocytární růstový faktor (HGFR). Vazba ligandu HGF aktivuje dráhy s různými buněčnými funkcemi, které jsou důležité v rozvoji a progresi rakoviny. Prvně byla identifikována mutace genu HGFR u karcinomu renálních buněk, avšak později byla zjištěna mutace v různých maligních lézích. Jedná se především o karcinom prsu, plic, žaludku, tlustého střeva a hltanu (Ho-Yen *et al.*, 2015).

Receptor pro růstový faktor kmenových buněk (SCFR) hraje důležitou roli pro hematopoetické buňky, podílí se na jejich proliferaci a diferenciaci (Chen *et Xiong*, 2002). Tyto receptory jsou široce distribuovány jednak v krvetvorných buňkách, ale také v dalších tkáňových buňkách, jako jsou buňky zárodečné, žírné, melanomové a buňky gastrointestinálního traktu (Jiang *et al.*, 2005). Z výše uvedeného výskytu receptorů vyplývají onemocnění, která jsou způsobena mutacemi genů kódujících SCFR receptory. Nejčastěji se jedná o gastrointestinální karcinomy, karcinomy žírných buněk a akutní myeloidní leukémie (Liang *et al.*, 2013). Avšak deregulace signalizace SCF může hrát důležitou roli i v mnoha dalších maligních nádorech, jako jsou karcinomy vaječníků, plic, prostaty a ledvin (Heinrich *et al.*, 2002).

Receptor pro růstový faktor podobný inzulínu (IGFR) patří také mezi významné onkogenní receptory. Tento receptor spolu se svým ligandem IGF je nezbytný pro růst a vývoj buněk. Deregulací této signální dráhy dochází k potlačení apoptózy, stimulaci buněčného dělení, angiogenezi a metastatické aktivitě. Mnohé studie dokazují nadměrnou expresi IGFR v různých typech rakoviny, jako je rakovina prsu, prostaty a plic (Pollak, 2004; LeRoith *et* Roberts, 2003).

3 TRANSFORMUJÍCÍ RŮSTOVÝ FAKTOR BETA – TGF β

3.1 Objev a význam TGF β

V roce 1976 proběhly studie s myšimi buňkami, které byly transformovány sarkomovým virem. Bylo zjištěno, že tyto buňky produkují růstové faktory, které stimulují buněčné dělení u normálních fibroblastů a interagují s membránovými receptory pro epidermální růstový faktor (de Larco *et* Todaro, 1976). V roce 1978 de Larco a Todaro popsali postup částečného přečištění objeveného růstového faktoru, jejímž výsledkem byla látka, kterou nazvali sarkomový růstový faktor (SGF) (de Larco *et* Todaro, 1978). Nicméně brzy bylo odhaleno, že SGF není jedna látka, ale směs nejméně dvou složek. Jedna z frakcí byla pojmenována transformující růstový faktor alfa (TGF α) a druhá jako transformující růstový faktor beta (TGF β). Rozdíl mezi těmito dvěma složkami je značný, mají jiné molekulární složení, biologickou odpověď a vykazují jinou vaznost k membránovým receptorům. Pro transformující růstový faktor alfa je charakteristická vysoká afinita k receptoru pro EGF a pravděpodobně se také jedná o embryonální zárodek EGF. Transformující růstový faktor beta sice nevykazuje afinitu k receptoru pro EGF, ale bylo zjištěno, že aktivita TGF β se až stonásobně zvýší přidáním již nanogramového množství EGF (Anzano *et al.*, 1982; Moses *et al.*, 1985). Dnes již víme, že transformující růstový faktor beta reguluje proliferaci a diferenciaci různých typů buněk. Má klíčovou úlohu v embryonálním vývoji a je zapojen do udržování tkáňové homeostázy. Transformující růstový faktor beta se váže na specifické transmembránové receptory na povrchu buněk, které mají charakter serin/threoninové kinasy. Signál z receptorů je přenášen skrze proteiny SMAD, které následně putují do jádra buněk. V jádře tyto proteiny fungují jako složky transkripčních komplexů a ovlivňují expresi cílových genů. Důvod, proč právě tomuto růstovému faktoru je věnována taková pozornost a jeho signální dráha se stala populárním cílem pro vývoj léčiv, je ten, že je často nadměrně exprimován u chronicky chorobných stavů, včetně rakoviny, fibrózy a zánětu. V průběhu onemocnění jeho nadměrná produkce pohání progresi onemocnění modulací buněčného růstu (Derynck *et* Miyazono, 2008; Derynck *et* Akhurst, 2007; Fuchs, 2002).

3.2 Isoformy TGFβ

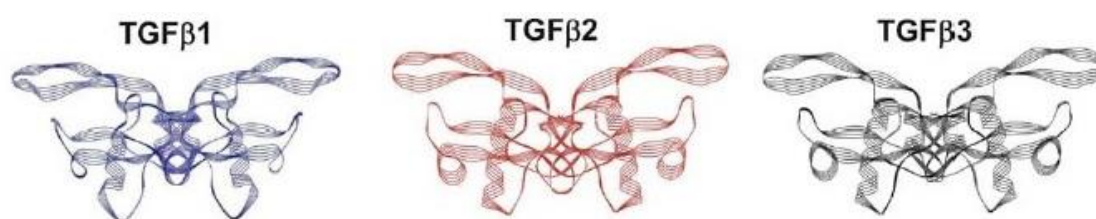
Transformující růstový faktor beta se vyskytuje ve třech isoformách – TGFβ1, TGFβ2 a TGFβ3. Jednotlivé isoformy byly objeveny pomocí izolace a purifikace proteinu, nebo díky klonování cDNA, v případě TGFβ3. Každá tato isoforma je kódována jiným genem, avšak struktura výsledných proteinů je velice podobná (Obr. 1) (Cheifetz *et al.*, 1987; Derynck *et al.*, 1988). Sdílejí receptorový komplex a signální dráhu, ale jejich hladiny exprese se liší v závislosti na typu tkáně (Millan *et al.*, 1991).

Jako první byl objeven transformující růstový faktor beta 1 (TGFβ1), který byl izolován a přečištěn z lidských a prasečích krevních destiček. Původně byl identifikován jako mitogen, neboť u něj byla zjištěna schopnost indukovat růst kolonií některých hlodavčích buněčných linií (Assoian *et al.*, 1983). Později se ale ukázalo, že TGFβ1 vykazuje také inhibiční účinky na růst u mnoha typů buněk (Moses *et al.*, 1985). Hlavní biologickou aktivitou této isoformy je indukce zvýšené biosyntézy složek extracelulární matrix, inhibitorů proteas a snížené syntézy extracelulárních proteas (Ignotz *et Massagué*, 1986; Lund *et al.*, 1987; Edwards *et al.*, 1987). Extracelulární matrix (ECM) je směs proteinů, glykosaminoglykanů a glykoproteinů, která vyplňuje mezibuněčný prostor. Pro organismus je ECM důležitý z mnoha důvodů, má vliv na buněčnou adhezi, mezibuněčnou signalizaci, diferenciaci, proliferaci a vytváří strukturální podporu tkání a celých orgánů (Hynes, 2009). Uskupení ECM hraje tedy důležitou úlohu při vzniku nádorů (Liotta *et Rao*, 1983).

Transformující růstový faktor beta 2 (TGFβ2) byl poprvé objeven u člověka jako peptid tvořený nádorovými buňkami mozku, a proto byl nejdříve označen jako G-TsF (glioblastoma-derived T cell suppressor factor), tedy faktor odvozený od glioblastomu potlačující růst T-lymfocytů (de Martin *et al.*, 1987). Brzy nato bylo zjištěno, že tento protein je jak strukturálně, tak i funkčně příbuzný s TGFβ1 (Seyedins *et al.*, 1987). Jeho důležitost ve fyziologických procesech byla dokázána u myši s cíleně nefunkčním genem pro TGFβ2, u kterých byly poté pozorovány četné vývojové malformace (Sanford *et al.*, 1997). Pro nádorové buňky je tento faktor také důležitý, neboť u nich zvyšuje buněčnou proliferaci autokrinní cestou a snižuje imunitní dozor nad vývojem nádoru (de Martin *et al.*, 1987).

Transformující růstový faktor beta 3 (TGFβ3) byl identifikován pomocí molekulárního klonování cDNA (Derynck *et al.*, 1988). Jeho základní funkci prokázaly studie na myších s cíleně nefunkčním genem pro TGFβ3. Pokusné myši umíraly krátce po narození, trpěly opožděným plicním vývojem a rozštěpy patra. Z tohoto faktu je zřejmé,

že TGF β 3 je důležitý při srůstu patra a morfogenezi plic, respektive při epiteliálně-mesenchymální interakci při těchto dějích (Proetzel *et al.*, 1995; Kaartinen *et al.*, 1995).



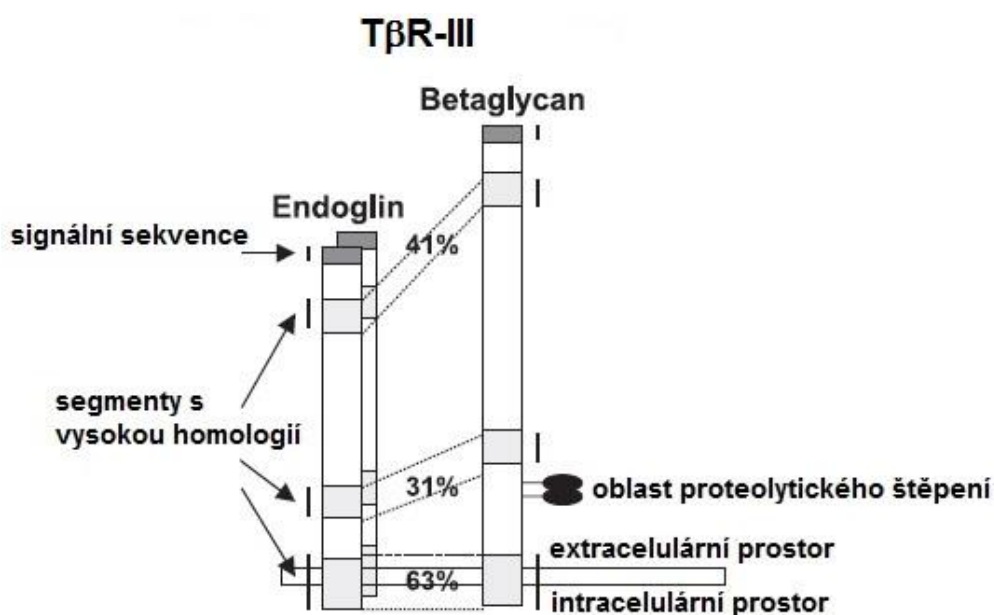
Obr. 1: Dimerní struktura jednotlivých isoform TGF β (převzato z Laverty *et al.*, 2009).

3.3 Receptory pro TGF β

Transformující růstový faktor beta interaguje s vysokou afinitou s několika odlišnými membránovými proteiny. Pomocí radioaktivního značení TGF β bylo zjištěno, že existují tři typy receptorů pro TGF β (Massagué, 1985; Cheifetz *et al.*, 1986).

Za receptory pro transformující růstový faktor beta typu III (T β RIII) jsou považovány betaglykan a endoglin, což jsou látky exprimované na povrchu buněk a fungují jako zprostředkovatelé signálu pro receptory typu I a II. Betaglykan je proteoglykan s velikostí 250-350 kDa, který je exprimován ve většině typů buněk (Cheifetz *et al.*, 1988). Betaglykan je schopen vázat všechny tři isoformy TGF β s relativně vysokou afinitou, nicméně TGF β 2 vykazuje o něco vyšší afinitu k betaglykanu než TGF β 1 a TGF β 3 (Andres *et al.*, 1991). Tento povrchový proteoglykan hraje klíčovou roli v působení TGF β , neboť zvyšuje jeho vazbu k receptoru I a II. Tento signalizační účinek je zejména patrný u TGF β 2, který má nízkou afinitu k receptoru typu I a II v nepřítomnosti betaglykanu. Různé buněčné linie, které neexprimují betaglykan jsou méně citlivé na TGF β 2 ve srovnání s TGF β 1, avšak po transfekci betaglykanu získávají citlivost na TGF β 2. Membránový betaglykan je tedy považován za pozitivní regulátor ve zprostředkování signalizace TGF β (Attisano *et al.*, 1994). Betaglykan se nevyskytuje pouze jako receptor pevně ukotvený v membráně, ale jeho extracelulární doména je vylučována buňkami v rozpustné formě. Tento jev je pravděpodobně dán působením proteolytických enzymů na jednom ze dvou možných míst štěpení v blízkosti transmembránové domény (Obr. 2) (Andres *et al.*, 1989; López-Casillas *et al.*, 1991). Jelikož je sekretovaný betaglykan stále schopný vázat TGF β , může tak kompetitivně inhibovat vazbu TGF β na receptory a tím regulovat jeho signalizaci. Betaglykan tedy ovlivňuje vazbu TGF β k receptorům dvojím způsobem, záleží, v jaké formě se vyskytuje.

Určujícím faktorem je tedy poměr rozpustného a ukotveného betaglykanu v membráně (Attisano *et al.*, 1994). Endoglin je dimerní membránový glykoprotein, který byl poprvé identifikován v endotelových buňkách (Gougos *et Letarte*, 1990). Později byla zjištěna jeho tvorba na povrchu některých hematopoetických buněk, stromálních buněk kostní dřeně a chondrocytů. Jeho transmembránová a krátká cytoplazmatická doména vykazuje poměrně vysokou podobnost s betaglykanem. Částečná podobnost je i v extracelulárních doménách (Obr. 2). Na rozdíl od betaglykanu je endoglin schopen vázat s vysokou afinitou TGF β 1 a TGF β 3, ale není schopen vázat TGF β 2 (Cheifetz *et al.*, 1992).

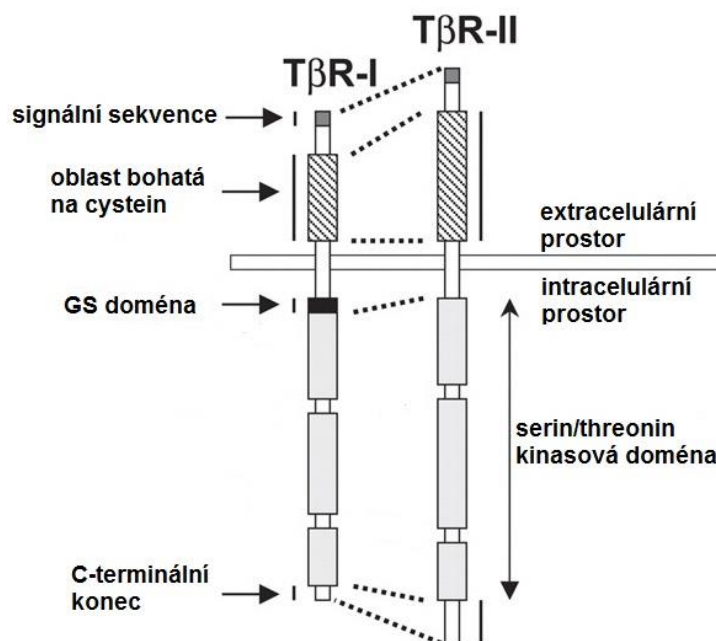


Obr. 2: Struktura TGF β receptorů typu III (převzato a upraveno z Lebrin *et al.*, 2005).

Receptor transformujícího růstového faktoru beta typu II (T β RII) je transmembránová serin/threoninová kinasa s velikostí 85-110 kDa (Obr. 3) (Massague, 1992). Výskyt T β RII byl zkoumán na myších modelech, přičemž nejvyšší exprese byla u dospělých jedinců v plicní tkáni, hladkém a kosterním svalstvu. Dále byla zjišťována exprese T β RII mRNA u embryí, u nichž nejvyšší množství bylo zjištěno ve vyvíjejících se tkáních, zejména v epidermis, končetinách a páteři (Lawler *et al.*, 1994).

Receptor pro transformující růstový faktor beta typu I (T β RI) je také serin/threoninová kinasa s velikostí 65-75 kDa (Massague, 1992). Tento receptor je strukturně podobný s receptorem typu II, avšak jeho intracelulární i extracelulární doména je kratší než u T β RII a na cytoplazmatické doméně se oproti receptoru II nachází ještě GS-doména (Obr. 3). Tato oblast nese charakteristickou sekvenci SGSGSG, která je během

aktivace receptoru I fosforylovaná T β RII, neboť T β RI není samostatně schopen vazby s TGF β (Lyons *et al.*, 1988). T β RI je také označován jako ALK5 (activin receptor like kinase 5) (Franzén *et al.*, 1993).



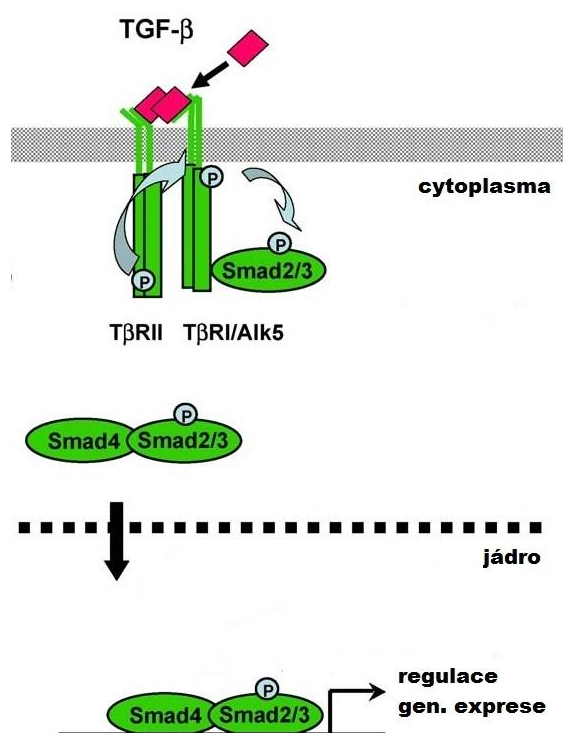
Obr. 3: Struktura TGF β receptoru typu I a II (převzato a upraveno z Lebrin *et al.*, 2005).

3.4 Signální dráha TGF β

Transformující růstový faktor beta významně zasahuje do biologických procesů tím, že reguluje signální dráhy, které řídí buněčnou proliferaci, diferenciaci, smrt, adhezi a pohyb buněk (Macias *et al.*, 2015). Transformující růstový faktor beta přenáší signál vazbou na heterotetramerní komplex receptorů T β RI a T β RII, čímž dochází k vytvoření produktivní konformace pro intracelulární serin/threonin kinasovou doménu receptorů, což umožní fosforylaci a aktivaci receptoru I receptorem II. Konkrétně dochází k fosforylaci GS-domény T β RI, která tak mění svoji konformaci a stává se dostupná pro proteiny SMAD (Obr. 4). Proteinová rodina SMAD je rozdělena do tří skupin, R-SMADs (receptor-regulated), Co-SMADs (collaborating) a I-SMADs (inhibitory). Ze skupiny R-SMADs jsou v této signální dráze konkrétně zapojeny proteiny SMAD2 a SMAD3, které jsou přímo fosforylovány receptorem typu I. Fosforylací těchto proteinů dochází k tvorbě heteromerních komplexů s Co-SMADs, z nichž SMAD4 je jediným členem. V jádře se tento komplex spojí s jedním z mnoha DNA vazebných partnerů a různými transkripčními koaktivátory či korepresory a tím dochází k pozitivní, nebo negativní regulaci genové exprese (Obr. 4). Protein SMAD7, který náleží do skupiny I-SMADs, je inhibitorem

přenosu signálu TGF β . Jeho inhibiční aktivita spočívá v tvorbě stabilních komplexů s aktivovanými receptory typu I a tím brání fosforylaci proteinu SMAD2 (Akhurst *et Hata*, 2012; Attisano *et Wrana*, 2002).

Mezi další endogenní inhibitory signální dráhy TGF β patří proteiny Ski, SnoN a Smurf2. Proteiny Ski a SnoN působí jako transkripční represory, neboť se v buněčném jádře váží na aktivní SMADs komplexy a inhibují tak jejich transkripční aktivitu (Luo, 2004). V případě Smurf2 se jedná o ubiquitinační lipázu cílenou na protein SMAD2. Její inhibiční účinek spočívá v připojení k proteinu SMAD2, jeho ubiquitinaci s následnou degradací v proteasomu, čímž dochází k zablokování signalizace TGF β (Lin *et al.*, 2000).



Obr. 4: Signální dráha transformujícího růstového faktoru beta (převzato a upraveno z Levy *et Hill*, 2006).

3.5 Patofyziologie signalizace TGF β

Rakovina je vícestupňový proces vedoucí k tvorbě klonální buněčné populace. Příčinou tohoto procesu je únik před kontrolními mechanismy, které za fyziologických podmínek řídí proliferaci buněk a homeostázu. To může nastat vlivem dvou odlišných typů genetických změn. Prvním typem je aktivující mutace onkogenů, která vede k buněčné proliferaci bez závislosti na růstových faktorech. Druhou variantou je inaktivující mutace nádorových supresorů, která umožňuje únik nádorových buněk před inhibičními signály růstu (Alberts *et al.*, 2002).

Signalizace TGF β je zapojena do mnoha různých biologických procesů, ať už v průběhu embryonálního vývoje, nebo také u dospělého organismu při udržení tkáňové homeostázy. Změny některých součástí této signalizace byly identifikovány v několika lidských nádorech. Bylo prokázáno, že TGF β v raných stádiích tvorby nádoru inhibuje proliferaci buněk. Tato skutečnost byla zjištěna na myších model, u nichž byl vyřazen gen pro TGF β 1. Došlo k rychlému malignímu procesu, kdy se vytvořil karcinom kůže a tlustého střeva (Glick, 2004; Engle *et al.*, 1999). Inaktivace TGF β jako nádorového supresoru může být způsobena nadměrnou expresí či zesílením jeho inhibitorů, jako je SMAD7, Smurf2, nebo transkripčními represory Ski, SnoN (Luo, 2004). Avšak u již vzniklých nádorů dochází k rezistenci na tumor supresivní účinek TGF β , a naopak je tento protein nadměrně exprimován a chová se jako nádorový promotor. Zde je pak pozorován vyšší stupeň neovaskularizace, vyšší riziko metastazování a špatná prognóza (Derynck *et al.*, 2001).

3.5.1 Změny v receptorech pro TGF β

Gen pro receptor typu II leží na chromozomu 3 krátkého raménka. Právě ztráta heterozygoty v této oblasti je často pozorována u karcinomu plic a žaludku. (Tani *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 1998). Gen pro T β RII obsahuje v exonu 3 specifické polyadeninové opakování, které se označuje BAT-RII (big adenin tract in receptor type II). Právě mutace v této konkrétní oblasti bývá spojována s některými typy rakoviny. Konkrétně dochází ke vložení nebo delecii adeninových bází, což má za následek vznik receptoru postrádajícího transmembránovou doménu nebo intracelulární serin/threonin kinasovou doménu. Mutace BAT-RII byly identifikovány ve vysoké četnosti u karcinomu tlustého střeva, žaludku, mozku, žlučových cest a nemalobuněčného karcinomu plic (Markowitz *et al.*, 1995; Myeroff *et al.*, 1995; Izumoto *et al.*, 1997; Nagai *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000). Další změna, která se velmi často u nádorů vyskytuje, je ztráta exprese T β RII. Je pozorována téměř v polovině případů nemalobuněčného karcinomu plic a karcinomu močového měchýře (Zhang *et al.*, 2004; Tokunaga *et al.*, 1999). V menší míře se pak také vyskytuje u karcinomu hlavy a krku, jícnu, prostaty, prsu a vaječníků (Wang *et al.*, 1997; Garrigue-Antar *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1996; Gobbi *et al.*, 2000; Lynch *et al.*, 1998). Příčinou deficitu T β RII je metylace promotoru v jeho genu (Zhang *et al.*, 2004). Při tomto procesu dochází k navázání metylové skupiny na cytosinové báze nacházející se v sousedství guaninů. Tyto úseky se označují CpG ostrůvky, které se hojně nacházejí právě

v oblastech promotorů genů. Metylace promotorové sekvence pak zabraňuje expresi genu inhibicí vazby transkripčního faktoru (Lipská, Vysokai *et al.*, 2009; Klener, 2010).

Mutace genu pro T β RI byla také u některých nádorů zaznamenána, i když s velmi nízkou frekvencí. Prvním případem je stejně jako u T β RII mutace genu, která způsobí vznik proteinu postrádajícího transmembránovou doménu nebo intracelulární serin/threonin kinasovou doménu. Tento defekt byl zaznamenán u některých karcinomů vaječníku, prsu, hlavy a krku (Wang *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2001). Oproti těmto změnám, které se vyskytují poměrně zřídka, dochází také úplné ztrátě exprese T β RI. Tato změna byla nalezena u více jak poloviny testovaných karcinomů hlavy a krku a žaludku (Fukai *et al.*, 2003; Ito *et al.*, 1992). V menší míře také u karcinomu močového měchýře a prostaty. Důvodem ztráty exprese je také metylace promotoru (Tokunaga *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1996).

3.5.2 Změny v proteinech SMAD

Proteiny SMAD jsou pro signalizaci TGF β nezbytné. Jsou složeny přibližně z 500 aminokyselin a obsahují dvě konzervované oblasti a jednu spojovací oblast. Jednou z konzervovaných oblastí je MH1 (Mad-homology 1), která se nachází na N-terminální doméně proteinu a jedná se o DNA vazebnou oblast. Spojovací oblast obsahuje místo, kde dochází k fosforylaci. Druhá konzervovaná oblast se nachází na C-terminální doméně, která se označuje jako MH2. Tato oblast odpovídá za tvorbu SMADs komplexů (Shi *et Massagué*, 2003).

SMAD4 se ještě v cytoplazmě váže do komplexu se SMAD2/3, který putuje do jádra, kde nasedá na DNA a ovlivňuje transkripci cílových genů. Gen pro protein SMAD4 leží na chromozomu 18 dlouhého raménka. Ztráta heterozygosity v této oblasti je ve vysoké frekvenci spojována s karcinomem slinivky břišní, žaludku, tlustého střeva a nemalobuněčným karcinomem plic (Hahn *et al.*, 1995; Thiagalingam *et al.*, 1996; Nagatake *et al.*, 1996). Nejčastěji dochází k mutaci konkrétně v MH2 oblasti (Mad-homology), která je odpovědná za vazbu s proteiny SMAD2/3 (Shi *et al.*, 1997).

Gen pro SMAD2 také leží na chromozomu 18 dlouhého raménka. K mutacím tohoto genu dochází velmi zřídka (Maliekal *et al.*, 2003). Gen pro SMAD3 leží na chromozomu 15 dlouhého raménka. Mutace tohoto genu nebyla v nádorových buňkách identifikována (Han *et al.*, 2004).

3.5.3 Změny v antagonistech signální dráhy TGFβ

Je známo několik přirozených endogenních inhibitorů TGFβ signální dráhy. Patří mezi ně SMAD7, Smurf2 a proteiny Ski a SnoN. Zvýšená exprese těchto složek inhibuje tumor supresivní funkci TGFβ. Tato nadměrná exprese byla zjištěna u některých typů lidských nádorů (Levy *et al.*, 2006).

Inhibiční protein SMAD7 se od ostatních SMAD proteinů strukturně liší zvláště v N-terminální části molekuly. Tento přirozený inhibitor se váže na aktivovaný komplex SMAD2/3 a kompetuje tak se SMAD4 (Shi *et al.*, 2003). Gen pro protein SMAD7 leží na chromozomu 18 dlouhého raménka. Zvýšená exprese toho proteinu je spojována s progresí karcinomu tlustého střeva, dělohy a štítné žlázy (Boulay *et al.*, 2001; Dowdy *et al.*, 2005; Cerutti *et al.*, 2003).

V případě Smurf2 se jedná o ubiquitinační lipázu cílenou na protein SMAD2. Její inhibiční účinek spočívá v připojení k proteinu SMAD2 a jeho ubiquitinaci s následnou degradací v proteasomu (Lin *et al.*, 2000). Nadměrná exprese tohoto přirozeného antagonisty TGFβ signální dráhy byla zaznamenána u některých karcinomů. Zejména se jedná o karcinom jícnu (Fukuchi *et al.*, 2002).

Ski a SnoN proteiny se řadí také mezi negativní regulátory TGFβ signalizace. Interagují jednak s proteiny SMAD2/3 skrze jejich N-terminální doménu, tak také s proteinem SMAD4, čím brání SMADs komplexu aktivovat transkripci cílových genů. Vzhledem k jejich inhibičním účinkům, může vysoká hladina Ski a SnoN proteinů podporovat proliferaci buněk. Mnoho lidských nádorů exprimuje vysoké hladiny těchto proteinů (Luo, 2004). Konkrétně byl tento jev zjištěn u některých karcinomů prsu, jícnu, tlustého střeva a u melanomu (Zhang *et al.*, 2003; Fukuchi *et al.*, 2004; Buess *et al.*, 2004; Reed *et al.*, 2001).

3.5.4 Změny v TGFβ

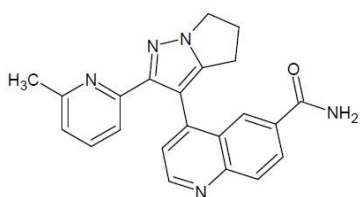
Za fyziologických podmínek TGFβ působí jako nádorový supresor a inhibuje růst buněk a vyvolává apoptózu. Avšak nádorové buňky, které mutacemi ztratily citlivost k inhibičnímu působení TGFβ na buněčný cyklus, tento protein exprimují ve zvýšeném množství a využívají jej naopak ke stimulaci buněčného růstu, angiogenezi a modulaci imunitního systému (Massagué, 2008). Zvýšená koncentrace TGFβ byla identifikována u několika typů karcinomů, jako je karcinom prsu, jater, plic, tlustého střeva, žaludku, slinivky břišní a prostaty (Walker *et al.*, 1992; Ito *et al.*, 1995; Hasegawa *et al.*, 2001; Friedman *et al.*, 1995; Saito *et al.*, 1999; Friess *et al.*, 1998; Wikstrom *et al.*, 1998).

4 INHIBITORY SIGNÁLNÍ DRÁHY TGFβ

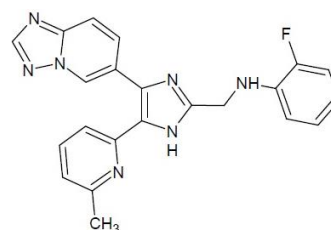
Během nádorové transformace má signalizace TGFβ dva odlišné a zcela protichůdné účinky. Zatímco v přednádorových fázích tumorogeneze působí jako nádorový supresor, kdy inhibuje růst buněk a vyvolává apoptózu, v pozdějších stádiích nádoru naopak působí jako nádorový promotor (Akhurst *et* Derynck, 2001). Jeho tumor-protektivní účinek spočívá v antiproliferativní signalizaci, ale během transformace nádorové buňky postupně ztrácí citlivost k inhibičnímu působení TGFβ a dochází ke zvýšené expresi TGFβ, kterou využívají k řízení procesů, jako je buněčná invaze, angiogeneze či regulace imunitního systému. Tato změna účinku TGFβ se objevuje i u jiných onemocnění, například u kardiovaskulárních chorob či fibrózy. Z tohoto důvodu je signální dráha TGFβ považována za farmakologicky a terapeuticky ovlivnitelnou. Velkou výhodou je právě skutečnost, že inhibitory signalizace TGFβ nevykazují cytotoxické účinky u buněk *in vitro*, ale zasahují na cílové vlastnosti nádoru, které jsou nutné pro jeho progresi (Akhurst *et* Hata, 2012). Selektivní inhibice signální dráhy TGFβ je možná na několika úrovních. Jednou z nich je inhibice kinasové domény TβRI pomocí malých molekul. Interakce TGFβ–receptor může být inhibována pomocí protilátek. Alternativou může být inhibice na úrovni mRNA, což umožňují antisense oligonukleotidy (ASO) (Herbertz *et al.*, 2015).

4.1 Malé molekuly

Tato skupina představuje velkou a různorodou skupinu chemických látek, které jsou navrženy tak, aby zablokovaly aktivaci signální kaskády vazbou na kinasovou oblast receptoru typu I (ALK5). Podle základní chemické skupiny můžeme inhibitory ALK5 rozdělit do tří různých chemických strukturních skupin, které sdílejí několik společných vazebných interakcí s ALK5 kinasou, jedná se o pyrazolové deriváty, di- nebo triimidazoly a triazoly (Bonafoux *et* Lee, 2009). Ze skupiny pyrazolových derivátů je nyní ve druhé fázi klinického zkoušení galunisertib (Obr. 5) na karcinom jater, slinivky břišní a glioblastom. Další látkou, která by mohla být klinicky aplikována je látka s označením EW-7197 (Obr. 6), která je v první fázi (Herbertz *et al.*, 2015).



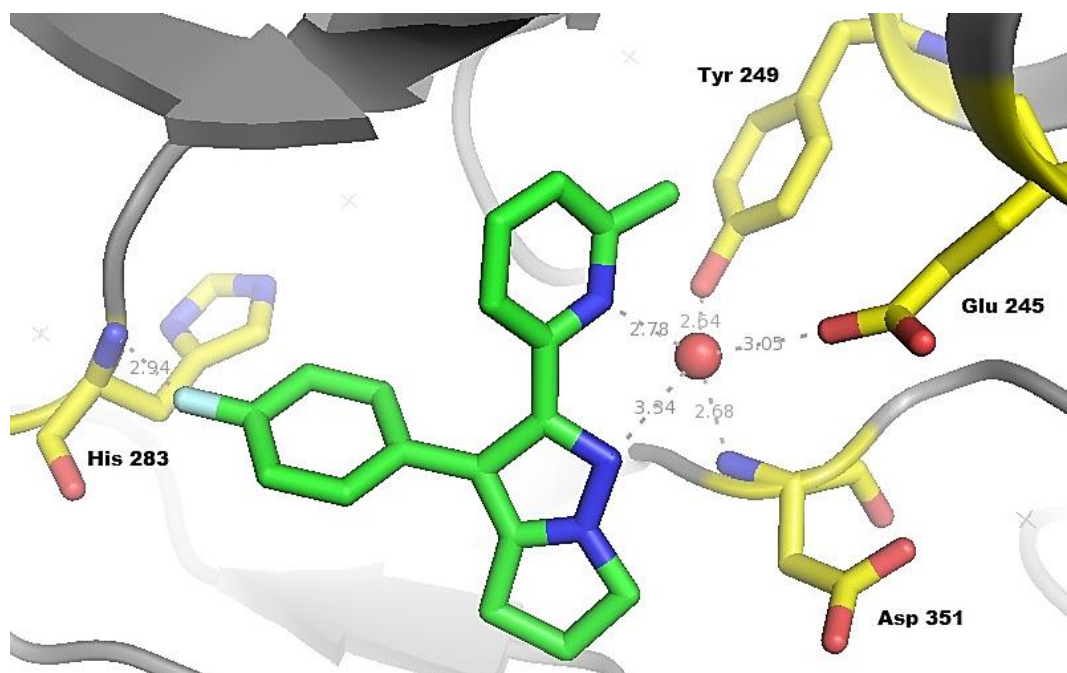
Obr. 5 : Chemická struktura galunisertibu



Obr. 6 : Chemická struktura EW-7197

Jsou známy dva klíčové strukturální rysy těchto látek. Prvním z nich je přítomnost 2-pyridylové skupiny, která je umístěna v hydrofobní kapse. V tomto místě je skupina zapojena do vodíkových vazeb, na kterých se podílí postranní aminokyselinové řetězce Tyr249, Glu245 a Asp351 (Obr. 7). Druhým rysem je substituovaná aromatická skupina, jako je p-fluorofenylová nebo p-hydroxyfenylová skupina. Může se také jednat o heteroarylovou skupinu. Tyto skupiny vytvářejí vodíkovou vazbu s postranním řetězcem His283 (Sawyer *et al.*, 2003; Sawyer *et al.*, 2004) (Obr. 7). Hlavní interakcí je tedy hydrofobní ATP vazebná kapsa ALK5 kinasy, čímž dochází k inhibici fosforylace SMAD2.

Seznam látek z této skupiny se neustále rozrůstá o nové sloučeniny, které by se mohly stát účinnými léčivy, ale zatím se nacházejí v preklinických fázích (Herbertz *et al.*, 2015). Tyto skupiny látek mají několik výhod, především se jedná o stabilitu a možnosti podání orální cestou. Mají krátký poločas, což by umožňovalo jejich rychlé vysazení v případě objevení nežádoucích účinků (Saunier *et al.*, 2006). Pirfenidon je prozatím jediným schváleným léčivem této skupiny. Je zřejmé, že tlumí proliferaci fibroblastů, tvorbu proteinů spojených s fibrózou, zvýšenou biosyntézu a akumulaci extracelulární matrix v reakci na cytokinové růstové faktory, jako je například transformující růstový faktor beta a lidský destičkový růstový faktor, avšak přesný mechanismus účinku nebyl doposud zcela objasněn. Jeho klinickou indikací je plicní fibróza (Zhou *et al.*, 2005).



Obr. 7: Schéma vazebného místa ALK5 s navázaným pyrrolo[1,2-*b*]pyrazolovým inhibítorem (2004, *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 14: 3581-3584)

4.2 Monoklonální protilátky, antisense oligonukleotidy, vakcíny

Monoklonální protilátky jsou považovány za vysoce specifické a selektivní. Jejich další výhodou je farmakokinetická stabilita, což znamená, že tyto látky mohou být podávány v delším časovém rozpětí. Jedny z prvních klinicky testovaných byly lerdelimumab a metelimumab. Lerdelimumab je monoklonální protilátka proti TGF β 2, která neprošla třetí fází klinického testování a studie byla proto ukončena. Podobně na tom byl i metelimumab, monoklonální protilátka proti TGF β 1, přičemž u něj došlo k přerušení studie již po první fázi (Bonafoux *et al.*, 2009). Nyní je ve druhé fázi klinického testování fresolimumab, monoklonální protilátka proti TGF β 1/2. Tato látka byla původně vyvinuta pro léčbu renální fibrózy, ale nyní probíhá testování i u jiných onemocnění. Oproti nízkomolekulárním inhibitorům se předpokládá, že inhibitory T β R ze skupiny monoklonálních protilátek budou mít nižší toxicitu díky vyšší specifitě. Na druhou stranu, jejich velkou nevýhodou je fakt, že protilátka může být rozpoznána jako tělu cizí a s tím souvisí vznik možných nežádoucích reakcí (Herbertz *et al.*, 2015).

Další možností, jak zablokovat signalizaci TGF β , je použití antisense oligonukleotidů (ASO). Podstata mechanismu účinku je, že ASO jsou zrcadlovou kopií části mRNA, na kterou se naváží a znemožní její translaci a vznik příslušné bílkoviny. Prvním preparátem z této skupiny byl trabedersen, jenž blokuje produkci TGF β 2. Nadměrná exprese TGF β 2 byla zjištěna především u glioblastomu, proto byl trabedersen klinicky testován u tohoto onemocnění (Bogdahn *et al.*, 2011). Nevýhodou ASO první generace je, že pro optimální farmakologickou aktivitu je nutná aplikace přímo do nádoru. Toto byl také důvod ukončení studie s tabedersenem u glioblastomu. Nyní je ale v druhé fázi klinického zkoušení u karcinomu slinivky břišní, tlustého střeva a melanomu (Herbertz *et al.*, 2015).

Jiný přístup k blokování TGF β signalizace je založen na vakcínách. Belagenpumatucel-L je vakcína, která inhibuje syntézu TGF β 2 a je nyní ve třetí fázi klinického zkoušení. Jedná se o geneticky modifikované nádorové buňky, které po aplikaci do těla stimulují pacientův imunitní systém k útoku na nádor. Vakcína obsahuje čtyři typy ozářených buněčných linií nemalobuněčného karcinomu plic, do nichž byl transfekován gen exprimující syntetický antisense genu TGF β 2 (Giaccone *et al.*, 2015).

5 MATERIÁL A METODY

5.1 Přístroje a vybavení

V experimentální části bakalářské práce byly použity následující přístroje: flowbox s vertikálním prouděním vzduchu TC 48 (Gelaire), CO₂ inkubátor (Sanyo), mikroskop Nikon TMS (Nikon), centrifuga BR4i (Jouan), vodní lázeň, ultrazvukový homogenizátor Sonoplus HD2200 (Bandelin), UV-VIS spektrofotometr UV-1800 (Schimadzu), aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad), blotovací aparatura Mini Trans-Blot Cell (BioRad), chemiluminiscenční kamera LAS4000 (FujiFilm), fluorescenční mikroskop Olympus BX50 (Olympus).

5.2 Použité chemikálie

V experimentální části byly použity následující chemikálie: ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), ethylenglykoltetraoctová kyselina (EGTA), trypsin, kultivační médium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), dimethylsulfoxid (DMSO), penicilin, streptomycin, glutamin, aprotinin, leupeptin, dithiothreitol (DTT), fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), fluorid sodný, Nonidet P-40, akrylamid, tetramethylethylendiamin (TEMED), Triton X-100, hovězí sérový albumin (BSA) od firmy Invitrogen, Tween 20, tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) od firmy MP Biomedicals, chemiluminiscenční substráty luminol a peroxid od firmy Thermo Scientific, 2-merkapt ethanol a Ponceau S od firmy Serva, chlorid sodný, dodecylsírán sodný (SDS) a glycerol od firmy Lach-ner, dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, ethanol, chlorid draselný a chlorid sodný od firmy Penta, dihydrogenfosforečnan draselný od firmy Chemapol, formaldehyd od firmy MP Biomedicals, 4',6-diamidino-2-fenylindol dihydrochlorid (DAPI) od firmy Sigma Aldrich, FluorSave, TGFβ od firmy Peptidech.

5.3 Použité roztoky

Při experimentech bylo pracováno s následujícími roztoky:

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄ (pH = 7,4 – 7,5)

TBS: 137 mM NaCl, 20 mM TRIS (pH = 6,8)

RIPA pufr: 20 mM TRIS (pH = 7,4), 100 mM NaCl, 2 mM EGTA, 5 mM EDTA, 2 mM NaF, 0,2% Nonidet P-40 (pH = 7,4), před použitím přidán: 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin

Činidlo Bradfordové: 0,01% Coomassie Brilliant Blue, 95% ethanol, 85% kyselina fosforečná

5× SDS vzorkový pufr: 0,3 M TRIS (pH = 6,8), 10% SDS, 50% glycerol, 0,05% bromfenolová modř, 5% 2-merkaptoethanol

Elektroforetický pufr: 25 mM TRIS, 192 mM glycin, 0,1% SDS

Blotovací pufr: 25 mM TRIS, 192 mM glycin

Blokovací roztok: 5% BSA v TBS s 0,1% Tween 20

Ponceau S: 0,2% v 1% kyselině octové

5.4 Použité protilátky

V experimentální části byly použity následující protilátky:

anti-SMAD2/3 a anti-phosphoSMAD2 (Cell Signaling), anti-PCNA (Santa Cruz Biotechnology), sekundární protilátky značené kořenovou peroxidázou RAM/Px (rabbit anti-mouse) a SwAR/Px (swine anti-rabbit) od firmy Sigma Aldrich.

Při fluorescenčním barvení byla použita fluorescenčně značená sekundární protilátka Goat-anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Cell Signaling).

5.5 Použitá buněčná linie

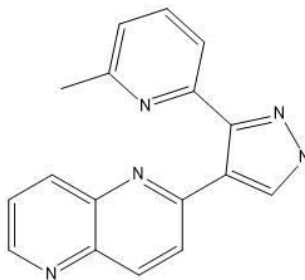
Během experimentu byla použita adherentní nádorová buněčná linie HeLa odvozená z karcinomu děložního čípku a linie BJ – lidské kožní fibroblasty.

Obě buněčné linie byly kultivovány na Petriho miskách v živném médiu DMEM s obsahem fetálního telecího séra (10 %), penicilinu (0,1 U/ml), streptomycinu (0,1 mg/ml) a L-glutaminu (0,3 mg/ml) v inkubátoru při teplotě 37 °C v atmosféře s obsahem 5 % oxidu uhličitého.

5.6 Studované inhibitory ALK5

V experimentální části bakalářské práce byly studovány biologické účinky několika vybraných substituovaných pyrrolo[1,2-b]pyrazolů připravených Mgr. Jurajem Galetou z Ústavu chemie Přírodovědecké fakulty Masarykovy Univerzity v Brně. Struktury byly Mgr. Galetou potvrzeny analýzami hmotovou spektrometrií, nukleární magnetickou rezonancí a elementární analýzou. Čistota studovaných sloučenin byla min. 99 %. Jejich struktury však vzhledem k plánované přípravě vhodné publikační formy zde nemohly být uvedeny. Jako srovnávací standard byl použit komerčně dostupný inhibitor ALK5 (Obr. 8). Sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO na koncentraci 100 mM. Tyto zásobní roztoky byly

uchovávány při teplotě 4 °C a ředěny těsně před použitím do kultivačního média tak, aby koncentrace DMSO v kultivačním médiu nepřesáhla 0,1 %.



Obr. 8: Chemická struktura standardu ALK5i II

5.7 Kultivace a ovlivnění buněčné linie

Buněčné linie HeLa a BJ byly kultivovány na Petriho miskách při teplotě 37 °C v atmosféře obsahující 5 % oxidu uhličitého. Buňky byly vysazeny v počtu 1 milion na 1 Petriho misku (100 mm), poté následovala 24 hodinová inkubace, aby došlo k přilnutí buněk ke dnu kultivační nádoby. Po inkubaci bylo v Petriho miskách vyměněno médium za médium bez obsahu fetálního telecího séra, které bylo na miskách s buňkami ponecháno 24 hodin za standardních kultivačních podmínek. Následně bylo vyměněno médium za médium, které obsahovalo naředěné testované látky v požadované koncentraci. Toto médium bylo ponecháno na miskách 30 minut. Po 30 minutách bylo do Petriho misek přidáno TGFβ v koncentraci 20 ng/ml a opět ponecháno na dobu 30 minut. Poté byly buňky připraveny na sklízení. Jako kontrola byly použity buňky, ke kterým bylo přidáno médium s odpovídajícím množstvím DMSO.

5.8 Sklizení a lyzace buněk

Pro přípravu vzorků určených pro další analýzu metodou western blotting byly buňky uvolněny ze dna kultivační nádoby pomocí škrabky a přeneseny do zkumavky. Buňky ve zkumavce byly centrifugovány 8 minut při 1000 g a teplotě 4 °C. Supernatant byl odsát a pelet opět resuspendován v 1 ml PBS. Poté následovala opět centrifugace a druhé promytí, po kterém byly buňky přeneseny do 1,5 ml mikrozkuavek a centrifugovány. Po odstranění supernatantu byly sklizené buňky uskladněny při -80 °C.

Buněčný pelet byl resuspendován v daném množství lyzačního pufru RIPA dle velikosti peletu. Buňky byly lyzovány 15 minut na ledu a během této doby byl pelet několikrát resuspendován. Poté byly buňky dále lyzovány pomocí ultrazvukového homogenizátoru (3 cykly, 10 sekund, 40% max). Resuspendované buňky v RIPA pufru

byly následně centrifugovány 25 minut při 14000 g a teplotě 4 °C. Supernatanty byly přeneseny do 0,6 ml mikrozkuvek, z nichž byla spektrofotometricky pomocí metody Bradfordové stanovena koncentrace proteinů. Pomocí RIPA pufu byla koncentrace ve všech vzorcích upravena podle nejnižší koncentrace a byl přidán 5x SDS vzorkovací pufr pro elektroforézu. Nakonec byly lyzáty denaturovány 5 minut při teplotě 95 °C a uskladněny při teplotě -20 °C.

5.9 SDS-PAGE, western blotting, imunodetekce

Proteiny byly separovány elektroforézou ve vertikálním uspořádání v 10% polyakrylamidovém gelu o pH 8,8 v kombinaci se zaostřovacím 5% gelem o pH 6,8. Pro separaci proteinů bylo použito napětí 80 V po dobu 30 minut a následně bylo napětí zvýšeno na 120 V. Separované proteiny byly přeneseny z gelu na nitrocelulózovou membránu metodou western blotting, která probíhala za stálého chlazení ledem při proudu 270 mA 3 hodiny. Poté byla membrána s proteiny ponechána v roztoku Ponceau S, aby bylo možné zkontrolovat, zda byly vzorky nanесeny rovnoměrně. Po 5 minutách byla membrána opláchnuta destilovanou vodou a usušena na filtračním papíře. Následovalo nařezání membrány dle známé hmotnosti sledovaných proteinů. Jednotlivé nařezané proužky membrány byly zcela odbarveny v TBS a inkubovány po dobu 1 hodiny v 3% roztoku BSA v TBS s 0,1% Tween 20, čímž bylo zabráněno vzniku nespecifických vazeb. Po inkubaci byly na membrány nanесeny specifické primární protilátky a ponechány přes noc při teplotě 4 °C. Následující den byly membrány promyty roztokem TBS a roztokem TBS s 0,1% Tween 20. Na membrány byly nanесeny sekundární protilátky značené kořenovou peroxidázou. Inkubace probíhala 1 hodinu při pokojové teplotě. Po uplynutí stanovené doby následovalo druhé promytí v roztoku TBS a v roztoku TBS s 0,1% Tween 20. Ke kvantitativní vizualizaci proteinů bylo nutné nanесení roztoku luminolu a peroxidu v poměru 1:1. Detekce signálu byla provedena pomocí CCD kamery LAS4000.

5.10 Fluorescenční vizualizace SMAD2/3

Buněčná linie HeLa byla kultivována v 8-jamkové mikrotitrační destičce při teplotě 37 °C v atmosféře obsahující 5 % oxidu uhličitého. Buňky byly vysazeny v počtu 50 tisíc buněk na 1 ml, poté následovala 24 hodinová inkubace, aby došlo k přilnutí buněk ke dnu mikrotitrační destičky. Po inkubaci bylo v destičkách vyměněno médium za médium bez obsahu fetálního telecího séra, buňky byly takto ponechány 24 hodin za standardních

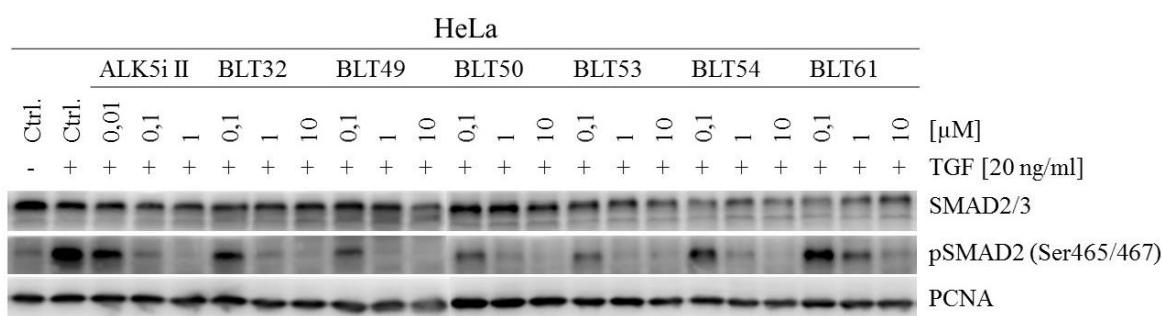
podmínek. Následně bylo vyměněno médium za médium, které obsahovalo naředěné testované látky v požadované koncentraci. Toto médium bylo ponecháno na destičkách 30 minut. Po 30 minutách byl do média přidán TGF β na koncentraci 20 ng/ml a opět ponecháno na dobu 30 minut. Po této době byly buňky připraveny na barvení. Jako kontrola byly použity buňky, ke kterým bylo přidáno médium s odpovídajícím množstvím DMSO.

V destičkách bylo odsáto médium a buňky byly propláchnuty 300 μ l PBS, proplach byl opakován celkem třikrát. Poté byly buňky fixovány přidáním 270 μ l 10% formaldehydu, který byl v destičkách ponechán 10 minut při laboratorní teplotě. Znovu následoval trojnásobný proplach buněk v PBS. Buňky byly permeabilizovány přidáním 300 μ l 0,2% tritonu X-100 v PBS, který byl ponechán v destičce 1 minutu při laboratorní teplotě. Buňky byly třikrát propláchnuty v PBS. Aby došlo k zablokování nespecifických vazeb, bylo přidáno 300 μ l 0,2% BSA v PBS po dobu 20 minut. Po uplynutí této doby byl roztok BSA odsát a byla přidána primární protilátka naředěná v 0,2% BSA v PBS (1:100), přičemž na jednu jamku destičky bylo použito 200 μ l. Inkubace primární protilátky probíhala 1 hodinu na kývačce. Po inkubaci byly buňky třikrát promyty v PBS. Poté byla přidána fluorescenčně značená sekundární protilátka naředěná v 0,2% BSA v PBS (1:250), opět 200 μ l na jednu jamku destičky. Inkubace sekundární protilátkou probíhala 1 hodinu na kývačce ve tmě. Po inkubaci následoval oplach v PBS po dobu 10 minut, opakováno třikrát. Pro zobrazení jádra bylo použito fluorescenční barvivo DAPI (10 mg/ml) vázající se na AT bohaté oblasti DNA. Toto barvivo bylo ředěno do PBS (1:500) a na jamku bylo použito 200 μ l tohoto roztoku, inkubace probíhala 20 minut na kývačce ve tmě. Po inkubaci následoval oplach v PBS, celkem třikrát. Po posledním oplachu bylo PBS odsáto a do každé jamky byla aplikována 1 kapka FluorSave. Zafixované buňky byly prohlíženy pomocí fluorescenčního mikroskopu a fotografovány.

6 VÝSLEDKY

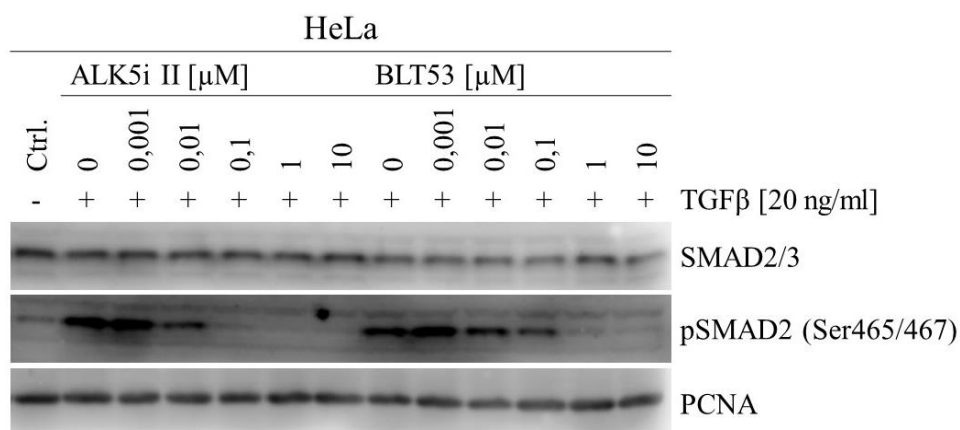
6.1 Vliv studovaných látek na fosforylaci SMAD2 v linii HeLa

Působením TGF β na buňky dochází k aktivaci podřízené signální dráhy zahrnující fosforylaci proteinů SMAD2 na serinu 465/467. Míru fosforylace SMAD2 proto lze považovat za marker aktivace signalizace řízené TGF β . Tato vlastnost byla pro ověření inhibice TGF β již několikrát použita ve studiích podobného typu jako je tato práce (*Park et al.*, 2011; *Huynh et al.*, 2011). Pro sledování vlivu testovaných sloučenin byla proto sledována fosforylace SMAD2 v buňkách HeLa metodou western blottingu a imunodetekce. Touto metodou byla nejprve testována série šesti nově syntetizovaných látek ve třech koncentracích (0,1-1-10 μ M). Jako srovnávací standard byl použit známý inhibitor (ALK5 inhibitor II). Téměř u všech látek došlo k výraznému úbytku signálu pSMAD2 v koncentraci 1 μ M. S výjimkou látky BLT61, u které byl ještě v této koncentraci signál detekován (Obr. 9).

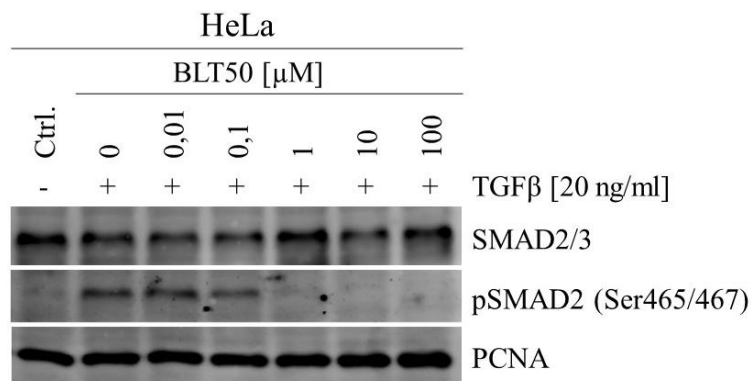


Obr. 9: Vliv nových inhibitorů a standardního inhibitoru ALK5 na fosforylaci proteinu SMAD2 v linii HeLa. Jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorků byla provedena detekce PCNA. Doba působení studovaných látek byla 1 hodina a stimulace signální dráhy pomocí TGF β 30 minut.

Pro přesnější stanovení potřebné koncentrace pro zablokování signální dráhy TGF β , bylo zvoleno větší koncentrační rozpětí. Pro toto studium byly vybrány dvě látky (BLT50 a BLT53). Jako srovnávací standard byl použit známý inhibitor (ALK5 inhibitor II). Obě studované sloučeniny (BLT50 a BLT53) byly schopny snížit fosforylaci SMAD2 již od submikromolárních koncentrací. Úplné vymizení signálu pSMAD2 však bylo pozorováno až při koncentracích od 1 μ M (Obr. 10; Obr. 11). Standardní inhibitor ALK5 snižoval hladinu pSMAD2 již při 0,01 μ M, ale k úplné ztrátě signálu došlo v 0,1 μ M koncentraci (Obr. 10).



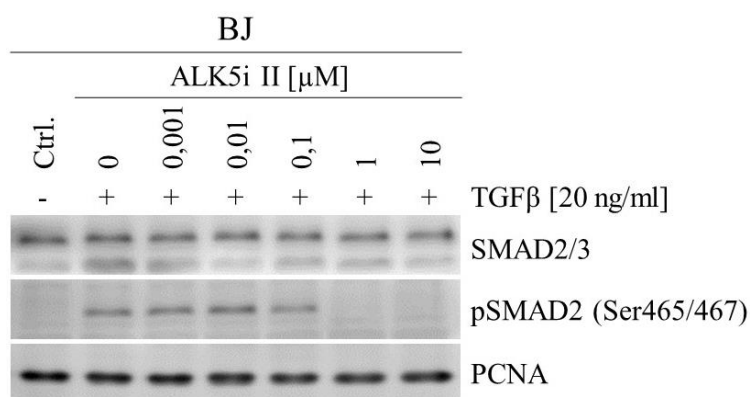
Obr. 10: Vliv BLT53 a standardního inhibitoru ALK5 na fosforylaci SMAD2 v linii HeLa. Jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorků byla provedena detekce PCNA. Doba působení studovaných látek byla 1 hodina a stimulace signální dráhy pomocí TGF β 30 minut.



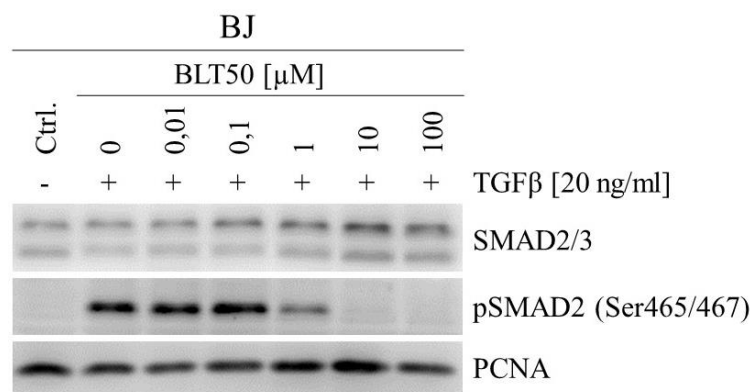
Obr. 11: Vliv BLT50 na fosforylaci SMAD2 v linii HeLa. Jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorků byla provedena detekce PCNA. Doba působení studovaných látek byla 1 hodina a stimulace signální dráhy pomocí TGF β 30 minut.

6.2 Vliv studovaných látek na fosforylaci SMAD2 v linii BJ

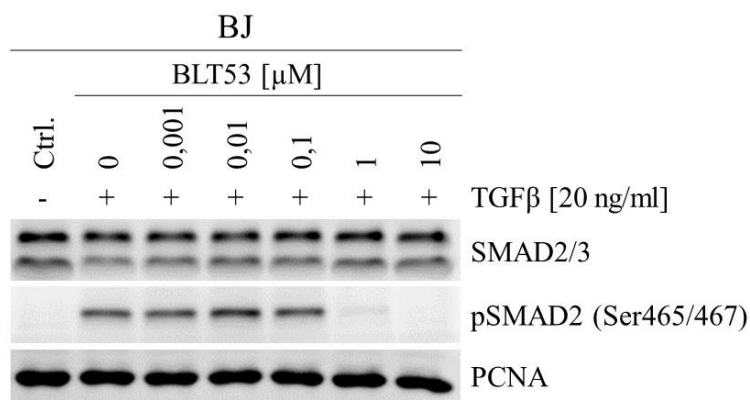
Pro sledování vlivu testovaných sloučenin v buňkách BJ byla sledována fosforylace SMAD2 stejnou metodou. Testována byla účinnost dvou nových sloučenin (BLT50 a BLT53) a jako srovnávací standard byl použit známý inhibitor (ALK5 inhibitor II). Dostačující koncentrace pro inhibici fosforylace SMAD2 standardem byla 1 μ M (Obr. 12). Při použití látky BLT50 v koncentraci 1 μ M byl signál ještě zaznamenán, i když již slabší. K úplnému vymizení signálu došlo až u koncentrace 10 μ M (Obr. 13). U látky BLT53 byla zaznamenána dostačující inhibiční koncentrace již při použití 1 μ M roztoku (Obr. 14).



Obr. 12: Vliv ALK5i II na fosforylaci proteinu SMAD2 v linii BJ. Jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorků byla provedena detekce PCNA. Doba působení studovaných látek byla 1 hodina a stimulace signální dráhy pomocí TGF β 30 minut.



Obr. 13: Vliv BLT50 na fosforylaci proteinu SMAD2 v linii BJ. Jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorků byla provedena detekce PCNA. Doba působení studovaných látek byla 1 hodina a stimulace signální dráhy pomocí TGF β 30 minut.

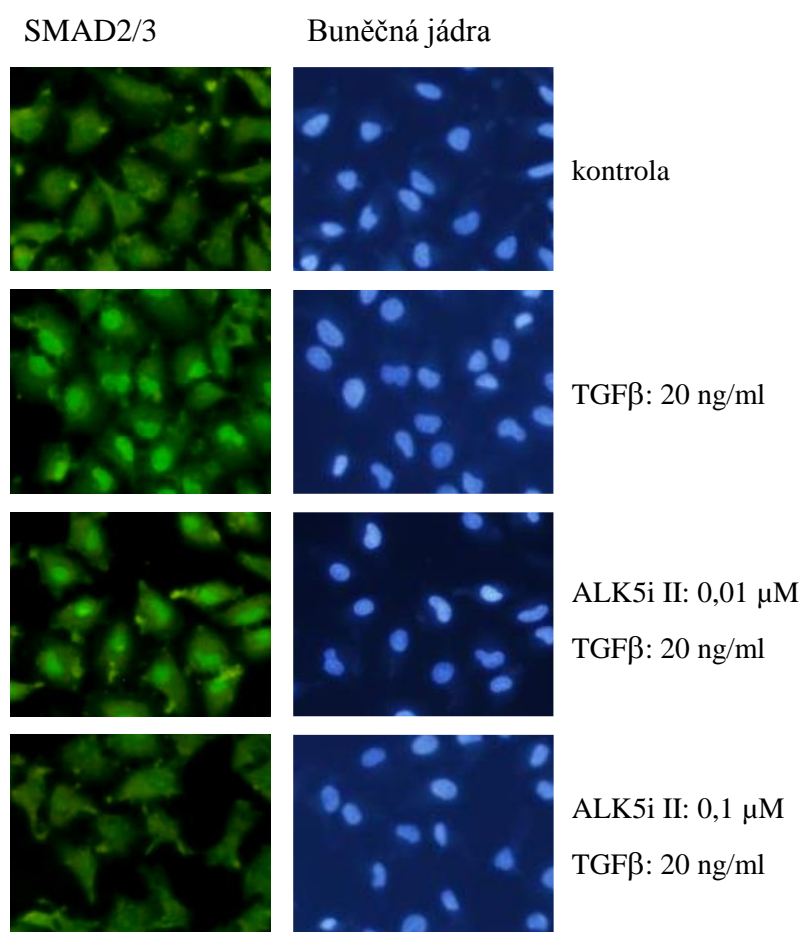


Obr. 14: Vliv BLT53 na fosforylaci proteinu SMAD2 v linii BJ. Jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorků byla provedena detekce PCNA. Doba působení studovaných látek byla 1 hodina a stimulace signální dráhy pomocí TGF β 30 minut.

6.3 Vliv studovaných látek na lokalizaci SMAD2/3 v linii HeLa

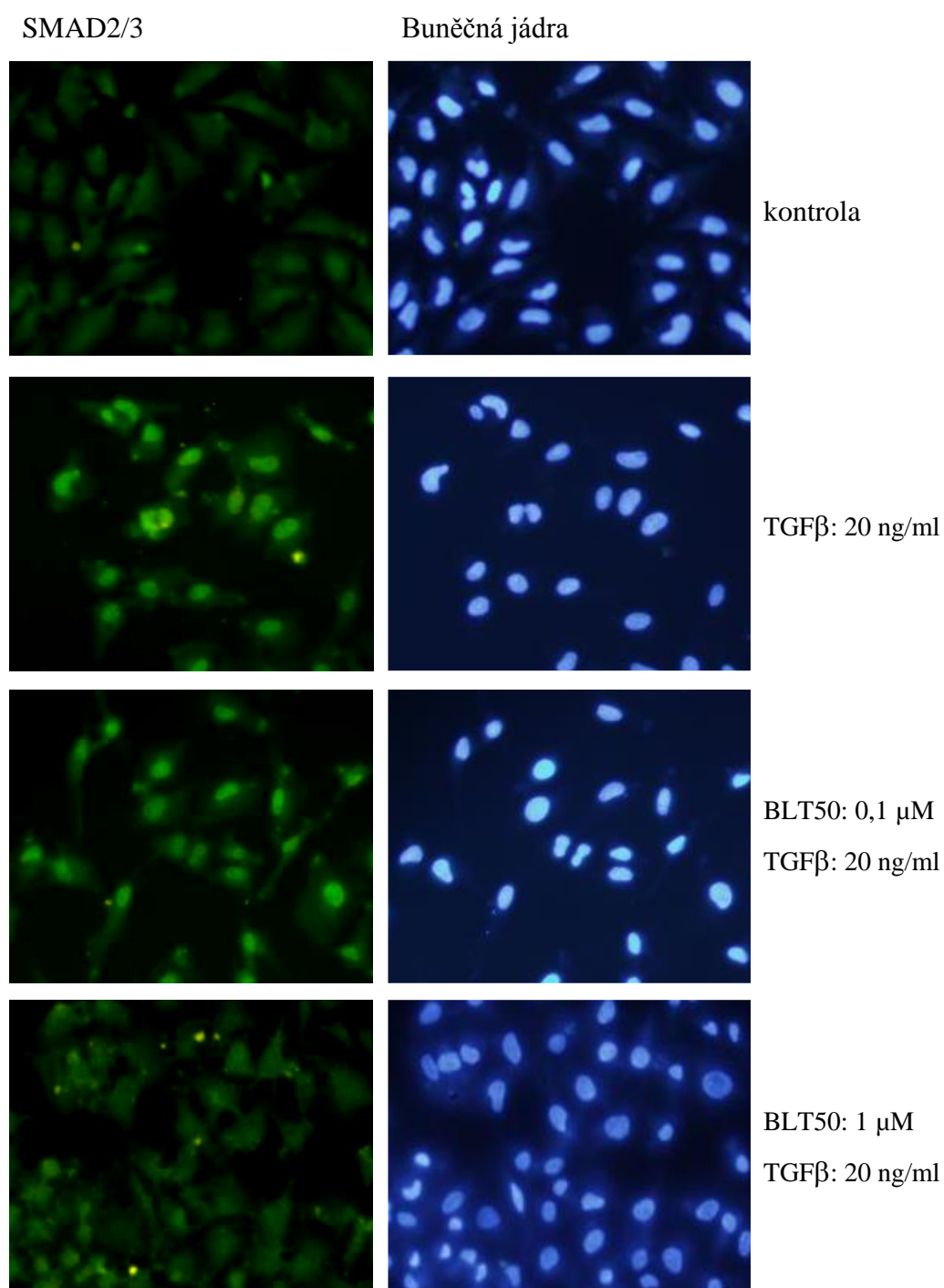
Pokud není signální dráha TGF β aktivována, proteiny SMAD2/3 se nachází převážně v cytoplasmě. Fosforylace SMAD2 stimuluje asociaci SMAD2/3 s proteinem SMAD4 a následnou relokací do jádra, kde tento komplex funguje jako transkripční faktor. Pro zjištění účinné koncentrace studovaných inhibitorů byla sledována lokalizace proteinů SMAD2/3 pomocí fluorescenčního mikroskopu v buněčné linii HeLa. Detekce proběhla na základě použití fluorescenčně značené sekundární protilátky. Pro sledování morfologie buněčného jádra bylo použito fluorescenční barvivo DAPI. Srovnávací experiment byl proveden se standardním inhibitorem (ALK5 inhibitor II).

První testovanou látkou byl standardní inhibitor ALK5. Zatímco v kontrolních buňkách byl fluorescenční signál SMAD2/3 slabý a rozptýlený v cytoplazmě, v buňkách stimulovaných TGF β došlo k výraznému nárůstu intenzity fluorescenčního signálu a k jeho nahromadění v buněčném jádře. U buněk, které byly ovlivněny standardním inhibitorem ALK5 v koncentraci 0,01 μ M lze stále pozorovat signál SMAD2/3 v jádře. Teprve 0,1 μ M koncentrace způsobí zablokování jaderné lokalizace (Obr. 15).



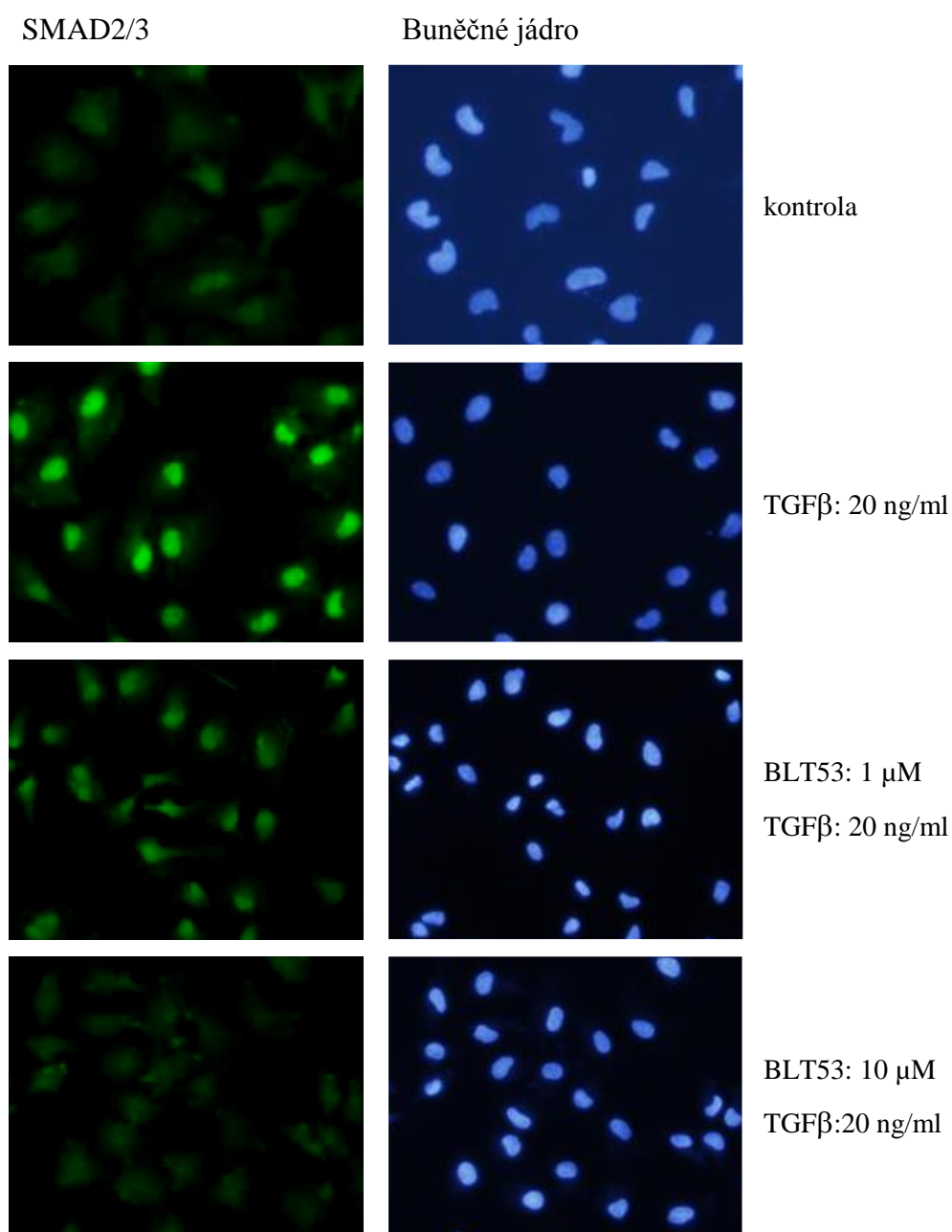
Obr. 15: Imunofluorescenční detekce proteinu SMAD2/3 v buněčné linii HeLa. Srovnání kontrolních buněk a buněk po ovlivnění látkou ALK5i II (1 hod.) a TGF β (30 min.). Buněčná jádra byla obarvena DAPI.

Další látkou, u které byl pozorován vliv na lokalizaci SMAD2/3, byla látka s označením BLT50. Dostatečná koncentrace pro zablokování jaderné lokalizace SMAD2/3 byla 1 μM (Obr. 16).



Obr. 16: Imunofluorescenční detekce proteinu SMAD2/3 v buněčné linii HeLa. Srovnání kontrolních buněk a buněk po ovlivnění látkou BLT50 (1 hod.) a TGFβ (30 min.). Buněčná jádra byla obarvena DAPI.

Následně byl testován vliv na lokalizaci proteinů SMAD2/3 v buňkách ovlivněných látkou BLT53. V kontrolních (neovlivněných) buňkách byl opět fluorescenční signál SMAD2/3 slabý a rozptýlený v cytoplazmě, v buňkách stimulovaných TGF β došlo k výraznému nárůstu intenzity signálu a k jeho nahromadění v jádře. Při použití BLT53 v 1 μ M koncentraci byl ještě stále pozorován signál SMAD2/3 v jádře, avšak již s nižší intenzitou. U buněk, které byly ovlivněny BLT53 v koncentraci 10 μ M, lze vidět stejný fluorescenční signál jako u kontrolních buněk. Signální dráha TGF β byla tedy v této koncentraci zablokována (Obr. 17).



Obr. 17: Imunofluorescenční detekce proteinu SMAD2/3 v buněčné linii HeLa. Srovnání kontrolních buněk a buněk po ovlivnění látkou BLT53 (1 hod.) a TGF β (30 min.). Buněčná jádra byla obarvena DAPI.

7 DISKUZE

TGF β signální dráha je zapojena jak ve fyziologických, tak v patologických stavech, ale dosavadní preklinické i klinické experimenty naznačují, že její inhibice může mít významný farmakologický potenciál (Zhang *et al.*, 2014). Cílem této bakalářské práce bylo prostudovat vliv několika nově syntetizovaných a zatím nepublikovaných nízkomolekulárních inhibitorů signalizace TGF β na buněčné linie HeLa a BJ. Konkrétně se jednalo o substituované pyrrolo[1,2-b]pyrazoly, připravené Mgr. Jurajem Galetou (Masarykova Univerzita, Brno) jako analoga známých inhibitorů ALK5 (Sawyer *et al.*, 2004; Callahan *et al.*, 2002; Bueno *et al.*, 2008). Schopnost těchto sloučenin inhibovat enzymatickou aktivitu ALK5 byla zjištěna pomocí kinetických experimentů s rekombinantním purifikovaným enzymem, přičemž inhibiční konstanty IC₅₀ se pohybovaly v řádu desítek až stovek nM (ústní sdělení, Kryštof, 2016)

Pro ověření účinku těchto sloučenin v buněčném systému byly v této práci použity dvě metody, a to western blotting s imunodetekcí a imunofluorescenční lokalizace. Inhibice receptorové kinasy ALK5 byla ověřena sledováním fosforylace SMAD2, který je touto kinasou přímo fosforylován. Se zvyšující se koncentrací testovaných látek v obou buněčných liniích dochází ke ztrátě signálu pSMAD2. Absence fosforylovaného proteinu SMAD2 při působení vyšších koncentrací látek je způsobena zablokováním vazebného místa ATP na receptoru ALK5, což znemožní přes fosfátové skupiny na protein SMAD2 (Nyati *et al.*, 2011). Jako standard byl použit komerčně dostupný pyrazolový derivát s označením ALK5i II (IC₅₀=18 nM), který také vykazuje inhibici receptorové kinasy ALK5 (Gellibert *et al.*, 2004). Pomocí imunoblottingu byla nejprve testována celá série nově syntetizovaných látek, včetně standardu ALK5i II, a to ve třech koncentracích v linii HeLa. Všechny sloučeniny výrazně zeslabovaly signál pSMAD2 v koncentraci 1 μ M, pouze látka BLT56 v této koncentraci nebyla schopna fosforylaci SMAD2 potlačit.

Pro detailnější studium byly vybrány látky BLT50 a BLT53, spolu se standardem. Opět byl studován jejich vliv na fosforylaci proteinu SMAD2 metodou imunoblottingu, přičemž bylo zvoleno větší koncentrační rozpětí. Studovaná látka BLT53 způsobuje ztrátu signálu pSMAD2 v obou liniích od koncentrace 1 μ M. Stejných výsledků dosahuje i druhá testovaná látka (BLT50) v linii HeLa, ale v linii BJ je její účinnost přibližně desetkrát nižší. U standardu ALK5i II byla inhibice zaznamenána již v koncentraci 0,1 μ M, což odpovídá dříve publikovaným výsledkům (Gellibert *et al.*, 2004). Pro kontrolu byla analyzována také celková hladina proteinu SMAD2/3, která by se neměla měnit, protože testované sloučeniny neovlivňují ani translaci SMAD2/3, ani jeho stabilitu.

Obě nové látky (BLT50 a BLT53) vykazují srovnatelný vliv na fosforylaci SMAD2 jako jiné inhibitory ALK5. U látky podobného typu s označením SB431542 byla detekována hladina pSMAD2, přičemž požadované účinnosti nedosahovala při nižší koncentraci než 5 μM (Inman *et al.*, 2002; Nyati *et al.*, 2011). Také látka s označením LY2157299 (klinicky testovaný preparát, vyvíjený pod názvem galunisertinib) nezpůsobovala inhibici fosforylace SMAD2 při koncentraci nižší než 5 μM (Bhola *et al.*, 2013). Na druhou stranu EW7197, další preparát v preklinických studiích, vykazuje lepší účinnost – k potlačení fosforylace SMAD2 dochází již v koncentraci od 50 nM (Son *et al.*, 2014). Poměrně velké rozdíly v aktivních koncentracích u zmiňovaných látek mohou být způsobeny rozdílnými experimentálními podmínkami, neboť je nutno vzít v potaz, že dané látky nebyly testovány na stejných buněčných liniích.

Dále byl studován vliv látek na lokalizaci SMAD2/3 v buněčné linii HeLa. Pokud není SMAD2 fosforylován, nedochází k přesunu komplexu SMAD2/3 do buněčného jádra. Lokalizaci proteinů na buněčné úrovni lze studovat pomocí fluorescenčně značených protilátek mikroskopicky (Xu *et al.*, 2012). Tato metoda byla také použita v podobných studiích zabývajících se nízkomolekulárními inhibitory ALK5 (Son *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2011). Pro toto studium byly vybrány opět dvě látky (BLT50 a BLT53), spolu se standardem ALK5i II. Látka BLT50 blokuje translokaci SMAD2/3 do jádra v koncentraci 1 μM . U látky BLT53 byl pozorován týž účinek až při desetkrát vyšší koncentraci, tedy 10 μM . Výrazně silnější standardní inhibitor ALK5 vykazoval negativní vliv na translokaci SMAD2/3 již při 0,1 μM koncentraci, což koreluje s výsledky získané imunoblottingem i dříve publikovanými výsledky (Gellibert *et al.*, 2004). Kromě fluorescenčně značené sekundární protilátky proti SMAD2/3 bylo použito barvivo DAPI, které se váže na DNA, čímž je možné sledovat jadernou morfologii (Chazotte, 2011). Ani u jedné z testovaných látek nebyla zjištěna výrazná změna tvaru a velikosti buněčného jádra, nebyl pozorován ani nárůst intenzity fluorescenčního signálu DAPI, který by mohl naznačovat vliv na viabilitu buněk.

Pro další studium těchto látek by bylo vhodné i ověření inhibice genové exprese řízené signální dráhou TGF β . Tento experiment byl proveden některými inhibitory ALK5. V těchto studiích byly různé nádorové buněčné linie transfekovány plasmidem 3TP-Lux, který obsahuje promotorovou sekvenci aktivovanou signalizací TGF β , za níž následuje reportérový gen kódující luciferasu. Produkce luciferázy odpovídá aktivaci nebo inhibici signální dráhy aktivované TGF β (Son *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2011).

8 ZÁVĚR

Pomocí dvou metod byly určeny některé biologické účinky šesti nových pyrrolo[1,2-b]pyrazolových inhibitorů ALK5 v buněčné linii HeLa a BJ. Jednalo se o látky s označením BLT32, BLT49, BLT50, BLT53, BLT54 a BLT61. Pro srovnání byl také testován standardní inhibitor ALK5.

Z výsledků vyplývá, že všechny látky vykazují inhibiční efekt na signální dráhu TGF β . Při studiu fosforylace proteinu SMAD2 došlo téměř u všech látek k zablokování fosforylace SMAD2 při koncentraci 1 μ M. Bližší studium bylo provedeno s látkou BLT50 a BLT53, spolu se standardem ALK5i II, kdy byl sledován jejich vliv na lokalizaci proteinového komplexu SMAD2/3 v buněčné linii HeLa. U obou nových látek dochází ve vyšších koncentracích ke ztrátě akumulace tohoto komplexu v jádře. Přičemž u látky BLT50 byl pozorován silnější účinek, neboť dostačující koncentrace pro zablokování jaderné lokalizace SMAD2/3 byla 1 μ M. Pro látku BLT53 je nutná 10 μ M koncentrace. Pro látku ALK5i II byla stanovena účinná koncentrace na 0,1 μ M.

Účinnosti studovaných sloučenin jsou podobné nebo nižší, než účinnosti preparátů vyvíjených pro farmakologické účely. Pro zvýšení aktivity proto bude pravděpodobně nutné struktury dále modifikovat.

9 SEZNAM LITERATURY

- Akhurst, R. J., Derynck, R. (2001): TGF-beta signaling in cancer - a double-edged sword. *Trends in cell biology* 11(11): 44–51.
- Akhurst, R. J., Hata, A. (2012). Targeting the TGF β signalling pathway in disease. *Nature Reviews Drug Discovery* 11(10): 790–811.
- Alberts, B. (2002). *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science.
ISBN 0-8153-3218-1.
- Andrae, J., Gallini, R., Betsholtz, C. (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes & Development* 22: 1276–1312.
- Andres, J. L., Rönstrand, L., Cheifetz, S., Massagué, J. (1991). Purification of the transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteoglycan betaglycan. *The Journal of biological chemistry* 266(34): 23282–23287.
- Andres, J. L., Stanley, K., Cheifetz, S., Massague, J. (1989). Membrane-anchored and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor- β . *Journal of Cell Biology* 109(6): 3137–3145.
- Anzano, M. A., Roberts, A. B., Meyers, C. A., Smith, J. M., Sporn, M. B. (1982). Communication: Synergistic Interaction of Two Classes of Transforming Growth Factors from Murine Sarcoma Cells. *Cancer research* 42: 4776–4778.
- Assoian, R. K., Komoriya, A., Meyers, A., Miller, D. M., Sporn, M. B. (1983). Transforming Growth Factor in Human Platelets. *The Journal of Biological Chemistry* 258(11): 7155–7160.
- Attisano, L., Wrana, J. L. (2002). Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 296(5573): 1646–1647.
- Attisano, L., Wrana, J. L., López-Casillas, F., Massagué, J. (1994). TGF-beta receptors and actions. *Biochimica et biophysica acta* 1222(1): 71–80.
- Bhola, N. E., Balko, J. M., Dugger, T. C., Kuba, M. G., Sanches, V., Sanders, M., Stanford, J., Cook, R. S., Arteaga, C. L. (2013). TGF- β Inhibition enhances chemotherapy action against triple-negative breast cancer. *The Journal of Clinical Investigation* 123(3): 1348-1358
- Bogdahn, U., Hau, P., Stockhammer, G., Venkataramana, N. K., Mahapatra, A. K., Suri, A., Balasubramaniam, A., Nair, S., Oliushine, V., Parfenov, V., Poverennova, I., Zaaroor, M., Jachimczak, P., Ludwig, S., Schmaus, S., Heinrichs, H., Schlingensiepen, K. H. (2011). Targeted therapy for high-grade glioma with the TGF- β 2 inhibitor trabedersen: results of a randomized and controlled phase IIb study. *Neuro-Oncology* 13(1): 42–132.
- Bonafoux, D., Lee, W. (2009). Strategies for TGF- β modulation: a review of recent patents. *Expert Opinion* 19(12): 1759–1769.

- Boulay, J. L., Mild, G., Reuter, J., Lagrange, M., Terracciano, L., Lowy, A., Laffer, U., Orth, B., Metzger, U., Stamm, B., Martinoli, S., Herrmann, R., Rochlitz, C. (2001). Combined copy status of 18q21 genes in colorectal cancer shows frequent retention of SMAD7. *Genes Chromosomes and Cancer* 31(3): 240–247.
- Bueno, L., de Alwis, D. P., Pitou, C., Yingling, J., Lahn, M., Glatt, S., Trocóniz, I. F. (2008). Semi-mechanistic modelling of the tumour growth inhibitory effects of LY2157299, a new type I receptor TGF- β kinase antagonist, in mice. *European Journal of Cancer* 44(1): 142–150.
- Buess, M., Terracciano, L., Reuter, J., Ballabeni, P., Boulay, J. L., Laffer, U., Metzger, U., Herrmann, R., Rochlitz, C. (2004). Amplification of SKI is a prognostic marker in early colorectal cancer. *Neoplasia* 6(3): 207–212.
- Callahan, J. F., Burgess, J. L., Fornwald, J. a, Gaster, L. M., Harling, J. D., Harrington, F. P., Heer, J., Kwon, CH., Lehr, R., Mathur, A., Olson, B. A., Weinstock, J., Laping, N. J. (2002). Identification of novel inhibitors of the transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) type 1 receptor (ALK5). *Journal of medicinal chemistry* 45(5): 999–1001.
- Cerutti, J. M., Ebina, K. N., Matsuo, S. E., Martins, L., Maciel, R. M. B., Kimura, E. T. (2003). Expression of Smad4 and Smad7 in human thyroid follicular carcinoma cell lines. *Journal of Endocrinological Investigation* 26(6): 516–521.
- Cibula, D., Petruželka, L. (2009). *Onkogynekologie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2665-6
- Cohen, P. (2002). Protein kinases - the major drug targets of the twenty-first century? *Nature reviews. Drug discovery*, 1: 309–315.
- Dar, A. C., Shokat, K. M. (2011). The evolution of protein kinase inhibitors from antagonists to agonists of cellular signaling. *Annual review of biochemistry* 80: 769–795.
- de Larco, J. E., Todaro, G. J. (1976). Transformation by murine and feline sarcoma viruses specifically blocks binding of epidermal growth factor to cells. *Nature* 264: 26-30
- de Larco, J. E., Todaro, G. J. (1978). Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75(8): 4001–4005.
- de Martin, R., Haendler, B., Hofer-Warbinek, R., Gaugitsch, H., Wrann, M., Schlüsener, H., Seifert, J. M., Bodmer, S., Fontana, A., Hofer, E. (1987). Complementary DNA for human glioblastoma-derived T cell suppressor factor, a novel member of the transforming growth factor- β gene family. *The EMBO journal* 6(12): 3673–3677.
- Derynck, R., Akhurst, R. J. (2007). Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease. *Nature cell biology* 9(9): 1000–1004.
- Derynck, R., Akhurst, R. J., Balmain, A. (2001). TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature genetics* 29(2): 117–129.

- Derynck, R., Lindquist, P. B., Lee, A., Wen, D., Tamm, J., Graycar, J. L., Rhee, L., Mason, A. J., Miller, D. A., Coffey, R. J., Moses, H. L., Chen, E. Y. (1988). A new type of transforming growth factor- β , TGF- β 3. *The EMBO journal* 7(12): 3737–43.
- Derynck, R., Miyazono, K. (2008). TGF- β and the TGF- β Family. *The TGF- β Family* 29–43.
- Dowdy, S. C., Mariani, A., Reinholz, M. M., Keeney, G. L., Spelsberg, T. C., Podratz, K. C., Janknecht, R. (2005). Overexpression of the TGF- β antagonist Smad7 in endometrial cancer. *Gynecologic oncology* 96(2): 368–373.
- Druker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G. M., Fanning, S., Zimmermann, J., Lydon, N. B. (1996). Effects of a selective inhibitor of the abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nature Medicine* 2(5): 561–566.
- Edwards, D. R., Murphy, G., Reynolds, J. J., Whitham, S. E., Docherty, A. J., Angel, P., Heath, J. K. (1987). Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *The EMBO journal* 6(7): 1899–904.
- Eglen, R. M., Reisine, T. (2011). Screening for compounds that modulate epigenetic regulation of the transcriptome: an overview. *Journal of Biomolecular Screening* 16(10): 1137–1152.
- Engle, S. J., Hoying, J. B., Boivin, G. P., Ormsby, I., Gartside, P. S., Doetschman, T. (1999). Transforming growth factor β 1 suppresses nonmetastatic colon cancer at an early stage of tumorigenesis. *Cancer Research* 59(14): 3379–3386.
- Franzén, P., ten Dijke, P., Ichijo, H., Yamashita, H., Schulz, P., Heldin, C. H., Miyazono, K. (1993). Cloning of a TGF β type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF β type II receptor. *Cell* 75(4): 681–692.
- Friedman, E., Gold, L. I., Klimstra, D., Zeng, Z., Winawer, S., Cohen, A. (1995). High levels of transforming growth factor β 1 correlate with disease progression in human colon cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 4(5): 549–554.
- Friess, H., Lu, Z., Riesle, E., Uhl, W., Bründler, A. M., Horvath, L., Gold, L. I., Korc, M., Büchler, M. W. (1998). Enhanced expression of TGF- β s and their receptors in human acute pancreatitis. *Annals of surgery* 227(1): 95–104.
- Fuchs, O. (2002). Úloha signální dráhy indukované transformujícím růstovým faktorem beta při vzniku nádoru. *Klinická onkologie* 15: 7–15.
- Fukai, Y., Fukuchi, M., Masuda, N., Osawa, H., Kato, H., Nakajima, T., Kuwano, H. (2003). Reduced expression of transforming growth factor-beta receptors is an unfavorable prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma. *International journal of cancer* 104(2): 161–6.

- Fukuchi, M., Fukai, Y., Masuda, N., Miyazaki, T., Nakajima, M., Sohda, M., Manda, R., Tsukada, K., Kato, H., Kuwano, H. (2002). High-level expression of the Smad ubiquitin ligase Smurf2 correlates with poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 62(24): 7162–7165.
- Fukuchi, M., Nakajima, M., Fukai, Y., Miyazaki, T., Masuda, N., Sohda, M., Manda, R., Tsukada, K., Kato, H., Kuwano, H. (2004). Increased expression of c-Ski as a co-repressor in transforming growth factor- β signaling correlates with progression of esophageal squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer* 108(6): 818–824.
- Garrique-Antar, L., Souza, R. F., Vellucci, V. F., Meltzer, S. J., Reiss, M. (1996). Loss of transforming growth factor-beta type II receptor gene expression in primary human esophageal cancer. *Lab Invest.* 75(2): 263-272.
- Gellibert, F., Woolven, J., Fouchet, M.-H., Mathews, N., Goodland, H., Lovegrove, V., Laroze, A., Nguyen, V.-L., Sautet, S., Wang, R., Janson, CH., Smith, W., Krysa, G., Boullay, V., de Gouville, A.-CH., Huet, S., Hartley, D. (2004). Identification of 1,5-naphthyridine derivatives as a novel series of potent and selective TGF-beta type I receptor inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* 47(18): 4494–4506.
- Giaccone, G., Bazhenova, L. A., Nemunaitis, J., Tan, M., Juhasz, E., Ramlau, R., van den Heuvel, M. M., Lal, R., Kloecker, G. H., Eaton, K. D., Chu, Q., Dunlop, D. J., Jain, M., Garon, E. B., Davis, C. S., Carrier, E., Moses, S. C., Shawler, D. L., Fakhrizadeh, H. (2015). A phase III study of belagenpumatucel-L, an allogeneic tumour cell vaccine, as maintenance therapy for non-small cell lung cancer. *European Journal of Cancer* 51(16): 2321–2329.
- Glick, A. (2004). TGF β 1, back to the future. *Cancer biology & therapy* 3(3): 276–283.
- Gobbi, H., Arteaga, C. L., Jensen, R. A., Simpson, J. F., Dupont, W. D., Olson, S. J., Schuyler, P. A., Plummer, W. D., Page, D. L. (2000). Loss of expression of transforming growth factor beta type II receptor correlates with high tumour grade in human breast in-situ and invasive carcinomas. *Histopathology* 36(2): 168–177.
- Gougos, A., Letarte, M. (1990). Primary Structure of Endoglin , an Glycoprotein of Human Endothelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 265(15): 8361–8364.
- Guo, R. J., Wang, Y., Kaneko, E., Wang, D. Y., Arai, H., Hanai, H., Takenoshita, S., Hagiwara, K., Harris, C. C., Sugimura, H. (1998). Analyses of mutation and loss of heterozygosity of coding sequences of the entire transforming growth factor beta type II receptor gene in sporadic human gastric cancer. *Carcinogenesis* 19(9): 1539–1544.
- Gupta, M. K., Qin, R. Y. (2003). Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World Journal of Gastroenterology* 9(6): 1144–1155.
- Hahn, S. A., Seymour, A. B., Hoque, A. T. M. S., Schutte, M., Costa, L. T. da, Redston, M. S., Caldas, C., Weinstein, C. L., Fischer, A., Yeo, CH. J., Hruban, R. H., Kern, S. E. (1995). Allelotype of Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer research* 55: 4670–4675.

- Hahn, S. A., Schmiegel, W. H. (1995). Mutations of the hMSH2 and hMSH1 genes are responsible for 90% of hereditary colorectal carcinomas. *Gastroenterol* 33(2): 135-137.
- Han, S.-U., Kim, H.-T., Seong, D. H., Kim, Y.-S., Park, Y.-S., Bang, Y.-J., Yang, H.-K., Kim, S.-J. (2004). Loss of the Smad3 expression increases susceptibility to tumorigenicity in human gastric cancer. *Oncogene* 23(7): 1333–41.
- Hasegawa, Y., Takanashi, S., Kanehira, Y., Tsushima, T., Imai, T., Okumura, K. (2001). Transforming growth factor- β 1 level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 91(5): 964–71.
- Heinrich, M. C., Blanke, C. D., Druker, B. J., Corless, C. L. (2002). Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *Journal of Clinical Oncology* 20(6): 1692–1703.
- Herbertz, S., Sawyer, J. S., Stauber, A. J., Gueorguieva, I., Driscoll, K. E., Estrem, S. T., Cleverly, A. L., Dessaiah, D., Guba, S. C., Benhadji, K. A., Slapak, CH. A., Lahn, M. M. (2015). Clinical development of galunisertib (LY2157299 monohydrate), a small molecule inhibitor of transforming growth factor-beta signaling pathway. *Drug design, development and therapy* 9: 4479–4499.
- Herbst, R. S., Sandler, A. B. (2004). Overview of the current status of human epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer. *Clinical lung cancer* 6(1): 7–19.
- Hojjat-Farsangi, M. (2014). Small-molecule inhibitors of the receptor tyrosine kinases: promising tools for targeted cancer therapies. *International journal of molecular sciences* 15(8): 13768–13801.
- Ho-Yen, C. M., Jones, J. L., Kermorgant, S. (2015). The clinical and functional significance of c-Met in breast cancer: a review. *Breast cancer research* 17(1): 52.
- Huynh, Q. K., Wise, S. J., Koch, K. a, Castonguay, L. a, Reid, B. G., Pagratis, E. E., Koditek, D., Glascock, CH. B., Pitts, K. R., Turner, B. A., Liu, X., Hung, M., Han, B., Pagratis, N. (2011). Screening and identification of a novel class of TGF- β type 1 receptor kinase inhibitor. *Journal of biomolecular screening* 16(7): 724–33.
- Hynes, R. O. (2009). Extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 326(5957): 1216–1219.
- Chazotte, B. (2011). Labeling nuclear DNA using DAPI. *Cold Spring Harb Protocols* 6(1): 80–83.
- Cheifetz, S., Andres, J. L., Massagues, J. (1988). The Transforming Growth Factor- β Receptor Type III Is a Membrane Proteoglycan. *The Journal of Biological Chemistry* 263(32): 16984–16991.

- Cheifetz, S., Bellon, T., Cales, C., Vera, S., Bernabeu, C., Massagué, J., Letarte, M. (1992). Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* 267(27): 19027–19030.
- Cheifetz, S., Like, B., Massagué, J. (1986). Cellular distribution of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta. *The Journal of Biological Chemistry* 261(21): 9972–9978.
- Cheifetz, S., Weatherbee, J. A., Tsang, M. L. S., Anderson, J. K., Mole, J. E., Lucas, R., Massagué, J. (1987). The transforming growth factor- β system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell* 48(3): 409–415.
- Chen, S. Q., Xiong A. Q. (2002). The progress and implication of stem cell factor. *Basic Medical Sciences and Clinics* 22(5): 385-390.
- Chen, T., Carter, D., Garrigue, A. L., Reiss, M. (1998). Transforming growth factor β type I receptor kinase mutant associated with metastatic breast cancer. *Cancer Research* 58: 4805–4810.
- Chen, T., Yan, W., Wells, R. G., Rimm, D. L., McNiff, J., Leffell, D., Reiss, M. (2001). Novel inactivating mutations of transforming growth factor- β type I receptor gene in head-and-neck cancer metastases. *Int. J Cancer* 93(5): 653–661.
- Ignotz, R. A., Massagué, J. (1986). Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *The Journal of biological chemistry* 261(9): 4337–4345.
- Inman, G. J., Nicolás, F. J., Callahan, J. F., Harling, J. D., Gaster, L. M., Reith, A. D., Laping N. J., Hill, C. S. (2002). SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor- β superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Molecular pharmacology* 62(1): 65–74.
- Ito, M., Yasui, W., Kyo, E., Yokozaki, H., Nakayama, H., Ito, H., Tahara, E. (1992). Growth Inhibition of Transforming Growth Factor β on Human Gastric Carcinoma Cells : Receptor and Postreceptor Signaling. *Cancer research* 52: 295–300.
- Ito, N., Kawata, S., Tamura, S., Shirai, Y., Kiso, S., Tsushima, H., Matsuzawa, Y. (1995). Positive correlation of plasma transforming growth factor- β 1 levels with tumor vascularity in hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters* 89(1): 45–48.
- Izumoto, S., Arita, N., Ohnishi, T., Hiraga, S., Taki, T., Tomita, N., Ohue, M., Hayakawa, T. (1997). Microsatellite instability and mutated type II transforming growth factor- β receptor gene in gliomas. *Cancer Letters* 112: 251-256.
- Jiang, X. L., Fan, L. Q., Zhu, W. B. (2005). Research on expression of CD117 on germ cells in human semen. *China Journal of Modern Medicine* 15(2): 208-211.

- Kaartinen, V., Voncken, J. W., Shuler, C., Warburton, D., Bu, D., Heisterkamp, N., Groffen, J. (1995). Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF- β 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nature genetics* 11: 415–421.
- Kim, I. Y., Ahn, H.-J., Zelner, D. J., Shaw, J. W., Lang, S., Kato, M., Oefelein, M. G., Miyazono, K., Nemeth, J. A., Kozlowski, J. M., Lee, C. (1996). Loss of expression of transforming growth factor β type I and type II receptors correlates with tumor grade in human prostate cancer tissues. *Clinical Cancer Research* 2(8): 1255–1261.
- Kim, W. S., Park C., Hong S. K., Park B. K., Kim H. S., Park K. (2000). Microsatellite instability (MSI) in non-small cell lung cancer(NSCLC) is highly associated with transforming growth factor-beta type II receptor(TGF- β RII) frameshift mutation. *Anticancer Res.* 20(3):1499-1502
- Klener, P. (2010). *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2808-7
- Lavery, H. G., Wakefield, L. M., Occleston, N. L., O’Kane, S., Ferguson, M. W. J. (2009). TGF- β 3 and cancer: A review. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 20(4): 305–317.
- Lawler, S., Candia, a F., Ebner, R., Shum, L., Lopez, a R., Moses, H. L., Wright, CH. V., Derynck, R. (1994). The murine type II TGF- β receptor has a coincident embryonic expression and binding preference for TGF- β 1. *Development* 120(1): 165–75.
- Lebrin, F., Deckers, M., Bertolino, P., Ten Dijke, P. (2005). TGF- β receptor function in the endothelium. *Cardiovascular Research* 65(3): 599–608.
- LeRoith, D., Roberts, C. T. (2003). The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Letters* 195(2): 127–137.
- Levy, L., Hill, C. S. (2006). Alterations in components of the TGF- β superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 17: 41–58.
- Liang, J., Wu, Y. L., Chen, B. J., Zhang, W., Tanaka, Y., Sugiyama, H. (2013). The C-Kit receptor-mediated signal transduction and tumor-related diseases. *International Journal of Biological Sciences* 9(5): 435–443.
- Lin, X., Liang, M., Feng, X. H. (2000). Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor- β signaling. *Journal of Biological Chemistry* 275(47): 36818–36822.
- Lipská, L., Visokai, V. (2009). *Recidiva kolorektálního karcinomu: komplexní přístup z pohledu chirurga*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3026-4.
- López-Casillas, F., Cheifetz, S., Doody, J., Andres, J. L., Lane, W. S., Massagué, J. (1991). Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF- β receptor system. *Cell* 67(4): 785–795.

- Lund, L. R., Riccio, A., Andreasen, P. A., Nielsen, L. S., Kristensen, P., Laiho, M., Saksela, O., Blasi, F., Dano, K. (1987). Transforming growth factor- β is a strong and fast acting positive regulator of the level of type-1 plasminogen activator inhibitor mRNA in WI-38 human lung fibroblasts. *The Embo Journal* 6(5): 1281–1286.
- Luo, K. (2004). Ski and SnoN: Negative regulators of TGF- β signaling. *Current Opinion in Genetics and Development*,14(1): 65–70.
- Lynch, M. a, Nakashima, R., Song, H., Degroff, V. L., Wang, D., Enomoto, T., Weghorst, C. M. (1998). Mutational Analysis of the Transforming Growth Factor β Receptor Type II Gene in Human Ovarian Carcinoma. *Cancer research*, 58: 4227–4232.
- Lyons, R. M., Keski-Oja, J., Moses, H. L. (1988). Proteolytic activation of latent transforming growth factor- β from fibroblast-conditioned medium. *Journal of Cell Biology* 106(5): 1659–1665.
- Macias, M. J., Martin-Malpartida, P., Massagué, J. (2015). Structural determinants of Smad function in TGF- β signaling. *Trends in biochemical sciences* 40(6): 296–308.
- Maliekal, T. T., Antony, M.-L., Nair, A., Paulmurugan, R., Karunagaran, D. (2003). Loss of expression, and mutations of Smad 2 and Smad 4 in human cervical cancer. *Oncogene* 22: 4889–4897.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S. (2002). The Protein kinase complement of the human genom. *Science* 298: 1912-1934.
- Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R. S., Zborowska, E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Brattain, M., Willson, J. K. V. (1995). Inactivation of the Type II TGF- β Receptor in Colon Cancer Cells with Microsatellite Instability. *Science* 268: 1994–1996.
- Massague, J. (1992). Receptors for the TGF- β family. *Cell* 69(7): 1067–1070.
- Massagué, J. (1985). Subunit Structure of a High-affinity Receptor for Type β -transforming Growth Factor. *Journal of Biological Chemistry* 260(11): 7059–7066.
- Massagué, J. (2008). TGF β in cancer. *Cell* 134(2): 215–230.
- Millan, F. A., Denhez, F., Kondaiah, P., Akhurst, R. J. (1991). Embryonic gene expression patterns of TGF β 1, β 2 and β 3 suggest different developmental functions in vivo. *Development* 111(1): 131–143.
- Moses H. L., Tucker R. F., Leof E. B., Coffrey R. J., Halper J., Shipley G. D. (1985). Type-beta transforming growth factor is a growth stimulator and a growth inhibitor. *In Cancer Cells* 3: 65-71.

- Myeroff, L. L., Parsons, R., Kim, S.-J., Hedrick, L., Cho, K. R., Orth, K., Mathis, M., Kinzler, K. W., Lutterbaugh, J., Park, K., Bang, Y. J., Lee, H. Y., Park J. G., Lynch, H. T., Roberts, A. B., Vogelstein, B., Markowitz, S. D. (1995). A Transforming Growth Factor β Receptor Type II Gene Mutation Common in Colon and Gastric but Rare in Endometrial Cancers with Microsatellite Instability. *Cancer Research* 55(23): 5545–5547.
- Nagatake, M., Takagi, Y., Osada, H., Uchida, K., Mitsudomi, T., Saji, S., Shimokata, K., Takahashi, T., Takahashi, T. (1996). Somatic in vivo alterations of the DPC4 gene at 18q21 in human lung cancers. *Cancer Research* 56(12): 2718–2720.
- Nyati, S., Schinske, K., Ray, D., Nyati, M., Ross, B. D., Rehemtulla, A. (2011). *Clinical cancer research* 17(23): 7424–7439.
- Park, C. Y., Kim, D. K., Sheen, Y. Y. (2011). EW-7203, a novel small molecule inhibitor of transforming growth factor- β (TGF- β) type I receptor/activin receptor-like kinase-5, blocks TGF- β 1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Cancer Science* 102(10): 1889–1896.
- Park, C.-Y., Son, J.-Y., Jin, C. H., Nam, J.-S., Kim, D.-K., Sheen, Y. Y. (2011). EW-7195, a novel inhibitor of ALK5 kinase inhibits EMT and breast cancer metastasis to lung. *European journal of cancer* 47(17): 2642–53.
- Pollak, M. N. (2004). Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nature reviews* 4: 505-518
- Proetzel, G., Pawlowski, S. a, Wiles, M. V, Yin, M., Gregory, P., Howles, P. N., Ding, J., Ferguson, M. W. J., Doetschman, T. (1995). *Nature genetics* 11(4): 1–15.
- Reed, J. a, Bales, E., Xu, W. (2001). Cytoplasmic Localization of the Oncogenic Protein Ski in Human Cutaneous Melanomas in Vivo: Functional Implications for Transforming Growth Factor β Signaling. *Cancer research* 250: 8074–8078.
- Roskoski, R. (2014). The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacological Research* 79: 34–74.
- Roskoski, R. (2015). A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacological Research* 100: 1–23.
- Saito, H., Tsujitani, S., Oka, S., Kondo, A., Ikeguchi, M., Maeta, M., Kaibara, N. (1999). The expression of transforming growth factor- β 1 is significantly correlated with the expression of vascular endothelial growth factor and poor prognosis of patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer* 86(8): 1455–1462.
- Sanford, L. P., Ormsby, I., Groot, A. C. G., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G. P., Cardell, E. L., Doetschman, T. (1997). TGF β 2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGF β knockout phenotypes *Development* 124(13): 2659–2670.
- Saunier, E. F., Akhurst, R. J. (2006). TGF Beta Inhibition for Cancer Therapy. *Current cancer drug target* 6: 565–578.

- Sawyer, J. S., Anderson, B. D., Beight, D. W., Campbell, R. M., Jones, M. L., Herron, D. K., Lampe, J. W., McCowan, J. R., McMillen, W. T., Mort, N., Parsons, S., Smith, E. C. R., Vieth, M., Weir, L. C., Yan, L., Zhang, F., Yingling, J. M. (2003). Synthesis and activity of new aryl- and heteroaryl-substituted pyrazole inhibitors of the transforming growth factor- β type I receptor kinase domain. *Journal of Medicinal Chemistry* 46(19): 3953–3956.
- Sawyer, J. S., Beight, D. W., Britt, K. S., Anderson, B. D., Campbell, R. M., Goodson, T., Herron, D. K., Li, H. Y., McMillen, W. T., Mort, N., Parsons, S., Smith, E. C. R., Wagner, J. R., Yan, L., Zhang, F., Yingling, J. M. (2004). Synthesis and activity of new aryl- and heteroaryl-substituted 5,6-dihydro-4H-pyrrolo[1,2-b]pyrazole inhibitors of the transforming growth factor- β type I receptor kinase domain. *Journal of Medicinal Chemistry* 46(19): 3953–3956.
- Seyedins, S. M., Segarini, P. R., David, M., Thompson, A. Y., Bentz, H., Graycar, J. (1987). Cartilage-inducing Factor-B is a unique protein structurally and functionally related to transforming growth factor- β . *The Journal of Biological Chemistry* 262(15) 1946–1949.
- Shi, Y., Hata, A., Lo, R. S., Massagué, J., Pavletich, N. P. (1997). A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4. *Nature* 388: 87-93
- Shi, Y., Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113(6): 685–700.
- Singh, J., Petter, R. C., Baillie, T. A., Whitty, A. (2011). The resurgence of covalent drugs. *Nature reviews. Drug discovery* 10(4): 307–317.
- Son, J. Y., Park, S.-Y., Kim, S.-J., Lee, S. J., Park, S.-A., Kim, M.-J., Kim, S. W., Kim, D. K., Nam, J. S., Sheen, Y. Y. (2014). EW-7197, a novel ALK-5 kinase inhibitor, potently inhibits breast to lung metastasis. *Molecular cancer therapeutics* 13(7): 1704–16.
- Tani, M., Takenoshita, S., Kohno, T., Hagiwara, K., Nagamachi, Y., Harris, C. C., Yokota, J. (1997). Infrequent mutations of the transforming growth factor beta-type II receptor gene at chromosome 3p22 in human lung cancers with chromosome 3p deletions. *Carcinogenesis* 18(5): 1119–1121.
- Thiagalingam, S., Lengauer, C., Leach, F., Schutte, M., Hahn, S. a, Overhauser, J., Willson, J. K. V., Markowitz, S., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1996). Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nature genetics* 13(3): 343–346.
- Thompson, D. M., Grill, G. N. (1985). The EGF receptor: structure, regulation and potential role in malignancy. *Cancer Surv.* 4(4): 767-788

- Tokunaga, H., Lee, D. H., Kim, I. Y., Wheeler, T. M., Lerner, S. P. (1999). Decreased expression of transforming growth factor beta receptor type I is associated with poor prognosis in bladder transitional cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 5(9): 2520–2525.
- Tsai, C., Nussinov, R. (2013). The molecular basis of targeting protein kinases in cancer therapeutics. *Seminars in Cancer Biology*: 1–8.
- Walker, R. A., Dearing, S. J. (1992). Transforming growth factor beta 1 in ductal carcinoma in situ and invasive carcinomas of the breast. *European journal of cancer* 28: 641–644.
- Wang, D., Kanuma, T., Mizunuma, H., Takama, F., Ibuki, Y., Wake, N., Mogi, A., Shitara, Y., Takenoshita, S. (2000). Analysis of specific gene mutations in the transforming growth factor-beta signal transduction pathway in human ovarian cancer. *Cancer research* 60(16): 4507–4512.
- Wang, D., Song, H., Evans, J. a, Lang, J. C., Schuller, D. E., Weghorst, C. M. (1997). Mutation and downregulation of the transforming growth factor beta type II receptor gene in primary squamous cell carcinomas of the head and neck. *Carcinogenesis* 18(11): 2285–2290.
- Wikström, P., Stattin, P., Franck-Lissbrant, I., Damber, J. E., Bergh, A. (1998). Transforming growth factor beta1 is associated with angiogenesis, metastasis and poor clinical outcome in prostate cancer. *Prostate* 37: 19-29.
- Xu, P., Liu, J., Derynck, R. (2012). Post-translational regulation of TGF- β receptor and Smad signaling. *FEBS Letters* 72(2): 181–204.
- Zhang, F., Lundin, M., Ristimäki, A., Heikkilä, P., Lundin, J., Isola, J., Joensuu, H., Laiho, M. (2003). Ski-related novel protein N (SnoN), a negative controller of transforming growth factor- β signaling, is a prognostic marker in estrogen receptor-positive breast carcinomas. *Cancer Research* 63(16): 5005–5010.
- Zhang, H. T., Chen, X. F., Wang, M. H., Wang, J. C., Qi, Q. Y., Zhang, R. M., Xu, W. Q., Fei, Q. Y., Wang, F., Cheng, Q. Q., Chen, F., Zhu, CH. S., Tao, S. H., Luo, Z. (2004). Defective expression of transforming growth factor beta receptor type II is associated with CpG methylated promoter in primary non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 10: 2359–2367.
- Zhang, J., Yang, P. L., Gray, N. S. (2009). Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature Reviews Cancer* 9(1): 28–39.
- Zhang, S., Sun, W. Y., Wu, J. J., Wei, W. (2014). TGF- β signaling pathway as a pharmacological target in liver diseases. *Pharmacological Research* 85: 15–22.
- Zhou, H., Latham, C. W., Zander, D. S., Margolin, S. B., Visner, G. A. (2005). Pirfenidone inhibits obliterative airway disease in mouse tracheal allografts. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 24(10): 1577–1585.

Internetové zdroje:

www.fda.gov

10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ALK5	Activin receptor-like kinase 5
ASO	Antisense oligonukleotides
ATP	Adenosine triphosphate
BAT-RII	Big adenin tract in receptor type II
BSA	Bovine serum albumin
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic acid
CML	Chronic myeloid leukemia
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DDT	Dithiothreitol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
ECM	Extracellular matrix
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGTA	Ethylenglycoltetraacetic acid
G-TsF	Glioblastoma-derived T cell supressor factor
HER2	Human epidermal growth receptor 2
HGF	Hepatocyte growth factor
HGFR	Hepatocyte growth factor receptor
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
IGF	Insulin-like growth factor
IGFR	Insuline-like growth factor receptor
MH1	Mad homology 1
MH2	Mad homology 2
mRNA	Messenger ribonucleic acid
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PDGF	Platelet derived growth factor
PDGFR	Platelet derived growth factor receptor
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
RIPA	Radioimmunoprecipitation buffer

SCF	Stem cell growth factor
SCFR	Stem cell growth factor receptor
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	Sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SGF	Sarcoma growth factor
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TβR	Transforming growth factor receptor
TGFβ	Transforming growth factor beta
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor