

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2013

Monika Horáková

**Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Neziskové léky: Aktivita komplexu
disulfiram (antabusu) s mědí proti buněčné
linii odvozené od melanomu**

Bakalářská práce

Monika Horáková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013

Vedoucí práce: Mgr. Boris Cvek, Ph.D.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením Mgr. Borise Cveka, Ph.D. a pouze s použitím citované literatury.

V Olomouci, 23. dubna 2013

.....

podpis

Tato bakalářská práce byla vypracována v rámci projektu OP VK CZ.1.07/2.3.00/20.0062. Levný lék antabus jako protinádorové léčivo: mechanismus účinku a klinické testy.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Monika Horáková

Název práce: Neziskové léky: Aktivita komplexu disulfiramu (antabusu) s mědí proti buněčné linii odvozené od melanomu

Typ práce: bakalářská

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP Olomouc

Vedoucí práce: Mgr. Boris Cvek, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2013

Abstrakt

Maligní melanom je nejvíce smrtícím druhem rakoviny kůže. Zvyšující se incidence melanomu a jeho špatná prognóza jsou pádnými důvody k objevování nových léčiv. Při hledání nových terapií se vynořují obavy týkající se finančních otázek financování výzkumu a vývoje.

Objevují se důkazy, že kovové komplexy disulfiramu zabíjejí rakovinné buňky, aniž by poškozovaly buňky zdravé. Bezpečnost pro pacienty byla demonstrována dekádami bezpečného používání disulfiramu v anti-averzní terapii alkoholiků. Účinnost disulfiramových komplexů s Cu^{2+} nebo Zn^{2+} byla prokázána testováním na melanomových buněčných liniích, na myších a u pacientky s metastázovaným melanomem. Cena disulfiramové léčby nepřevyšuje 1 až 2 dolary za jednu tabletu. Nízká cena činí tento lék dostupný také pro pacienty z rozvojových zemí. Disulfiram byl proto navržen jako pilotní projekt neziskového léčiva.

Klíčová slova: melanom, ubikvin-proteazomový systém, disulfiram, neziskové léky.

Bibliographical Identification:

Author's first and last name: Monika Horáková

Title: Non-profit drugs: The activity of disulfiram-copper complex against a cell line derived from melanoma

Type of thesis: bachelor

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc,

Supervisor: Mgr. Boris Cvek, Ph.D.

The year of presentation: 2013

Abstract

Malignant melanoma is the deadliest kind of skin cancer. The rising incidence of melanoma and its poor prognosis in advanced stages are compelling reasons to discover novel drugs. Along with the quest to find new therapies, there are concerns related to the financial questions of drug research and development.

There is emerging evidence that metal complexes of disulfiram kill cancer cells without harming normal cells of a body. Safety for patients has been demonstrated by decades of safe use of disulfiram in anti-aversion therapy for alcoholics. The effectiveness of disulfiram complexes with Cu^{2+} or Zn^{2+} has been shown by testing it on melanoma cell lines, on mice and on a patient with metastasized melanoma. The cost of the disulfiram treatment does not exceed \$1–2 per pill. The low cost makes this drug affordable also for patients from developing countries. Disulfiram has been, therefore, proposed as a pilot case of non-profit drug.

Keywords: melanoma, ubiquitin-proteasome system, disulfiram, non-profit drugs.

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce Mgr. Borisi Cvekovi, Ph.D. za odborné vedení a Mgr. Jindřichu Sedláčkovi za pomoc při vypracování praktické části bakalářské práce.

OBSAH

1 ÚVOD.....	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	2
2.1 Melanom.....	2
2.1.1 Epidemiologie.....	2
2.1.2 Melanocyty.....	3
2.1.3 Rizikové faktory.....	4
2.1.4 Genetika.....	5
2.2 Léčba melanomu.....	6
2.3 Inhibice proteazomu.....	10
2.4 Ubikvitin-proteazomový systém.....	11
2.4.1 Ubikvitin-proteazomový systém jako terapeutický cíl.....	11
2.4.2 Struktura proteazomu.....	13
2.4.3 Ubikvitinace.....	14
2.4.4 Deubikvitinace a degradace.....	14
2.4.5 Bortezomib.....	16
2.4.6 Jaderný faktor NFκB.....	17
2.5 Disulfiram.....	18
2.6 Disulfiram jako neziskový lék.....	19
3 CÍL PRÁCE.....	21
4 MATERIÁL A METODIKA.....	22
4.1 Biologický materiál.....	22
4.2 Chemikálie.....	22

4.3	Přístrojové vybavení.....	23
4.4	Materiál.....	24
4.5	Kultivace buněčné linie G-361.....	24
4.6	Počítání buněk.....	25
4.7	Určení vlivu testovaných látek na buňky.....	25
4.8	Kontrola vlivu rozpouštědla.....	25
4.9	Detekce živých buněk pomocí MTT testu.....	26
4.10	Statistické vyhodnocení.....	26
4.11	Určení hodnot IC_{50} a zjištění morfologie buněk.....	27
5	VÝSLEDKY.....	28
5.1	Určení vlivu zkoumaných látek na buňky.....	28
5.1.1	Vliv DMSO na buňky.....	28
5.1.2	Vliv koncentrace DDTC na viabilitu buněk.....	28
5.1.3	Vliv koncentrace $CuCl_2$ na viabilitu buněk.....	29
5.1.4	Vliv koncentrace $Cu(EtDTC)_2$ komplexu na viabilitu buněk.....	30
5.1.5	Vznik $Cu(EtDTC)_2$ komplexu.....	31
5.1.6	Vliv koncentrace bortezomibu na viabilitu buněk.....	33
5.2	Hodnoty IC_{50} pro zkoumané látky.....	34
5.3	Morfologie buněk.....	35
6	DISKUZE.....	39
7	ZÁVĚR.....	41
8	LITERATURA.....	42
9	SEZNAM ZKRATEK.....	68

1 ÚVOD

Maligní melanom je závažný druh rakoviny kůže, jehož incidence se za poslední dekády mnohonásobně zvýšila. Časná stádia melanomu lze dobře léčit chirurgickým odstraněním. V případě pozdních stádií, kdy melanom již metastázoval do jiných orgánů, je prognóza velmi špatná. Celosvětově podporovaná snaha vytvořit nová léčiva se zatím naplnila jen zčásti. Na oba nové léky ipilimumab a vemurafenib schválené v roce 2011 se objevuje rezistence. Skutečné vyléčení pacientů s melanomem je proto velkou výzvou do budoucna.

V méj bakalářské práci se zabývám inhibitory proteazomu jako jednou z možností léčby maligního melanomu. Náplní praktické části budou MTT testy různých inhibitorů proteazomu na buněčné linii odvozené od melanomu. Inhibitor proteazomu bortezomib se navzdory slibným výsledkům na buněčných liniích a myších xenograftech u pacientů ukázal neúčinným. V antiaverzní terapii alkoholiků se používá lék disulfiram, který dosáhl podobně optimistických výsledků jako inhibitor proteazomu na buněčných liniích i u myši a způsobil kompletní remisi u pacientky s očním melanomem. Přidáním mědi do potravy léčených pacientů se účinek disulfiramu zvyšuje.

Bylo by žádoucí provést klinické testy disulfiramu s mědí proti různým rakovinám. Disulfiram byl navržen jako pilotní projekt neziskového léčiva, protože jeho nízká cena by umožnila zlepšení onkologické péče i pro občany rozvojových zemí.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Melanom

2.1.1 Epidemiologie

Melanom je závažný, vzácně se vyskytující, druh rakoviny kůže. Ve Spojených státech amerických způsobuje 75 % úmrtí na rakovinu kůže [1], ačkoli se vyskytuje pouze u 4 % diagnostikovaných případů kožních malignit. Četnost výskytu melanomu se během 20. století mnohonásobně zvýšila. Zatímco v roce 1935 byla pravděpodobnost rozvinutí melanomu u jednoho z 1500 nově narozených Američanů, v roce 1993 nemoc připadala na jednu osobu ze 105. [2] Incidence melanomu je nejvyšší v Austrálii, na Novém Zélandu a v Severní Americe. [3] Na rozdíl od jiných rakovin kůže, které postihují převážně starší populaci, je četnost výskytu melanomu největší mezi 25. až 40. rokem života, přičemž 50 % melanomů se nachází u lidí mladších 55 let. [2] V rozvinutých zemích se počet nových případů odhaduje pro rok 2008 na 85300 mužů a 81600 žen. [4] Tloušťka tumoru, mitotický index, ulcerace čili tvorba vředů a anatomická lokace na hlavě a krku jsou spojeny s úmrtím na melanom. [5] Mitotický index není nezávislý prognostický faktor, nýbrž je těsně propojen s tloušťkou a ulcerací tumoru. [6]

Incidence melanomu je ve srovnání s běžnou populací mnohem vyšší u jedinců s onemocněním xeroderma pigmentosum. Pacientům s touto chorobou chybějí opravné mechanismy DNA. Maligní melanom byl nalezen u 15,8 % pacientů s rakovinou kůže trpících poruchou xeroderma pigmentosum. [7]

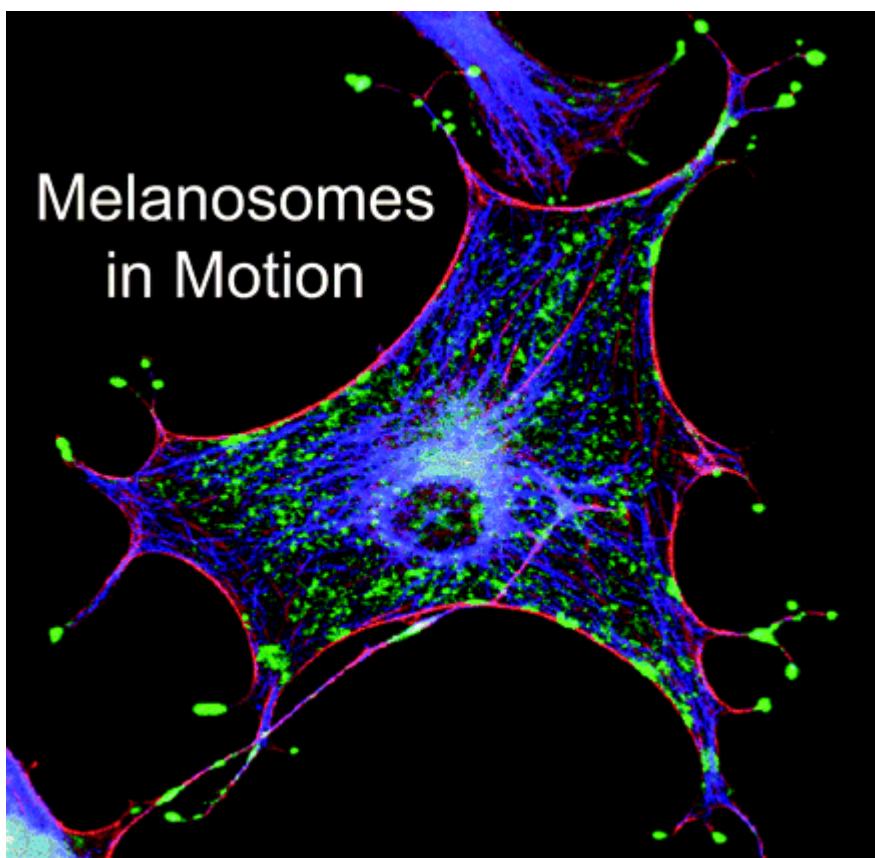
Poměr incidence a mortality nemocných mužů/žen se mírně liší v jednotlivých evropských zemích. V České republice poměr incidence mužů/ženy dosahuje hodnot 0,9, poměr mortality 1,3. [8] Ženy vykazují v porovnání s muži delší dobu přežití a tumory s nižším sklonem tvořit metastázy. [9] Anatomické umístění se u obou pohlaví liší. U mužů je většina tumorů lokalizována na trupu, zatímco u žen je nejčastějším místem dolní končetina. [10]

Historicky první varování o potenciálně škodlivých účincích slunečního světla byly zaznamenány v roce 1894 Paulem Unnou. [11] Popsal degenerativní změny v kůži námořníků a připisoval je pobytu na slunci. Na rozdíl od jiných rakovin kůže melanom není spojen s dlouhodobým kumulativním efektem slunečního záření. Riziko je zvýšeno

při občasném intenzivním vystavení se slunečnímu záření (intermittent sun exposure). [12] V souvislosti se slunečním zářením byl zkoumán vztah melanomu a vitamínu D. Dráha 1,25-dihydroxyvitaminu D₃ (1,25(OH)₂D₃) může chemopreventativně působit proti melanomu. [13] Antiproliferativní a prodiferenční účinky vitamínu D byly demonstrovány u některých buněčných melanomových linií [14] a na xenograftech u imunodeficientních myši [15]. Vysoké dávky vitamínu D přijímané v potravě však neposkytují ochranu proti melanomu u lidských pacientů. [16]

2.1.2 Melanocyty

Rakovina vzniká díky nahromadění mutací v klíčových genech, které řídí buněčné dělení, diferenciaci a smrt buňky. Příčinou vzniku melanomu je řada poškození DNA melanocytů, které postupně vedou k získání schopnosti jejich neomezeného dělení. Biologickým posláním melanocytů je tvorba melaninu a jeho distribuce keratinocytům. [17] K tomuto účelu mají melanocyty zvláštní výběžky, melanosomy.



Obrázek č. 1 – Melanocyt, převzato z [18]

Melanin zabezpečuje ochranu před světlem absorpcí ultrafialového záření, jehož energii přeměňuje na teplo. [19] Hnědo-černá forma melaninu, eumelanin, je takto schopen přeměnit na teplo více než 99,9 % absorbovaného UV záření. [20] Proces se označuje jako disipace energie melanocyty.

Melanocyty se v lidském těle nacházejí převážně v pokožce. Ve spodní vrstvě pokožky (stratum basale) se nalézá největší počet melanocytů. Jejich hustota kolísá v rozpětí od 1000 melanocytů na 1 mm² na stehnech, pažích a předloktí do 2000 až 4000 na 1 mm² na krku a v obličeji. [21] Rozdíly v barvě kůže jsou způsobeny vylučovaným množstvím, typem a makromolekulárním uspořádáním melaninu, počet melanocytů u všech lidských ras zůstává konstantní. [22] Konečný počet melanocytů v kůži je ovlivněn věkem a mírou vystavení pokožky slunečnímu záření. [23] Kromě pokožky, vlasových váčků a oční živnatky (uvey) se melanocyty vyskytují na dalších místech, kde plní řadu, prozatím zcela neobjasněných, funkcí. [24] Byly nalezeny v různých orgánech, například ve slinných žlázách. [25] Melanomy mohou vzniknout v kterékoli části těla, kde se vyskytují melanocyty. Kožní melanomy mají tendenci metastázovat do gastrointestinálního traktu. Metastázy v tenkém střevě jsou časté, zatímco primární intestinální melanom je extrémně vzácný. [26]

2.1.3 Rizikové faktory

Na vzniku melanomu se podílí faktory vrozené i enviromentální. Hlavním vrozeným rizikovým faktorem je barva kůže. [27] Čím je kůže světlejší, tím je riziko melanomu vyšší. Větší množství případů spálení pokožky od slunce v raném dětství souvisí hlavně s povrchově se šířícím melanomem spíše než s jinými variantami. [28] Barva vlasů a přítomnost velkých asymerických név na nohou jsou silně spojeny s vyšším rizikem melanomu, přičemž riziko dále zvyšuje spálení kůže od slunce a používání solárií. [29] Nejohroženější skupinou jsou lidé s rezavými vlasy, menší riziko představuje žlutá, nejnižší hnědá a černá barva vlasů. Časté návštěvy solárií zvyšují riziko melanomu bez ohledu na typ použitého zařízení. [30]

Opalovací krémy by měly být jen doplňkem k všeobecné redukci vystavení slunečnímu záření jako je vyhýbání se pobytu na slunci v poledních hodinách, použití ochranných oděvů a vyhledávání stínu. [31-32] Pravidelné a dlouhodobé používání opalovacích krémů poskytuje ochranu proti dlaždicobuněčnému karcinomu kůže [33], jejich použití k ochraně proti melanomu je vysoce kontroverzní. [34] Autoři článku [34]

došli k závěru, že opalovací krémy působí preventivně a snižují riziko melanomu. Naproti tomu studie [35–36] neprokázaly žádný vztah mezi vznikem melanomu a používáním opalovacích krémů. Opalovací krémy nezabraňují spálení pokožky a zároveň prodlužují dobu pobytu na slunci. Falešný pocit bezpečí při jejich používání může vést k rizikovějšímu chování a následně k vyšší incidenci melanomu. [37] Autor [38] poukazuje na nedostatek pacientů ve studii [34] nutný k dosažení statistické signifikance. Díky nejasnostem a protichůdným výsledkům klinických testů zůstává otázka ochrany proti melanomu použitím opalovacích krémů zatím nezodpovězená.

Lidé s melanomem mají vyšší riziko rozvinutí dalšího melanomu nebo jiné rakoviny. Riziko následného melanomu je u pacientů 9 krát vyšší ve srovnání s běžnou populací, z ostatních rakovin se nejčastěji objevuje ne-Hodgkinův lymfom, rakovina prsu a prostaty. [39]

2.1.4 Genetika

Rodinná historie nádoru je jeden z významných rizikových faktorů. [40] Srovnání tradiční klinicko-patologické klasifikace melanomu s klasifikací založenou na charakteru somatických mutací vykazuje nápadné podobnosti. [41] Výzkum několika rodin s výskytem melanomu prokázal, že zvýšená predispozice k tomuto onemocnění souvisí s mutací v genu pro transkripční faktor spojený s mikrofthalmií, *MITF*. [42] Protein MITF kódovaný tímto genem je jeden z hlavních regulátorů vývoje melanocytů. [43] S vyšším rizikem výskytu melanomu je rovněž spojena mutace v genu *CDKN2A*, inhibitoru cyklin-dependentní kinázy 2A. [44] Průměrně 39 % rodin s výskytem melanomu má nějakou formu mutace v tomto genu, přičemž hodnoty kolísají od 20 % v Austrálii přes 45 % v Severní Americe až k 57 % v Evropě. [45]

Mutace v genu *BRAF*, v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1, která má za následek zařazení špatné aminokyseliny v proteinovém produktu, se vyskytuje u 66 % případů melanomu a s nižší frekvencí také u jiných rakovin. [46] Samotná aktivace RAS/RAF/MAPK dráhy řízená nefunkčním *BRAF* není dostatečná pro rozvoj névu v maligní melanom, ale vyžaduje další molekulární defekty. [47] Melanomy bělochů s kůží bez chronického poškození způsobeného sluncem mají časté mutace v genu *BRAF* a časté ztráty chromozomu 10, zatímco s melanomy kůže s chronickým poškozením indukovaným slunečním zářením často vykazují zvýšený počet kopií *CCND1* genu pro cyklin D1 a standardní *BRAF*. [48] *BRAF* mutace jsou

charakteristickým rysem více než 80 % non-CSD melanomů (melanomů bez chronického poškození způsobeného sluncem) u jedinců s dvěma variantními alelami *MC1R*, melanokortinového receptoru 1, ale pouze u 30 % lidí se standardním *MC1R*. [49] Spojení mutace v genu *BRAF* a *MC1R* u non-CSD melanomů bylo potvrzeno [50], nicméně studie provedené u australské populace [51] a v Severní Karolíně [52] na vzájemný vztah neukazují.

U 84 % metastazujících tumorů očního melanomu byla identifikována mutace v genu pro BRCA1-associated protein 1 (*BAP1*). [53] Dostupná data nasvědčují na vztah mezi mutací v receptoru pro vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D₃), *BsmI* *VDR* polymorfismem a rizikem melanomu. [54] Varianta *TaqI* *t* představuje ochrannou alelu, zatímco *FokI* *f* riziko zvyšuje. [55]

KIT, v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog, byl identifikován jako onkogen a potenciální terapeutický cíl v melanomech sliznic, kůže okrajových částí těla a kůže chronicky poškozené slunečním zářením. [56] 23 % akrálních a 15,6 % slizničních melanomů má mutaci v genu *KIT*. [57] Kromě mutací v kódující oblasti proteinu mohou vznikat mutace i v regulačních oblastech genů. Příkladem je nedávno objevená mutace v promotoru genu pro telomerázovou revezní transkriptázu. [58–59]

2.2 Léčba melanomu

Existuje mnoho způsobů léčby maligního melanomu. Možné terapie jsou chirurgické odstranění tumoru, chemoterapie, radiační terapie, imunoterapie a terapie pomocí monoklonálních protilátek. Léčba závisí na umístění tumoru, stádiu nemoci a celkovém zdravotním stavu pacienta.

K potvrzení klinické diagnózy na melanom je provedena biopsie. Pokud se jedná opravdu o maligní melanom, prvním krokem je chirurgické odstranění maligního névu. Již v roce 1840 Samuel Cooper poznamenal v díle [60], že jediná šance na vyléčení melanomu je včasný chirurgický zákrok. Bohužel i přes uplynulých 170 let je chirurgické odstranění tumoru stále nejúčinnější používanou léčebnou strategií. Melanomy v prvním stádiu s tloušťkou do 1 mm jsou dobře léčitelné. V závislosti na ulceraci tumoru a mitotickém indexu je očekávaná průměrná doba celkového přežití

vyšší než 10 let u 88 % až 99 % pacientů. [61] Jakmile však tumor dosáhne pokročilých stádií, je extrémně obtížné ho léčit.

Nádorové buňky se mohou vyskytovat i v okolí névu, vždy je proto nutné vyříznout i úsek kůže kolem postiženého mateřského znaménka. Běžná tloušťka tumoru je od jednoho do čtyř milimetrů. Pro tumory běžné tloušťky by mělo být vyříznuto okolí tumoru o průměru 2 cm. [62]

Nejčastějším druhem melanomu *in situ* je lentigo maligna. Standardně je u podtypu lentigo maligna provedeno chirurgické odstranění tumoru s okraji 5 mm. Lentigo maligna se nejčastěji vyskytuje na hlavě a krku, je proto snaha o co možná nejmenší plochu odstraňovaného místa bez rizika rekurence. Pro podtyp lentigo maligna se 5mm okraj zá být nedostatečný a mě by být zvětšen na 6 až 9 mm u tumorů s průměrem do 2 cm, u větších průměrů až na 8 až 12 mm. [63]

U pacientů s očním melanomem, kteří neměli tumor včas diagnostikován, je často nutné provést enukleaci (odstranění) očního bulbu. [64] Metastázy z očního melanomu se vyskytují z 80 % v játrech, dalšími orgány jsou plíce, lymfatické uzliny, kůže a kosti. Průměrná doba trvání od kompletního chirurgického odstranění metastáz očního melanomu do výskytu první rekurence choroby je 8 let. [65]

V závislosti na stádiu je provedena biopsie sentinelové uzliny. Sentinelová uzlina je první uzlina, do které odtéká míza z oblasti primárního nádoru. Při biopsii sentinelové uzliny však může dojít k falešně pozitivním výsledkům a autor [66] ji nedoporučuje. Podle novějších údajů je biopsie sentinelové uzliny vhodná pro pacienty s melanomy střední tloušťky, u jiných ji lze doporučit pouze, když klinický benefit převáží rizika procedury. [67]

Po odstranění primárního tumoru může následovat pomocná, adjuvantní terapie. Adjuvantní terapie interferonem α -2a se ukázala být neúčinnou. Po pěti letech léčby zemřelo v kontrolní skupině 31 % pacientů oproti 24 % úmrtí při léčbě interferonem α -2a. Relaps choroby se objevil u 49 % kontrolních a 41 % léčených pacientů. [68]

Dříve se k léčbě melanomu využívala radiační terapie. Melanom je jeden z nejvíce radiorezistentních tumorů. K navození odpovědi na léčbu muselo být užito velkých dávek radiačního záření. [69] Nevýhodou radiační terapie byla malá doba přežití pacientů. Pacienti s mozkovými metastázami původem z melanomu, kteří

podstoupili radiační terapii, se dožívali průměrně pouze 10 až 14 týdnů. [70] Pro zesílení účinku se radiační terapie kombinovala s hypertermií. [71] Radiační terapie může snížit riziko místní rekurence, ale doba přežití se při jejím použití nemění. [72]

Léky na rakovinu jsou tradičně řazeny do čtyř kategorií: chemoterapie, hormonální terapie, imunoterapie a cílená léčba. Chemoterapie zahrnuje velkou skupinu cytotoxických léků, které narušují proces buněčného dělení a syntézy DNA. Melanom je téměř univerzálně rezistentní na chemoterapii. Receptory pro faktor nádorové nekrózy, pro tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing a Fas receptory hrají důležitou roli při získání rezistence melanocytů k apoptóze. [73]

Jako chemoterapie se od 70 let. 20. století používá látka dacarbazin. Dacarbazin ničí rakovinné buňky navázáním alkylových skupin na jejich DNA. Nevýhodou je intravenózní podání a nutnost podávání léků proti zvracení, protože dacarbazin je vysoce emetogenní. [74] Mezi další vedlejší účinky patří leukopénie, trombocytopénie, anémie a neutropénie. [75] Nadto způsobuje dacarbazin objektivní odpověď tumoru u pouhých 13 až 20 % pacientů a téměř ve všech případech je odpověď pouze částečná. [76–77] Dacarbazin byl proto testován v kombinaci s mnoha dalšími látkami. Dacarbazin účinkuje lépe v kombinaci ipilimumabem a sorafenibem. Průměrná doba celkového přežití při užívání samotného dacarbazinu je 9,1 měsíce, v kombinaci s ipilimumabem 11,2 měsíců. [78] Průměrná doba přežití bez progresu byla u pacientů léčených samostatným dacarbazinem 11,7 týdnů, při kombinaci sorafenibu a dacarbazinu to již bylo 21,1 týdnů. [79]

Temozolomid vykazuje srovnatelnou aktivitu s ve srovnání s dacarbazinem. Výhodou temozolomidu je orální podání, které umožňuje proniknutí účinné látky skrze hematoencefalickou bariéru. [80]

K léčbě melanomu se využívá kombinace čtyř chemoterapeutik, známá pod zkratkou BOLD - bleomycin, oncovin (= vincristine), lomustin (= CCNU) a dacarbazin. Byla pozorována kompletní remise melanomu s metastázami v mozku u pacienta, který podstoupil chemoterapii BOLD a byl zároveň léčen hormonem G-CSF (granulocyty stimulující faktor) kvůli současnému nedostatku bílých krvinek, leukopénii. Kombinace BOLD a G-CSF navozuje u některých pacientů kompletní remisi a zdá se být vskutku efektivní, naneštěstí však pouze u malé skupiny pacientů (3 z 8). [81]

Léky při hormonální terapii ovlivňují signalizaci růstu skrze hormonální receptory na rakovinných buňkách. Jako hormonální terapie se u melanomu používá tamoxifen. Bylo prokázáno, že tamoxifen navozuje apoptózu u melanomových linií *in vitro*. [82] Tato látka rovněž inhibuje buněčnou migraci, invazi a metastázování u myších modelů. [83] Ukázalo se však, že zpočátku slibná terapie tamoxifenem nefunguje u lidských pacientů. Tamoxifen by neměl být díky jeho neúčinnosti dále používán samostatně ani v kombinaci s chemoterapeutiky. [84–85]

Cílem imunoterapie je vytvoření a/nebo posílení imunitní odpovědi organismu proti rakovině. V březnu 2011 byl americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration, FDA) schválen ipilimumab, lidská monoklonální protilátka specifická pro cytotoxický T-lymfocytární antigen 4 (CTLA-4) pro léčbu neodstranitelného nebo metastázujícího melanomu. Melanom je považován za jeden z nejvíce imunogenních pevných tumorů díky jeho schopnosti podstupovat spontánní regresi. [86] Ipilimumab, samostatně či v kombinaci s melanomovým antigenem gp100, mírně prodlužuje dobu přežití (10 měsíců při léčbě ipilimumabem vs. 6,4 měsíců u kontrolní skupiny). [87] Používání ipilimumabu má však vedlejší účinky. Testy anti-CTLA-4 protilátek v klinice prokázaly nový syndrom autozánětlivých a autoimunitních účinků při jejich používání. [88]

Malé molekuly a protilátky jsou inhibitory kináz, které fosforylují specifické proteiny zahrnuté v signalizaci růstových drah rakovinných buněk, což je podstatou cílené terapie. Látka PLX4032 je byla vytvořena na základě znalosti struktury cílového proteinu (structure-based drug design). [89] PLX4032 je silný inhibitor onkogenní B-RAF kinázové aktivity a později se začal označovat vemurafenib. Více než 50 % pacientů nesoucích mutaci *BRAF V600E* úspěšně reagovalo na léčbu vemurafenibem. Nevýhodou léčby vemurafenibem jsou vedlejší účinky. 38 % pacientů musela být upravena dávka léku kvůli jeho toxicitě. [90] Melanomy s mutací genu *BRAF V600E* mohou získat rezistenci na vemurafenib. Rezistence neproběhne skrze sekundární *BRAF V600E* mutace, ale vzniká cestou receptorové tyrozin kinázy RTK-zprostředkované aktivace alternativních drah pro přežití nebo aktivované RAS-zprostředkované reaktivace MAPK dráhy. [91] Autoři [92] navrhli algoritmus pro pořadí použití léků ipilimumabimu a BRAF inhibitorů pro melanomy pozitivní na *BRAF V600* mutaci. Je-li u melanomu přítomen maximálně jeden rizikový faktor a je předpokládán pomalý rozvoj choroby, optimálním klinickým postupem je léčit pacienta

BRAF inhibitorem a následně ipilimumabem. Pokud má pacient dva a více rizikových faktorů a je předpokládán rychlý průběh onemocnění, nejlepším řešením je použít první ipilimumab a následně pokračovat v léčbě BRAF inhibitorem, například vemurafenibem. [92] Střídání vysokých a nízkých dávek vemurafenibu je jednou z možností, jak se zábránit výskytu rezistence na vemurafenib. [93]

Na základě racionálního návrhu léčiv byla pro rakoviny s mutací v genu *Bcr-Abl* vytvořena látka imatinib. Imatinib byl zamýšlen pro použití na oční melanom, ale není účinný navzdory vysoké expresi *KIT* a stem cell faktoru (*SCF*) u tohoto typu onemocnění. [94]

Cílená terapie u melanomu je obrovským přínosem po dekáдах stagnace ve vývoji nových léčiv. V současné době probíhají desítky klinických testů různých cílených terapií a jejich kombinací pro léčbu maligního melanomu. Z časových důvodů je zde nelze všechny uvádět, jejich přehled lze najít v [95].

Melanom u starších lidí (nad 65 let) je spojen s horší prognózou. Míry mortality v evropských zemích u starších pacientů stále stoupají v důsledku zvyšující se incidence melanomu. [96] Se stárnutím populace můžeme proto očekávat zvýšení nákladů na léčbu a zatížení veřejného zdravotního systému. [97] Během posledního desetiletí bylo dosaženo v léčbě melanomu velkých pokroků. Publikované klinické testy fáze III zahrnující interleukin-2, ipilimumab a vemurafenib vytváří nové možnosti standardní péče pro metastázující melanom a prodlužují dobu přežití ve srovnání s dacarbazinem. [98] Bohužel i na nově patentovaná léčiva jako je vemurafenib se objevuje rezistence na léčbu. Závažné vedlejší účinky léčiv a jejich neúčinnost jsou hlavními důvody pro nové strategie v léčbě melanomu.

2.3 Inhibice proteazomu

Novým přístupem k léčbě melanomu je inhibice proteazomu. Inhibitor proteazomu bortezomib v koncentraci 0,1 µg/ml značně snižuje růst melanomových linií *in vitro* a to na hodnoty 1 až 13 % kontroly. Rosiglitazon efektivitu bortezomibu dále umocňuje. [99] Kombinace bortezomibu s gossypolem inhibuje růst metastáz buněčných linií SK-Mel-103 and SK-Mel-147 u imunodeficientních myší. [100] Jiná studie [101] rovněž prokazuje inhibici růstu melanomových linií *in vitro* při použití bortezomibu a zesílenou účinnost při kombinaci s temozolomidem. Při testování na

myších modelech byla u testovaných zvířat navozena kompletní remise hmatatelných tumorů již po 30 dnech léčby. Remise trvala po dobu více než 200 dní. [101] Jako inhibitor proteazomu je bortezomib účinnější než peptidový aldehyd karbobenzoxyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal, MG132. [102]

I když léčba samotným interferonem alfa pacientům nepřináší žádný přínos [103], interferon alfa kombinovaný s bortezomibem byl efektivní v navození apoptózy u maligních melanocytů. Signifikantní antitumorová aktivita kombinace interferonu alfa a bortezomibu byla potvrzena na myších modelech B16 a myši s implantovanými A375 melanomovými xenografty. [104]

Klinické testy bortezomibu u lidských pacientů dopadly neúspěchem. Proti melanomu není účinný samostatný bortezomib [105] ani kombinace bortezomibu s temozolomidem. [106] Další klinické testy bortezomibu v kombinaci s jinými léky probíhají nyní. [107]

Inhibitory proteazomu lze nalézt i v běžných potravinách. Hlavní polyfenol obsažený v zeleném čaji, epigalokatechin-3-galát a jeho syntetické analogy působí jako silné inhibitory proteazomu s možným potenciálem vývoje jako nových léků proti rakovině. [108–110] Epigalokatechin-3-galát, způsobuje apoptózu u melanomových linií *in vitro*, přičemž neovlivňuje normální melanocyty. [111] Kombinace epigalokatechin-3-galátu s dacarbazinem silně inhibuje počet metastáz, růst primárního tumoru a zlepšuje dobu přežití u myši s melanomovými xenografty. [112]

Salinosporamid A působí jako velmi silný inhibitor proteazomu. U testované melanomové linie SK-Mel-28 dosahovala 50% letální koncentrace LC_{50} hodnot nižších než 10 nmol/l. [113] Zajímavostí je, že salinosporamid A byl izolován z bakterie žijící v usazeninách na mořském dně, na návrh autorů [113] byl rod později pojmenován *Salinosporea*.

2.4 Ubikvitin-proteazomový systém

2.4.1 Ubikvitin-proteazomový systém jako terapeutický cíl

V současné době je zkoumána řada nových látek k léčbě maligního melanomu i jiných rakovin. V této části bych chtěla popsat, jakým mechanismem fungují léčiva, která v buňkách inhibují ubikvitin-proteazomový systém (UPS).

V průběhu života každé buňky jsou neustále syntetizovány nové a degradovány staré či nepotřebné proteiny. Za hlavní způsob likvidace proteinů byla v minulosti považována lyzozomární degradace. Nezralé červené krvinky, retikulocyty, jsou buňky, které lyzozomy nemají, ale přesto jsou schopny se zbavovat proteinů. Objev retikulocytů naznačoval, že kromě lyzozomů musí existovat ještě jiný způsob, jak naložit s nežádoucími proteiny. [114] Tímto mechanismem je ubiquitinem zprostředkovaná degradace proteinů, za jejíž objev byla v roce 2004 udělena Nobelova cena za chemii třem vědcům - Aaronu Ciechanoverovi, Avramu Hershkovi a Irwinu Roseovi. [115]

Proteazomy lze najít u všech tří domén života. Eukaryotické proteazomy se od prokaryotických liší závislostí degradace na ubiquitinu a přítomností proteazomového víka. [116] Aktinobakterie a archea také připojují k malé proteiny k degradovaným proteinům. Tyto proteiny se u prokaryot nazývají prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup) a u archeí hovoříme o small archaeal modifier proteins (Samps). [117]

Ubikvitin-proteazomový systém je v eukaryotických buňkách primární mechanismus pro odstraňování nepotřebných nebo špatně poskládaných intracelulárních proteinů. [118] Tvorba nových i odstraňování starých nepotřebných proteinů je přísně regulováno. Množství jednotlivých proteinů v průběhu času mění a dynamika jejich obratu je v proteomických studiích opomíjena. [119] Jednou z cest, jak uměle navodit proteazomovou degradaci, je navázání malé hydrofobní molekuly k nežádoucímu proteinu. [120–121]

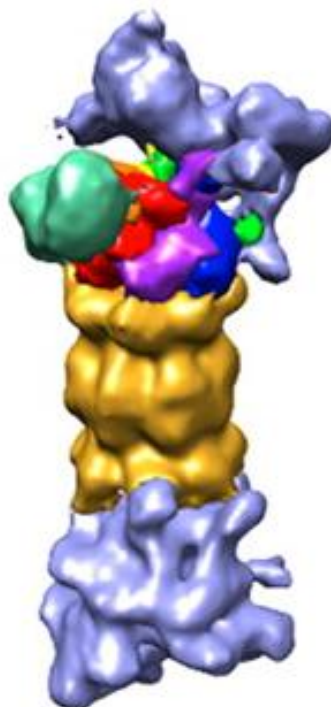
UPS reguluje množství cyklinů a ovlivňuje tím klíčové body buněčného cyklu. [122] Zdravé buňky se s nefunkčním proteazomem dokáží vypořádat, buňky nádorové po jeho inhibici hynou. [123] Proč je inhibice proteazomu letální pro rakovinné buňky bylo dlouho záhadou. Autoři [124] zjistili, že buňky s inhibovaným proteazomem hynou v důsledku nedostatku aminokyselin. Při akutním nedostatku aminokyselin v buňkách je dodání potřebných aminokyselin pro proteosyntézu zajištěno degradací starších proteinů v proteazomu, přičemž nově vytvořené proteiny jsou před degradací z velké části chráněny. [125] Proteazomová degradace proteinů v buňkách hostitele také poskytuje potřebné aminokyseliny pro intracelulární růst bakterií. [126]

Jako možné cíle v boji proti rakovině byl navržen ubiquitin-proteazomový systém [127–134] i lyzozomy. [135] Zvýšená autofágie pomocí lyzozomů poskytuje

rakovinným buňkám dostatek živin pro růst. [136] Maligní melanocyty díky zvýšené autofágii přežívají a prolifерují i za podmínek metabolického stresu, kyselého pH a působení chemoterapeutik. [137]

2.4.2 Struktura proteazomu

Proteazomy eukaryot se vyskytují v cytoplazmě i v buněčném jádře. [138–139] Proteazom tvoří válcovitou strukturu skládající se ze středové části (20S proteazom) a dvou 19S proteazomových vík uložených na obou koncích 20S proteazomu. Celková struktura má sedimentační koeficient 26S, [140] obrázek č. 2 znázorňuje současný model 26S proteazomu.



Obrázek č. 2 – Model 26S proteazomu eukaryot, převzato z [141]

20S proteazom je složen ze 14 α a 14 β podjednotek uspořádaných ve čtyřech homoheptamerických kruzích. [142] Sestavení proteazomu je složitý proces vyžadující množství pomocných proteinů, chaperonů. [143–146] Maturace savčích 20S proteazomů se účastní proteasome assembling chaperone-1 (PAC1) a PAC2. [147] Uspořádání proteazomových ATPáz je řízeno skrze delecí jejich karboxylových konců. [148]

2.4.3 Ubikvitinace

Ubikvitinace je postranslační modifikace, kdy je malý protein ubikvitin připojen k akceptorové aminoskupině, nejčastěji k lysinu substrátu určeného k degradaci. [149] Aby byly proteiny označeny k degradaci v proteazomu, musí obsahovat nejméně čtyři ubikvitiny spojené skrze lysin 48. [150] Existují ovšem výjimky. Regulační komplex PA28 (11S, REG) se váže na 20S proteazom a umožňuje ATP-independentní degradaci krátkých neubikvitinových peptidů. [151] Polyubikvitinový řetězec navázaný přes lysin 63 může také sloužit jako signál pro degradaci 26S proteazomem. [152] Pro degradaci oxidovaných proteinů není nutná ubikvitinace ani hydrolyza ATP. [153] Enzym ornithin dekarboxyláza je degradována 26S proteazomem bez předchozí ubikvitinace. [154]

Kaskády polyubikvitinace cílového proteinu se účastní tři skupiny enzymů. Prvním krokem je aktivace ubikvitinu ubikvitin-aktivačním enzymem E1, následuje konjugace, kterou vykonává ubikvitin-konjugační enzym E2 a ligace uskutečňovaná ubikvitin-ligázou E3. [155] Přenos ubikvitinu z ubikvitin-konjugačního enzymu E2 na lysin cílového proteinu katalyzují RING E3 enzymy. [156] RING (Really Interesting New Gene) je strukturální doména E3 ligáz obsahující zinkový prst se dvěma zinečnatými kationty. [157–159] RING doména je nutná pro zprostředkování přenosu ubikvitinu z E2 ubikvitin-konjugačního enzymu na konečný substrát. [160–161] Jednotlivé ubikvitiny jsou na substrát přidávány postupně jeden za druhým. [162] Největší známou skupinou ubikvitin E3 ligáz jsou Cullin–RING ligázy. [163] RING doména listerin E3 ubikvitin-ligázy 1 (Ltn1) označuje ubikvitinem proteiny, které pocházejí z chybně exprimované mRNA postrádající stop kodon. [164]

Funkcí ubikvitinu není jen označování proteinů určených k degradaci, ale je také důležitý při endocytóze, v buněčné signalizaci [165] a regulaci transkripce. [166] Cílení proteinů do organel nebo ven z buňky je přes Bag6 komplex propojeno s jejich degradací, proteiny vyskytující se mimo určená místa jsou tak ihned degradovány. [167]

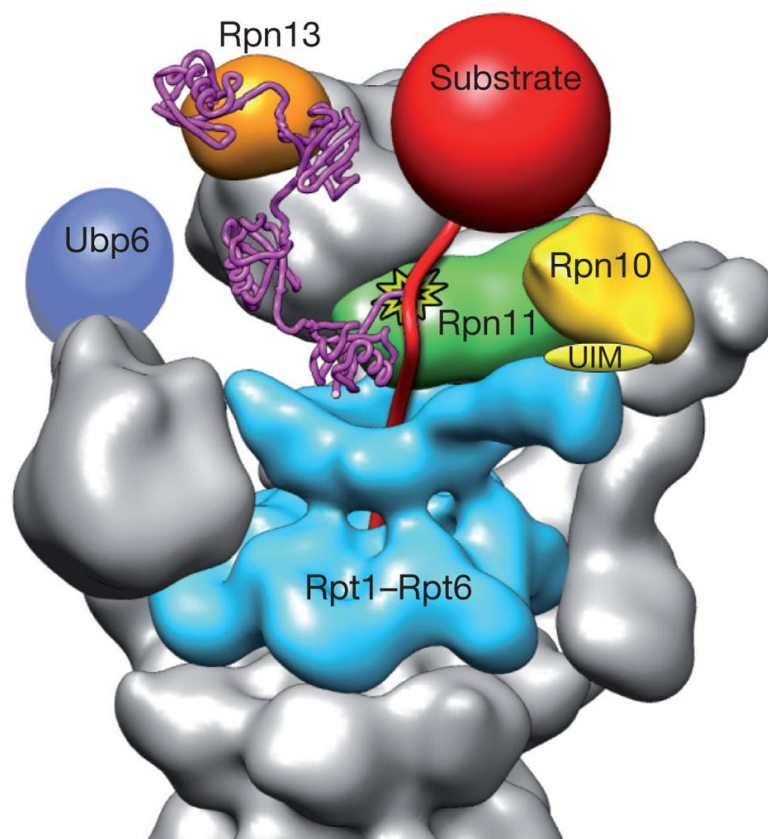
2.4.4 Deubikvitinace a degradace

Substráty proteazomu jsou rozpoznány regulační částicí a následně v rozvolněném stavu přemístěny k degradaci do středové části proteazomu (core particle – CP). [168] Rozpoznání polyubikvitinového degradačního signálu je zprostředkováno proteazomovou ATP-ázovou podjednotkou S6' (také známou pod názvem tat-binding

protein 1 nebo Rtp5). [169] Deubikvitinace a degradace proteinu jsou pevně spřažené děje, které zajišťuje podjednotka proteazomového víka Rpn11. [170] Proteazomová podjednotka Rpn11 se označuje také Poh1 a je Zn^{2+} -dependentní proteáza. [171] Nepoškozený zinek obsahující JAMM motiv (JAB1/MPN/Mov34 metaloenzym) lidské deubikvitinázy Poh1 je nezbytný pro funkci 26S proteazomu a životaschopnost buněk. [172] Kromě 19S regulační částice může být 20S proteazom aktivován interakcí s Cdc48 ATPázou neboli proteinem p97. [173] Tento mechanismus byl objeven u archeí i eukaryotických buněk. [173–175]

Savčí proteazomy obsahují tři deubikvitinační enzymy: Rpn11, Uch37 a Usp14. [176] Ubikvitinované proteiny po navázání k 26S proteazomu interagují s podjednotkami Ubp6/Usp14 nebo Uch37, čímž spustí hydrolýzu ATP a podpoří tak svou vlastní destrukci. [177] Inhibice ubikvitin karboxyl-terminální hydrolázy 14 Usp14 aktivitu proteazomu zvyšuje. [178] Podjednotka proteazomového víka Rpn13 je receptor rozpoznávající ubikvitinem označené substráty. [179]

Podjednotka víka Ubp6 odštěpuje polyubikvitinový řetězec směrem od jeho distálního konce. [180] Substráty putují skrze úzkou štěrbinu (α -annulus) do aktivního místa centrální části proteazomu, kde se odehrává vlastní proces proteolýzy. [181] Před vlastním vstupem do katalytického místa jsou proteiny v dutině víka udržovány jako neposkládané řetězce aminokyselin. [182] Mechanismus rozpoznání a deubikvitinace substrátu víkem proteazomu je znázorněn na obrázku č. 3.



Obrázek č. 3 – Mechanismus rozpoznání a deubikvitinace substrátu, převzato z [183]

Proteiny jsou proteazomem degradovány na peptidy dlouhé 2 až 24 aminokyselinových zbytků, přičemž nejčastější velikost peptidů je sedm až osm aminokyselin. [184–186] Vzniklé peptidy jsou v buňce ihned degradovány na aminokyseliny za účasti enzymů aminopeptidáz. [187–191]

Existuje velké množství způsobů, jak zabránit degradaci proteinů. Exprese specifického deubikvitinačního enzymu EBV-DUB odvozeného z viru Epstein-Barrové zabraňuje degradaci předčasnou deubikvitinací proteinů. [192] Pokud dojde k navázání ubistatinů na protein označený řetězcem ubikvitinů spojených přes lysin 48, degradace tohoto proteinu je inhibována. [193]

2.4.5 Bortezomib

Prvním inhibitorem proteazomu v klinické léčbě byla látka bortezomib. Americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration, FDA), schválil bortezomib v roce 2003 pro léčbu mnohočetného myelomu [194] a znovu v roce 2006 pro léčbu pacientů s lymfomem pláštěvých buněk. [195]

U buněk anaplastického velkobuněčného lymfomu bortezomib způsobuje apoptózu inhibicí 26S proteazomu. [196] Cílem bortezomibu je $\beta 5$ podjednotka (chymotrypsin-like) centrální částice proteazomu, kromě ní jsou lékem ovlivněny i podjednotky $\beta 1$ a $\beta 2$. [197]

Jiným biologickým účinkem léku je změna celkových hladin peptidů v buňce. [198] Podstatou rezistence k bortezomibu je mutace v genu pro $\beta 5$ podjednotku, která znemožňuje navázání léčiva a/nebo overexprese téhož genu. [199–201] Epigalokatechin-3-galát účinek bortezomibu snižuje. [202]

Kromě rezistence na bortezomib je dalším problémem výskyt vedlejších účinků. U více než 30 % pacientů s mnohočetným myelomem bortezomib indukuje periferální neuropatii. [203–206] Bortezomibem indukované poškození axonů je zapříčiněno vazbou léku na další proteiny v buňce a tento mechanismus probíhá nezávisle na proteazomu. [207]

2.4.6 Jaderný faktor NF κ B

Jaderný faktor NF κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) je udržován v inaktivním stavu asociací s jedním ze tří I κ B proteinů. Po stimulaci I κ B kináza (IKK) fosforyluje na NF κ B navázané proteiny a tím je označuje pro degradaci skrze ubiquitin-proteazomový systém. [208] Inhibice NF κ B byla spojována s protirakovinnými účinky proteazomových inhibitorů, [209–211] později se však zjistilo, že bortezomib jaderný faktor NF- κ B u buněk mnohočetného myelomu aktivuje. [212] NF κ B může být degradován i nezávisle na proteazomu. Sekreční proteáza typu III NleC patogenní *Escherichia coli* degraduje NF κ B nezávisle na proteazomu a způsobuje tak potlačení vrozené imunity v buňkách hostitele. [213–215]

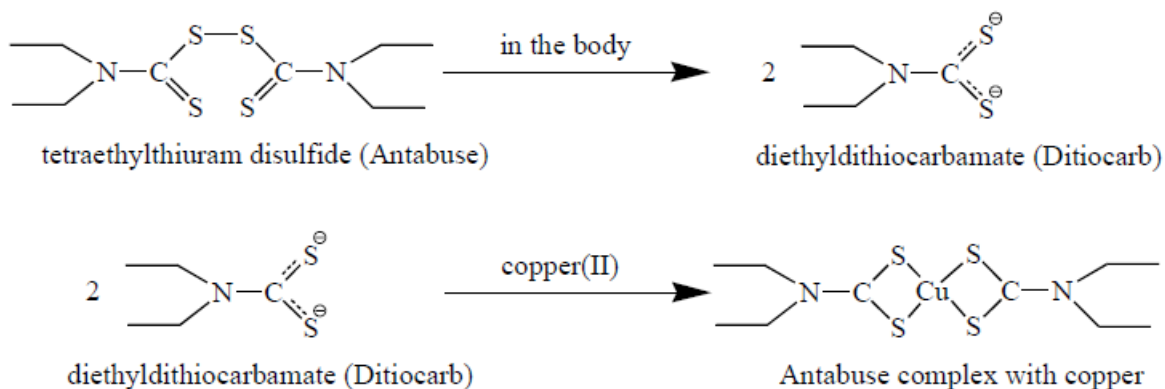
NF κ B indukující kináza (NIK) je vysoce exprimována u maligních melanocytů a aktivita NIK spojená s IKK je u nich zesílena ve srovnání s normálními buňkami. [216] NF κ B indukující kináza moduluje tumorogenezi melanomu pomocí regulace exprese faktorů pro přežití skrze β -kateninovou dráhu. [217] Dithiokarbamáty inhibují aktivaci NF- κ B. [218]

2.5 Disulfiram

Disulfiram je používán již desítky let v protialkoholní léčbě pod obchodním názvem Antabus a své místo v léčbě alkoholizmu má dodnes. [219] Enzym aldehyd dehydrogenáza je disulfiramem inhibován, což má za následek nepříjemné pocity po požití alkoholu. [220] Dávka 200 mg/den je dostačující k vyvolání disulfiram-alkoholové reakce, maximální dávka doporučená FDA je 500 mg/den. [221] Disulfiram působí anti-protozoálně [222–223] a je znám svou schopností inhibovat proteazom.

Disulfiram je levný a bezpečný inhibitor proteazomu, oproti bortezomibu také poskytuje výhodu orálního podání. Nejčastějším vedlejším účinkem indukovaným disulfiramem je hepatotoxicita, která ročně způsobuje jedno úmrtí na každých 30 000 léčených pacientů. [224] Nejzávažnější případy hepatotoxicity vznikají, když je v léčbě pokračováno i přes disulfiramem indukované jaterní poškození, [225] mylně přisuzované alkoholu. [226] Další nežádoucí reakce jsou neurologické, kožní a psychiatrické, ale vyskytují se méně často. [227]

Metabolity disulfiramu, dithiokarbamáty, jsou poměrně reaktivní sloučeniny, které tvoří komplexy s kovy. Nejběžnějším kovovým komplexem je diethyldithiokarbamát měďnatý. [228–229] Mechanismus vzniku měďnatého komplexu je na obrázku č. 4.



Obrázek č. 4 – Mechanismus vzniku diethyldithiokarbamátového komplexu s mědí, převzato z [230]

Dithiokarbamátové komplexy s kovy pravděpodobně inhibují JAMM doménu v Poh1 podjednotce 19S proteazomu. [231–232] Kromě toho ovlivňují kovové komplexy dithiokarbamátů celou řadu dalších buněčných proteinů. [233]

První pozorování protirakovinné aktivity disulfiramu bylo vymizení metastáz u pacientky s rakovinou prsu. [234] Signifikantní proapoptotická aktivita disulfiramu byla pozorována na několika melanomových liniích, [235–236] přičemž účinek je značně zesílen přidáním mědi do živného média. [235] Disulfiram v přítomnosti mědi inhibuje buněčné dělení a indukuje apoptózu u buněčných linií odvozených od nodulárního a povrchově se šířícího melanomu v koncentracích dosažitelných při orálním podání (50–500 nmol/l). [237]

Testy na buněčných liniích byly potvrzeny *in vivo*. Disulfiram inhibuje růst a angiogenezi melanomu u myši a jeho účinek je dále posílen přidáním Zn^{2+} do potravy testovaných zvířat. Kombinace disulfiramu s glukonátem zinečnatým navodila klinickou remisi u pacientky s jaterní metastázou z očního melanomu. Remise trvala více než 53 měsíců. [238] Na základě této publikované případové studie je nyní veden klinický test disulfiramu s glukonátem měďnatým k léčbě refraktorních pevných tumorů postihujících játra. [239] V oblasti je nutný další výzkum, protože není jasné, zda disulfiram bude účinný vůči metastázám z očního melanomu postihujících jiné orgány či proti ostatním formám melanomu. V současné době probíhá klinický test kombinace disulfiramu s oxidem arsenitým a samostatného disulfiramu k léčbě metastázujícího melanomu. [240]

2.6 Disulfiram jako neziskový lék

Cena vývoje nového léku byla 802 milionů amerických dolarů v roce 2000, [241] dnes již cena dosahuje sumy přes jednu miliardu dolarů. [242–243] Autoři jiné studie hovoří o částce mezi 500 miliony až 2 miliardami, v závislosti na druhu léčiva. [244] Jedná se pouze o odhady, protože přesná data nejsou k dispozici vědcům ani kontrolním orgánům. [245] I přes závratné částky investované do výzkumu a vývoje stagnuje počet nových léků schválených FDA. [246] Příčinou malého počtu nových léčiv mohou být omezení současného modelu výzkumu a vývoje. [247]

Mnohem horší však je nejen nízký počet schválených léků, ale i jejich malá účinnost. Počet neúspěšných látek ve třetí fázi klinických testů je v onkologii nejvyšší,

[248] což je zapříčiněno mnoha faktory. [249] Nejčastějším jevem je používání buněčných linií a myších modelů, které dobře necharakterizují situaci v lidském organismu [250] a vedou ke zkresleným výsledkům, [251] takže většina výsledků publikovaných v biomedicíně je nesprávných. [252] Farmaceutické firmy musejí provést nákladné a drahé testy, aby přivedly na trh lék, který oproti starému poskytuje pouze malé výhody. [253] Extrémním příkladem je erlotinib, který oproti standardní léčbě prodlužuje dobu dožití o pouhých 10 dní. [254] Vysoká cena za vývoj se promítá do konečné ceny léku. Cetuximab je lék, který prodlouží dobu dožití o pouhé 1,2 měsíce, přičemž cena 1,2 měsíce trvající léčby u jednoho pacienta je neuvěřitelných 80 000 dolarů. [255] Vysoké ceny léčiv nejsou problémem pouze v zemích třetího světa, ale ohrožují dostupnost onkologické péče i v rozvinutých státech. [256]

Možnosti, jak ušetřit peníze, by měly být hledány v průběhu celého procesu výzkumu a vývoje nového léku. [257] Kromě negativních vedlejších účinků léčiv by měly být monitorovány i pozitivní účinky. [258] Vazba látky na mnoho buněčných proteinů je jev mnohem častější, než se předpokládalo. [259] Řada výpočetně navržených interakcí ligandů s proteiny byla experimentálně potvrzena, [260] interakce s nežádoucími proteiny bývá spojena s toxicitou [261] a vedlejšími účinky. [262] Látky, které se vážou výhradně na jediný protein, mohou být méně účinné než látky ovlivňující řadu buněčných cílů. [263–264] Hledání různých biologických cílů a možných využití starých léků je jeden ze záměrů Národního centra pro rozvoj translačních věd amerického Národního institutu zdraví. [265–266] Používané léky by měly být podrobeny rutinnímu zkoumání pro další možné cíle v organismu a pro potenciální využití při léčbě jiné nemoci. [267]

Jednou z nesporných výhod pro pacienty je ověřená bezpečnost léku [268] a nízká cena. [269] Dostat nepatentovatelná léčiva do klinických testů je cíl neziskové organizace GlobalCures. [270] Disulfiram byl navržen jako pilotní projekt neziskového léčiva v onkologii. [271] Disulfiram představuje levný lék, jehož cena se pohybuje mezi 1 až 2 dolary na jednoho pacienta denně a zdá se být aktivní i proti pevným tumorům. [272] V rámci prosazení disulfiramu jako neziskového léku proti rakovině bude nutná široká mezinárodní podpora, případný úspěch by mohl přispět ke změně společenského klimatu směrem k podpoře výzkumu neziskových léků. [273]

3 CÍL PRÁCE

Cílem mé bakalářské práce je literární rešerše o melanomu a současných možnostech jeho léčby. Z rozličných forem používané terapie se zaměřuji na inhibitory proteazomu a jejich použití k léčbě melanomu. V závěrečné části teoretické části se věnuji otázkám efektivity a ceny při vývoji nového léčiva. V praktické části budu testovat bortezomib, bis-(diethyldithiokarbamát) měďnatý komplex a jeho strukturní komponenty na buněčné linii odvozené od melanomu.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Biologický materiál

Buněčná linie G-361, 88030401, Health Protection Agency Culture Collections.

K testům byla použita buněčná linie G-361. Melanomová linie G-361 byla izolována z kožního melanomu 31-letého muže, bělocha. Rakovinné buňky často vykazují genetickou nestabilitu. [274–275] Je tomu tak i v případě melanomové linie G-361, protože tyto buňky jsou triploidní a nemají chromozom Y. [276]

4.2 Chemikálie

Bortezomib, Millenium Pharmaceuticals

bis-(diethyldithiokarbamát) měďnatý komplex $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$, Mgr. Boris Cvek, PhD.

chlorid měďnatý dihydrát 307483-100G, Sigma-Aldrich

Triton-X 100, 37240, Serva

McCoy's 5A Medium, with GlutaMAXTMI, without L-glutamine, 0030126DK, Life Technologies

Penicillin-Streptomycin (100ml), P11-010 PAA, The Cell Culture Company

Fetal Bovine Serum (FBS); Heat Inactivated, sterile-filtered, cell culture tested, F9665-500ML, Sigma-Aldrich

L-glutamin, G63921-VL, Sigma-Aldrich

Trypanová modř, T6146-256, Sigma-Aldrich

Dimethylsulfoxide (DMSO), D8418-100ML, Sigma-Aldrich

PBS (Phosphate buffered saline) 1x (pH 7,4) NaCl 4g, KCl 0,1g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ 1,605g, KH_2PO_4 0,01g

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid), Sigma-Aldrich

MTT roztok: 3 mg MTT/ml PBS

MTT rozpouštěcí roztok: DMSO/1% NH_3

deionizovaná voda (pomocí přístroje Aqua Osmotic)

dezinfekce Izorapid

4.3 Přístrojové vybavení

Autokláv PS20A Chirana, ČR

Box skříňový mrazící (-80 °C) Sanyo, Japonsko

Inkubátor Contherm, Nový Zéland

Laminární box SafeFASTTop, Faster, Itálie

Lednice Calex, ČR

Mikroskop T2 103411 Olympus, ČR

Spektrofotometr Tecan (program I-Control), Švýcarsko

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

Pipeta multikanálová (30-300 μl) Proline Plus, Biohit

Přístroj na výrobu deionizované vody, Aqua Osmotic, ČR

Váhy Kern ABS 80-4, Německo

pH metr PL600RK, G.O.N Electronic

Centrifuga Mini Labnet International, USA

Vodní lázeň LCB 11D Thermo-circulator, LabTech

Invertovaný mikroskop NIB-100 Nanjing Jiangnan Novel Optics, Čína

Třepačka Reax Top Heidolf, Německo

Membránová vývěva, KNF Lab, Francie

4.4 Materiál

1,5ml mikrozkušavky (Tubes for you)

0,5ml mikrozkušavky (Tubes for you)

2ml mikrozkušavky (Tubes for you)

Kultivační destičky 96-jamkové (Orange Scientific)

Kultivační destičky 24-jamkové (Orange Scientific)

Kultivační láhev 75 cm³, filter cap (Orange Scientific)

Stříkačka plastová z PP pro jednorázové použití 2ml (Chirana)

Stříkačka plastová z PP pro jednorázové použití 20ml (Chirana)

epTIPS 50 - 1 000 µl, 2 x 500 špiček (Eppendorf)

epTIPS 0,1 - 10 µl, 2 x 500 špiček (Eppendorf)

epTIPS 2 - 200 µl, 2 x 500 špiček (Eppendorf)

4.5 Kultivace buněčné linie G-361

Veškerá manipulace s buněčnou kulturou byla prováděna ve sterilních podmínkách laminárního boxu. Buňky byly kultivovány v kultivačních nádobách o objemu 75 ml umístěných v inkubátoru při 37 °C a koncentraci CO₂ 5 %. Ke kultivaci bylo použito McCoy's 5A Medium, k médiu byl přidán penicillin-streptomycin, fetální hovězí sérum a L-glutamin. Konečná koncentrace penicillin-streptomycinu v médiu byla 1 %, koncentrace fetálního hovězího séra 10 % a L-glutaminu 1 %.

Buněčné linie se dlouhodobě uchovávají zamražené při -80 °C. K vlastnímu pokusu jsem použila již předem rozmraženou a připravenou melanomovou linii. Veškeré roztoky, které přišly do kontaktu s buňkami, byly sterilizovány a ohřáty na

37 °C. Z 75ml kultivační nádoby jsem pomocí membránové vývěvy odsála staré médium a přidala 7 ml fosfátového pufru PBS. Pufr jsem ihned opět odsála a k buňkám přidala 1 ml trypsinu.

Trypsin se nechal působit přibližně dvě minuty. Buňky se během působení trypsinu oddělily od dna kultivační nádoby a následně se k nim přidalo asi 8 ml čistého média. Cca 90% roztoku buněk se odebralo do plastové zkumavky a použilo k MTT testům. Zbytek buněk se po přidání čerstvého média přemístil k další kultivaci do inkubátoru.

4.6 Počítání buněk

V získaném roztoku buněk v médiu bylo nutné stanovit koncentraci buněk. Bylo odebráno 10 µl média s buňkami do plastové mikrozkuavky a do ní se dále přidalo 90 µl trypanové modři. Roztok byl promíchán. Odebralo se z něj 10 µl, přeneslo do Bürkerovy komůrky a buňky byly spočítány pod mikroskopem. Z počtu buněk v 10 velkých čtvercích Bürkerovy komůrky se vypočítal aritmetický průměr. Průměr se vynásobil 10^5 a získané číslo odpovídalo počtu buněk v jednom mililitru média.

Buňky byly vysety na 96 jamkovou destičku. Před vysetím byly buňky naředěny do požadované koncentrace tak, aby v každé jamce bylo 200 µl média obsahujícího 20 000 buněk. Takto připravená mikrotitrační destička se přenesla zpět do inkubátoru.

4.7 Určení vlivu testovaných látek na buňky

Po uplynutí 24 hodin se pod mikroskopem zkontrolovala hustota a morfologie buněk na mikrotitrační destičce. Bylo odsáto staré médium a přidáno 200 µl čistého média s obsaženou testovanou látkou v požadované koncentraci. Každá látka byla testována ve čtyřech koncentracích a každá koncentrace použita ve třech jamkách mikrotitrační destičky. Navíc byla provedena pozitivní a negativní kontrola a kontrola vlivu rozpouštědla. Negativní kontrolou byl 20% Triton-X dále zředěný médiem (630 µl média na 370 µl Tritonu). Čisté médium bez přidání jiných látek sloužilo jako pozitivní kontrola.

4.8 Kontrola vlivu rozpouštědla

$\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ komplex a bortezomib jsou nepolární látky, které se ve vodě špatně rozpouštějí. Byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO). K ověření, jestli není

DMSO pro buňky toxický, byl proto přidán 1 μl DMSO k 999 μl média a hodnota viability takto ošetřených buněk byla porovnána s buňkami kultivovanými pouze v médiu. Ke každému pokusu byl vždy namíchán nový roztok $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ komplexu a bortezomibu.

Diethyldithiokarbamat (DDTC) a CuCl_2 byly rozpuštěny ve vodě. Obě látky jsou dostatečně stabilní, proto byl používán stejný zásobní roztok pro všechny MTT testy. Vliv vody na viabilitu buněk testován nebyl, protože voda tvoří převážnou část média. Přidání 1 μl vody na 999 μl média je zanedbatelné množství, které výrazně neovlivní pH ani osmolalitu roztoku.

4.9 Detekce živých buněk pomocí MTT testu

Každý pokus byl proveden ve třech nezávislých opakováních. Po uplynutí 24 hodin inkubace s testovanou látkou bylo odstraněno staré médium. Buňky byly propláchnuty 100 μl PBS/jamka a bylo k nim přidáno 100 μl média s MTT soli. 3 mg MTT soli byly rozpuštěny v 1 ml PBS a roztok byl 10x naředěn médiem.

Žlutá MTT sůl (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid) je redukována na tmavě fialový formazan. Redukce MTT soli probíhá pouze v živých buňkách, množství vytvořeného fialového produktu je přímo úměrné počtu živých buněk v roztoku. [277] Buňky se následně nechaly inkubovat 45 minut v inkubátoru při 37 °C. Následně byl formazan detekován spektrofotometrem při vlnové délce 570 nm.

4.10 Statistické vyhodnocení

Při ověřování vlivu látek na buňky se nejdříve stanoví nulová a alternativní hypotéza. Nulová hypotéza říká, že mezi pozorovanými jevy není žádný vztah. Alternativní hypotéza je opak nulové hypotézy, tedy že mezi pozorovanými jevy závislost existuje.

Příklad nulové hypotézy H_0 : Buňky kultivované po dobu 24 hodin v přítomnosti DDTC o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ dosahují stejných hodnot viabilit jako buňky pěstované pouze v přítomnosti média.

Alternativní hypotéza H_1 : Buňky kultivované po dobu 24 hodin v přítomnosti DDTC o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ se v hodnotách viability liší od kontroly.

Při pokusech porovnáváme viabilitu kontrolních buněk kultivovaných v samotném médiu a viabilitu buněk po 24 hodinové inkubaci s testovanou látkou. Pomocí t-testu určíme, s jakou pravděpodobností má daná látka vliv na viabilitu buněk. Viabilita buněk v médiu je 100 %. Pokud budou naměřené viability testované látky například 98 %, 99 %, a 97 %, je pravděpodobné, že daná látka nemá na životnost buněk žádný vliv a rozdíly jsou způsobeny pouze náhodou. Jestli budou naměřené hodnoty naopak velmi nízké, například 1 %, 10 %, a 5 %, testovaná látka s velkou pravděpodobností způsobuje snížení životaschopnosti buněk.

Rozdíl dvou populací testovaných buněk hodnotíme nepárovým t-testem za pomoci statistických softwarů. Při výpočtu předem stanovíme hladinu statistické významnosti α , v případě MTT testu zvolíme $\alpha = 0,05$. Pokud je vypočítaná p-hodnota nižší než 0,05, zamítáme nulovou hypotézu ve prospěch alternativní hypotézy.

4.11 Určení hodnot IC_{50} a zjištění morfologie buněk

Pomocí lineární regrese byla v programu ED50plus v1.0. spočítána poloviční hodnota maximální inhibiční koncentrace (half maximal inhibitory concentration, IC_{50}). IC_{50} udává koncentraci noxy, při níž se životaschopnost buněk sníží na polovinu. Buňky byly vysazeny na 24-jamkovou destičku a inkubovány po 24 hodin při IC_{50} koncentraci každé látky. Následně byly buňky vyfoceny inverzním mikroskopem s kamerou.

5 VÝSLEDKY

5.1 Určení vlivu zkoumaných látek na buňky

5.1.1 Vliv DMSO na buňky

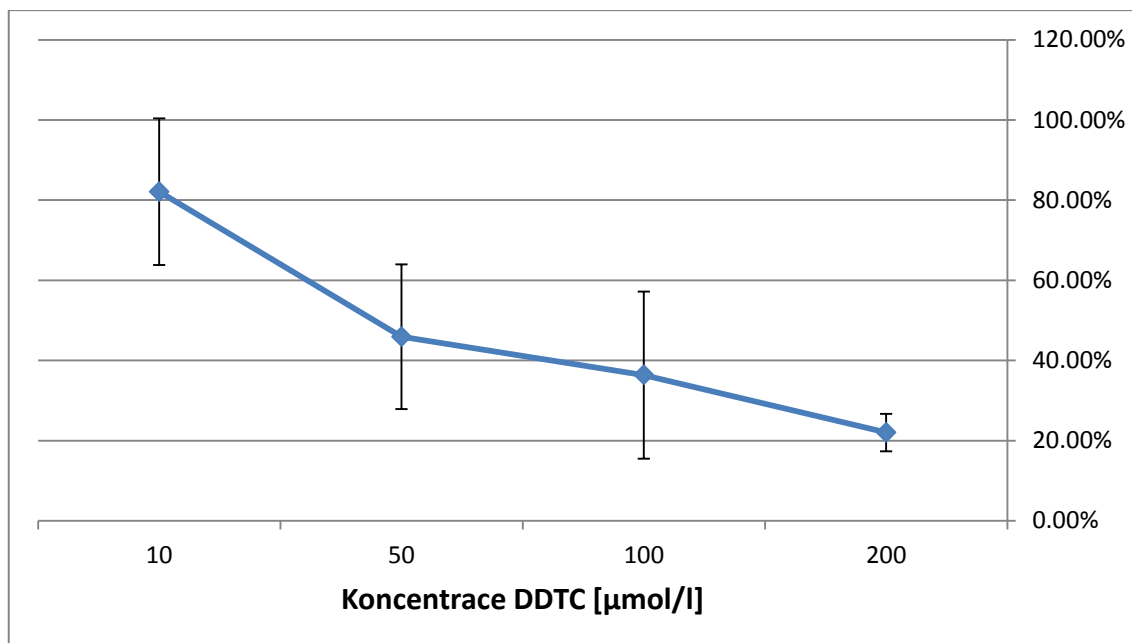
V jednotlivých pokusech s přidaným 1 μ l DMSO byly určeny následující hodnoty viabilit: 102,49 %; 86,69 %; 109,44 %; 94,17 %; 99,36 %; 98,72 %. Průměrná hodnota viability byla 98,48%. Hodnoty viabilit DMSO a média byly porovnány v programu Statistica verze 10. Nepárovým t-testem bylo ověřeno, že DMSO nemá životnost buněk žádný vliv. Vypočítaná p-hodnota byla vyšší než 0,05.

5.1.2 Vliv koncentrace DDTC na viabilitu buněk

Buňky byly vystaveny působení diethyldithiokarbamátu o koncentracích 200, 100, 50 a 10 μ mol/l. DDTC způsobuje signifikantní snížení viability od koncentrace 50 μ mol/l. Souhrnné výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 1 a v grafu č. 1.

Tabulka č. 1 – Viabilita buněk při inkubaci s DDTC po dobu 24 hodin

koncentrace DDTC [μ mol/l]	viabilita buněk [%]				směrodatná odchylka	p-hodnota
	1. test	2. test	3. test	průměr		
200	26,30	17,05	22,76	22,03	4,67	0,000008
100	57,12	36,61	15,42	36,38	20,85	0,006151
50	66,81	35,66	35,36	45,94	18,07	0,006602
10	63,77	100,32	82,26	82,11	18,28	0,165



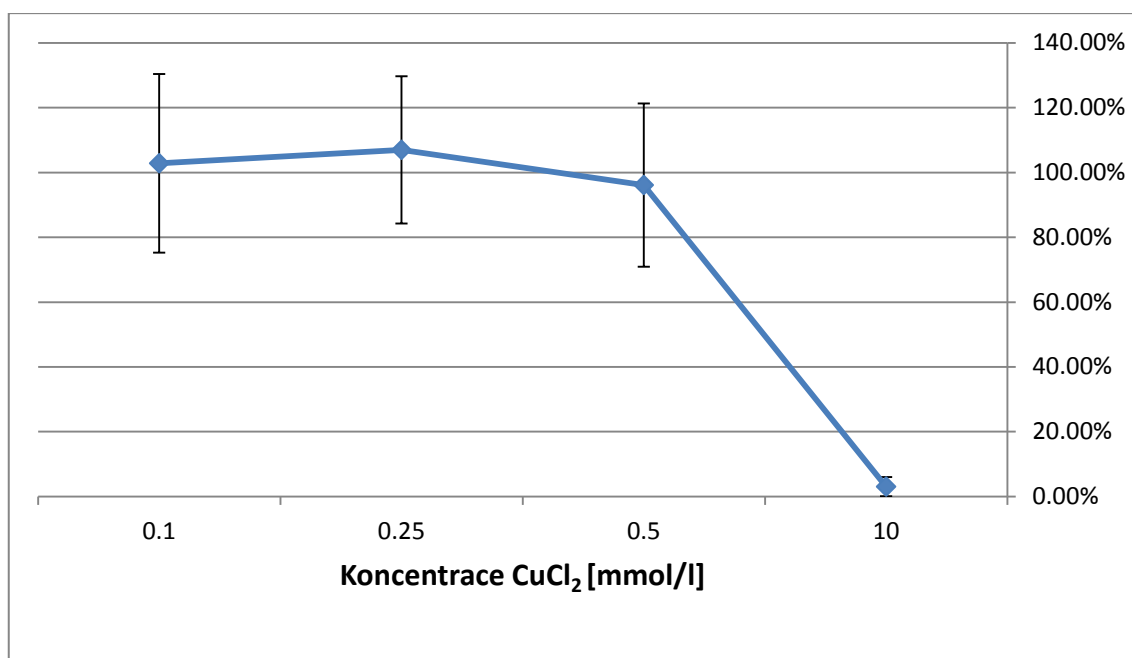
Graf č. 1 – Závislost viability buněk (osa y) na koncentraci DDTC (inkubace 24 hodin)

5.1.3 Vliv koncentrace CuCl_2 na viabilitu buněk

Použité koncentrace CuCl_2 byly 1; 0,5; 0,25 a 0,1 mmol/l. Měď byla pro buňky toxická pouze v nejvyšší testované koncentraci 1 mmol. Souhrnné výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 2 a v grafu č. 2.

Tabulka č. 2 – Viabilita buněk při inkubaci s CuCl_2 po dobu 24 hodin

koncentrace CuCl_2 [mmol/l]	viabilita buněk [%]				směrodatná odchylka	p-hodnota
	1. test	2. test	3. test	průměr		
1	0,60	2,17	6,35	3,04	2,97	0,000001
0,5	67,57	115,25	105,47	96,10	25,18	0,802
0,25	85,45	130,69	104,69	106,94	22,71	0,624
0,1	77,27	132,02	99,09	102,79	27,56	0,869



Graf č. 2 – Závislost viability buněk (osa y) na koncentraci CuCl_2 (inkubace 24 hodin)

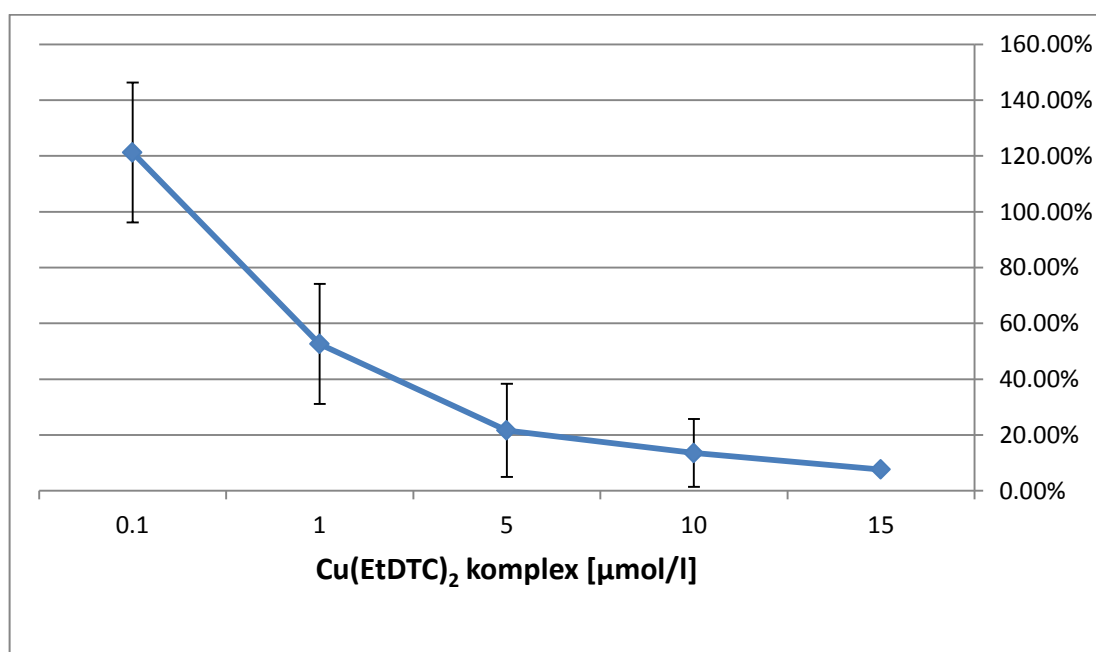
5.1.4 Vliv koncentrace $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ komplexu na viabilitu buněk

$\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ komplex byl původně testován při koncentracích 15; 10; 5 a 1 $\mu\text{mol/l}$. $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ komplex byl pro buňky toxický ve všech původně použitých koncentracích a z některých výsledků (zde nepublikovaných) nebylo možné stanovit IC_{50} kvůli nízkým hodnotám viability. Koncentraci $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ jsem proto snížila na 10; 5; 1 a 0,1 $\mu\text{mol/l}$.

S výjimkou nejnižší testované koncentrace 0,1 $\mu\text{mol/l}$ se viabilita $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ komplexu statisticky významně lišila od kontroly ve všech použitých koncentracích. Souhrnné výsledky při testování vlivu $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ komplexu na viabilitu buněk jsou uvedeny v tabulce č. 3 a v grafu č. 3.

Tabulka č. 3 – Viabilita buněk při inkubaci s $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ komplexem po dobu 24 hodin

koncentrace $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ [$\mu\text{mol/l}$]	viabilita buněk [%]					p-hodnota
	1. test	2. test	3. test	průměr	směrodatná odchylka	
15	7,66					
10	6,52	6,61	27,57	13,57	12,13	0,000247
5	31,73	2,38	30,92	21,68	16,71	0,001254
1	68,33	61,46	28,09	52,62	21,53	0,018908
0,1		138,92	103,51	121,22	25,04	0,354



Graf č. 3 – Závislost viability buněk (osa y) na koncentraci $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ komplexu (inkubace 24 hodin)

5.1.5 Vznik $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ komplexu

Byl použit syntetický $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ komplex, který v testovaných koncentracích způsobil signifikantní snížení viability. Bylo nutné ověřit, jestli tento komplex vzniká

v kultivačním médiu z jeho strukturních komponent (mědi a diethyldithiokarbamátu). Buňky byly proto inkubovány s CuCl_2 a DDTC v nejnižší koncentraci, která byla použita v předchozích MTT testech.

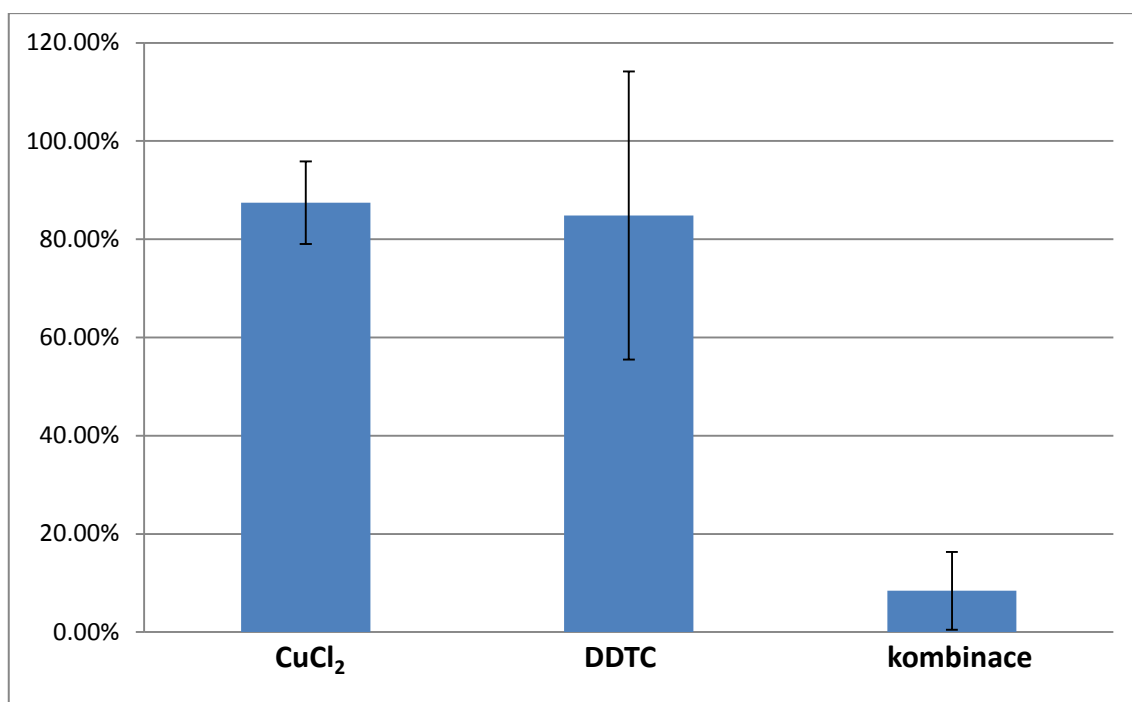
Testovaná koncentrace CuCl_2 byla 0,1 mmol/l a koncentrace DDTC 0,01 mmol/l. K ověření vzniku $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ komplexu v kultivačním médiu se do mikrozkušavky s médiem přidalo množství roztoku obou látek, tak aby tato mikrozkušavka obsahovala CuCl_2 o koncentraci 0,1 mmol/l a zároveň DDTC o koncentraci 0,01 mmol/l.

Při statistickém zhodnocení byla v nepárovém t-testu porovnána hodnota viabilit buněk testovaných s CuCl_2 a DDTC a buněk inkubovaných v přítomnosti obou látek dohromady. Viabilita buněk samostatně testovaných látek se statisticky významně lišila od jejich kombinace. Průměrná hodnota viability samostatných látek byla mezi 80 a 90 %, průměr viability kombinace CuCl_2 a DDTC byl 8,41 %. Na základě desetkrát nižší viability kombinace CuCl_2 a DDTC můžeme proto usoudit, že $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ komplex v kultivačním médiu vzniká. Souhrnné výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 4 a v grafu č. 4.

Tabulka č. 4 – Viabilita buněk při inkubaci s CuCl_2 , DDTC a jejich kombinace (24 hodin)

látky a její koncentrace [mmol/l]	viabilita buněk [%]					p-hodnota*
	1. test	2. test	3. test	průměr	směrodatná odchylka	
CuCl_2 0,1	89,29	94,79	78,23	87,44	8,43	
DDTC 0,01	115,98	80,77	57,70	84,82	29,35	
kombinace	1,05	7,39	16,79	8,41	7,92	0,000334

*p-hodnota při srovnání viabilit buněk testovaných s CuCl_2 a DDTC vůči buňkám vystavených jejich kombinaci



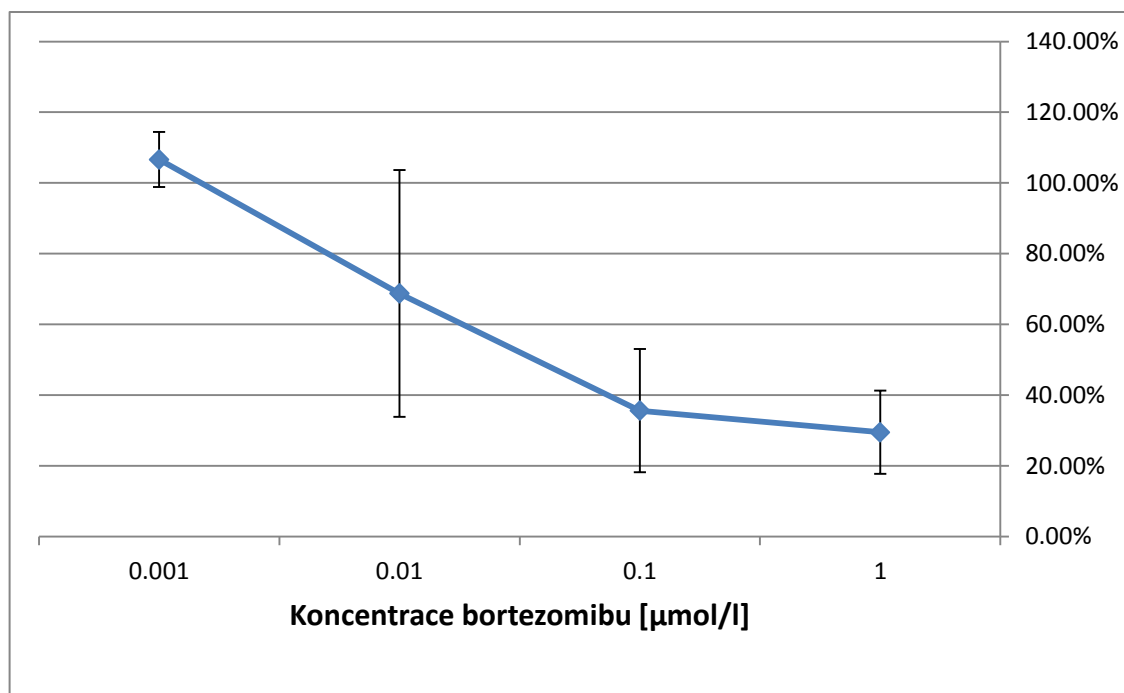
Graf č. 4 – Porovnání hodnot viability při inkubaci s CuCl_2 , DDTC a jejich kombinace (24 hodin)

5.1.6 Vliv koncentrace bortezomibu na viabilitu buněk

V teoretické části již bylo uvedeno, že bortezomib způsobuje velké snížení viability melanomových buněčných linií. Z tohoto důvodu a také kvůli vysoké ceně této látky byly testované koncentrace velmi nízké. Použité koncentrace bortezomibu byly 1; 0,1; 0,01 a 0,001 $\mu\text{mol/l}$. Koncentrace 1 a 0,1 $\mu\text{mol/l}$ způsobily statisticky signifikantní snížení viability, koncentrace 0,01 a 0,001 $\mu\text{mol/l}$ viabilitu buněk neovlivnily. Výsledky MTT testu bortezomibu jsou shrnuty v tabulce č. 5 a v grafu č. 5.

Tabulka č. 5 – Viabilita buněk při inkubaci s bortezomibem po dobu 24 hodin

koncentrace bortezomibu [$\mu\text{mol/l}$]	viabilita buněk [%]				směrodatná odchylka	p-hodnota
	1. test	2. test	3. test	průměr		
1	23,60	21,92	43,04	29,52	11,74	0,000483
0,1	29,39	22,13	55,33	35,62	17,45	0,003080
0,01	108,25	42,13	55,86	68,75	34,89	0,196
0,001	110,31	111,86	97,69	106,62	7,77	0,214



Graf č. 5 – Závislost viability buněk (osa y) na koncentraci bortezomibu (inkubace 24 hodin)

5.2 Hodnoty IC_{50} pro zkoumané látky

IC_{50} bortezomibu byla ze všech testovaných látek nejnižší (0,45 $\mu\text{mol/l}$). $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ komplex měl koncentraci IC_{50} přibližně desetkrát vyšší. DDTC i CuCl_2 byly látky pro buňky málo toxické. Hodnota IC_{50} DDTC byla 116,07 $\mu\text{mol/l}$, IC_{50}

chloridu měďnatého byla nejvyšší ze všech testovaných látek (660,95 $\mu\text{mol/l}$). Všechny hodnoty IC_{50} byly shrnuty do přehledné tabulky č. 6.

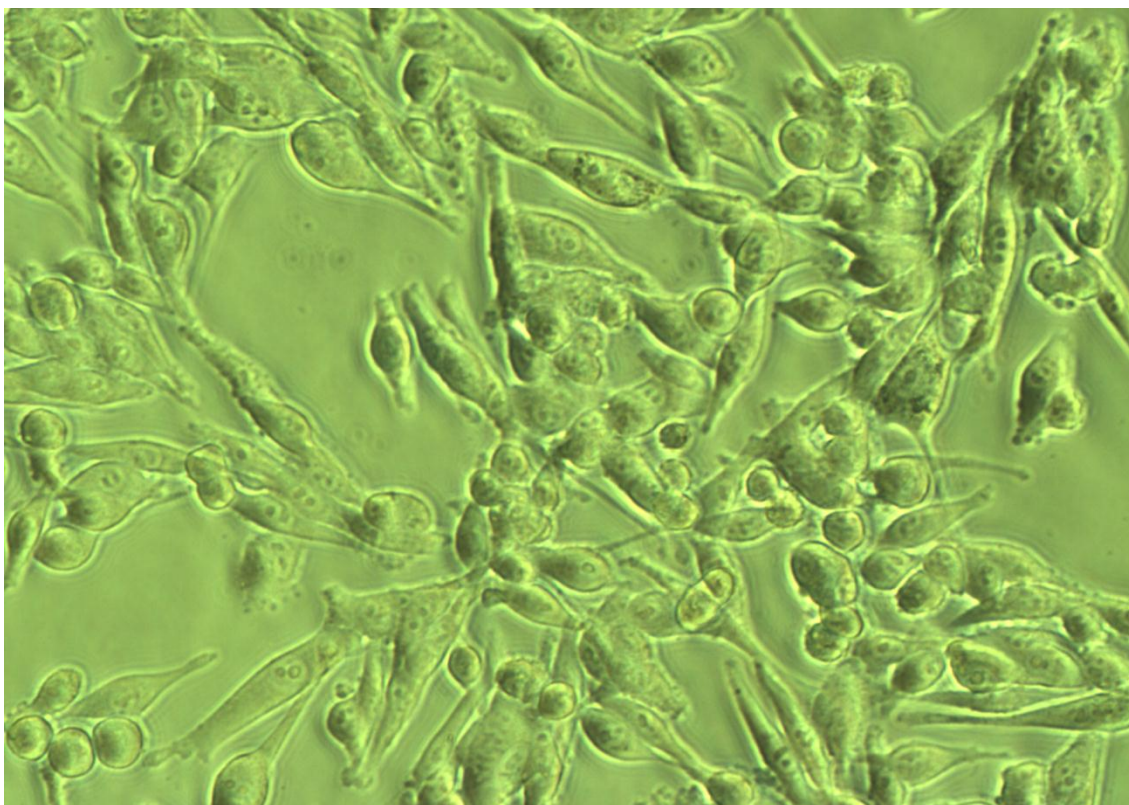
Tabulka č. 6 – IC_{50} všech testovaných látek (inkubace 24 hodin)

testovaná látka	hodnota IC_{50} [$\mu\text{mol/l}$]
DDTC	116,07
CuCl_2	660,95
$\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ komplex	4,04
bortezomib	0,45

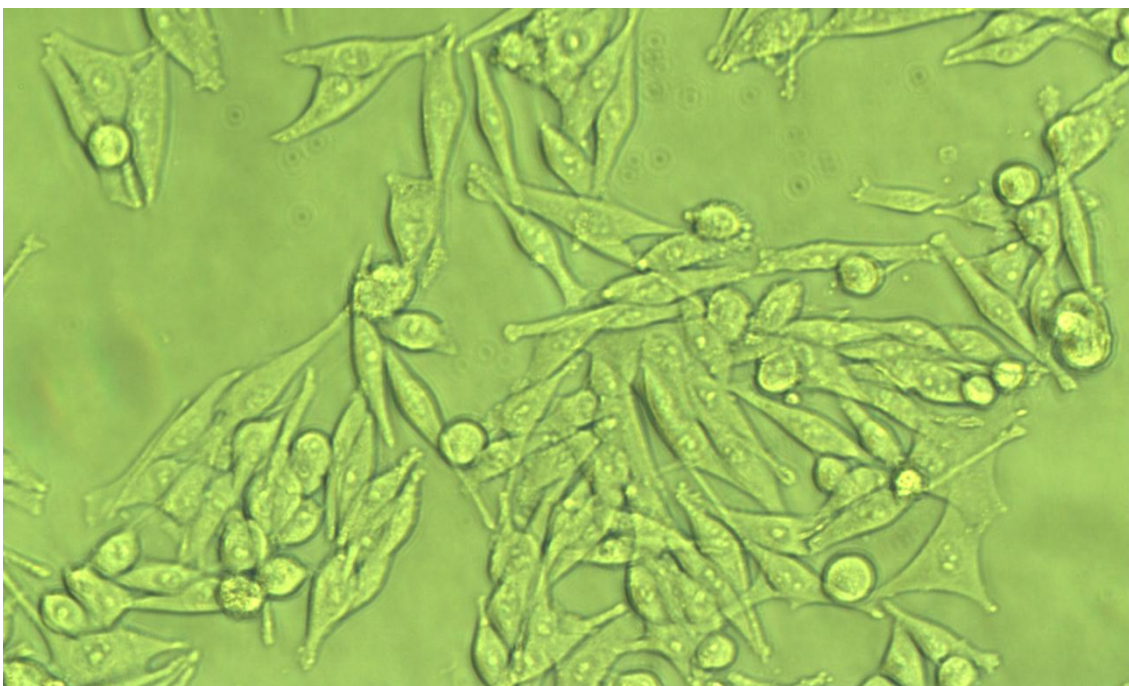
5.3 Morfologie buněk

Buňky kultivované v médiu měly po 24 hodinách kultivace většinou podélný tvar a hustě pokryly dno jamky. Byla porovnána hustota a morfologie buněk kontrolních a buněk rostoucích v přítomnosti testované látky o koncentraci IC_{50} po dobu 24 hodin. Hustota buněk rostoucích v přítomnosti CuCl_2 o koncentraci 660,95 $\mu\text{mol/l}$, byla nižší než u kontroly, tvar ani velikost buněk se nezměnily.

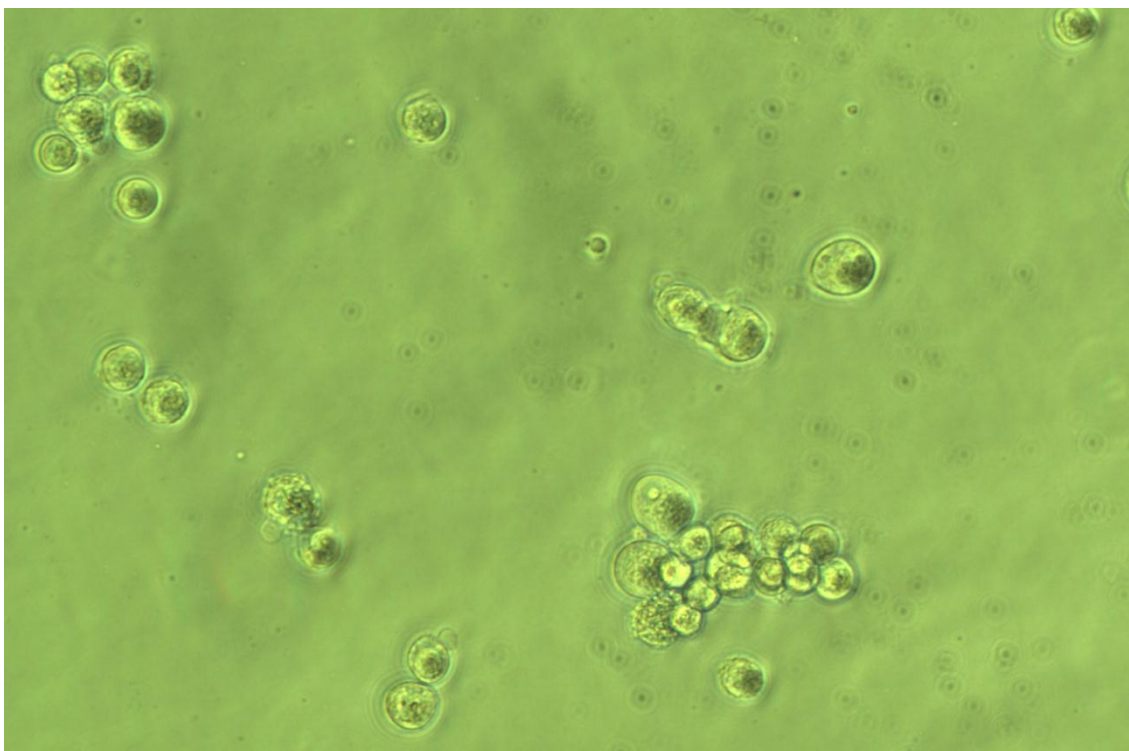
Buňky rostoucí v přítomnosti DDTC, $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ komplexu a bortezomibu prodělaly morfologické změny. V přítomnosti každé z těchto tří látek buňky získaly kulatý tvar a jejich hustota se výrazně snížila. Buňky pěstované v přítomnosti DDTC měly tendenci ke shlukování. Fotografie buněk pořízené invertovaným mikroskopem s kamerou jsou na obrázcích č. 6 až 10.



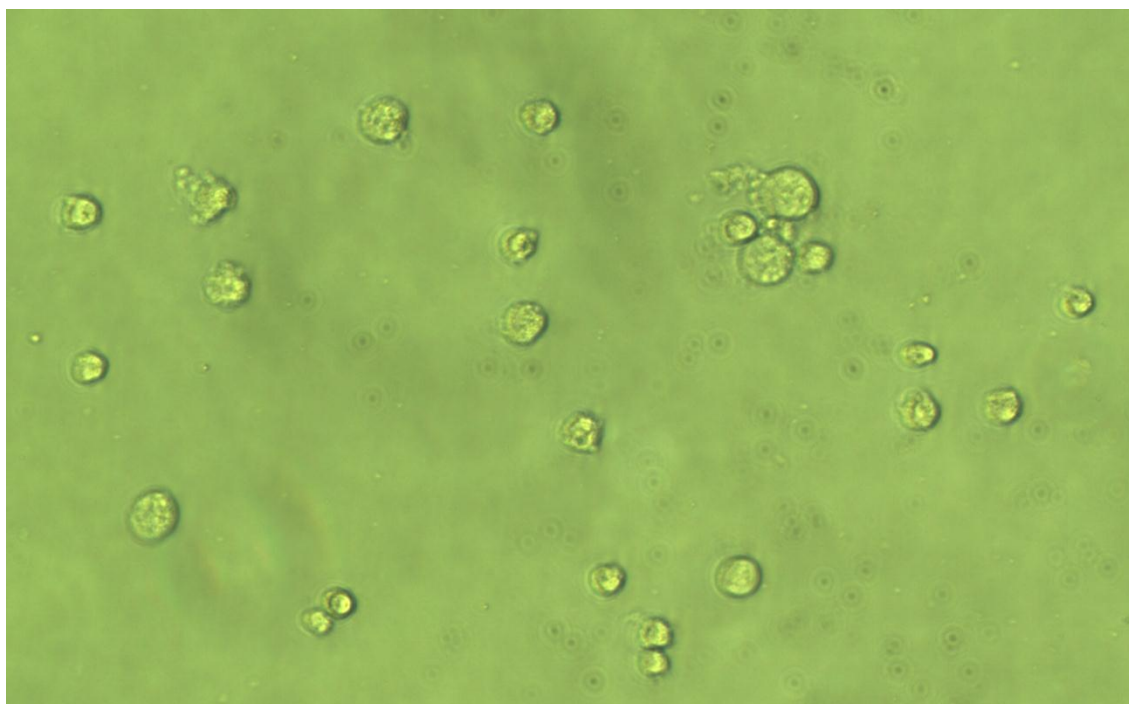
Obrázek č. 6 – Kontrola – buňky inkubované po dobu 24 hodin v médiu, zvětšení 200x



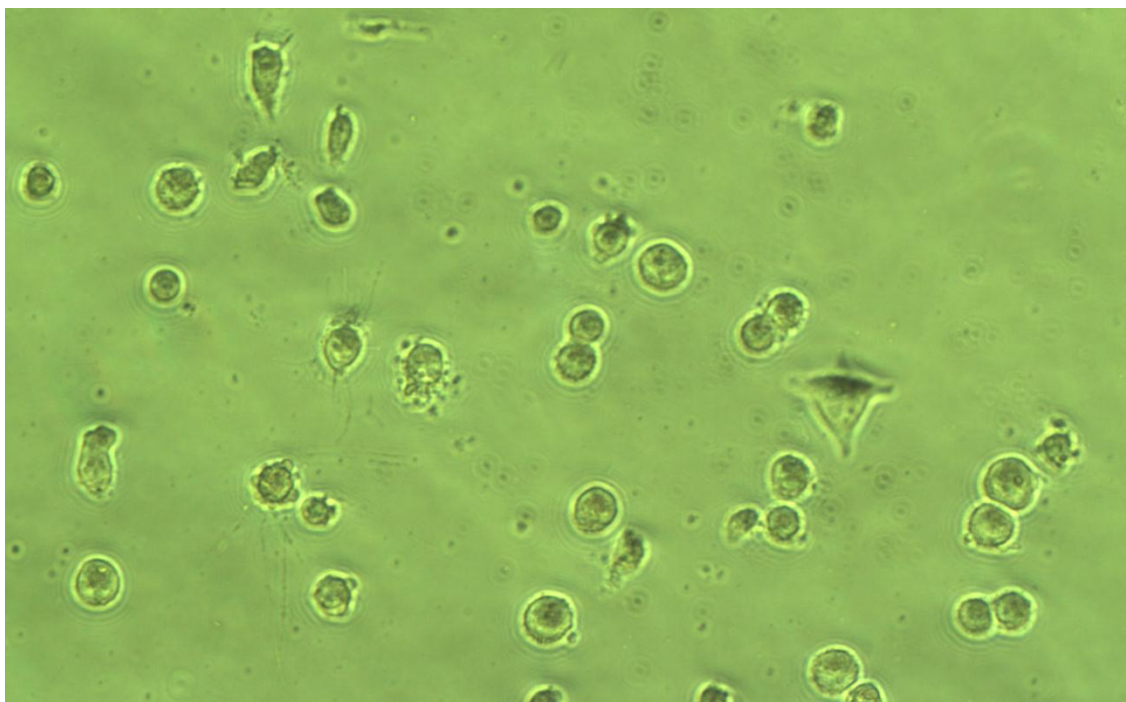
Obrázek č. 7 – Buňky inkubované po dobu 24 hodin v médiu s CuCl_2 o koncentraci $660,95 \mu\text{mol/l}$, zvětšení 200x



Obrázek č. 8 – Buňky inkubované po dobu 24 hodin v médiu s DDTC o koncentraci 116,07 $\mu\text{mol/l}$, zvětšení 200x



Obrázek č. 9 – Buňky inkubované po dobu 24 hodin v médiu s $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ komplexem o koncentraci 4,04 $\mu\text{mol/l}$ zvětšení 200x



Obrázek č. 10 – Buňky inkubované po dobu 24 hodin v médiu s bortezomibem o koncentraci 0,45 $\mu\text{mol/l}$, zvětšení 200x

6 DISKUZE

V praktické části bakalářské práce byl zkoumán vliv bortezomibu, bis-(diethyldithiokarbamát) měďnatého komplexu, chloridu měďnatého a diethyldithiokarbamátu na melanomové buněčné linii G-361.

IC₅₀ bortezomibu byla 0,45 μmol/l. Koncentrace 1 a 0,1 μmol/l způsobily statisticky signifikantní snížení viability, koncentrace 0,01 a 0,001 μmol/l viabilitu buněk neovlivnily. Autoři [99] použili stejnou melanomovou linii G-361, ale dosáhli většího snížení viability. Při použití 0,1 μg/ml bortezomibu byla jimi naměřená viabilita 1-13% kontroly, IC₅₀ její buněčné linie byla 0,17 μg/ml. Rozdíl je způsoben delší dobou inkubace. Autoři [99] buňky inkubovali s testovanou látkou po dobu 48 hodin, doba její inkubace byla poloviční (24 hodin). Bortezomib bych jako lék proti malignímu melanomu nedoporučila, protože není účinný proti pevným tumorům. Navzdory všem úspěchům bortezomibu na buněčných liniích i xenograftech musel být klinický test na pacientech s melanomem předčasně ukončen z důvodu neúčinnosti. [105–106]

IC₅₀ Cu(EtDTC)₂ komplexu byla 4,04 μmol/l. Cu(EtDTC)₂ komplex pravděpodobně vzniká z diethyldithiokarbamátu a mědi v kultivačním médiu. Disulfiram v kombinaci s glukonátem měďnatým bych doporučila ke klinickým testům pro léčbu pacientů s maligním melanomem. Fáze, kdy melanom již metastázoval do jiných orgánů, je v současné době nevyléčitelná. U pacientky s jaterní metastázou z očního melanomu došlo k vymizení tumoru a značnému zlepšení kvality života. [238] Pacientka užívala kromě disulfiramu i zinek ve formě potravinového doplňku, což vedlo k tvorbě účinných kovových komplexů dithiokarbamátu. Klinické testy disulfiramu proti různým formám melanomu by zodpověděly otázku, které formy melanomu jsou citlivé na tento lék. V případě úspěšného schválení disulfiramu jako léku proti melanomu by byly ušetřeny velké náklady za onkologickou léčbu, která je v současnosti obrovskou finanční zátěží zdravotnických systémů.

Mým závěrečným doporučením plynoucím z bakalářské práce je důraz na prevenci melanomu v populaci. U osob mezi 25 a 29 lety je melanom nejčastější rakovinou. [278] Vysoká incidence je připisována častému užívání solárií v této věkové

skupině. [279] Jako prevenci melanomu bych doporučila vyhnoutí se všem formám umělého opalování a spálení kůže od slunce. V případě podezření na melanom by měli lidé ihned kontaktovat praktického lékaře nebo dermatologa. Včasné chirurgické odstranění melanomu vede k úplnému vyléčení bez jakýchkoli následků do budoucna.

7 ZÁVĚR

Cílem práce bylo vypracovat literární rešerši o melanomu a současných možnostech jeho léčby. Maligní melanom je závažný druh rakoviny kůže, který způsobuje 75 % úmrtí na tuto rakovinu. Vyhýbáním se zařízením umělého opalování by se mohla značně snížit incidence, především u mladých žen. U osob mezi 25 a 29 lety věku je melanom nejčastější rakovinou, což je dáváno do souvislosti s častými návštěvami solárií. Pokud je nemoc zachycena včas, dá se melanom zcela vyléčit chirurgickým odstraněním.

Stádia, kdy již nemoc metastázovala, jsou zatím neléčitelná. Melanom se léčí pomocí klasické chemoterapie, která má řadu nežádoucích účinků. V roce 2011 byly FDA schváleny dva nové léky ipilimumab a vemurafenib, na obě léčiva se u pacientů vytváří rezistence. Ve svojí bakalářské práci jsem se zaměřila na inhibitory proteazomu jako nový způsob léčby melanomu.

Náplní praktické části byly MTT testy bortezomibu, bis-(diethyldithiokarbamát) měďnatého komplexu a jeho strukturních komponent na buněčné linii G-361. Měď i diethyldithiokarbamát ovlivnily viabilitu buněk pouze ve vysokých koncentracích. IC_{50} bortezomibu byla velmi nízká ($0,45 \mu\text{mol/l}$), $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ komplex měl koncentraci IC_{50} přibližně desetkrát vyšší ($4,04 \mu\text{mol/l}$).

Inhibitor proteazomu bortezomib byl úspěšně testován na buněčných liniích a myších xenograftech, ale na pevné tumory pacientů bohužel nefunguje. Disulfiram se užívá v léčbě alkoholismu již desítky let, ale mohl by být využit jako inhibitor proteazomu proti různým rakovinám. Za protirakovinovou aktivitou disulfiramu je pravděpodobně inhibice JAMM domény Pih1 podjednotky 19S proteazomu komplexem diethyldithiokarbamátu s kovy.

Disulfiram v kombinaci s glukonátem zinečnatým bych doporučila do klinických testů pro léčbu melanomu. Disulfiram je bezpečný, levný inhibitor proteazomu, který navodil kompletní remisi u pacientky s metastázou z očního melanomu. Díky nízké ceně nepřevyšující 1 až 2 dolary za jednu tabletu byl disulfiram navržen jako pilotní projekt neziskového léčiva. Další výzkum by se měl proto zaměřit na klinické testy disulfiramu proti melanomu i jiným rakovinám.

8 LITERATURA

- [1] Jerant AF, Johnson JT, Sheridan CD, Caffrey TJ. Early detection and treatment of skin cancer. *Am Fam Physician*. 2000; 62(2): 357-68.
- [2] Gloster HM, Brodland DG. The epidemiology of skin cancer. *Dermatol Surg*. 1996; 22: 217–26.
- [3] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005; 55(2): 74-108.
- [4] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61(2): 69-90.
- [5] Berwick M, Armstrong BK, Ben-Porat L, Fine J, Kricke A, Eberle C, *et al*. Sun exposure and mortality from melanoma. *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97(3): 195-9.
- [6] Attis MG, Vollmer RT. Mitotic rate in melanoma: a reexamination. *Am J Clin Pathol*. 2007; 127(3): 380-4.
- [7] Takebe H, Nishigori C, Tatsumi K. Melanoma and other skin cancers in xeroderma pigmentosum patients and mutation in their cells. *J Invest Dermatol*. 1989; 92(5 Suppl): 236S-238S.
- [8] De Vries E, Bray FI, Coebergh JW, Parkin DM. Changing epidemiology of malignant cutaneous melanoma in Europe 1953-1997: rising trends in incidence and mortality but recent stabilizations in western Europe and decreases in Scandinavia. *Int J Cancer*. 2003; 107(1): 119-26.
- [9] Joosse A, de Vries E, Eckel R, Nijsten T, Eggermont AM, Hölzel D, *et al*. Gender differences in melanoma survival: female patients have a decreased risk of metastasis. *J Invest Dermatol*. 2011; 131(3): 719-26.
- [10] Leiter U, Garbe C. Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer—the role of sunlight. *Adv Exp Med Biol*. 2008; 624: 89-103.
- [11] Unna PG 1894, citováno v Randle HW. Suntanning: differences in perceptions throughout history. *Mayo Clin Proc*. 1997; 72(5): 461-6.

- [12] Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, *et al.* Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clin Proc.* 2007; 82(3): 364-80.
- [13] Osborne JE, Hutchinson PE. Vitamin D and systemic cancer: is this relevant to malignant melanoma? *Br J Dermatol.* 2002; 147(2): 197-213.
- [14] Reichrath J, Rech M, Moeini M, Meese E, Tilgen W, Seifert M. In vitro comparison of the vitamin D endocrine system in 1,25(OH)₂D₃-responsive and -resistant melanoma cells. *Cancer Biol Ther.* 2007; 6(1): 48-55.
- [15] Eisman JA, Barkla DH, Tutton PJ. Suppression of in vivo growth of human cancer solid tumor xenografts by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Cancer Res.* 1987; 47(1): 21-5.
- [16] Asgari MM, Maruti SS, Kushi LH, White E. A cohort study of vitamin D intake and melanoma risk. *J Invest Dermatol.* 2009; 129(7): 1675-80.
- [17] Tolleson WH. Human melanocyte biology, toxicology, and pathology. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2005; 23: 105–161.
- [18] Cover photo, *J Cell Biol.* 2001; 152(4).
- [19] Ortonne JP. Photoprotective properties of skin melanin. *Br J Dermatol.* 2002; 146 Suppl 61: 7-10.
- [20] Meredith P, Riesz J. Radiative relaxation quantum yields for synthetic eumelanin. *Photochem Photobiol.* 2004; 79(2): 211-6.
- [21] Szabó G. The number of melanocytes in human epidermis. *Br Med J.* 1954; 1(4869): 1016-7.
- [22] Rees JL. Genetics of hair and skin color. *Annu Rev Genet.* 2003; 37: 67-90.
- [23] Hoath SB, Leahy DG. The organization of human epidermis: functional epidermal units and phi proportionality. *J Invest Dermatol.* 2003; 121(6): 1440-6.
- [24] Plonka PM, Passeron T, Brenner M, Tobin DJ, Shibahara S, Thomas A, *et al.* What are melanocytes really doing all day long...? *Exp Dermatol.* 2009; 18(9): 799-819.

- [25] Takeda Y. Existence and distribution of melanocytes and HMB-45-positive cells in the human minor salivary glands. *Pathol Int.* 2000; 50(1): 15-9.
- [26] Lens M, Bataille V, Krivokapic Z. Melanoma of the small intestine. *Lancet Oncol.* 2009; 10(5): 516-21.
- [27] Marks R. Epidemiology of melanoma. *Clin Exp Dermatol.* 2000; 25(6): 459-63.
- [28] Naldi L, Altieri A, Imberti GL, Gallus S, Bosetti C, La Vecchia C, *et al.* Sun exposure, phenotypic characteristics, and cutaneous malignant melanoma. An analysis according to different clinico-pathological variants and anatomic locations (Italy). *Cancer Causes Control.* 2005; 16(8): 893-9.
- [29] Veierød MB, Adami HO, Lund E, Armstrong BK, Weiderpass E. Sun and solarium exposure and melanoma risk: effects of age, pigmentary characteristics, and nevi. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010; 19(1): 111-20.
- [30] Lazovich D, Vogel RI, Berwick M, Weinstock MA, Anderson KE, Warshaw EM. Indoor tanning and risk of melanoma: a case-control study in a highly exposed population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010; 19(6): 1557-68.
- [31] Rivers JK. Is there more than one road to melanoma? *Lancet.* 2004; 363(9410): 728-30.
- [32] Diffey B. Sunscreen isn't enough. *J Photochem Photobiol B.* 2001; 64(2-3): 105-8.
- [33] Green A, Williams G, Neale R, Hart V, Leslie D, Parsons P, *et al.* Daily sunscreen application and betacarotene supplementation in prevention of basal-cell and squamous-cell carcinomas of the skin: a randomised controlled trial. *Lancet.* 1999; 354(9180): 723-9.
- [34] Green AC, Williams GM, Logan V, Strutton GM. Reduced melanoma after regular sunscreen use: randomized trial follow-up. *J Clin Oncol.* 2011; 29(3): 257-63.
- [35] Huncharek M, Kupelnick B. Use of topical sunscreens and the risk of malignant melanoma: a meta-analysis of 9067 patients from 11 case-control studies. *Am J Public Health.* 2002; 92(7): 1173-7.

- [36] Dennis LK, Beane Freeman LE, VanBeek MJ. Sunscreen use and the risk for melanoma: a quantitative review. *Ann Intern Med.* 2003; 139(12): 966-78.
- [37] Goldenhersh MA, Koslowsky M. Increased melanoma after regular sunscreen use? *J Clin Oncol.* 2011; 29(18): e557-8.
- [38] Lebwohl M. ACP journal club. Regular sunscreen use reduces invasive but not overall melanoma in white adults. *Ann Intern Med.* 2011; 154(10): JC5-12.
- [39] Bradford PT, Freedman DM, Goldstein AM, Tucker MA. Increased risk of second primary cancers after a diagnosis of melanoma. *Arch Dermatol.* 2010; 146(3): 265-72.
- [40] Hayward NK. Genetics of melanoma predisposition. *Oncogene.* 2003; 22(20): 3053-62.
- [41] Scolyer RA, Long GV, Thompson JF. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. *Mol Oncol.* 2011; 5(2): 124-36.
- [42] Yokoyama S, Woods SL, Boyle GM, Aoude LG, MacGregor S, Zismann V, *et al.* A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature.* 2011; 480(7375): 99-103.
- [43] Levy C, Khaled M, Fisher DE. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med.* 2006; 12(9): 406-14.
- [44] Hayward N. New developments in melanoma genetics. *Curr Oncol Rep.* 2000; 2(4): 300-6.
- [45] Goldstein AM, Chan M, Harland M, Hayward NK, Demenais F, Bishop DT, *et al.* Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J Med Genet.* 2007; 44(2): 99-106.
- [46] Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002; 417(6892): 949-54.
- [47] Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, *et al.* High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet.* 2003; 33(1): 19-20.

- [48] Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, *et al.* Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med.* 2005; 353(20): 2135-47.
- [49] Landi MT, Bauer J, Pfeiffer RM, Elder DE, Hulley B, Minghetti P, *et al.* MC1R germline variants confer risk for BRAF-mutant melanoma. *Science.* 2006; 313(5786): 521-2.
- [50] Fargnoli MC, Pike K, Pfeiffer RM, Tsang S, Rozenblum E, Munroe DJ, *et al.* MC1R variants increase risk of melanomas harboring BRAF mutations. *J Invest Dermatol.* 2008; 128(10): 2485-90.
- [51] Hacker E, Hayward NK, Dumenil T, James MR, Whiteman DC. The association between MC1R genotype and BRAF mutation status in cutaneous melanoma: findings from an Australian population. *J Invest Dermatol.* 2010; 130(1): 241-8.
- [52] Thomas NE, Kanetsky PA, Edmiston SN, Alexander A, Begg CB, Groben PA, *et al.* Relationship between germline MC1R variants and BRAF-mutant melanoma in a North Carolina population-based study. *J Invest Dermatol.* 2010; 130(5): 1463-5.
- [53] Harbour JW, Onken MD, Roberson ED, Duan S, Cao L, Worley LA, *et al.* Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science.* 2010; 330(6009): 1410-3.
- [54] Mocellin S, Nitti D. Vitamin D receptor polymorphisms and the risk of cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Cancer.* 2008; 113(9): 2398-407.
- [55] Li C, Liu Z, Zhang Z, Strom SS, Gershenwald JE, Prieto VG, *et al.* Genetic variants of the vitamin D receptor gene alter risk of cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol.* 2007; 127(2): 276-80.
- [56] Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol.* 2006; 24(26): 4340-6.
- [57] Beadling C, Jacobson-Dunlop E, Hodi FS, Le C, Warrick A, Patterson J, *et al.* KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(21): 6821-8.

- [58] Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, *et al.* TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science*. 2013; 339(6122): 959-61.
- [59] Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science*. 2013; 339(6122): 957-9.
- [60] Cooper S. First lines of theory and practice of surgery, p. 363, Longman, Orme & Co. London, 1840.
- [61] Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, *et al.* Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*. 2009; 27(36): 6199-206.
- [62] Balch CM, Urist MM, Karakousis CP, Smith TJ, Temple WJ, Drzewiecki K, *et al.* Efficacy of 2-cm surgical margins for intermediate-thickness melanomas (1 to 4 mm). Results of a multi-institutional randomized surgical trial. *Ann Surg*. 1993; 218(3): 262-9.
- [63] Erickson C, Miller SJ. Treatment options in melanoma in situ: topical and radiation therapy, excision and Mohs surgery. *Int J Dermatol*. 2010; 49(5): 482-91.
- [64] Damato EM, Damato BE. Detection and time to treatment of uveal melanoma in the United Kingdom: an evaluation of 2,384 patients. *Ophthalmology*. 2012; 119(8): 1582-9.
- [65] Aoyama T, Mastrangelo MJ, Berd D, Nathan FE, Shields CL, Shields JA, *et al.* Protracted survival after resection of metastatic uveal melanoma. *Cancer*. 2000; 89(7): 1561-8.
- [66] Thomas JM. Prognostic false-positivity of the sentinel node in melanoma. *Nat Clin Pract Oncol*. 2008; 5(1): 18-23.
- [67] Wong SL, Balch CM, Hurley P, Agarwala SS, Akhurst TJ, Cochran A, *et al.* Sentinel lymph node biopsy for melanoma: American Society of Clinical Oncology and Society of Surgical Oncology joint clinical practice guideline. *J Clin Oncol*. 2012; 30(23): 2912-8.

- [68] Grob JJ, Dreno B, de la Salmonière P, Delaunay M, Cupissol D, Guillot B, *et al.* Randomised trial of interferon alpha-2a as adjuvant therapy in resected primary melanoma thicker than 1.5 mm without clinically detectable node metastases. *Lancet.* 1998; 351(9120): 1905-10.
- [69] Kim JH, Hahn EW, Tokita N. Combination hyperthermia and radiation therapy for cutaneous malignant melanoma. *Cancer.* 1978; 41(6): 2143-8.
- [70] Carella RJ, Gelber R, Hendrickson F, Berry HC, Cooper JS. Value of radiation therapy in the management of patients with cerebral metastases from malignant melanoma: Radiation Therapy Oncology Group Brain Metastases Study I and II. *Cancer.* 1980; 45(4): 679-83.
- [71] Overgaard J, Gonzalez Gonzalez D, Hulshof MC, Arcangeli G, Dahl O, Mella O, *et al.* Randomised trial of hyperthermia as adjuvant to radiotherapy for recurrent or metastatic malignant melanoma. European Society for Hyperthermic Oncology. *Lancet.* 1995; 345(8949): 540-3.
- [72] Bastiaannet E, Beukema JC, Hoekstra HJ. Radiation therapy following lymph node dissection in melanoma patients: treatment, outcome and complications. *Cancer Treat Rev.* 2005; 31(1): 18-26.
- [73] Ivanov VN, Bhoumik A, Ronai Z. Death receptors and melanoma resistance to apoptosis. *Oncogene.* 2003; 22(20): 3152-61.
- [74] Herrstedt J, Dombernowsky P. Anti-emetic therapy in cancer chemotherapy: current status. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2007; 101(3): 143-50.
- [75] Eggermont AM, Kirkwood JM. Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: what have we learned in 30 years? *Eur J Cancer.* 2004; 40(12): 1825-36.
- [76] Luikart SD, Kennealey GT, Kirkwood JM. Randomized phase III trial of vinblastine, bleomycin, and cis-dichlorodiammine-platinum versus dacarbazine in malignant melanoma. *J Clin Oncol.* 1984; 2(3): 164-8.
- [77] Chapman PB, Einhorn LH, Meyers ML, Saxman S, Destro AN, Panageas KS, *et al.* Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 1999; 17(9): 2745-51.

- [78] Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, M D JW, Garbe C, *et al.* Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2011; 364(26): 2517-26.
- [79] McDermott DF, Sosman JA, Gonzalez R, Hodi FS, Linette GP, Richards J, *et al.* Double-blind randomized phase II study of the combination of sorafenib and dacarbazine in patients with advanced melanoma: a report from the 11715 Study Group. *J Clin Oncol.* 2008; 26(13): 2178-85.
- [80] Quirt I, Verma S, Petrella T, Bak K, Charette M. Temozolomide for the treatment of metastatic melanoma: a systematic review. *Oncologist.* 2007; 12(9): 1114-23.
- [81] Bottoni U, Bonaccorsi P, Devirgiliis V, Panasiti V, Borroni RG, Trasimeni G, *et al.* Complete remission of brain metastases in three patients with stage IV melanoma treated with BOLD and G-CSF. *Jpn J Clin Oncol.* 2005; 35(9): 507-13.
- [82] Kanter-Lewensohn L, Girnita L, Girnita A, Dricu A, Olsson G, Leech L, *et al.* Tamoxifen-induced cell death in malignant melanoma cells: possible involvement of the insulin-like growth factor-1 (IGF-1) pathway. *Mol Cell Endocrinol.* 2000; 165(1-2): 131-7.
- [83] Matsuoka H, Tsubaki M, Yamazoe Y, Ogaki M, Satou T, Itoh T, *et al.* Tamoxifen inhibits tumor cell invasion and metastasis in mouse melanoma through suppression of PKC/MEK/ERK and PKC/PI3K/Akt pathways. *Exp Cell Res.* 2009; 315(12): 2022-32.
- [84] Lens MB, Reiman T, Husain AF. Use of tamoxifen in the treatment of malignant melanoma. *Cancer.* 2003; 98(7): 1355-61.
- [85] Beguerie JR, Xingzhong J, Valdez RP. Tamoxifen vs. non-tamoxifen treatment for advanced melanoma: a meta-analysis. *Int J Dermatol.* 2010; 49(10): 1194-202.
- [86] Maire C, Vercambre-Darras S, Devos P, D'Herbomez M, Dubucquoi S, Mortier L. Metastatic melanoma: spontaneous occurrence of auto antibodies is a good prognosis factor in a prospective cohort. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013; 27(1): 92-6.
- [87] Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, *et al.* Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010; 363(8): 711-23.

- [88] Weber J. Ipilimumab: controversies in its development, utility and autoimmune adverse events. *Cancer Immunol Immunother.* 2009; 58(5): 823-30.
- [89] Bollag G, Hirth P, Tsai J, Zhang J, Ibrahim PN, Cho H, *et al.* Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature.* 2010; 467(7315): 596-9.
- [90] Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, *et al.* Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 2011; 364(26): 2507-16.
- [91] Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, *et al.* Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature.* 2010; 468(7326): 973-7.
- [92] Ascierto PA, Simeone E, Giannarelli D, Grimaldi AM, Romano A, Mozzillo N. Sequencing of BRAF inhibitors and ipilimumab in patients with metastatic melanoma: a possible algorithm for clinical use. *J Transl Med.* 2012; 10: 107.
- [93] Das Thakur M, Salangsang F, Landman AS, Sellers WR, Pryer NK, Levesque MP, *et al.* Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance. *Nature.* 2013; 494(7436): 251-5.
- [94] Hofmann UB, Kauczok-Vetter CS, Houben R, Becker JC. Overexpression of the KIT/SCF in uveal melanoma does not translate into clinical efficacy of imatinib mesylate. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(1): 324-9.
- [95] Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature.* 2007; 445(7130): 851-7.
- [96] Erdmann F, Lortet-Tieulent J, Schüz J, Zeeb H, Greinert R, Breitbart EW, *et al.* International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008-are recent generations at higher or lower risk? *Int J Cancer.* 2013; 132(2): 385-400.
- [97] Tsai S, Balch C, Lange J. Epidemiology and treatment of melanoma in elderly patients. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010; 7(3): 148-52.
- [98] Sondak VK, Flaherty LE. Targeted therapies: Improved outcomes for patients with metastatic melanoma. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011; 8(9): 513-5.

- [99] Freudlsperger C, Thies A, Pfüller U, Schumacher U. The proteasome inhibitor bortezomib augments anti-proliferative effects of mistletoe lectin-I and the PPAR-gamma agonist rosiglitazone in human melanoma cells. *Anticancer Res.* 2007; 27(1A): 207-13.
- [100] Wolter KG, Verhaegen M, Fernández Y, Nikolovska-Coleska Z, Riblett M, de la Vega CM, *et al.* Therapeutic window for melanoma treatment provided by selective effects of the proteasome on Bcl-2 proteins. *Cell Death Differ.* 2007; 14(9): 1605-16.
- [101] Amiri KI, Horton LW, LaFleur BJ, Sosman JA, Richmond A. Augmenting chemosensitivity of malignant melanoma tumors via proteasome inhibition: implication for bortezomib (VELCADE, PS-341) as a therapeutic agent for malignant melanoma. *Cancer Res.* 2004; 64(14): 4912-8.
- [102] Yerlikaya A, Erin N. Differential sensitivity of breast cancer and melanoma cells to proteasome inhibitor Velcade. *Int J Mol Med.* 2008; 22(6): 817-23.
- [103] Lens MB, Dawes M. Interferon alfa therapy for malignant melanoma: a systematic review of randomized controlled trials. *J Clin Oncol.* 2002; 20(7): 1818-25.
- [104] Lesinski GB, Raig ET, Guenterberg K, Brown L, Go MR, Shah NN, *et al.* IFN-alpha and bortezomib overcome Bcl-2 and Mcl-1 overexpression in melanoma cells by stimulating the extrinsic pathway of apoptosis. *Cancer Res.* 2008; 68(20): 8351-60.
- [105] Markovic SN, Geyer SM, Dawkins F, Sharfman W, Albertini M, Maples W, *et al.* A phase II study of bortezomib in the treatment of metastatic malignant melanoma. *Cancer.* 2005; 103(12): 2584-9.
- [106]
<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00512798?term=bortezomib+melanoma&rank=2> (říjen 2012)
- [107]
<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=bortezomib+melanoma&Search=Search> (říjen 2012)
- [108] Nam S, Smith DM, Dou QP. Ester bond-containing tea polyphenols potently inhibit proteasome activity in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 2001; 276(16): 13322-30.

- [109] Smith DM, Wang Z, Kazi A, Li LH, Chan TH, Dou QP. Synthetic analogs of green tea polyphenols as proteasome inhibitors. *Mol Med*. 2002; 8(7): 382-92.
- [110] Osanai K, Landis-Piowar KR, Dou QP, Chan TH. A para-amino substituent on the D-ring of green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate as a novel proteasome inhibitor and cancer cell apoptosis inducer. *Bioorg Med Chem*. 2007; 15(15): 5076-82.
- [111] Nihal M, Ahmad N, Mukhtar H, Wood GS. Anti-proliferative and proapoptotic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on human melanoma: possible implications for the chemoprevention of melanoma. *Int J Cancer*. 2005; 114(4): 513-21.
- [112] Liu JD, Chen SH, Lin CL, Tsai SH, Liang YC. Inhibition of melanoma growth and metastasis by combination with (-)-epigallocatechin-3-gallate and dacarbazine in mice. *J Cell Biochem*. 2001; 83(4): 631-42.
- [113] Feling RH, Buchanan GO, Mincer TJ, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W. Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus salinospora. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2003; 42(3): 355-7.
- [114] Etlinger JD, Goldberg AL. A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977; 74(1): 54-58.
- [115] Oficiální stránky Nobelovy ceny, <http://www.nobelprize.org/> (leden 2013)
- [116] Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem*. 1999; 68: 1015-68.
- [117] Maupin-Furlow J. Proteasomes and protein conjugation across domains of life. *Nat Rev Microbiol*. 2011 Dec; 10(2): 100-11.
- [118] Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*. 1998; 67: 425-79.
- [119] Pratt JM, Petty J, Riba-Garcia I, Robertson DH, Gaskell SJ, Oliver SG, *et al*. Dynamics of protein turnover, a missing dimension in proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2002; 1(8): 579-91.

- [120] Neklesa TK, Crews CM. Chemical biology: Greasy tags for protein removal. *Nature*. 2012; 487(7407): 308-9.
- [121] Neklesa TK, Tae HS, Schneekloth AR, Stulberg MJ, Corson TW, Sundberg TB, *et al.* Small-molecule hydrophobic tagging-induced degradation of HaloTag fusion proteins. *Nat Chem Biol*. 2011; 7(8): 538-43.
- [122] King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW. How proteolysis drives the cell cycle. *Science*. 1996; 274(5293): 1652-9.
- [123] Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, *et al.* Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res*. 1999; 59(11): 2615-22.
- [124] Suraweera A, Münch C, Hanssum A, Bertolotti A. Failure of amino acid homeostasis causes cell death following proteasome inhibition. *Mol Cell*. 2012; 48(2): 242-53.
- [125] Vabulas RM, Hartl FU. Protein synthesis upon acute nutrient restriction relies on proteasome function. *Science*. 2005; 310(5756): 1960-3.
- [126] Price CT, Al-Quadan T, Santic M, Rosenshine I, Abu Kwaik Y. Host proteasomal degradation generates amino acids essential for intracellular bacterial growth. *Science*. 2011; 334(6062): 1553-7.
- [127] Orlowski RZ, Kuhn DJ. Proteasome inhibitors in cancer therapy: lessons from the first decade. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(6): 1649-57.
- [128] Adams J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(5): 349-60.
- [129] Mitchell BS. The proteasome--an emerging therapeutic target in cancer. *N Engl J Med*. 2003; 348(26): 2597-8.
- [130] Rajkumar SV, Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *J Clin Oncol*. 2005; 23(3): 630-9.

- [131] Almond JB, Cohen GM. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia*. 2002; 16(4): 433-43.
- [132] Voorhees PM, Dees EC, O'Neil B, Orlowski RZ. The proteasome as a target for cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2003; 9(17): 6316-25.
- [133] Richardson PG, Mitsiades C, Hideshima T, Anderson KC. Proteasome inhibition in the treatment of cancer. *Cell Cycle*. 2005; 4(2): 290-6.
- [134] Adams J, Palombella VJ, Elliott PJ. Proteasome inhibition: a new strategy in cancer treatment. *Invest New Drugs*. 2000; 18(2): 109-21.
- [135] Fehrenbacher N, Jäättelä M. Lysosomes as targets for cancer therapy. *Cancer Res*. 2005; 65(8): 2993-5.
- [136] Rabinowitz JD, White E. Autophagy and metabolism. *Science*. 2010; 330(6009): 1344-8.
- [137] Marino ML, Pellegrini P, Di Lernia G, Djavaheri-Mergny M, Brnjic S, Zhang X, *et al*. Autophagy is a protective mechanism for human melanoma cells under acidic stress. *J Biol Chem*. 2012; 287(36): 30664-76.
- [138] Peters JM, Franke WW, Kleinschmidt JA. Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem*. 1994; 269(10): 7709-18.
- [139] Reits EA, Benham AM, Plougastel B, Neefjes J, Trowsdale J. Dynamics of proteasome distribution in living cells. *EMBO J*. 1997; 16(20): 6087-94.
- [140] Walz J, Erdmann A, Kania M, Typke D, Koster AJ, Baumeister W. 26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy. *J Struct Biol*. 1998; 121(1): 19-29.
- [141] Förster F, Lasker K, Nickell S, Sali A, Baumeister W. Toward an integrated structural model of the 26S proteasome. *Mol Cell Proteomics*. 2010; 9(8): 1666-77.
- [142] Groll M, Ditzel L, Löwe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, *et al*. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*. 1997; 386(6624): 463-71.

- [143] Saeki Y, Toh-E A, Kudo T, Kawamura H, Tanaka K. Multiple proteasome-interacting proteins assist the assembly of the yeast 19S regulatory particle. *Cell*. 2009; 137(5): 900-13.
- [144] Madura K. Cell biology: The proteasome assembly line. *Nature*. 2009; 459(7248): 787-8.
- [145] Ramos PC, Dohmen RJ. PACemakers of proteasome core particle assembly. *Structure*. 2008; 16(9): 1296-304.
- [146] Roelofs J, Park S, Haas W, Tian G, McAllister FE, Huo Y, *et al*. Chaperone-mediated pathway of proteasome regulatory particle assembly. *Nature*. 2009; 459(7248): 861-5.
- [147] Hirano Y, Hendil KB, Yashiroda H, Iemura S, Nagane R, Hioki Y, *et al*. A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Nature*. 2005; 437(7063): 1381-5.
- [148] Park S, Roelofs J, Kim W, Robert J, Schmidt M, Gygi SP, *et al*. Hexameric assembly of the proteasomal ATPases is templated through their C termini. *Nature*. 2009; 459(7248): 866-70.
- [149] Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*. 2001; 70: 503-33.
- [150] Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J*. 2000; 19(1): 94-102.
- [151] McCutchen-Maloney SL, Matsuda K, Shimbara N, Binns DD, Tanaka K, Slaughter CA, *et al*. cDNA cloning, expression, and functional characterization of PI31, a proline-rich inhibitor of the proteasome. *J Biol Chem*. 2000; 275(24): 18557-65.
- [152] Saeki Y, Kudo T, Sone T, Kikuchi Y, Yokosawa H, Toh-e A, *et al*. Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome. *EMBO J*. 2009; 28(4): 359-71.
- [153] Shringarpure R, Grune T, Mehlhase J, Davies KJ. Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *J Biol Chem*. 2003; 278(1): 311-8.

- [154] Murakami Y, Matsufuji S, Kameji T, Hayashi S, Igarashi K, Tamura T, *et al.* Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature*. 1992; 360(6404): 597-9.
- [155] Dye BT, Schulman BA. Structural mechanisms underlying posttranslational modification by ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2007; 36: 131-50.
- [156] Tyers M, Willems AR. One ring to rule a superfamily of E3 ubiquitin ligases. *Science*. 1999; 284(5414): 601, 603-4.
- [157] Borden KL, Freemont PS. The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. *Curr Opin Struct Biol*. 1996; 6(3): 395-401.
- [158] Lovering R, Hanson IM, Borden KL, Martin S, O'Reilly NJ, Evan GI, *et al.* Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(6): 2112-6.
- [159] Deshaies RJ, Joazeiro CA. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem*. 2009; 78: 399-434.
- [160] Budhidarmo R, Nakatani Y, Day CL. RINGs hold the key to ubiquitin transfer. *Trends Biochem Sci*. 2012; 37(2): 58-65.
- [161] Plechanovová A, Jaffray EG, Tatham MH, Naismith JH, Hay RT. Structure of a RING E3 ligase and ubiquitin-loaded E2 primed for catalysis. *Nature*. 2012; 489(7414): 115-20.
- [162] Pierce NW, Kleiger G, Shan SO, Deshaies RJ. Detection of sequential polyubiquitylation on a millisecond timescale. *Nature*. 2009; 462(7273): 615-9.
- [163] Petroski MD, Deshaies RJ. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005; 6(1): 9-20.
- [164] Bengtson MH, Joazeiro CA. Role of a ribosome-associated E3 ubiquitin ligase in protein quality control. *Nature*. 2010; 467(7314): 470-3.
- [165] Mukhopadhyay D, Riezman H. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science*. 2007; 315(5809): 201-5.

- [166] Conaway RC, Brower CS, Conaway JW. Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science*. 2002; 296(5571): 1254-8.
- [167] Hessa T, Sharma A, Mariappan M, Eshleman HD, Gutierrez E, Hegde RS. Protein targeting and degradation are coupled for elimination of mislocalized proteins. *Nature*. 2011; 475(7356): 394-7.
- [168] Finley D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem*. 2009; 78: 477-513.
- [169] Lam YA, Lawson TG, Velayutham M, Zweier JL, Pickart CM. A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature*. 2002; 416(6882): 763-7.
- [170] Verma R, Aravind L, Oania R, McDonald WH, Yates JR 3rd, Koonin EV, *et al*. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science*. 2002; 298(5593): 611-5.
- [171] Yao T, Cohen RE. A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature*. 2002; 419(6905): 403-7.
- [172] Gallery M, Blank JL, Lin Y, Gutierrez JA, Pulido JC, Rappoli D, *et al*. The JAMM motif of human deubiquitinase Poh1 is essential for cell viability. *Mol Cancer Ther*. 2007; 6(1): 262-8.
- [173] Barthelme D, Sauer RT. Bipartite determinants mediate an evolutionarily conserved interaction between Cdc48 and the 20S peptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Feb 11.
- [174] Barthelme D, Sauer RT. Identification of the Cdc48•20S proteasome as an ancient AAA+ proteolytic machine. *Science*. 2012; 337(6096): 843-6.
- [175] Matouschek A, Finley D. Cell biology. An ancient portal to proteolysis. *Science*. 2012; 337(6096): 813-4.
- [176] Koulich E, Li X, DeMartino GN. Relative structural and functional roles of multiple deubiquitylating proteins associated with mammalian 26S proteasome. *Mol Biol Cell*. 2008; 19(3): 1072-82.

- [177] Peth A, Kukushkin N, Bosse M, Goldberg AL. Ubiquitinated proteins activate the proteasomal ATPases by binding to Usp14 or Uch37. *J Biol Chem*. 2013 Jan 22.
- [178] Lee BH, Lee MJ, Park S, Oh DC, Elsasser S, Chen PC, *et al*. Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature*. 2010; 467(7312): 179-84.
- [179] Husnjak K, Elsasser S, Zhang N, Chen X, Randles L, Shi Y, *et al*. Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature*. 2008; 453(7194): 481-8.
- [180] Hanna J, Hathaway NA, Tone Y, Crosas B, Elsasser S, Kirkpatrick DS, *et al*. Deubiquitinating enzyme Ubp6 functions noncatalytically to delay proteasomal degradation. *Cell*. 2006; 127(1): 99-111.
- [181] Wenzel T, Baumeister W. Conformational constraints in protein degradation by the 20S proteasome. *Nat Struct Biol*. 1995; 2(3): 199-204.
- [182] Ruschak AM, Religa TL, Breuer S, Witt S, Kay LE. The proteasome antechamber maintains substrates in an unfolded state. *Nature*. 2010; 467(7317): 868-71.
- [183] Lander GC, Estrin E, Matyskiela ME, Bashore C, Nogales E, Martin A. Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature*. 2012; 482(7384): 186-91.
- [184] Niedermann G, King G, Butz S, Birsner U, Grimm R, Shabanowitz J, *et al*. The proteolytic fragments generated by vertebrate proteasomes: structural relationships to major histocompatibility complex class I binding peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(16): 8572–8577.
- [185] Kisselev AF, Akopian TN, Woo KM, Goldberg AL. The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem*. 1999; 274(6): 3363-71.
- [186] Emmerich NP, Nussbaum AK, Stevanovic S, Priemer M, Toes RE, Rammensee HG, *et al*. The human 26 S and 20 S proteasomes generate overlapping but different sets of peptide fragments from a model protein substrate. *J Biol Chem*. 2000; 275(28): 21140-8.

- [187] Reits E, Neijssen J, Herberts C, Benckhuijsen W, Janssen L, Drijfhout JW, *et al.* A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity*. 2004; 20(4): 495-506.
- [189] Reits E, Griekspoor A, Neijssen J, Groothuis T, Jalink K, van Veelen P, *et al.* Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity*. 2003; 18(1): 97-108.
- [190] Beninga J, Rock KL, Goldberg AL. Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J Biol Chem*. 1998; 273(30): 18734-42.
- [191] Saric T, Graef CI, Goldberg AL. Pathway for degradation of peptides generated by proteasomes: a key role for thimet oligopeptidase and other metallopeptidases. *J Biol Chem*. 2004; 279(45): 46723-32.
- [192] Ernst R, Claessen JH, Mueller B, Sanyal S, Spooner E, van der Veen AG, *et al.* Enzymatic blockade of the ubiquitin-proteasome pathway. *PLoS Biol*. 2011; 8(3): e1000605.
- [193] Verma R, Peters NR, D'Onofrio M, Tochtrop GP, Sakamoto KM, Varadan R, *et al.* Ubistatins inhibit proteasome-dependent degradation by binding the ubiquitin chain. *Science*. 2004; 306(5693): 117-20.
- [194] Kane RC, Bross PF, Farrell AT, Pazdur R. Velcade: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy. *Oncologist*. 2003; 8(6): 508-13.
- [195] Kane RC, Dagher R, Farrell A, Ko CW, Sridhara R, Justice R, *et al.* Bortezomib for the treatment of mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(18 Pt 1): 5291-4.
- [196] Bonvini P, Zorzi E, Basso G, Rosolen A. Bortezomib-mediated 26S proteasome inhibition causes cell-cycle arrest and induces apoptosis in CD-30+ anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia*. 2007; 21(4): 838-42.
- [197] Appel A. Drugs: More shots on target. *Nature*. 2011; 480(7377): S40-2.

- [198] Gelman JS, Sironi J, Berezniuk I, Dasgupta S, Castro LM, Gozzo FC, *et al.* Alterations of the intracellular peptidome in response to the proteasome inhibitor bortezomib. PLoS One. 2013; 8(1): e53263.
- [199] Oerlemans R, Franke NE, Assaraf YG, Cloos J, van Zantwijk I, Berkers CR, *et al.* Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. Blood. 2008; 112(6): 2489-99.
- [200] Franke NE, Niewerth D, Assaraf YG, van Meerloo J, Vojtekova K, van Zantwijk CH, *et al.* Impaired bortezomib binding to mutant $\beta 5$ subunit of the proteasome is the underlying basis for bortezomib resistance in leukemia cells. Leukemia. 2012; 26(4): 757-68.
- [201] Balsas P, Galán-Malo P, Marzo I, Naval J. Bortezomib resistance in a myeloma cell line is associated to PSM $\beta 5$ overexpression and polyploidy. Leuk Res. 2012; 36(2): 212-8.
- [202] Golden EB, Lam PY, Kardosh A, Gaffney KJ, Cadenas E, Louie SG, *et al.* Green tea polyphenols block the anticancer effects of bortezomib and other boronic acid-based proteasome inhibitors. Blood. 2009; 113(23): 5927-37.
- [203] Argyriou AA, Iconomou G, Kalofonos HP. Bortezomib-induced peripheral neuropathy in multiple myeloma: a comprehensive review of the literature. Blood. 2008; 112(5): 1593-9.
- [204] Cavaletti G, Nobile-Orazio E. Bortezomib-induced peripheral neurotoxicity: still far from a painless gain. Haematologica. 2007; 92(10): 1308-10.
- [205] Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Jagannath S, Irwin D, *et al.* A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. N Engl J Med. 2003; 348(26): 2609-17.
- [206] Jagannath S, Barlogie B, Berenson J, Siegel D, Irwin D, Richardson PG, *et al.* A phase 2 study of two doses of bortezomib in relapsed or refractory myeloma. Br J Haematol. 2004; 127(2): 165-72.
- [207] Arastu-Kapur S, Anderl JL, Kraus M, Parlati F, Shenk KD, Lee SJ, *et al.* Nonproteasomal targets of the proteasome inhibitors bortezomib and carfilzomib: a link to clinical adverse events. Clin Cancer Res. 2011; 17(9): 2734-43.

- [208] Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1998; 16: 225-60.
- [209] Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest.* 2001; 107(3): 241-6.
- [210] Fahy BN, Schlieman MG, Mortenson MM, Virudachalam S, Bold RJ. Targeting BCL-2 overexpression in various human malignancies through NF-kappaB inhibition by the proteasome inhibitor bortezomib. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005; 56(1): 46-54.
- [211] Cusack JC Jr, Liu R, Houston M, Abendroth K, Elliott PJ, Adams J, *et al.* Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: implications for systemic nuclear factor-kappaB inhibition. *Cancer Res.* 2001; 61(9): 3535-40.
- [212] Hideshima T, Ikeda H, Chauhan D, Okawa Y, Raje N, Podar K, *et al.* Bortezomib induces canonical nuclear factor-kappaB activation in multiple myeloma cells. *Blood.* 2009; 114(5): 1046-52.
- [213] Pearson JS, Riedmaier P, Marchès O, Frankel G, Hartland EL. A type III effector protease NleC from enteropathogenic *Escherichia coli* targets NF- κ B for degradation. *Mol Microbiol.* 2011; 80(1): 219-30.
- [214] Yen H, Ooka T, Iguchi A, Hayashi T, Sugimoto N, Tobe T. NleC, a type III secretion protease, compromises NF- κ B activation by targeting p65/RelA. *PLoS Pathog.* 2010; 6(12): e1001231.
- [215] Mühlen S, Ruchaud-Sparagano MH, Kenny B. Proteasome-independent degradation of canonical NFkappaB complex components by the NleC protein of pathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2011; 286(7): 5100-7.
- [216] Dhawan P, Richmond A. A novel NF-kappa B-inducing kinase-MAPK signaling pathway up-regulates NF-kappa B activity in melanoma cells. *J Biol Chem.* 2002; 277(10): 7920-8.
- [217] Thu YM, Su Y, Yang J, Splittgerber R, Na S, Boyd A, *et al.* NF- κ B inducing kinase (NIK) modulates melanoma tumorigenesis by regulating expression of pro-survival factors through the β -catenin pathway. *Oncogene.* 2012; 31(20): 2580-92.

- [218] Schreck R, Meier B, Männel DN, Dröge W, Baeuerle PA. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *J Exp Med*. 1992; 175(5): 1181-94.
- [219] Fuller RK, Gordis E. Does disulfiram have a role in alcoholism treatment today? *Addiction*. 2004; 99(1): 21-4.
- [220] Vallari RC, Pietruszko R. Human aldehyde dehydrogenase: mechanism of inhibition of disulfiram. *Science*. 1982; 216(4546): 637-9.
- [221] Suh JJ, Pettinati HM, Kampman KM, O'Brien CP. The status of disulfiram: a half of a century later. *J Clin Psychopharmacol*. 2006; 26(3): 290-302.
- [222] Nash T, Rice WG. Efficacies of zinc-finger-active drugs against *Giardia lamblia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42(6): 1488-92.
- [223] Bouma MJ, Snowdon D, Fairlamb AH, Ackers JP. Activity of disulfiram (bis(diethylthiocarbamoyl)disulphide) and ditiocarb (diethyldithiocarbamate) against metronidazole-sensitive and -resistant *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *J Antimicrob Chemother*. 1998; 42(6): 817-20.
- [224] Chick J. Safety issues concerning the use of disulfiram in treating alcohol dependence. *Drug Saf*. 1999; 20(5): 427-35.
- [225] Forns X, Caballería J, Bruguera M, Salmerón JM, Vilella A, Mas A, *et al*. Disulfiram-induced hepatitis. Report of four cases and review of the literature. *J Hepatol*. 1994; 21(5): 853-7.
- [226] Ranek L, Buch Andreasen P. Disulfiram hepatotoxicity. *Br Med J*. 1977; 2(6079): 94-6.
- [227] Enghusen Poulsen H, Loft S, Andersen JR, Andersen M. Disulfiram therapy--adverse drug reactions and interactions. *Acta Psychiatr Scand Suppl*. 1992; 369: 59-65; discussion 65-6.
- [228] Johansson B, Stankiewicz Z. Bis-(diethyldithiocarbamate) copper complex: a new metabolite of disulfiram? *Biochem Pharmacol*. 1985; 34(16): 2989-91.

- [229] Johansson B. A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of disulfiram and its metabolites. *Acta Psychiatr Scand Suppl.* 1992; 369: 15-26.
- [230] Cvek B. Targeting malignancies with disulfiram (Antabuse): multidrug resistance, angiogenesis, and proteasome. *Curr Cancer Drug Targets.* 2011; 11(3): 332-7.
- [231] Cvek B, Milacic V, Taraba J, Dou QP. Ni(II), Cu(II), and Zn(II) diethyldithiocarbamate complexes show various activities against the proteasome in breast cancer cells. *J Med Chem.* 2008; 51(20): 6256-8.
- [232] Skrott Z, Cvek B. Diethyldithiocarbamate complex with copper: the mechanism of action in cancer cells. *Mini Rev Med Chem.* 2012; 12(12): 1184-92.
- [233] Cvek B, Dvorak Z. Targeting of nuclear factor-kappaB and proteasome by dithiocarbamate complexes with metals. *Curr Pharm Des.* 2007; 13(30): 3155-67.
- [234] Lewison EF. Spontaneous regression of breast cancer. *Natl Cancer Inst Monogr.* 1976; 44: 23-6.
- [235] Cen D, Brayton D, Shahandeh B, Meyskens FL Jr, Farmer PJ. Disulfiram facilitates intracellular Cu uptake and induces apoptosis in human melanoma cells. *J Med Chem.* 2004; 47(27): 6914-20.
- [236] Cen D, Gonzalez RI, Buckmeier JA, Kahlon RS, Tohidian NB, Meyskens FL Jr. Disulfiram induces apoptosis in human melanoma cells: a redox-related process. *Mol Cancer Ther.* 2002; 1(3): 197-204.
- [237] Morrison BW, Doudican NA, Patel KR, Orlow SJ. Disulfiram induces copper-dependent stimulation of reactive oxygen species and activation of the extrinsic apoptotic pathway in melanoma. *Melanoma Res.* 2010; 20(1): 11-20.
- [238] Brar SS, Grigg C, Wilson KS, Holder WD Jr, Dreau D, Austin C, *et al.* Disulfiram inhibits activating transcription factor/cyclic AMP-responsive element binding protein and human melanoma growth in a metal-dependent manner in vitro, in mice and in a patient with metastatic disease. *Mol Cancer Ther.* 2004; 3(9): 1049-60.
- [239] <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00742911>(březen 2013)
- [240] <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=disulfiram+melanoma> (říjen 2012)

- [241] DiMasi JA, Hansen RW, Grabowski HG. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ.* 2003; 22(2): 151-85.
- [242] Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR, *et al.* How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9(3): 203-14.
- [243] Adams CP, Brantner VV. Spending on new drug development¹. *Health Econ.* 2010; 19(2): 130-41.
- [244] Adams CP, Brantner VV. Estimating the cost of new drug development: is it really 802 million dollars? *Health Aff (Millwood).* 2006; 25(2): 420-8.
- [245] Collier R. Drug development cost estimates hard to swallow. *CMAJ.* 2009; 180(3): 279-80.
- [246] Grabowski H. Are the economics of pharmaceutical research and development changing?: productivity, patents and political pressures. *Pharmacoeconomics.* 2004; 22(2 Suppl 2): 15-24.
- [247] Munos B. Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. *Nat Rev Drug Discov.* 2009; 8(12): 959-68.
- [248] Kola I, Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3(8): 711-5.
- [249] Begley CG, Ellis LM. Drug development: Raise standards for preclinical cancer research. *Nature.* 2012; 483(7391): 531-3.
- [250] Francia G, Kerbel RS. Raising the bar for cancer therapy models. *Nat Biotechnol.* 2010; 28(6): 561-2.
- [251] Sarewitz D. Beware the creeping cracks of bias. *Nature.* 2012; 485(7397): 149.
- [252] Ioannidis JP. Why most published research findings are false. *PLoS Med.* 2005; 2(8): e124.
- [253] Collier R. Rapidly rising clinical trial costs worry researchers. *CMAJ.* 2009; 180(3): 277-8.

- [254] Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, *et al.* Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol.* 2007; 25(15): 1960-6.
- [255] Fojo T, Grady C. How much is life worth: cetuximab, non-small cell lung cancer, and the \$440 billion question. *J Natl Cancer Inst.* 2009; 101(15): 1044-8.
- [256] Cressey D. Health economics: Life in the balance. *Nature.* 2009; 461(7262): 336-9.
- [257] Rawlins MD. Cutting the cost of drug development? *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3(4): 360-4.
- [258] Boguski MS, Mandl KD, Sukhatme VP. Drug discovery. Repurposing with a difference. *Science.* 2009; 324(5933): 1394-5.
- [259] Nobeli I, Favia AD, Thornton JM. Protein promiscuity and its implications for biotechnology. *Nat Biotechnol.* 2009; 27(2): 157-67.
- [260] Keiser MJ, Setola V, Irwin JJ, Laggner C, Abbas AI, Hufeisen SJ, *et al.* Predicting new molecular targets for known drugs. *Nature.* 2009; 462(7270): 175-81.
- [261] MacDonald ML, Lamerdin J, Owens S, Keon BH, Bilter GK, Shang Z, *et al.* Identifying off-target effects and hidden phenotypes of drugs in human cells. *Nat Chem Biol.* 2006; 2(6): 329-37.
- [262] Bender A, Scheiber J, Glick M, Davies JW, Azzaoui K, Hamon J, *et al.* Analysis of pharmacology data and the prediction of adverse drug reactions and off-target effects from chemical structure. *ChemMedChem.* 2007; 2(6): 861-73.
- [263] Hopkins AL. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. *Nat Chem Biol.* 2008; 4(11): 682-90.
- [264] Peterson RT. Chemical biology and the limits of reductionism. *Nat Chem Biol.* 2008; 4(11): 635-8.
- [265] Collins FS. Mining for therapeutic gold. *Nat Rev Drug Discov.* 2011; 10(6): 397.

- [266] Mullard A. Could pharma open its drug freezers? *Nat Rev Drug Discov.* 2011; 10(6): 399-400.
- [267] Campillos M, Kuhn M, Gavin AC, Jensen LJ, Bork P. Drug target identification using side-effect similarity. *Science.* 2008; 321(5886): 263-6.
- [268] Tobinick EL. The value of drug repositioning in the current pharmaceutical market. *Drug News Perspect.* 2009; 22(2): 119-25.
- [269] Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3(8): 673-83.
- [270] <http://www.global-cures.org/> (březen 2013)
- [271] Cvek B. Antabuse (disulfiram) as a pilot case of nonprofit drug. *Int J Cancer.* 2010; 127(10): 2486.
- [272] Cvek B. Nonprofit drugs as the salvation of the world's healthcare systems: the case of Antabuse (disulfiram). *Drug Discov Today.* 2012; 17(9-10): 409-12.
- [273] Cvek B. Antabuse repurposing: We need more knowledge and wide international support. *Int J Cancer.* 2011; 129: 1286-7.
- [274] Gordon DJ, Resio B, Pellman D. Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nat Rev Genet.* 2012; 13(3): 189-203.
- [275] Rajagopalan H, Lengauer C. Aneuploidy and cancer. *Nature.* 2004; 432(7015): 338-41.
- [276]
http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=88030401&collection=ecacc_gc (únor 2013)
- [277] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1-2): 55-63.
- [278] Bleyer A, O'Leary M, Barr R, Ries LAG (editors). *Cancer Epidemiology in Older Adolescents and Young Adults 15 to 29 Years of Age, Including SEER Incidence and*

Survival: 1975-2000, p. 55. National Cancer Institute, NIH Pub. No. 06-5767. Bethesda, 2006.

[279] Coelho SG, Hearing VJ. UVA tanning is involved in the increased incidence of skin cancers in fair-skinned young women. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010; 23(1): 57-63.

9 SEZNAM ZKRATEK

ATP adenzintrifosfát

BAP1 BRCA1-associated protein 1

BOLD bleomycin, oncovin, lomustin a dacarbazin

BRAF v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1

CCND1 cyklin D1

CCNU jiný název pro lomustin

CDKN2A cyklin-dependentní kináza 2A

CTLA-4 cytotoxický T-lymfocytární antigen 4

Cu(EtDTC)₂ bis-(diethyldithiokarbamát) měďnatý komplex

DDTC diethyldithiokarbamát

DMSO dimethylsulfoxid

DNA deoxyribonukleová kyselina

EBV-DUB deubikvitinační enzym z viru Epstein-Barrové

FBS fetální hovězí sérum

FDA Food and Drug Administration

G-CSF granulocyty stimulující faktor

gp100 glykoprotein 100

IC₅₀ poloviční hodnota maximální inhibiční koncentrace

IKK IκB kináza

JAMM JAB1/MPN/Mov34 metaloenzym

KIT v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog

LC₅₀ 50% letální koncentrace

Ltn1 listerin E3 ubikvitin ligáza 1

MC1R melanokortinový receptor 1

MG132 karbobenzoxyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal

MITF transkripční faktor spojený s mikroftalmií

mRNA mediátorová RNA

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

NFκB nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NIK NFκB indukující kináza

non-CSD melanom bez chronického poškození způsobeného sluncem

PBS phosphate buffered saline, fosfátový pufr

Pup prokaryotic ubiquitin-like protein

RING Really Interesting New Gene

RNA ribonukleová kyselina

Rpn podjednotka regulační části proteazomu (Regulatory Particle non-ATPase)

Rpt podjednotka regulační části proteazomu (Regulatory Particle Triple-A ATPase)

RTK receptorová tyrozin kináza

Samps small archaeal modifier proteins

SCF stem cell factor, růstový faktor kmenových buněk

UPS ubikvitin-proteazomový systém

Usp 14 ubikvitin karboxyl-terminální hydroláza 14

UV ultrafialové záření

VDR receptor pro vitamin D