

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2012**

**Zdeněk Škrott**

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



**Neziskové léky: Aktivita komplexu disulfiramu  
(antabusu) s mědí proti buněčné linii odvozené od  
karcinomu žaludku**

**Bakalářská práce**

**Zdeněk Škrott**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie  
Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2012**

**Vedoucí práce:  
Mgr. Boris Cvek, Ph.D.**

## **Prohlášení:**

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

V Olomouci, 14. dubna 2012

.....

podpis

Tato 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: Zdeněk Škrott

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

Typ práce: bakalářská

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP Olomouc

Vedoucí práce: Mgr. Boris Cvek, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2012

## **Abstrakt**

Rakovina žaludku je s 800 tisíci úmrtími ročně celosvětově druhou nejzávažnější rakovinou. Především díky pozdní diagnóze se pravděpodobnost pětiletého přežití pohybuje pouze kolem deseti procent. Na rozdíl od jiných rakovinných onemocnění je pokrok v léčbě nádoru žaludku velmi pomalý, a proto je zřejmé, že nové léky jsou nezbytné. Rakovina žaludku je rozšířena zejména v zemích třetího světa, kde nejsou prostředky na nejnovější léky, jejichž vývoj stojí mnohdy až 1 miliardu dolarů. Možné řešení tohoto problému přináší myšlenka neziskových léků, jejichž vývoj by byl financován státními organizacemi nebo charitami. V případě rakoviny by se takovým prvním lékem mohl stát Antabus (disulfiram), který je po desetiletí používán při léčbě alkoholismu. Disulfiram vykazuje pozoruhodnou aktivitu proti pevným nádorům *in vivo*, za kterou pravděpodobně stojí komplex disulfiramu s mědí, jenž v těle po požití disulfiramu vzniká. Selektivní toxicita tohoto komplexu je připisována jeho schopnosti inhibovat proteazom, tedy multiproteinový komplex zodpovědný na degradaci nepotřebných, poškozených ale i regulačních proteinů. Inhibice proteazomu je novým přístupem k léčbě rakoviny s prvním lékem Velcade (bortezomib).

Aktivita proteazomových inhibitorů bortezomibu a komplexu disulfiramu s mědí byla následně experimentálně ověřena pomocí MTT testu na buněčné linii OACP4 C odvozené od rakoviny žaludku. Bortezomib i komplex byly toxické již v nanomolárních koncentracích s hodnotou  $IC_{50}$  0,78  $\mu\text{mol/l}$  respektive 0,55  $\mu\text{mol/l}$ . Tyto výsledky svědčí o aktivitě komplexu disulfiramu s mědí vůči buňkám rakoviny žaludku a mohou být výchozím bodem pro další experimenty.

**Klíčová slova:** rakovina žaludku, disulfiram, ubikvitin-proteazomový systém, bortezomib

## **Bibliographical Identification:**

Author's first and sure name: Zdeněk Škrott

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

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: 2012

## **Abstract**

Gastric cancer constitutes the second leading cause of cancer-related mortality worldwide (800,000 deaths annually). Unfortunately, the majority of newly diagnosed patient presents advanced or metastatic disease. The prognosis of these patients is poor, with 5-year survival rates less than 10%. In comparison to other non-hematologic malignancies, the progress in treating this disease remains painfully slow and thus new drugs are urgently needed. Almost two-third of cases occurs in low-income countries with weak health systems unable to buy new drugs of which estimated cost of bringing it to market is 1 mld. USD. One possible response to this costly and time-consuming drug discovery could be non-profit drugs financed by governments or charities. In a case of cancer, a pilot non-profit drug could be Antabuse (disulfiram) used for decades for a treatment of alcoholism. Disulfiram shows promising anticancer activity towards solid tumors. This activity is attributed to a disulfiram-copper complex formed in human body after administration of disulfiram, and complex's activity to inhibit the cellular proteasome. A degradation of unneeded, damaged or regulatory proteins is mediated by the proteasome, a multisubunit protein complex. The inhibition of the cellular proteasome is new promising approach to treat cancer with first-in-class drug Velcade (bortezomib).

The activity of proteasome inhibitors bortezomib and disulfiram-copper complex has been confirmed in experimental part of thesis. Both, bortezomib and the complex remarkably decrease a viability of OACP4 C cells derived from gastric carcinoma. The effect of each compound on cell viability has been determined using MTT assay.  $IC_{50}$  values of bortezomib and disulfiram-copper complex were 0,78  $\mu\text{mol/l}$  and 0,55  $\mu\text{mol/l}$  respectively.

**Keywords:** gastric cancer, disulfiram, ubiquitin-proteasome system, bortezomib

## **Poděkování:**

Na tomto místě bych chtěl poděkovat vedoucímu práce Mgr. Borisi Cvekovi, Ph.D. za odborné vedení a konzultace. A dále Mgr. Jindřichu Sedláčkovi za seznámení s laboratorními technikami.

# OBSAH

1	ÚVOD .....	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	3
2.1	Rakovina žaludku .....	3
2.2	Možnosti cílené léčby rakoviny žaludku .....	5
2.2.1	Růstové receptory .....	7
2.2.2	Angiogeneze .....	8
2.2.3	Matrix metalloproteinázy .....	8
2.2.4	Buněčný cyklus a ostatní cílené terapie.....	9
2.3	Inhibice proteazomu při léčbě rakoviny žaludku.....	10
2.4	Proteazom a ubikvitin-proteazomový systém.....	13
2.4.1	Ubikvitin-proteazomový systém .....	14
2.4.2	Struktura 26S proteazomu .....	18
2.4.3	Struktura 20S proteazomu .....	19
2.4.4	Struktura 19S proteazomu .....	21
2.4.5	Jiné regulační části proteazomu.....	23
2.4.6	Skládání proteazomu .....	23
2.4.7	Degradace proteinů nezávislá na ubikvitinu.....	24
2.5	Úloha jaderného faktoru- $\kappa$ B .....	24
2.5.1	Kanonická signalizace .....	26
2.5.2	Nekanonická signalizace .....	27
2.5.3	Alternativní signalizace .....	27
2.5.4	Úloha NF- $\kappa$ B v rakovině žaludku.....	30
2.5.5	Vliv inhibice proteazomu na NF- $\kappa$ B .....	31
2.6	Disulfiram .....	33
2.6.1	Inhibice NF- $\kappa$ B .....	34
2.6.2	Inhibice mnohočetné lékové rezistence.....	35
2.6.3	Inhibice tvorby metastáz a angiogeneze.....	36
2.6.4	Inhibice proteazomu .....	36
2.6.5	JAMM doména .....	38
2.6.6	Aktivita disulfiramu <i>in vivo</i> .....	40
2.7	Antabus jako neziskový lék .....	41
3	CÍL PRÁCE.....	45
4	MATERIÁL A METODIKA .....	46



4.1	Buněčná kultura .....	46
4.2	Chemikálie .....	46
4.3	Přístrojové vybavení .....	47
4.4	Materiál .....	47
4.5	Kultivace buněčné linie OACP4 C .....	48
4.6	Pasážování a počítání buněk .....	48
4.7	Rozmrazování a zamrazování buněk .....	49
4.8	Určení vlivu zkoumaných látek na viabilitu buněk .....	49
4.9	Zpracování výsledků .....	50
4.10	Tvorba obrázků .....	50
5	VÝSLEDKY .....	51
5.1	Určení vlivu zkoumaných látek na viabilitu buněk .....	51
5.1.1	Určení vlivu bortezomibu na viabilitu buněk .....	51
5.1.2	Určení vlivu $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ komplexu na viabilitu buněk .....	52
5.1.3	Určení vlivu DDTC na viabilitu buněk .....	53
5.1.4	Určení vlivu $\text{CuCl}_2$ na viabilitu buněk .....	54
5.1.5	Určení hodnot $\text{IC}_{50}$ pro zkoumané látky .....	55
6	DISKUZE .....	58
7	ZÁVĚR .....	63
8	ZDROJE .....	65
9	SEZNAM ZKRATEK .....	84
10	PŘÍLOHY .....	87

# 1 ÚVOD

Rakovina žaludku patří k celosvětově nejrozšířenějším rakovinám a s 800 tisíci úmrtími ročně je zároveň druhou nejzávažnější. Díky téměř bezpříznakovému projevu choroby bývá diagnostikována až v 90% v pokročilém a již metastazujícím stádiu, kdy je nutné vedle chirurgického zákroku nasadit systémovou chemoterapii. Nicméně výhledy pacientů s pokročilým stádiem rakoviny žaludku jsou velmi špatné, neboť pravděpodobnost přežití následujících pěti let je menší než 10%. I přes tyto hrozné statistiky a nesporné rozšíření znalostí o etiologii a molekulární biologii nádoru, je pokrok léčby v porovnání s jinými rakovinnými onemocněními nesmírně pomalý a bez výraznějších úspěchů. Nejvyšší incidence rakoviny žaludku je příznačná pro třetí svět, konkrétně jihovýchodní Asii, Jižní Ameriku a východní Evropu, tedy, s výjimkou Japonska, pro státy spíše chudé a se zaostalejším zdravotnickým systémem. Nové léky proti rakovině žaludku tedy musí být, vedle účinnosti, také cenově dostupné. Bolestnou pravdou ovšem zůstává, že náklady na vývoj nového léčiva stále stoupají a dnes sahají až k 1 mld. USD. Možným přístupem, jak překonat tuto enormní finanční i časovou náročnost, je hledání nového využití pro již známé starší léky. V boji proti rakovině by se prvním takto znovuobjeveným a neziskovým léčivem mohl stát Antabus. Tento po desetiletí používaný lék proti alkoholismu vykazuje pozoruhodnou protirakovinnou aktivitu potvrzenou klinickým testem u pacientů s nádorem prsu. Pozdější výzkumy ukázaly, že Antabus dokáže potlačovat mnohočetnou lékovou rezistenci, schopnost metastazovat a angiogenezi. Za samotnou protinádorovou aktivitou ovšem pravděpodobně stojí komplex diethyldithiokarbamátu s mědí ( $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ ), který v lidském těle vzniká po požití Antabusu. Selektivní cytotoxicitu  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  komplexu proti rakovinným buňkám lze vysvětlit jeho schopností inhibovat 26S proteazom. Proteazom je multiproteinový komplex zodpovědný za vysoce regulovanou degradaci proteinů v buňce, a to jak proteinů poškozených a nepotřebných, tak i proteinů účastnících se kontroly nad buněčným cyklem a apoptózou. Bortezomib, první FDA schválený inhibitor proteazomu užívaný při léčbě mnohočetného myelomu a lymfomu pláštěvých buněk, naznačuje, že zasahování do funkce proteazomu i celého ubikvitin-proteazomového systému může být slibným přístupem léčby maligních onemocnění. Nicméně druhá fáze klinických testů ukázala, že bortezomib nevykazuje téměř žádnou aktivitu proti rakovině žaludku, podobně jako proti ostatním pevným

nádorům. Je možné, že  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  komplex inhibuje proteazom jiným způsobem než bortezomib, který se váže na proteolytickou jednotku hlavního 20S proteazomu. Cílem komplexu by mohl být Poh1, protein s deubikvitinační aktivitou lokalizovaný v 19S regulační části, jehož aktivita je nezbytná pro správnou funkci 26S proteazomu. V experimentální části bakalářské práce je proto cílem pomocí MTT testu zjistit účinek  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  komplexu na viabilitu buněk linie OACP4 C odvozené od rakoviny žaludku.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Rakovina žaludku

Rakovina žaludku patří celosvětově k nejčastějším rakovinným onemocněním. Donedávna zaujímala druhé místo a nyní se s odhadovanými 934 000 novými případy za rok 2002 řadí na čtvrté místo za rakovinu plic, prsu, tlustého střeva a konečníku. S přibližně 700 000 úmrtími ročně se jedná o druhou nejzávažnější rakovinu [1]. S absolutní incidencí 1599 nových případů za rok 2007 se v České republice jedná spíše o méně častá rakovinu [2]. Epidemiologické studie ukazují, že poměr nemocných mužů a žen je nejméně 2:1, přičemž se diskutuje možnost ovlivnění vývoje karcinomu estrogenem [3]. I přes stále klesající incidenci a mortalitu zůstává rakovina žaludku nadále velmi nebezpečným onemocněním, jehož léčba je velmi problematická a s malou úspěšností. Pětileté přežívání bylo v Evropě mezi roky 2000-2002 pouze 25% [4].

Ve více než 95% případech maligních nádorů žaludku se jedná adenokarcinomy. Žaludek je rovněž nejčastějším místem lymfomů z celého gastrointestinálního traktu [5]. Adenokarcinomy jsou děleny na dva histologické typy, na velmi dobře diferenciováný intestinální typ a nediferenciováný difúzní typ, které se vyznačují jedinečnými vlastnostmi. Intestinální typ je hojnější zejména u starších pacientů, ale zároveň je spojován s optimističtější prognózou. Maligní nádor se vyvíjí v mnohastupňovém dobře popsatelném procesu známém jako Correova sekvence. Nádorové buňky tvoří polypové útvary nebo vředy. Difúzní typ bývá obvykle diagnostikován až v pozdějších stádiích, a proto je jeho léčba méně úspěšná. Zároveň je charakteristický ztrátou adheze (ztráta funkce E-kadherinu). Může být dále rozlišován slabě diferenciováný karcinom a signet-ring cell karcinom (SRCC). Přestože obecně četnost rakoviny žaludku klesá, incidence formy SRCC stoupá. Zatímco u intestinálního typu je výskyt značně geograficky rozlišený, početnost difúzního typu je celosvětově víceméně rovnoměrná [6]. Vývoj difúzního karcinomu je značně rozdílný v porovnání s intestinálním typem a není doposud zcela pochopen [5]. Zárodečná mutace v genu CDH1 kódující E-katherin vede k dědičnému rakovinotvornému syndromu známému jako Hereditary Diffuse Gastric Cancer, který je příčinou asi 1-3% případů. Celkově je s dědičností spojeno asi 10% maligních nádorů žaludku [7].

Pravděpodobně nejdůležitějším faktorem vedoucím ke vzniku nádoru je infekce bakterií *H. pylori*, která stojí zejména za karcinomy v noncardiální oblasti žaludku. V Japonsku, Číně, Střední a Jižní Americe, kde je největší prevalence infekcí *H. pylori*, je zároveň nejvyšší výskyt rakoviny žaludku [8]. Nepříznivý efekt na vývoj rakoviny má také konzumace alkoholu, zvýšený příjem slaných jídel a potravin obsahující nitrity a nitráty [9]. Obezita spolu s kouřením také zvyšují riziko onemocnění [5].

Největší nebezpečí rakoviny žaludku vychází obvykle z pozdní diagnózy. U naprosté většiny případů se jedná o lokálně pokročilé stádium nebo, v horším případě, o již metastazující onemocnění. Navíc i po léčebném zákroku je pravděpodobnost relapsu velmi vysoká [10]. Pozdní diagnóza souvisí se slabými příznaky onemocnění, které jsou téměř stejné jako u mnohých jiných onemocnění žaludku. Jedná se zejména o bolest v oblasti břicha, nevolnost, nechutenství, v pozdějším stádiu pak nevysvětlitelné hubnutí, občasné zvracení a krvácení [5]. Nejčastěji používanou diagnostickou metodou je endoskopie a biopsie, popřípadě radiologické vyšetření. Snahy o objevení specifických biomarkerů a jejich klinické využití prozatím nebyly dostatečně úspěšné [11].

I přes rozsáhlé znalosti biologie, etiologie a patologie karcinomu žaludku je chirurgické řešení stále nejúspěšnější metodou léčby. V závislosti na stádiu nádoru bývá provedena celková nebo částečná gastrektomie. V případě pokročilejšího nádoru je doprovázena resekcí lymfatických uzlin [12]. Chirurgická léčba, zvláště u počátečního stádia nemoci, dosahuje slibných výsledků a vysokého počtu pacientů přežívajících pět a více let. Problémem ovšem zůstává, že 80% až 90% případů je diagnostikováno v pozdním stádiu, které již nelze řešit operativně. Zároveň návrat nemoci do pěti let po chirurgickém zákroku je velmi častý [13]. Onemocnění tedy vyžaduje systémovou léčbu radioterapií a chemoterapií. V posledních 30 letech byly možnosti chemoterapie intenzivně studovány, ovšem výsledky byly většinou negativní, popřípadě nepříliš povzbudivé [12]. V porovnání s jinými častými nádorovými onemocněními jako je rakovina prsu nebo tlustého střeva a konečníku, u nichž se průměrná doba přežívání nejméně zdvojnásobila, bylo u karcinomu žaludku dosaženo pouze minimálních úspěchů, neboť průměrná doba života pacientů s metastazujícím nádorem je pouze 8 - 10 měsíců a pravděpodobností pětiletého přežití se pohybuje okolo 7% [10]. Přesto bylo dosaženo jistého pokroku, zejména při užívání trojkombinace epirubicinu, cisplatinu a 5-FU. Naději lze zároveň spatřovat v několika nových léčivech, které byly úspěšně

testovány proti rakovině žaludku, zejména taxany (piclitaxel, docetaxel), irinotecan a nové analogy 5-FU, S-1 a capecitabin. Ovšem teprve další klinické testy ukážou, do jaké míry budou skutečně účinné. Chemoterapie se používá zejména jako adjuvantní terapie po chirurgickém zákroku a také jako paliativní léčba u metastazujícího nádoru. Některé studie rovněž doporučují její užití jako neoadjuvantní terapie, ale pozitivní dopady této praxe jsou předmětem diskuzí. Zároveň se ukazuje, že lepších výsledků se dosahuje při kombinování chemoterapie s radioterapií zejména v určitých stádiích onemocnění [12]. Nepříliš optimistické výsledky chemoterapie podnítily intenzivnější studium a pátrání po nových biologických látkách, které by byly schopny přímo působit na signální dráhy silně exprimované v rakovinných buňkách. Byla tak vyvinuta léčiva cíleně zasahující angiogenezi, buněčný cyklus, epidermální receptor růstového faktoru (EGFR), matrix metaloproteinázu (MMP) a proteazom [14].

## **2.2 Možnosti cílené léčby rakoviny žaludku**

Během několika posledních desetiletí došlo bezesporu k výraznému zlepšení léčby mnohých typů rakovin. Za tímto úspěchem stojí zejména objev nových chemoterapeuticky aktivních látek a optimalizace kombinované terapie. To vedlo mimo jiné k výrazně příznivějším vyhlídkám dětských pacientů nebo téměř dvojnásobně lepším výsledkům léčby rakoviny varlat a prsu. Zároveň ovšem ani intenzivní výzkum některých velmi častých nádorových onemocnění, např. plic, tlustého střeva nebo žaludku, nepřinesl uspokojivé výsledky. Navíc se zdá, že klasická chemoterapie je dnes na hranici svých možností a pravděpodobně již nelze očekávat výraznější průlom a úspěchy. Nutnost zavedení nových postupů vývoje léčiv a změna přístupu k systémové léčbě rakoviny se tak stává stále zřejmější a aktuálnější [15]. Molekulárně cílená léčba může být adekvátní odpovědí. Díky značným pokrokům v buněčné a molekulární biologii bylo zároveň nalezeno mnoho odpovědí ohledně genetiky nádorových buněk, progresi rakoviny a schopnosti metastazovat do okolních tkání. Nynější poznatky ukazují, že za vznikem rakovinného bujení stojí několik mutací, které mohou vést mimo jiné ke zvýšené aktivitě drah stimulující buněčné dělení nebo k inhibici apoptózy. Snahy vědců se tedy mohou soustředit na ty buněčné dráhy, které přímo souvisí s vývojem nádoru, a jejich vhodným ovlivněním aktivní látkou dosáhnout léčby [16]. Tento přístup sebou přináší mnohá pozitiva, zejména vyšší účinnost a slabší vedlejší

účinky, které často stály za neúspěchem klasické chemoterapie. Cílená terapie tedy skýtá obrovskou příležitost, kterou se ovšem nedaří zcela využít. Přestože je neustále testováno nepřehledné množství přípravků, vývoj nových léčiv je bolestně pomalý, za čímž stojí zejména časově a finančně náročné třetí fáze klinických testů. Tyto velmi zdoluhavé a obsáhlé klinické testy obvykle neselektované podle biologických markerů mnohdy nevedou k výraznějším pokrokům, nebo dokonce mohou stát za neúspěchem látek, které ve skutečnosti mají dobré protirakovinné účinky. S rostoucími znalostmi molekulární biologie nádorů se totiž ukazuje, že nádory jednoho typu ve skutečnosti tvoří velmi heterogenní skupinu. Heterogenita je dokonce příznačná i pro rakovinné buňky jednoho pacienta. Léčba, která se osvědčila v rozsáhlých testech, tak zdaleka nemusí být tou nejvhodnější při léčbě jednotlivce [17]. Tyto objevy vedou k nutnosti zavedení konceptu personalizované léčby, která nahlíží na nádor z pohledu jeho molekulární charakteristiky. Každý jednatel by tak byl testován na přítomnost konkrétních znaků, podle kterých by byla následně zvolena adekvátní léčba. Tento přístup není doposud klinicky realizován [18], ovšem úspěšné příklady léčby chronické myeloidní leukemie (CML) a HER2 pozitivní rakoviny prsu dávají naději, že personalizovaná léčba bude zaváděna i u ostatních rakovinných onemocnění. Vývoj CML je spojován s chiméřním proteinem BCR-ABL, jehož objevení vedlo k vytvoření specifického inhibitoru imatinibu (Gleevec), což byl zásadní průlom v léčbě CML. Obdobně u rakoviny prsu, kde je často nadexprimován estrogenový receptor HER2, byl vynalezen trastuzumab, který se váže na tento růstový receptor [19]. Než se personalizovaná léčba stane běžnou praxí, je třeba ještě mnoha pokroků v objevení nových biomarkerů, ale zejména změnou přístupu klinického testování. Biologicky řízené testy mohou objevení nových léčiv i jejich specifických cílů zefektivnit [18].

Rakovina žaludku taktéž vykazuje heterogenitu a s rostoucími znalostmi její biologie se předpokládá, že personalizovaná a cílená léčba může dosáhnout velkých úspěchů. Zároveň je nepřilíš obtížné získat rakovinnou tkáň endoskopickou biopsií, což usnadní hledání specifických biomarkerů [20]. Ukazuje se, že klasifikace na morfologickém základě je zcela nedostatečná pro předpověď biologického chování nádoru a jeho odpověď na léčbu. Proto je nutné zavést rozdělení do podskupin podle molekulární charakteristiky, což povede k lepší úspěšnosti a zároveň menším vedlejším účinkům [14]. V případě rakoviny žaludku se většina potenciálních léčiv nachází ve fázi klinického testování a teprve blízká budoucnost ukáže, jak budou úspěšná. Nicméně už

byl potvrzen signifikantní účinek trastuzumabu u HER2 pozitivních nádorů žaludku [21]. Cílená léčiva můžeme z hlediska specificity účinku dělit na látky namířené na ovlivnění růstových receptorů, buněčného cyklu, apoptózy (např. inhibitory proteazomu), angiogeneze nebo schopnosti invadovat do okolních tkání [22].

### 2.2.1 Růstové receptory

Nejintenzivněji zkoumaná je inhibice receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR), při které je užíváno dvou přístupů: inhibice EGFR prostřednictvím monoklonálních protilátek (Mab) vázajících se na extracelulární doménu, nebo inhibice intracelulární domény s funkcí tyrosin kinázy [23]. Tento receptor je abnormálně exprimován u mnoha různých typů nádorů včetně rakoviny žaludku a to až u 50 - 63% případů. Jeho zvýšená exprese je zároveň spojována s nepříznivou prognózou. Po navázání ligandu, TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$ ) nebo EGF (Epidermal Growth Factor), dochází k aktivaci signální kaskády, jenž vede k dělení buňky, její migraci, angiogenezi nebo k utlumení apoptózy [22]. Cetuximab je chimérický Mab schválený k léčbě kolorektálního karcinomu a rakoviny hlavy a krku. Zároveň proběhlo několik testů zkoumajících jeho účinek na pokročilá stadia nádoru žaludku s poměrně dobrými výsledky, zvláště při kombinaci s klasickými cytotoxickými léčivy. Zajímavá se zdá především kombinace s cisplatinou a 5-FU, kdy pravděpodobně dochází ke zvýšení chemosenzitivity nádorových buněk. Bude ovšem zapotřebí dalšího výzkumu, než se plně prokáže efekt cetuximabu nebo i jiných Mab, např. matuzumabu [21]. Cytostatický efekt inhibitorů tyrosin kinás, gefitinibu a erlotinibu, doložený z preklinického pozorování nebyl v klinických testech příliš potvrzen. Konečné výsledky v kombinaci s 5-FU se ovšem teprve očekávají [24].

Také zvýšená exprese receptoru 2 lidského epidermálního růstového faktoru (HER2) je mnohdy zásadní pro rozvoj nádoru žaludku, zejména u intestinálního typu, kde se vyskytuje až u 34% případů. HER2 hraje roli v mnoha klíčových procesech, krom jiného je spojován s narušením funkce E-kadherinu, což má za následek snížení adheze a umožnění invaze do okolních tkání [25]. Je také diskutována možnost užití HER2 jako prognostického faktoru. I přes neúspěch několika prvních studií hledajících souvislost, je dnes dokázána přímá korelace HER2 pozitivních nádorů s nepříznivou prognózou [26]. Po úspěchu trastuzumabu, Mab vázající se na HER2 extracelulární



doménu, u HER2 pozitivních nádorů prsu se tento nový lék začal testovat i na karcinomu žaludku. Výsledky byly velmi slibné, bez vedlejších efektů, a proto byl trastuzumab jako první biologicky cílené léčivo schválen v roce 2010 EMA (European Medicines Agency) k léčbě pokročilé rakoviny žaludku v kombinaci cisplatinou a capecitabinem nebo 5-FU [27].

### **2.2.2 Angiogeneze**

Utváření a růst krevních kapilár je nezbytný pro růstu nádoru, jeho šíření do okolních tkání a tvorby metastáz. Není tedy překvapivé, že inhibice angiogeneze sebou přináší slibné terapeutické využití u mnoha pevných nádorů, včetně karcinomu žaludku. Formace cévního systému zahrnuje mnoho rozdílných drah, včetně růstových faktorů, membránových receptorů a signálních kaskád. Pravděpodobně nejvíce nadějný léčebný potenciál skýtá inhibice dráhy spojené se specifickým vaskulárním endotheliálním růstovým faktorem (VEGF) vázajícím se na membránový receptor (VEGFR) cévních endotheliálních buněk [28]. Jeho zvýšená hladina úzce souvisí s nepříznivou prognózou. Obdobně jako v případě EGFR lze u VEGFR inhibovat extracelulární receptorovou doménu nebo intracelulární tyrosin kinásovou katalytickou doménu. Krom toho byly vyvinuty protilátky nebo rozpustné receptory vázající přímo VEGF. Přestože nebyly doposud inhibitory angiogeneze schváleny k léčbě rakoviny žaludku, výsledky některých klinických testů naznačují, že se jedná o velmi perspektivní skupinu léčiv. Zejména bevacizumab, monoklonální protilátka proti VEGF užívaná např. u rakovin tlustého střeva nebo prsu, vykazuje velmi slibné účinky, zvláště v kombinaci s irinotecanem a cisplatinou [29].

### **2.2.3 Matrix metalloproteinázy**

Pro růst a šíření nádoru do okolních tkání je vedle angiogeneze zcela zásadní degradace bazální membrány a extracelulární matrix. S tímto procesem jsou úzce spojeny některé podtypy rozsáhlé rodiny zinek obsahujících enzymů, matrix metalloproteináz (MMP). Z hlediska schopnosti metastázovat jsou významné MMP-2 a MMP-9 pro jejich schopnost štěpit kolagen typu IV, tedy hlavní složku bazální

membrány cév [30]. V rakovinné tkáni dochází ke zvýšené expresi členů rodiny MMP a zároveň byly prokázány signifikantní rozdíly exprese MMP v závislosti na klinicko-patologických charakteristikách nádoru a jeho schopnosti invadovat a metastázovat do oblasti lymfatických uzlin [31]. Například MMP-9 pozitivně koreluje s hloubkou invaze nádoru nebo výskytem metastáz ve vzdálenějších tkáních. Zároveň je spojena s rychlejším obnovením nemoci po léčbě a zkrácení doby přežívání. Vzhledem k tomu je MMP-9 navržena jako vhodný nezávislý prognostický faktor k predikci etiologie nádoru a adekvátní léčby [32]. Marimastat, nízkomolekulární inhibitor MMP, byl několikrát klinicky testován proti rakovině žaludku jako cytostatikum. Byl prokázán klinicky významný efekt v kombinaci 5-FU bez výraznějších vedlejších účinků [33]. Zajímavé výsledky také přinesla studie na myších xenograftech prokávající, že marimastat inhibuje metastáze v oblasti peritonea, které jsou ke většině léčiv odolné, čímž byla signifikantně prodloužena doba přežívání myši [34]. I přes tyto úspěchy naznačující možné perspektivy, nebylo v testování marimastatu dále pokračováno, což reflektuje značné obtíže ve vývoji léčiv proti rakovině žaludku [22].

#### **2.2.4 Buněčný cyklus a ostatní cílené terapie**

Cyklin dependentní kinázy (CDK) jsou nezbytné pro přechod mezi jednotlivými fázemi buněčného růstu. Flavopiridol, inhibitor CDK kináz, blokuje přechod mezi zásadními fázemi, z G1 do S nebo z G2 do M fáze, čímž tlumí buněčný růst. Zároveň byla na mnohých buněčných liniích pozorována indukce apoptózy. Přes slibné výsledky z počátečních a preklinických studií, nebyly ve druhé fázi klinických testů prokázány příznivé účinky flavopiridolu při léčbě adenokarcinomu žaludku [35].

Aurora kináza A (AURKA) je serin/threonin kináza, která reguluje mitotické dělení, tvorbu centromery a dělicího vřeténka. Bylo zjištěno, že AURKA je více exprimována v nádorové nežli ve zdravé tkáni. Zvýšená aktivita vede mimo jiné ke chromozomální nestabilitě nebo tvorbě aneuploidních buněk. Zároveň se ukazuje, že může hrát roli v inhibici apoptózy a tumor-supresoru p53, což naznačuje, že AURKA by mohla být nadějným cílem léčby [36].

V současné době probíhá výzkum na mnoha dalších potenciálních terapeutických cílech, např. histonových deacetyláz, proteinů teplotního šoku nebo

cyklooxygenázy. Teprve další testy ukážou, jaký budou mít dopad na léčbu. Vedle toho i kombinace jednotlivých přístupů může být velmi efektivní, jako je tomu v případě současné inhibice EGFR a VGFR, při které bylo dosaženo signifikantních výsledků [23].

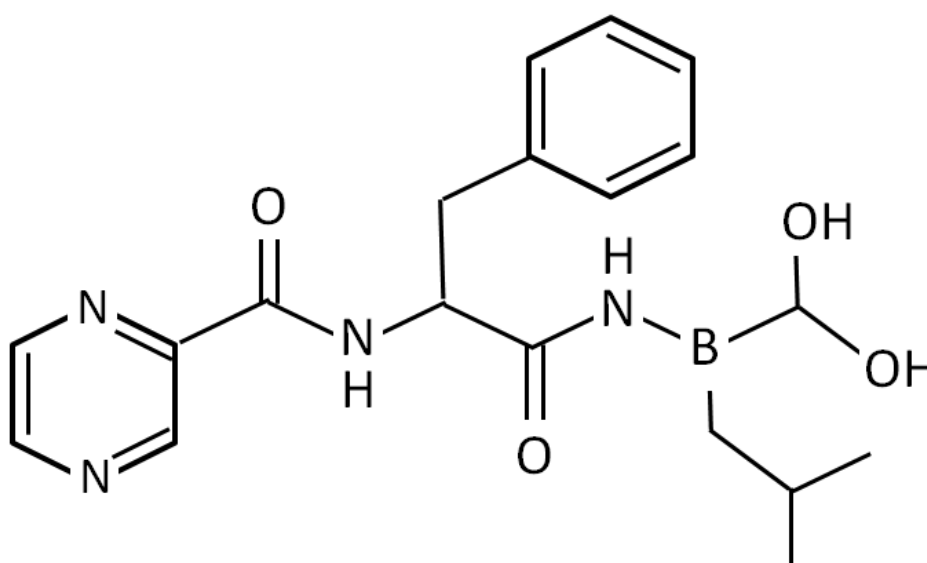
### **2.3 Inhibice proteazomu při léčbě rakoviny žaludku**

Dalším možným přístupem cílené léčby je inhibice proteazomu. Jedná se o multienzymový komplex vyskytující se hojně v jádře i cytoplasmě, který zprostředkovává odbourávání intracelulárních proteinů. Na regulaci hladiny proteinů a udržování buněčné homeostaze se podílí obzvláště transkripce, translace a degradace proteinů, jež byla ale dlouho poněkud opomíjena. Celý proces degradace proteinů se odehrává v rámci ubikvitin-proteazomového systému (UPS), která je vedle proteazomů tvořena i mnoha jinými enzymy a proteiny [37]. Vzhledem k tomu, že proteazomy jsou zodpovědné za degradaci více než 80% všech buněčných proteinů, včetně těch regulačních, nepotřebných či nesprávně složených, není překvapivé, že se tak UPS podílí na regulaci a funkci mnoha zásadních procesů u zdravých i transformovaných buněk, nevyjímaje buněčný cyklus, růst a dělení, angiogenezi, schopnost metastázovat, nebo přežívání buněk či apoptózu [38]. Inhibice proteazomu tak překvapivě skýtá slibný terapeutický cíl. V cestě ovšem stála pochopitelná obava, že inhibice tak klíčového procesu, jakým degradace proteinů bezesporu je, povede ke smrti nejen maligních, ale i zdravých buněk. Tyto představy se ovšem během preklinických testů nepotvrdily, neboť inhibitory proteazomu, z doposud ne zcela objasněných důvodů, selektivně působí především na rakovinné buňky [39].

Jako první se myšlenkou inhibice UPS za účelem terapeutického využití zabýval Alfred Goldberg, profesor z Harvard Medical School, a jeho spolupracovníci, se kterými založil společnost MyoGenics. Objektem jejich zájmu byla kachexie, patologické hubnutí spojené s intenzivním odbouráváním proteinů. Teprve po spolupráci s Julianem Adamsem a návrhu Avrama Hershka, spoluobjevitele UPS, se společnost (nyní již přejmenovaná na ProSript) spolu s Dana-Farber Cancer Institute začala zabývat možností léčby rakoviny cestou inhibice proteazomu. V rekordně rychlém čase byl na trh uveden bortezomib, první lék ve třídě inhibitorů proteazomu,

který byl v roce 2003 schválen FDA (Food and Drug Administration) k léčbě mnohočetného myelomu jako lék třetí volby. Vývoj tohoto léku je rovněž dáván za příklad rychlého a velmi efektivního translačního výzkumu, jenž byl umožněn díky úzké spolupráci mezi akademickou půdou, soukromým sektorem, investory, vládními úřady a advokátními společnostmi [40].

Bortezomib, známý také jako PS-341, uvedený na trh pod značkou VELCADE<sup>TM</sup> je dipeptidyl boronát (Obr. 1.), schopný se specificky a reverzibilně vázat na proteazom [41]. Konkrétně inhibuje enzymatickou aktivitu 20S hlavní části proteazomu, a to již v nanomolárních koncentracích [38].



**Obr. 1.** Chemická struktura bortezomibu.

I přes značné pokroky v poznání UPS a buněčné odpovědi na podání bortezomibu není jeho mechanismus účinku plně pochopen a stále je předmětem diskuzí [42]. Přesto je zřejmé, že způsobuje akumulaci mnoha regulátorů buněčného cyklu, včetně inhibitorů cyklin-dependentních kináz, jako jsou p21 a p27, nebo také tumor supresorového proteinu p53, což vede ke zvýšené senzitivě buněk k apoptóze. Zároveň v mnoha buněčných liniích zabraňuje aktivaci signalizace jaderného faktoru  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), která je často silně aktivní u maligních onemocnění, což vede k lepšímu přežívání rakovinných buněk a jejich větší odolnosti vůči chemoterapii [43]. Účinek bortezomibu byl prokázán na mnoha buněčných liniích a potvrzen v dalších klinických testech. Ukázalo se, že je aktivní jednak sám, tak i v kombinaci, neboť zvyšuje citlivost buněk na klasická

chemoterapeutika bez nárůstu vedlejších negativních účinků. V nynější době je schválen k léčbě mnohočetného myelomu a lymfomu plášťových buněk [44].

Také na buněčných liniích odvozených od karcinomu žaludku se testoval účinek bortezomibu. Bylo prokázáno, že signifikantně inhibuje růst a zároveň snižuje aktivitu extracelulární signál-regulující kinázy (ERK)1/2 a Akt signální dráhy, a naopak zvyšuje hladinu p21. Rovněž způsobil akumulaci buněk v G1 fázi. V kombinaci s konvenčními cytotoxickými léčivými 5-FU, doxorubicinem, paclitaxelem vykazoval synergistický účinek při inhibici růstu buněk [45]. Obdobných výsledků bylo dosaženo i v jiné studii, ve které se také potvrdilo, že bortezomib zvyšuje citlivost buněk na docetaxel. Zároveň aplikace této kombinace léčiv vyvolala snížení exprese anti-apoptického proteinu Bcl-2 za zvýšení hladiny pro-apoptického Bax. Navíc došlo ke zvýšení množství p27, ale bez nárůstu exprese tumor supresorového proteinu p53 [46]. Na základě poměrně slibných výsledků první fáze klinického testu s pacienty s pevnými nádory [47] proběhly i dvě druhé fáze klinických testů s pacienty trpícími rakovinou žaludku. V první studii byla aplikována kombinace bortezomibu a irinotecanu na základě vysoké účinnosti prokázané u myšího xenograftu rakoviny tlustého střeva. Ve skupině užívající bortezomib s irinotecanem byla míra odpovědi 33%, avšak u těch, kterým byl podáván jen samotný bortezomib pouze 9%. Kombinovaná léčba se tedy jeví jako velmi nadějná, ovšem je zapotřebí dalšího výzkumu [48]. Je zajímavé, že u rakoviny jícnu a kardiální oblasti žaludku neposkytoval bortezomib v kombinaci s carboplatinou a paclitaxelem žádný klinický prospěch [49]. V druhé studii [50] byl testován účinek samotného bortezomibu. I přes pozitivní preklinické výsledky nebyl zaznamenán žádný výrazný účinek, stejně jako tomu bylo i u mnoha jiných pevných nádorů [51-54]. Nejlepším výsledkem byla stabilizace onemocnění na méně než tři a půl měsíce. Bylo prokázáno, že v použité koncentraci bortezomib inhibuje 20S preteazom z více než 50% asi u 80% pacientů, takže neschopnost vázat se na cíl nevysvětluje jeho neúčinnost. Budoucí možnosti užití bortezomibu v léčbě karcinomu žaludku jsou tedy hlavně v kombinaci s klasickými chemoterapeutiky nebo jinými cílenými léčivými, jako jsou např. inhibitory proteinů teplotního šoku, které jsou po jeho aplikaci aktivovány a vedou k utlumení apoptózy, a tudíž i ke snížení účinku bortezomibu [50]. Léčbu bortezomibem mnohdy doprovází poměrně závažné vedlejší účinky, které jsou částečně vysvětlovány jeho nespecifickou inhibicí jiných proteáz, než těch proteazomových [55]. Také častá rezistence rakovinných buněk vůči bortezomibu je velkým problémem, je tedy zřejmé,

že jsou nutné nové inhibitory proteazomu, které by s menšími vedlejšími účinky vykazovaly širší a silnější protirakovinnou aktivitu. Ve vývoji je proto druhá generace inhibitorů proteazomu v čele s marizomibem (salinosporamid A) nebo carfilzomibem, u kterých je naděje, že budou účinné i proti pevným nádorům [56-57].

## **2.4 Proteazom a ubikvitin-proteazomový systém**

Od poloviny 20. století byla hlavním tématem molekulární a buněčné biologie otázka, jak je informace uložená v nukleových kyselinách převáděna do proteinů, a problematika odbourávání proteinů byla odsunuta na okraji zájmu. Po objevení lyzozomu, organely zodpovědné za degradaci intercelulárních proteinů, se předpokládalo, že odbourává i proteiny vnitrobuněčné, přestože to nebylo experimentálně potvrzeno a výsledky ojedinělých pokusů dokonce tvrdily pravý opak [58]. Podivuhodné bylo, že degradace intracelulárních proteinů byla závislá na energii, a tedy bez ATP neprobíhala, což odporovalo intuitivním představám. Potřeba ATP se vysvětlovala jako nutná pro udržení kyselého prostředí v lyzozomu [59]. Důležitý průlom přinesla studie z roku 1977 A. Goldberga a J. Etlingera [60], která prokázala na ATP závislé odbourávání vadných proteinů v lyzátu retikulocytů, tedy buněk neobsahujících organely. Na energii závislá degradace proteinů velmi zaujala Avrama Hershka, jeho studenta Aarona Ceichanovera z Technion Israel Institute of Technology a Irwina Rose z Institute of Cancer Research ve Filadelfii. Tito tři vědci utvořili jádro týmu, který pracoval na problematice odbourávání intracelulárních proteinů. Mezi lety 1978 a 1985 postupně poodhalili biochemickou podstatu tohoto procesu. Bylo zjištěno, že za degradaci je zodpovědný již dříve známý protein ubikvitin, který se pomocí několika dalších enzymů váže na proteiny určené k odbourání [59]. V roce 1986 byla objevena vysokomolekulární proteáza, později známá jako 26S proteazom, která specificky degradovala konjugáty ubikvitinu [61]. A. Hershko, A. Ceichanover a I. Rose byli roku 2004 oceněni Nobelovou cenou za chemii za objev ubikvitin-proteazomového systému (UPS) zodpovídající za řízené odbourávání proteinů [62].

V eukaryotických buňkách je naprostá většina cytoplazmatických i jaderných proteinů odbourávána UPS, jejímž srdcem je 26S proteazom. Tento velký, vysoce organizovaný a sofistikovaný komplex o hmotnosti přibližně 2,5 MDa je složen z několika desítek podjednotek, které zprostředkovávají mnoho rozdílných činností, od rozpoznání ubikvitinem označeného proteinu, jeho rozbalení a translokaci, až po jeho rozštípání na oligopeptidy [63]. Dříve se předpokládalo, že funkce proteazomu je pouze odstraňovat chybně složené, poškozené nebo nepotřebné proteiny. Ukázalo se však, že tento enzymatický komplex má rozhodující úlohu v udržování homeostázy, buněčném cyklu a přežívání buněk [64]. Poruchy v zachování vyrovnané hladiny proteinů mohou vést k metabolickým, onkologickým, neurogenerativním nebo kardiovaskulárním onemocněním [65]. Proteazomy se vyskytují v cytoplazmě i v jádře. V cytoplazmě jsou asociovány s centromerami, cytoskeletem a vnější membránou endoplazmatického retikula. V jádře jsou přítomny v celé nukleoplazmě, ale nenacházejí se v jadérku. Přestože jejich relativní četnost závisí na konkrétním buněčném typu, převážně se vyskytují početněji v cytoplazmě. Také v buňkách intenzivně se dělících nebo transformovaných jsou proteazomy zastoupeny hojněji, než v buňkách klidového stavu [66]. Proteazom se vedle degradace proteinů v jádře také podílí na regulaci syntézy DNA, její opravě a transkripci [65]. Vedle 26S proteazomu jsou známy také specifické imunoproteazomy a thymoproteazomy hrající roli v imunitní odpovědi [67].

#### **2.4.1 Ubikvitin-proteazomový systém**

S degradací intracelulárních proteinů se již od samého počátku pojily dvě otázky: proč je závislá na dodání energie a jakým způsobem jsou selektovány proteiny určené k odbourání. Odpovědi na obě v sobě ukrývá malý polypeptid ubikvitin. Tento vysoce konzervovaný 8,5 kDa polypeptid skládající se ze 76 aminokyselin se za spotřeby ATP váže svým C koncem přes izopeptidovou vazbu na  $\epsilon$ -aminoskupiny lyzinu cílového proteinu, čímž jej označí k degradaci [68]. V některých případech může být konjugován i na N-koncovou aminoskupinu substrátu [69]. Na navázaný ubikvitin se připojují další molekuly tohoto peptidu, a vytvářejí tak polyubikvitinový řetězec (polyUb). Vzhledem k tomu, že ubikvitin může být od substrátu oddělen proteázami, je modifikace proteinů ubikvitinací reverzibilní, a umožňuje tak, vedle označení proteinu k degradaci, zároveň vysoce efektivní způsob regulace funkce cílových proteinů, podobně jako fosforylace [70]. Zároveň ubikvitin slouží také k mnoha dalším účelům,

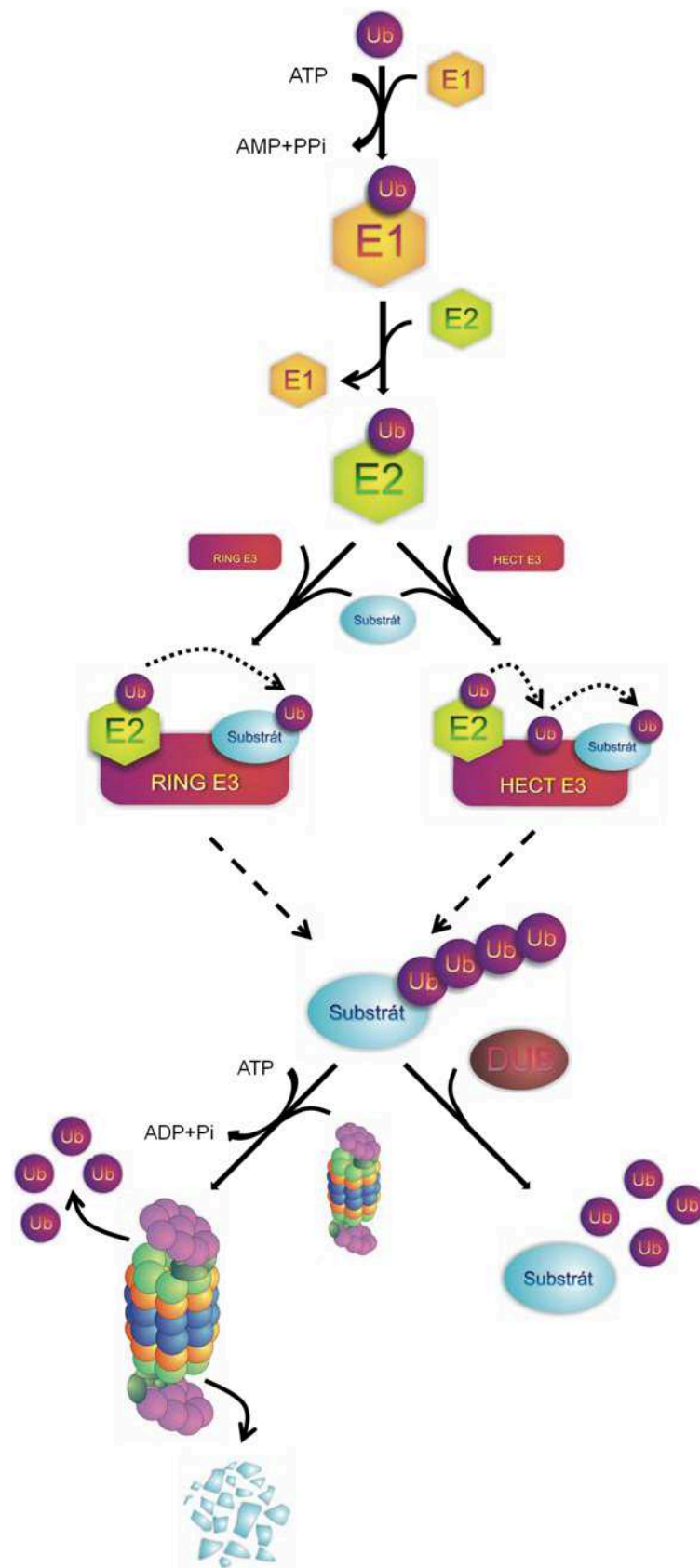
např. k opravě poškození DNA, regulaci transkripce, transdukcii signálu, endocytóze nebo třídění vezikulů. Kromě toho jsou známy také tzv. ubikvitinu podobné proteiny, které patří do stejné rodiny a vykonávají podobným způsobem mnoho dalších funkcí (regulace ubikvitin E3 ligáz, buněčného cyklu, odpověď na virovou infekci, jaderný transport, imunitní a zánětlivé reakce a mnoho dalších) [71]. Jak je patrné, ubikvitin (ubikvitin znamená „všude se vyskytující“) nedostal své jméno náhodou.

Navázání ubikvitinu na protein obvykle zahrnuje tři kroky: aktivace ubikvitinu E1 aktivujícím enzymem, přenesení ubikvitinu na E2 konjugující enzym a na závěr jeho připojení na substrát E3 ligázou (Obr. 2.) [72]. C-konec ubikvitinu je nejdříve aktivován ATP a vzniklý intermediát, ubikvitin-AMP, následně reaguje s cysteinovým reziduem E1 za tvorby E1-ubikvitin konjugátu [73]. Ten je následně rozeznán E2 enzymem, na který je ubikvitin přenesen a připojen další thiolesterovou vazbou. E2 pomáhá při dopravení aktivovaného ubikvitinu z E1 na substrát, a proto je často nazýván jako ubikvitin-konjugující nebo ubikvitin-přenašející protein. Všechny E2 také obsahují doménu pro vázání s E3 ligázou [74]. Zatímco se v buňce nachází jen malé množství různých E1 a E2 (dva druhy E1 a přinejmenším 38 druhů E2), můžeme nalézt více než 600 různých E3 ligáz [75]. Je tedy patrné, že za specificitou ubikvitinace stojí právě E3 ligázy. Podle struktury i mechanismu účinku se dělí do dvou hlavních skupin: obsahující doménu HECT (Homologous to E6-Associated Protein C-Terminus) a s doménou RING (Really Interesting New Gene). V HECT doméně se nachází cysteinové reziduum, na které se váže ubikvitin z E2. Tento intermediát je následně přenesen na cílový protein [76]. Druhou a zároveň nejobsáhlejší skupinou jsou RING E3, které jsou charakteristické přítomností domény zinkového prstu. Na rozdíl od HECT ligáz se neúčastní ubikvitinace přímo, ale pouze zprostředkovávají kontakt E2 se substrátem, na který je ubikvitin následně navázán přímo z E2. Nedochozí tedy ke tvorbě intermediátu E3-ubikvitin, jak tomu je u HECT ligáz (Obr. 2.) [77-78]. Vedle tří základních ubikvitinačních proteinů byl objeven i nový faktor pojmenovaný E4. Váže se na ubikvitinový řetězec substrátu a ve spolupráci s E1, E2 a E3 se podílí na jeho prodlužování a tvorbě polyUb [79].

Přestože je navázání ubikvitinu na substrát někdy označováno jako „polibek smrti“, nemusí ubikvitinace nutně znamenat odsouzení proteinu k degradaci v proteazomu. Molekuly ubikvitinu se mohou v polyUb vázat přes lyzin v mnoha pozicích (známy jsou K6, K11, K27, K29, K33), ale nejběžnější jsou K48 a K63



řetězce. Právě způsob vázání ubikvitinu v řetězci, který je určován E3 ligázami, rozhoduje o osudu označeného proteinu v buňce [80]. Za značku, která substrát vede k degradaci, jsou považovány zejména K48 řetězce, zatímco o K63 řetězcích se předpokládá, že hrají roli spíše v odpovědi na poškození DNA, buněčné signalizaci a vnitrobuněčném transportu. Jak se ovšem ukazuje, i proteiny označené K63 řetězci mohou být rozeznány proteazomem a rozloženy [81], nebo mohou hrát roli v procesu autofágie. Obdobně i u K48 byly nalezeny nekanonické, neproteolytické funkce [70].

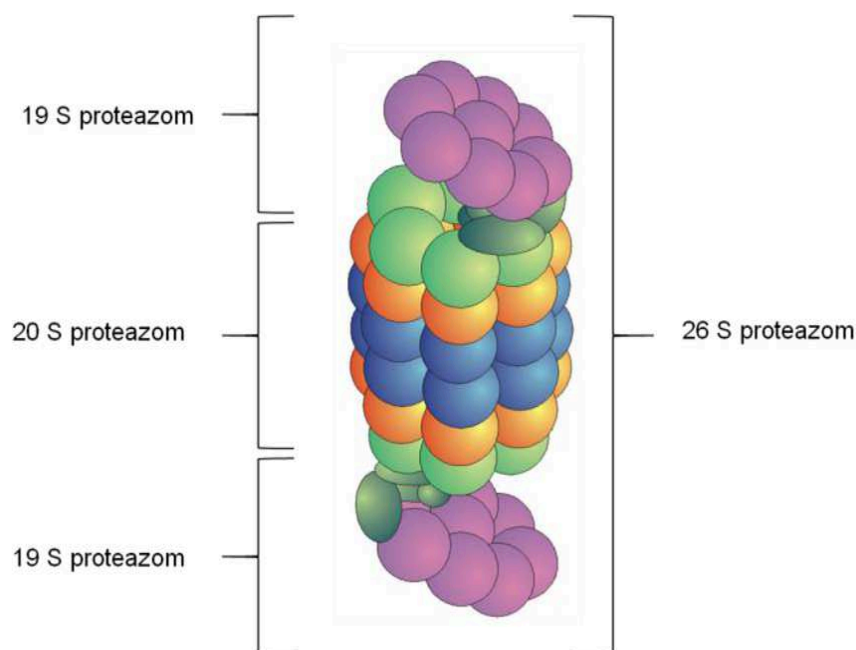


**Obr. 2.** Schéma ubikvitin-proteazomového systému.

Jak již bylo řečeno, ubikvitinace je proces reverzibilní, proto musí být v buňce přítomny také enzymy se schopností odštěpit ubikvitin od označeného proteinu. Tyto izopeptidázy se nazývají deubikvitinázy (DUB) a tvoří rozsáhlou a diverzifikovanou rodinu, do které patří více než 70 doposud známých DUB. Rozdělují se do pěti skupin: ubikvitin C-terminální hydrolázy (UCH), ubikvitin specifické proteázy (USP), proteázy vaječnickových tumorů (OTU), proteázy Machadovy-Josephovy nemoci (MJD) a proteázy s JAMM doménou [82]. Pro JAMM doménové DUB, které se řadí do skupiny zinek vázajících metaloproteáz, je charakteristické, že se často nacházejí v asociaci s velkými proteinovými komplexy. Např. JAMM doménová CSN5 se nachází v COP9 signalozomu, osmipodjednotkovém komplexu, který reguluje ubikvitinaci proteinů prostřednictvím modifikace E3 ligáz. Dalším velmi důležitým příkladem je Poh1 DUB, která je součástí proteazomu a je zásadní pro jeho funkci [83-84].

#### **2.4.2 Struktura 26S proteazomu**

V samém středu UPS se nachází proteazom, který rozeznává ubikvitinované proteiny a je schopen je následně degradovat. Skládá se ze dvou hlavních komplexů: základní části 20S proteazomu, 20S CP (Core particle) o velikosti asi 700 kDa a na něj navázanou regulační část 19S proteazomu 19S RP (Regulatory Particle) o velikosti asi 900 kDa (Obr. 3.). Zatímco 20S CP je dutý soudkovitý útvar zodpovědný za samotnou degradaci na oligopeptity, 19S CP obsahuje podjednotky zprostředkovávající rozpoznání a vázání polyubikvitinového řetězce a substrátu, odstříhnutí polyUb, rozpletení substrátu a jeho podstoupení 20S CP. 19S RP se může na 20S CP vázat z jedné nebo obou stran [85].



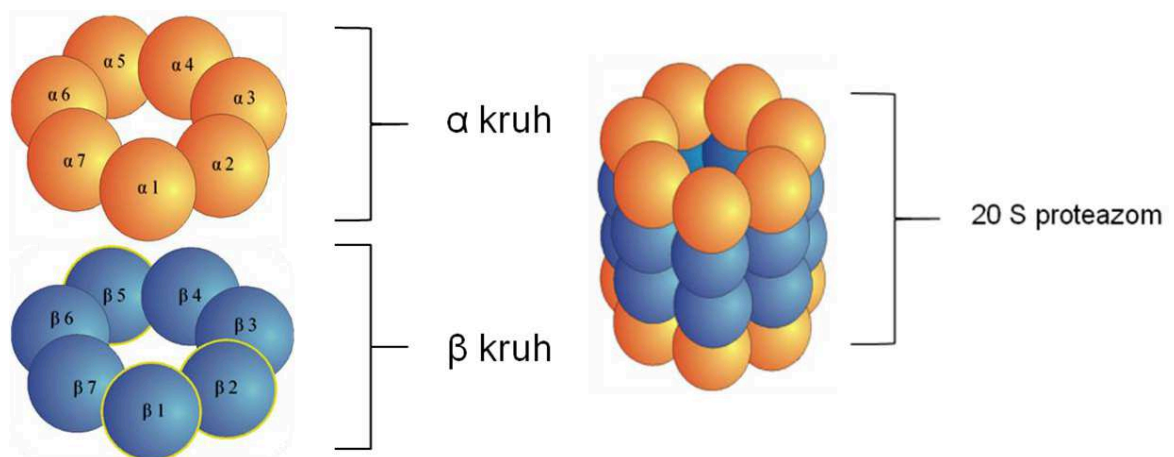
**Obr. 3.** Schéma struktury 26S proteazomu.

### 2.4.3 Struktura 20S proteazomu

20S proteazom zaujímá centrální část celého proteazomového systému. Jak již bylo řečeno, tvoří soudkovitou strukturu o velikosti 160x100 Å. Je složen z celkem čtyř homologních kruhů, dvou  $\alpha$ -kruhů a dvou  $\beta$ -kruhů vzájemně složených tak, že  $\beta$ -kruhy jsou umístěny uvnitř a  $\alpha$ -kruhy zvnějšku po obou stranách, v sekvenci  $\alpha\beta\beta\alpha$ .  $\alpha$ -kruh i  $\beta$ -kruh jsou shodně složeny ze sedmi podjednotek o velikosti mezi 20 až 30 kDa (Obr. 4.). Na rozdíl od jednoduššího původního proteazomu archeí jsou u eukaryot podjednotky vzájemně rozlišené, vytvářející tedy řadu rozdílných  $\alpha_{1-7}$  a  $\beta_{1-7}$  podjednotek [86]. V centrální části formují prstence tři nepřerušené komory, které tvoří dutinu proteazomu. V prostřední z těchto komor se nachází podjednotky  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  a  $\beta_5$  s proteolytickou aktivitou [87]. Tyto  $\beta$ -podjednotky obsahují na svém N-terminálním konci katalytické threoninové reziduum.  $\beta_1$  vykazuje kaspázám podobnou aktivitu,  $\beta_2$  trypsinu podobnou a  $\beta_5$  chymotrypsinu podobnou aktivitu [67]. Právě  $\beta_5$  podjednotka je inhibována lékem bortezomibem [38]. Na rozdíl od  $\beta$ -prstenců N-terminální konce okrajových  $\alpha$ -kruhů tvoří úzký tunel, vchod do nitra proteazomu, jehož otevření nebo uzavření umožňuje regulovat přístup substrátu k proteolytickým enzymům. Za

fyziologických podmínkách je brána 20S proteazomu uzavřena a otevírá se pouze po interakci s RP. Proto se regulační část nazývá také proteazomový aktivátor (PA) [87]. Na otevírání či uzavírání vstupu se podílí zejména  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  a  $\alpha_4$ , přičemž klíčovou roli hraje zřejmě  $\alpha_3$ . Otevření kanálu, který tak dosáhne průměru 13-20 Å, se děje prostřednictvím konformačních změn  $\alpha$  podjednotek. Ty mohou nastat zejména při interakci s RP (jako je například 19S a 11S) nebo při kontaktu s nesprávně složenými či poškozenými proteiny. Regulace vstupu má vliv hlavně na proteázovou aktivitu proteazomu (degradace celých proteinů nebo velkých polypeptidů), zatímco peptidázovou aktivitu (degradace malých oligopeptidů) ovlivňuje minimálně [86].

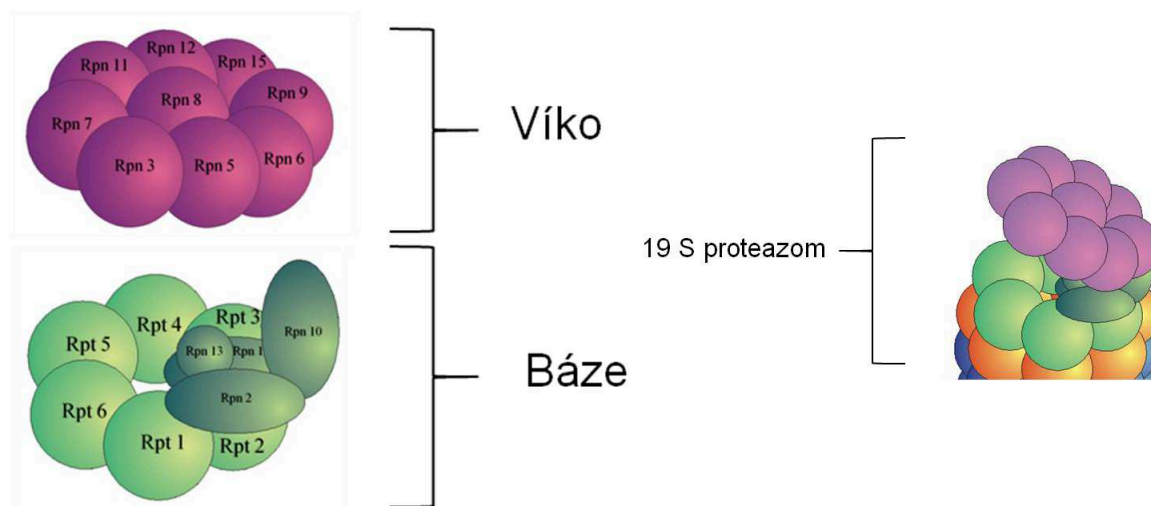
Jednotlivé podjednotky kvasinkového a savčího proteazomu si jsou velice podobné, stejně jako celková struktura 20S CP. Tato uniformita společná všem zástupcům eukaryot svědčí o vysoké evoluční konzervovanosti celého systému. Variabilitu vykazují pouze specifické inducibilní formy proteazomu hrající roli v adaptivním imunitním systému. Imunoproteazomy, obsahující pozměněné katalytické jednotky  $\beta_{1i}$ ,  $\beta_{2i}$  a  $\beta_{5i}$ , produkují peptidy, které se váží na MHC I na povrchu buněk, kde jsou kontrolovány  $T_c$  lymfocyty. Další specifický typ proteazomu se vyskytuje v brzlíku. Tyto thymoproteazomy, mající specifickou jednotku  $\beta_{5t}$ , jsou důležité při vývinu  $CD8^+$  T lymfocytů [67].



**Obr. 4.** Schéma struktury 20S proteazomu.

#### 2.4.4 Struktura 19S proteazomu

Bylo již zmíněno, že 20S proteazom má téměř uzavřený  $\alpha$ -kruh, čímž brání neregulovanému vstupu proteinů k proteázám umístěným v dutině proteazomu. Navázání RP umožňuje otevření tohoto vstupu, a je tedy klíčové pro správnou funkci proteazomu. Mezi nejčastější RP patří 19S proteazom, známý také jako PA700, schopný se vázat na 20S z jedné nebo obou stran, přičemž tato interakce je závislá na ATP. PA700 se skládá z téměř 20 heterogenních podjednotek o velikosti pohybující se mezi 25 až 110 kDa. Podjednotky můžeme podle vlastností rozdělit do dvou skupin: na první, která obsahuje 6 podjednotek s ATPázovou aktivitou, a na druhou, jež je tvořena zbylými strukturně nepříbuznými ne-ATPázovými podjednotkami [88]. Jednotky s ATPázovou aktivitou tvoří spolu s dalšími čtyřmi jednotkami bázi 19S, která je vzájemně spojená s víkem, složeným z ostatních devíti ne-ATPázových podjednotek (Obr. 5.) [89]. PA700 vykonává hned několik nezbytných funkcí. Předně rozpoznává a selektivně váže ubikvitinované proteiny určené k degradaci. Tyto proteiny musí být před vstupem do nitra proteazomu rozbaleny a zároveň od nich musí být odštěpena polyubikvitinová značka, což se děje za pomoci deubikvitinázy Pdh1. Vstup  $\alpha$ -kruhu musí být otevřen a protein transportován do nitra proteazomu, kde bude následně rozštěpen [90]. K pojmenování podjednotek se užívá několik názvosloví. U lidského proteazomu se jednotky jmenují podle jejich molekulové hmotnosti (tedy např. p56 nebo S4), v případě kvasinek podjednotky dostaly název Rpt (regulační partikule, trojí-A protein) nebo Rpn (regulační partikule, ne-ATPázová aktivita) [91].



**Obr. 5.** Schéma struktury 19S proteazomu.

Báze se sestává z deseti podjednotek. Šest z nich, Rpt1-6, (u člověka p56, p48, p50, S7, p45, p42) jsou AAA+ATPázy vykazující vysokou podobnost. Zbylé čtyři, Rpn1, Rpn2, Rpn10 a Rpn13, jsou ne-ATPázy [92]. Všechny šest podjednotek náleží do rozsáhlé a diverzifikované skupiny AAA (ATPázy asociované s různými buněčnými aktivitami) - ATPáz [91]. Jsou charakteristické vysoce konzervovanou 200 aminokyselin dlouhou doménou, která obsahuje sekvenci pro vázání ATP. Nepřetržité dodávání energie ve formě ATP je nezbytné pro průběh selektivní degradace proteinů [93]. Rpt1-6, podobně jako  $\alpha$  a  $\beta$  jednotky u 20S CP, jsou uspořádány do prstence, a vytvářejí tak heterohexamerický kruh s úzkým otvorem uvnitř. Je pravděpodobné, že velké podjednotky Rpn1 a Rpn2 jsou k ATPázovému kruhu připojeny z vnější strany, a že Rpn10 stabilizuje spojení mezi bází a víkem 19S. Nevyřešenou otázkou ovšem stále zůstává role jednotlivých Rpt a jejich případná spolupráce při degradaci proteinů [94].

Celkem z devíti ne-ATPázových podjednotek (Rpn3, Rpn5-9, Rpn11, Rpn12, Rpn15/Sem1) je složeno víko 19S proteazomu. Zdá se, že hlavní funkcí víka je deubikvitinace proteinů určených k degradaci. Za tuto činnost je zodpovědná Rpn11 (u lidí Poh1) JAMM doménová DUB, nejvíce konzervovaná podjednotka vykazující 65% podobnost mezi lidskou a kvasinkovou formou. Jedná se o metaloproteázu závislou na  $Zn^{2+}$  [92]. Ze všech proteinů víka je pouze u Poh1 dopodrobna zjištěna funkce, kterou je právě deubikvitinace proteinů nezbytná pro proteozomální degradaci. Ostatní podjednotky by mohly hrát roli při aktivační a poziční regulaci Poh1 [89].

#### 2.4.5 Jiné regulační části proteazomu

Mnoho eukaryotických buněk obsahuje vedle 19S i jiné složené proteiny schopné se cíleně vázat na vnější  $\alpha$ -kruh 20S CP, a tak tvořit strukturálně i funkčně rozdílné proteazom-regulační komplexy. Na rozdíl od 19S tyto alternativní RP nejsou ATPázy, pracují tedy nezávisle na dodávání energie, a navíc se nevážou na ubikvitinové řetězce, což naznačuje, že zprostředkovávají na ubikvitinu nezávislou degradaci proteinů [95]. Jedním z alternativních RP je PA28 (neboli také 11S regulátor), který stimuluje na ATP nezávislé odbourávání polypeptidů. PA28 je cytoplazmatický komplex složený ze dvou rozdílných, ale příbuzných 28 kDa velkých jednotek PA28 $\alpha$  a PA28 $\beta$ , které tvoří heterohexamer. PA28 $\alpha$  a PA28 $\beta$  se vyskytují pouze u organismů s adaptivní imunitou a jejich exprese je indukována cytokininem  $\gamma$ -interferonem. 11S regulátor navázaný na 20S CP je nezbytný pro správnou funkci MHC I molekul [96].

#### 2.4.6 Skládání proteazomu

Vzhledem k množství podjednotek a strukturní diverzitě proteazomu není překvapivé, že složení tak sofistikovaného komplexu je mnohastupňový a náročný proces vyžadující spolupráci mnoha pomocných proteinů. Poznání mechanismu kompletování proteazomu je nezbytné pro správné porozumění jeho funkci a zejména regulaci [97]. Skládání CP je poměrně dobře prostudováno. Podílí se na něm chaperony PAC1-4 a ubikvitinační maturační protein (UMP1). Nejdříve je zformován  $\alpha$ -kruh, který posléze slouží jako templáta pro  $\beta$ -kruh. Vzniká tak „poloviční proteazom“, který po interakci s druhým dává vzniknout novému kompletnímu 20S. Je zajímavé, že prvním substrátem určeným k degradaci právě složeného proteazomu jsou ty proteiny, které umožnily jeho vznik (konkrétně PAC1-2 a UMP1) [98]. Dosavadní poznatky o mechanismu formování 19S jsou skromnější. Za účasti pomocných proteinů se zvlášť kompletuje báze a víko, které se poté navzájem spojí prostřednictvím Rpn10. Také se zdá, že ke složení víka přispívá nejhojnější buněčný chaperon Hsp90 [97]. Krom této možnosti je podporován i druhý mechanismus kompletování proteazomu, ve kterém již hotový 20S slouží jako podstava pro tvorbu báze, na niž se posléze připojí víko [99].



#### **2.4.7 Degradace proteinů nezávislá na ubikvitinu**

Vedle obvyklé degradace ubikvitinovaných substrátů zodpovídá proteazom také za na ubikvitinu nezávislé odbourávání proteinů. Tento poněkud opomíjený proces nabývá na důležitosti, neboť se ukazuje, že se nevztahuje pouze na dosluhující, zoxidované či jinak poškozené nebo nesprávně složené proteiny. Cestou ubikvitin-independentní degradace může být regulována hladina několika důležitých proteinů souvisejících s nádorovými onemocněními. Týká se to zejména transkripčního faktoru c-Fos protoonkogenu, nebo tumor-supresorových proteinů p21, p53 či Rb [100-101]. Nicméně ubikvitin-proteazomový systém zůstává v centru vědeckého zájmu, neboť nabízí nepřehledné množství různých přístupů a potenciálních cílů pro terapii mnoha onemocnění, včetně rakoviny. Vedle samotného proteazomu to mohou být také E1 aktivační enzymy, E3 ligázy nebo deubikvitinázy. Komplexita celého UPS, který zasahuje do téměř všech buněčných procesů, sebou ovšem také přináší několik problémů. Předně je velmi obtížné určit přesný mechanismus účinku daného léčiva. Zároveň vyvstává otázka, jak je možné, že zásah do tak rozsáhlého a nepostradatelného systému dokážou buňky přežít a že toxicky působí hlavně na buňky rakovinné [102].

### **2.5 Úloha jaderného faktoru- $\kappa$ B**

Ubikvitin-proteazomový systém se překvapivě stal velmi atraktivním přístupem k léčbě rakovinných onemocnění s lékem bortezomibem (VELCADE<sup>TM</sup>), prvním klinicky užívaným inhibítorem proteazomu. Přestože o něm od roku 1998, kdy byl vyvinut (i od roku 2008, kdy byl FDA schválen jako lék první volby při léčbě mnohočetného myelomu), bylo publikováno nespočet studií, není otázka mechanismu jeho účinku vůči rakovinným buňkám doposud uspokojivě zodpovězena. Není to ovšem překvapivé vzhledem k tomu, že UPS zasahuje do nepřehledného množství buněčných dějů [42]. Jeden z prvních a zásadních mechanismů, který byl inhibítorem proteazomu přisuzován, byla inhibice jaderného faktoru- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) [44].

Transkripční faktory patřící do rodiny NF- $\kappa$ B jsou nepostradatelné pro správnou funkci imunitního systému. Jejich aktivace ale může být dvousečná zbraň, protože mohou neúměrně podporovat zánětlivou reakci, nebo dokonce vést ke kancerogenezi. NF- $\kappa$ B řídí geny, jejichž nepřiměřená exprese může způsobit transformaci a proliferaci

buněk. Mnohdy se jedná o onkogeny, které hrají důležitou roli při tvorbě metastáz nebo angiogenezi. Konstitutivní aktivace NF- $\kappa$ B je příznačná pro široké spektrum onkologických onemocnění a zdá se, že NF- $\kappa$ B může být mostem mezi zánětem a rakovinou [103]. Jaderný faktor-kappa B je souhrnné označení pro rodinu vysoce regulovaných transkripčních faktorů. U člověka patří do Rel/NF- $\kappa$ B rodiny p50/p105 (NF- $\kappa$ B1), p52/p100 (NF- $\kappa$ B2), RelA (p65), c-Rel a RelB, jejichž schopnost tvořit navzájem různé homo- nebo heterodimery umožňuje rozlišně kontrolovat genovou expresi [104]. Všechny proteiny patřící do NF- $\kappa$ B rodiny obsahují vysoce konzervovanou doménu RHD (Rel homology domain), která zprostředkovává tvorbu dimerů s jinými Rel/NF- $\kappa$ B proteiny a zároveň umožňuje jejich vazbu s DNA na 9 bp  $\kappa$ B motivy v oblasti promotoru. Členové „NF- $\kappa$ B“ podskupiny (p50 a p52) se tvoří z inaktivních prekurzorů p105 a p100, které jsou charakteristické dlouhými C-terminálními ankyrinovými repeticemi, jejichž úloha spočívá v inhibici těchto proteinů. K procesu zkracování a aktivace prekurzorů (z p105 vzniká p50, z p100 vzniká p52) dochází částečnou proteolýzou a degradací v proteozomu, nebo i kotranslačně předčasným ukončením překladu [105]. Pouze proteiny „Rel“ podskupiny (RelA, RelB, c-Rel) obsahují C-terminální transaktivační doménu, díky níž jsou zásadní pro expresi. Naopak homodimery p50 a p52, u nichž přítomna není, mohou hrát roli při negativní regulaci transkripce [106]. V buňkách klidového stavu jsou homo- heterodimery vázány na inhibitory  $\kappa$ B (I $\kappa$ B), které zabraňují jejich translokaci z cytoplazmy do jádra a následné expresi genů. Rodina I $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , Bcl-3 a také prekurzorové proteiny p105 a p100) je taktéž charakteristická přítomností ankyrinových repetic, které se váží na RHD NF- $\kappa$ B dimerů. I $\kappa$ B ovšem maskuje jadernou lokalizační sekvenci (NLS) zodpovídající za transport do jádra pouze u jedné podjednotky, takže u druhé podjednotky dimeru zůstává NLS dostupná. I $\kappa$ B naopak obsahuje jadernou exportní sekvenci (NES), což má za následek, že komplex I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B neustále přeskakuje z cytoplazmy do jádra a naopak, přičemž dynamická rovnováha se ustanovuje s výrazně vyšší koncentrací v cytoplazmě. Pokud je ovšem I $\kappa$ B odstraněn, dochází k translokaci NF- $\kappa$ B dimeru do jádra [107]. Degradace I $\kappa$ B je výrazně regulovaný proces, který je iniciován specifickou fosforylací pomocí aktivované I $\kappa$ B kinázy (IKK). IKK je komplex složený ze tří podjednotek: dvou katalytických sdílejících značnou sekvenční podobnost IKK $\alpha$  (IKK1) a IKK $\beta$  (IKK2) a třetí nepřibuzné regulační podjednotky známé jako NEMO (NF- $\kappa$ B essential modulator) nebo také IKK $\gamma$  [108].

Mnoho různých podmětů vede k aktivaci NF- $\kappa$ B, včetně exogenních a endogenních ligandů vázajících se na specifické receptory, nebo stresu chemického či fyzického původu. Mezi nejvýznamnější ligandy spouštějící signalizační dráhu patří např. TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ ), IL-1 (Interleukin-1) nebo ligandy vázající se na TLR (Toll-like receptor) jako jsou bakteriální lipopolysacharidy [109]. Doposud ne zcela objasněnou otázkou zůstává, jak může pouhých pět členů NF- $\kappa$ B rodiny (p50/p105, p52/p100, RelA, c-Rel a RelB) zastávat tolik různých rolí, navíc buněčně a tkáňově specifických. Ukazuje se, že jednotlivé NF- $\kappa$ B dimery se spojují s jinými transkripčními faktory (např. s p53), což mění jejich vlastnosti. Regulovány mohou být také fosforylací a interakcí s koaktivátory. Zásadní vlastností NF- $\kappa$ B umožňující větší rozmanitost je tvorba různých homo- a heterodimerů. Ty se váží na  $\kappa$ B motivy DNA, které vykazují vysokou variabilitu, a tudíž s nimi jednotlivé dimery interagují s rozdílnou preferencí. Nejlépe známé jsou heterodimery p50/RelA, které jsou spouštěny tzv. kanonickou cestou, a p52/RelB, pro něž je příznačný nekanonický způsob aktivace [110].

### 2.5.1 Kanonická signalizace

Při kanonické (nebo také klasické) dráze dochází k přenesení signálu z receptoru a aktivaci IKK, která fosforyluje I $\kappa$ B $\alpha$  vázanou na komplex p50/RelA. I $\kappa$ B $\alpha$  je následně ubikvitinována a degradována v proteazomu. Tím je umožněna translokace dimeru do jádra a případné spuštění exprese [111]. Všechny procesy kanonické dráhy nejsou doposud plně objeveny a pochopeny, nicméně je zřejmé, že nepostradatelnou roli zde hraje ubikvitinace. Pro aktivaci IKK je klíčová polyubikvitinace regulační jednotky NEMO pomocí K-63 řetězců, což pravděpodobně umožňuje přístup TAK1 (Transforming growth factor  $\beta$ -activated kinase) kinázy, která následně fosforyluje IKK $\beta$  jednotku, a tím se komplex IKK stává aktivní [112]. Vedle podjednotky NEMO je pro činnost IKK nezbytná také polyubikvitinace K-63 řetězci další signální molekuly RIP1 (Receptor interacting protein). Regulační jednotka NEMO je schopna specificky rozeznávat K-63 řetězce proteinu RIP1 a prostřednictvím ubikvitin-vázající domény s ním interagovat [113]. Tato vazba je rovněž nutná pro aktivaci IKK. Je možné, že polyubi-RIP zprostředkovává kontakt a následnou reakci TAK1 s IKK [114]. IKK $\beta$  následně fosforyluje I $\kappa$ B $\alpha$  vázanou na komplex p50/RelA, což vede k ubikvitinaci I $\kappa$ B $\alpha$

K-48 řetězci a posléze degradaci v 26S proteazomu. Volný komplex NF- $\kappa$ B tak může být transportován do jádra (Obr. 6.) [105].

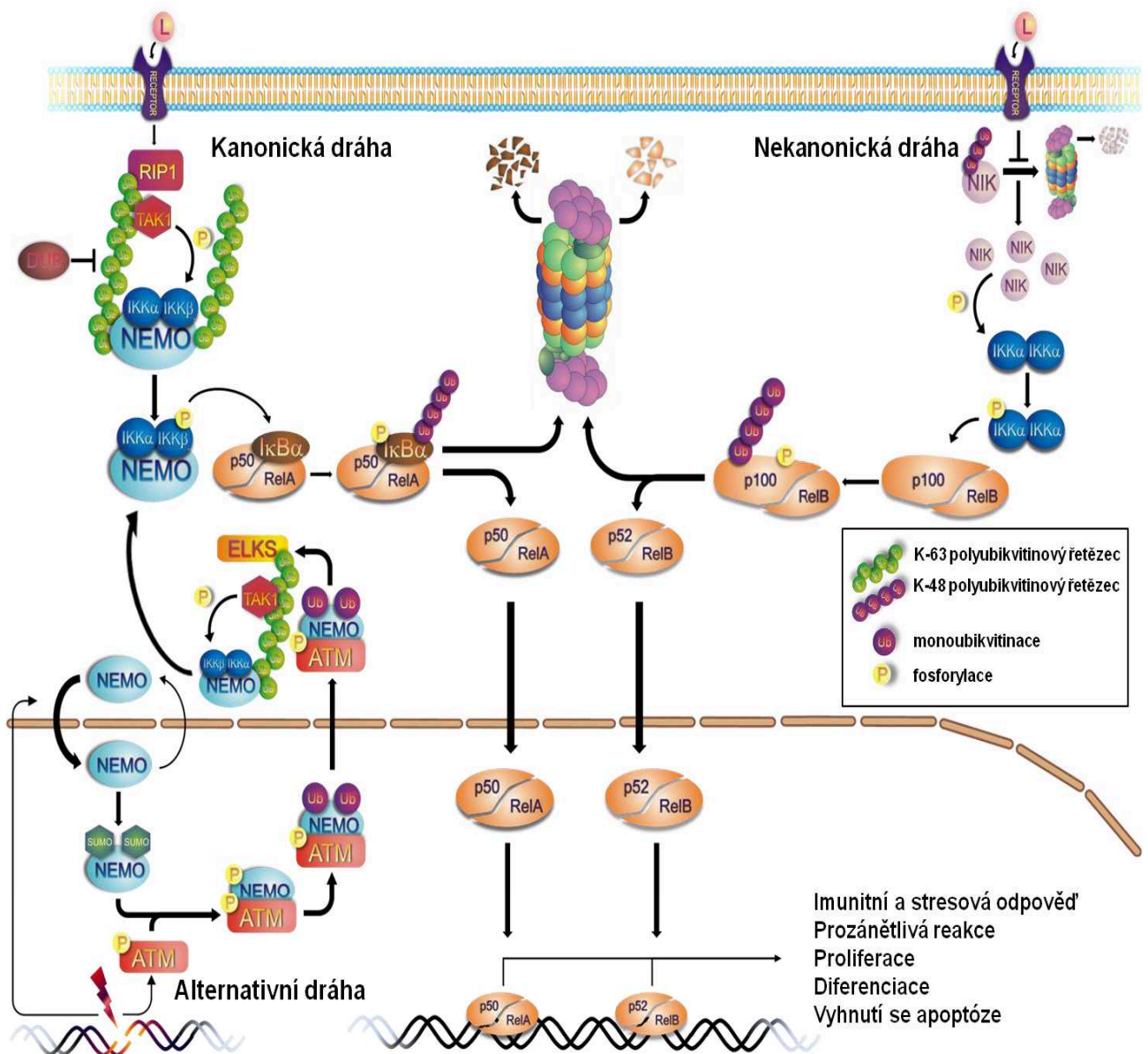
### 2.5.2 Nekanonická signalizace

V případě nekanonického způsobu signalizace dochází nejdříve k aktivaci NIK kinázy (NF- $\kappa$ B inducing kinase), která následně fosforyluje IKK komplex složený pouze ze dvou jednotek IKK $\alpha$ . Alternativní dráha tedy pracuje nezávisle na NEMO a IKK je funkční jako homodimer. Nejběžnějším komplexem NF- $\kappa$ B figurujícím při nekanonické signalizaci je p100/RelB heterodimer. Jak již bylo řečeno, p100 obsahuje dlouhou ankyrinovou terminální doménu, která tento komplex inhibuje. Po aktivaci IKK $\alpha$  dochází k fosforylaci této domény, která umožňuje její ubikvitinaci K-48 řetězci a následnou degradaci v proteazomu. Vzniklý dimer p52/RelB tak může translokovat do jádra (Obr. 6.) [115].

### 2.5.3 Alternativní signalizace

Vedle vnějších faktorů, které zodpovídají zejména za kanonickou a nekanonickou dráhu, může být NF- $\kappa$ B signalizace spuštěna také působením vnitřních stimulů. Mezi nejvýznamnější patří oxidační a exogenní genotoxický stres (který může být způsoben ionizujícím zářením, nebo i některými protirakovinnými léčivými jako je camptothecin nebo etoposid), teplotní šok, či vystavení etanolu. Mechanismus těchto alternativních drah není doposud přesně popsán, přesto se však i tady ukazuje, že nepostradatelnou roli zde zaujímá ubikvitinace [116]. V případě genotoxického podmětu může dojít k dvouřetězcovým zlomům DNA (DSB, Double strand break), což může mimo jiné vyvolat aktivaci NF- $\kappa$ B. Nejdříve dochází k transportu regulační jednotky NEMO do jádra, kde podléhá modifikaci ubikvitinu podobným proteinem SUMO (Small ubiquitin-like modifier). Díky SUMOylaci proteinu NEMO je podporováno jeho setrvání v jádře. DSB rovněž aktivují ATM kinázu (Ataxia telangiectasia mutated), která obvykle reguluje buněčný cyklus a umožňuje opravu DNA prostřednictvím fosforylace check-point kináz CHK1 a CHK2 [117]. V případě aktivace NF- $\kappa$ B dráhy ovšem ATM fosforyluje protein NEMO, což je nezbytné pro jeho následnou mono-ubikvitinaci. Monoubikvitinace slouží jako signál pro export z jádra, tudíž je NEMO spolu s ATM kinázou transportován do cytoplazmy. Zde dochází ke

tvorbě komplexu ATM/NEMO/katalytické jednotky IKK s proteinem ELKS (bohatý na glutamát (E), leucin (L), lyzin (K) a serin (S)), který je nepostradatelný pro aktivaci IKK [118]. Mechanismus aktivace IKK není do detailu poznán, ale nedávné studie [119-120] přinášejí možnou odpověď. ATM stimuluje polyubikvitinaci ELKS proteinu K-63 řetězci, což následně umožňuje kontakt jednotlivých složek celého reakčního komplexu. ATM rovněž aktivuje TAK1 kinázu, která následně fosforyluje IKK vázanou prostřednictvím NEMO na K-63 řetězec ELKS. Poté, co je IKK aktivována, dochází k fosforylaci I $\kappa$ B $\alpha$  a signalizace pokračuje obdobně jako u kanonické dráhy. Zároveň bylo zjištěno, že k podobné kaskádě zahrnující SUMOylaci proteinu NEMO, jeho ubikvitinaci a aktivaci ATM, nedochází pouze při poškození DNA a vzniku DSB, ale i při oxidativním stresu (Obr. 6.) [121]. Z výše uvedeného vyplývá, že modifikace proteinů ubikvitinem nebo ubikvitinu podobnými proteiny je zcela klíčová pro aktivaci NF- $\kappa$ B. Vedle toho ovšem může díky činnosti různých deubikvitináz (DUB) docházet i k inhibici signalizace. Při regulaci důležitých aktivátorů kaskády DUB často spolupracují s E3 ligázami, přičemž dochází nejdříve k odstranění K-63 řetězců pomocí DUB a následně E3 ligázy označí ten samý protein K-48 řetězci, čímž jej odsoudí k degradaci v proteazomu [122]. Je zřejmé, že studium NF- $\kappa$ B signalizace otevřelo „Pandořinu skříňku“, ve které se proplétá dynamická souhra fosforylace s různými formami ubikvitinace, vedoucí k velmi komplexní a účinné regulaci celého systému [116]. Je důležité si také uvědomit, že kaskáda nevede pouze k aktivaci NF- $\kappa$ B, ale také že interaguje s mnoha dalšími signálními drahami, díky čemuž může docházet k rozmanité determinaci osudu celé buňky [112].



**Obr. 6.** Schéma konanické, nekanonické a alternativní dráhy NF- κB signalizace.

Ubikvitin-proteazomový systém zasahuje hned do několika klíčových kroků NF-κB dráhy. Předně umožňuje translokaci dimerů do jádra degradací IκB proteazomem. Zároveň zodpovídá za procesování p105 a p100 prekurzorů (za tvorby aktivních p50 a p52), nebo dokonce za jejich úplnou degradaci. Vedle toho stojí za odbouráváním mnoha signálních molekul celé kaskády včetně samotných NF-κB [123]. Inhibice proteazomu tak může být možným přístupem, jak inaktivovat NF-κB, nicméně není jisté, zdali za účinností bortezomibu stojí právě tento efekt [124].

#### 2.5.4 Úloha NF- $\kappa$ B v rakovině žaludku

Úzký vztah mezi NF- $\kappa$ B a progresí rakoviny je dobře znám. U mnoha hematologických i pevných nádorů [125], včetně rakoviny žaludku [126], dochází ke konstitutivnímu zvýšení aktivity NF- $\kappa$ B. S myšlenkou, že rakovina může být spojena se zánětem, přišel již řecký lékař Galén před téměř dvěma tisíci let. V devatenáctém století na něj navázal Virchow, který předpokládal, že se nádory mohou vytvářet v místech postihnutých chronickým zánětem [127]. Potvrzení přišlo zejména ze strany epidemiologických studií, které uvádějí, že chronická infekce a zánět jsou vůbec nejčastější příčinou vzniku rakoviny. S nejsilnější asociací mezi chronickým zánětem a maligním onemocněním se lze setkat u ulcerózní kolitidy a Crohnovy choroby, které mohou vést k rakovině tlustého střeva, mezi Hepatitidou C a rakovinou jater, nebo gastritidou a nádorem žaludku [128]. Most mezi zánětem a rakovinou by mohl představovat NF- $\kappa$ B, neboť u obou hraje důležitou roli při jejich regulaci a progresi. NF- $\kappa$ B předně řídí expresi celé řady anti-apoptických proteinů, které mají funkci onkogenů. Zároveň stimuluje prozánětlivé cytokininy TNF- $\alpha$  a IL-1, které mohou být spojeny s karcinogenezí. Vedle cytokininů reguluje také růstové faktory, chemokininy, matrixové proteázy nebo faktory podporující angiogenezi [129]. Je velmi dobře známo, že infekce bakterií *Helicobacter pylori* může vést ke gastritidě, žaludečním vředům, ale i k rakovině žaludku nebo MALT (Mucosa-associated lymphoid tissue) lymfomu. Jedním z možných mechanismů vedoucím k těmto onemocněním je schopnost *H. pylori* indukovat aktivaci NF- $\kappa$ B u buněk žaludečního epitelu, s čímž je přímo spojena zvýšená sekrece IL-8, prozánětlivého chemokininu, atraktantu neutrofilů [130]. Při infekci *H. pylori* dochází k postupné degradaci I $\kappa$ B $\alpha$  a aktivaci katalytických IKK a NIK [131]. Bylo zjištěno, že různá virulence odlišných kmenů *H. pylori* reflektuje jejich schopnost indukovat sekreci IL-8, a tedy aktivovat NF- $\kappa$ B. Předpokládalo se, že zvýšenou virulenci podmiňuje přítomnost *cagA* (cytotoxic-associated antigen) proteinu, neboť jeho přítomnost byla dokázána téměř u 100% izolátů získaných od pacientů trpících vředy, zatímco ve vzorcích pacientů s gastritidou jen asi v polovině případů. Nicméně se ukázalo, že *cagA* přímo za patogenitu nezodpovídá, ale může sloužit jako marker. Nachází se totiž v asi 40 kb dlouhém úseku DNA nazvaném PAI (Pathogenicity island), který kóduje několik desítek proteinů mající úlohu v infekci. Šest z těchto proteinů (*cagE*, *cagG*, *cagH*, *cagI*, *cagL*, *cagM*) je nezbytných pro aktivaci NF- $\kappa$ B a značnou

měrou tedy stojí za virulencí [132]. Důležitost PAI, reprezentovaných přítomností *cagE*, se potvrdila i japonskou studií, ve které byly testovány různé izoláty na přítomnost *cagE* a porovnávány se stupněm onemocnění. Byla zjištěna úzká souvislost mezi přítomností *cagE*, aktivací NF- $\kappa$ B a závažností infekce. Zároveň se zdá pravděpodobné, že různé proteiny *cagPAI* mohou pronikat do hostitelských buněk a aktivovat v nich molekuly signalizace NF- $\kappa$ B [133]. Vedle toho byl objeven další faktor, strukturně i lokalizací nepříbuzný k *cagPAI*, protein Tip $\alpha$ , který aktivuje NF- $\kappa$ B a může vést k transformaci buněk [134]. Důležité poznatky přinesl experiment na modelu infekce *H. pylori* Pískomilu mongolském (*Meriones uingulatus*), který vykazuje podobné charakteristiky onemocnění jako u lidí. Byla prokázána zásadní úloha makrofágů při zánětlivé reakci díky vysoké produkci cytokininů i jiných prozánětlivých faktorů, jejichž exprese byla řízena silně aktivním NF- $\kappa$ B. Při depleci makrofágů došlo ke zmírnění zánětlivé reakce. Zároveň byla dokázána nezbytná role NF- $\kappa$ B aktivace pro vývoj chronické gastritidy, neboť při inhibici IKK $\beta$  došlo k výrazné regresi prozánětlivé odpovědi [135]. Pro rakovinu žaludku je příznačná dysregulace a zvýšená hladina mnoha cytokininů a chemokininů, z nichž u mnoha je exprese aktivována NF- $\kappa$ B, včetně TNF- $\alpha$ , IL-1 nebo IL-8. Tyto pak mohou přispívat růstu nádoru, tvorbě metastáz a angiogenezi [136].

### 2.5.5 Vliv inhibice proteazomu na NF- $\kappa$ B

Přestože je bortezomib schopen u několika rakovin inhibovat NF- $\kappa$ B [137-138], potenciálně i u rakoviny žaludku v kombinaci s jinými léčivy [45], nespočívá mechanismus jeho účinku pravděpodobně v tomto efektu, navzdory původním předpokladům [43]. K velmi překvapivým závěrům dospěla studie z roku 2004 [139]. Na intestinální epiteliální buněčné linii bylo prokázáno, že inhibitory proteazomu (PI), MG-115, MG-132 a lactacystin, nejenže neinhibují NF- $\kappa$ B, ale dokonce aktivují IKK, indukují I $\kappa$ B degradaci a podporují transkripci genů regulovaných NF- $\kappa$ B skrze jeho aktivaci. Efekt PI je tedy úplně opačný, než se předpokládalo. K degradaci I $\kappa$ B pravděpodobně došlo alternativní, na proteazomu nezávislou cestou pomocí kaspázového nebo kalpainového systému. O pět let později dosáhla obdobných výsledků i skupina prof. Andersona z Dana-Farber Cancer institute, jedni z tvůrců úspěchu bortezomibu, kteří prokázali, že bortezomib, stejně jako jiné PI, významně inhibuje expresi I $\kappa$ B, spouští fosforylaci IKK $\beta$  a aktivuje kanonickou NF- $\kappa$ B signalizaci v nádorových buňkách odebraným pacientům s mnohočetným myelomem, tedy



rakovinou, proti které je bortezomib nejúčinnější. Navíc po přidání specifických inhibitorů IKK $\beta$  došlo ke zvýšení cytotoxického účinku bortezomibu. Tím byla prokazatelně vyvrácena představa, že za aktivitou bortezomibu proti mnohočetnému myelomu stojí inhibice NF- $\kappa$ B [140].

Navzdory dobře známé skutečnosti, že NF- $\kappa$ B podporuje kancerogenezi, se stále více objevují důkazy, že za určitých okolností může mít i funkci zcela opačnou. Zejména v počátcích vývoje onemocnění může působit jako tumorový supresor. Tato překvapivá úloha NF- $\kappa$ B byla podpořena pozorováním, že RelA jbyl za určitých okolností nutný pro apoptózu indukovanou proteinem p53, a také, že další člen rodiny NF- $\kappa$ B, protein p52, je schopen ve spojení histonovou deacylázou inhibovat cyklin D1, což vede k útlumu proliferace [141]. Vedle toho může NF- $\kappa$ B interagovat s jinými onkogeny, kdy dochází k inhibici transkripce jím řízených genů, nebo může stimulovat expresi několika pro-apoptotických genů [115]. Velmi překvapivé poznatky přinesla studie zabývající se vztahem signalizace NF- $\kappa$ B a vývojem hepatocelulární rakoviny (HCC), která je podobně jako rakovina žaludku velmi úzce spojena s chronickým zánětem. U myši, u kterých byl v jaterních parenchymatických buňkách odstraněn gen pro NEMO, jednotku IKK komplexu, která je klíčová pro aktivaci NF- $\kappa$ B, došlo ve všech případech ke spontánnímu vývoji agresivní HCC. Minimálně v játrech tedy NEMO působí jako tumorový supresor. Za progresí HCC stála zvýšená citlivost NEMO-deficientních buněk k oxidativnímu stresu, který vyvolával apoptózu, což následně vedlo ke zvýšené proliferaci buněk, umocnění zánětu a aktivaci jaterních progenitorových buněk [142]. Také bylo zjištěno, že IKK $\alpha$  spolu s IKK $\beta$  chrání jaterní buňky před toxicitou lipopolysacharidů a apoptózou indukovanou TNF- $\alpha$  [143]. Nicméně je jisté, že úloha NF- $\kappa$ B signalizace při udržování homeostáze jater je komplexnější. V kontrastu k tumor supresorové aktivitě NF- $\kappa$ B jsou výsledky jiných experimentů, které prokázaly, že NF- $\kappa$ B hraje důležitou roli při podpoře vývoje HCC a že jeho inhibicí lze dosáhnout redukce onemocnění [144].

Přestože za účinkem bortezomibu stojí jistě mnohem složitější a spletitější mechanismus, než je prostá inhibice NF- $\kappa$ B, a navzdory tomu, že není doposud přesně popsán, nabízí UPS nepřeborné množství příležitostí pro objev nových léčiv. Bolestnou pravdou ovšem zůstává, že VELCADE<sup>TM</sup> je doposud jediným lékem zasahujícím tento systém, který je užíván v klinické praxi. Zároveň jeho nápadná neúčinnost vůči pevným nádorům vybízí k dalšímu intenzivnímu výzkumu na tomto poli [42]. Cílení UPS

disulfiramem sebou přináší nový a velmi slibný přístup, který se může ukázat jako vysoce účinný i při léčbě pevných nádorů [145].

## 2.6 Disulfiram

Antabus známý také jako disulfiram je lék hojně používaný při odvykací léčbě alkoholismu. Pro tyto účely byl FDA schválen již před více než půlstoletím. V disulfiramu je obsažen derivát thiuramdisulfidu, tetraethylthiuramdisulfid, který se v 19. století používal v gumárenském průmyslu, odkud také pochází první zmínka o jeho možném léčebném účinku [146]. Podnikový lékař E. E. Williams pozoroval, že dělníci pracující s touto látkou jsou donuceni k úplné abstinenci. Při požití alkoholu u nich totiž docházelo k prudkému zrychlení pulzu a zvýšení krevního tlaku následované zarudnutím rukou, tváře a bolestí hlavy. Doktor Williams rovněž navrhnul, že by tato látka mohla sloužit jako lék proti alkoholismu. Jeho pozorování bylo publikováno roku 1937 v časopise JAMA (Journal of the American Medical Association) [147]. Za mechanismem účinku disulfiramu stojí jeho schopnost inhibovat acetaldehyd dehydrogenázu, nepostradatelný enzym metabolické dráhy etanolu, což vede ke zvýšení koncentrace acetaldehydu, který je pro tělo toxický [148]. Dalšího velmi pozoruhodného účinku disulfiramu si povšimnul doktor Lewison, který ve své práci z roku 1977 [149] popisuje případ ženy trpící rakovinou prsu. Několik let po operaci se u ní objevily četné metastázy v páteři, žebrech, lebce a pánevních kostech. Navíc se stala závislou na alkoholu, a proto jí musela být vysazena veškerá chemoterapie a byl jí podáván pouze Antabus. Překvapivě nedošlo k postupu rakoviny, ale naopak se její zdravotní stav výrazně zlepšil. Došlo k úplnému vymizení metastáz a následujících 10 let až do své smrti nešťastnou náhodou žila zcela bez klinických příznaků rakoviny.

Vedle toho se disulfiram stal na sklonku 80. let velmi zajímavým přípravkem pro možnou terapii infekce HIV. Po jeho požití dochází v těle ke tvorbě látky zvané ditiocarb (diethyldithiokarbamát, DDTC), která byla díky své údajné schopnosti podporování imunitního systému nazývána také immuthiol. Jeho účinnost byla potvrzena i v klinických studiích, ve kterých se jeho sodná sůl ukázala jako velmi efektivní při zamezování vzniku a progresi oportunních infekcí u HIV pacientů [150].

Nicméně v následném rozsáhlém klinickém testu ditiocarb úplně propadl a zároveň s poznáním, že se jeho příznivý účinek na imunitní systém neukázal být pravdivým, bylo o tohoto přístupu léčby infekce HIV upuštěno. Je možné, že za jeho neúspěchem stálo nevhodné stravování pacientů. Jak se později prokázalo, ditiocarb je nejúčinnější v komplexech s mědí nebo zinkem, a při nízké koncentraci těchto kovů v krvi pacientů nemohl být dostatečně účinný [151].

V té době se také rozšiřovaly znalosti o protinádorovém účinku dithicarb. Bylo prokázáno, že v kombinaci s cisplatinou umocňuje její účinek na rakovinné buňky [152] a že může inhibovat progresi nádoru mimo jiné díky antioxidačním účinkům nebo interakcí s glutathionperoxidázovým systémem [153]. Na základě těchto poznatků a mylného předpokladu, že ditiocarb stimuluje imunitu, proběhl klinický test druhé fáze, ve kterém se na 64 pacientkách trpících pokročilým stádiem rakoviny prsu zkoušel efekt adjuvantní imunoterapie reprezentované sodnou solí ditiocarbu (DDTC). V kontrolní skupině došlo k více než dvojnásobnému počtu úmrtí a relapsů než ve skupině užívající DDTC. Ditiocarb měl také příznivý efekt na OS (Overall survival) a DFS (Disease free survival). Autoři tyto velmi slibné výsledky ditiocarbu připisovali jeho schopnosti pozitivně modulovat imunitní systém, a spekulovali také o přímém protinádorovém účinku [154]. Dnes již víme, že disulfiram zasahuje do nespočtu buněčných dějů, z nichž mnohé by mohly vysvětlovat jeho terapeutický efekt. Disulfiram je silný inhibitor NF- $\kappa$ B, tlumí angiogenezi a tvorbu metastáz, umožňuje překonání rezistence na léčiva a v komplexu s mědí inhibuje proteazom a zasahuje do UPS [145].

### **2.6.1 Inhibice NF- $\kappa$ B**

Disulfiram i jeho redukováný metabolit diethyldithiokarbamát (DDTC) jsou známými inhibitory aktivace NF- $\kappa$ B. Často používanou a vysoce účinnou látkou pro tento účel je také příbuzný pyrrolidindithiokarbamát (PDTC). K zamezení aktivace NF- $\kappa$ B dochází pravděpodobně prostřednictvím inhibice degradace I- $\kappa$ B nebo díky antioxidačním vlastnostem dithiokarbamátů [155]. Nicméně inhibice NF- $\kappa$ B pomocí DDTC a PDTC je dvoufázová a závislá na koncentraci. Při překročení určité koncentrace přestávají být dithiokarbamáty účinné, přestože při nižší jsou aktivní. Za tímto neobvyklým mechanismem zřejmě stojí jejich schopnost vázat  $Zn^{2+}$  a zvyšovat množství těchto kationtů v buňce, kterou ovšem při vyšších koncentracích ztrácejí

[156]. Nemalé množství chemo- i radioterapeutik aktivuje NF- $\kappa$ B signalizaci, což vede ke snížení jejich léčebného účinku, nebo dokonce až k vytvoření rezistence. Současné podávání inhibitorů NF- $\kappa$ B spolu s klasickými chemoterapeutiky tak může být velmi efektivní při překonávání rezistence a zvýšení citlivosti rakovinných buněk [157-158]. Tento předpoklad byl potvrzen studií, ve které se *in vitro* prokázalo, že disulfiramem zprostředkovaná inhibice NF- $\kappa$ B vedla ke zvýšení cytotoxicity 5-fluoruracilu proti rakovinným buňkám tlustého střeva [159]. Podobně slibných výsledků se dosáhlo při experimentu na rezistentních buněčných liniích rakoviny prsu a tlustého střeva. Za současně aplikace komplexu disulfiramu s mědí a gemcitabimu (dFdC) došlo k překonání rezistence na dFdC a zvýšení cytotoxicity až 1000x [160]. Že se může jednat o velmi nadějný přístup překonávání rezistence u různých pevných nádorů, potvrdila i práce, ve které byl zaznamenán synergistický cytotoxický účinek cysplatiny a PDTC, inaktivace NF- $\kappa$ B signalizace a snížení exprese proti-apoptotických proteinů Bcl-2 a Bcl-X<sub>L</sub> u buněk rakoviny ledvin [161]. Jako úspěšná se ukázala také inhibice NF- $\kappa$ B dráhy pro navýšení citlivosti buněk vůči klasickým chemoterapeutikům u rakoviny slinivky [162] a vaječníků [163].

### 2.6.2 Inhibice mnohočetné lékové rezistence

Velmi významnou překážkou stojící v cestě úspěšné chemoterapie je mnohočetná léková rezistence (MDR, multidrug resistance). Vedle genetických a epigenetických změn nastávajících v rakovinných buňkách, které ovlivňují citlivost buněk vůči léku díky jeho pozměněnému metabolismu, např. aktivací detoxikačního systému cytochromu P450, nebo vyhnutí se apoptóze, zodpovídá za MDR zejména příjem daného léčiva respektive jeho vylučování z buňky [164]. Mezi dobře známé proteiny, které zprostředkovávají transport léku do extracelulárního prostoru, patří ABC transportéry (ATP-binding cassette), s jejichž zvýšenou expresí se lze setkat u mnoha rakovin. Nejvýznamnějšími členy této rodiny transportérů jsou P-glykoprotein (PGP) známý také jako MDR1 (multidrug resistance protein1), dále MRP1 (Multidrug resistance - associated protein1) a MXR (Mitoxantrone - resistance protein) [165]. Prvním a nejlépe poznaným je PGP. Obsahuje dvě intracelulární domény vázající ATP a dvě transmembránové domény skládající se z několika (nejčastěji šesti)  $\alpha$ -helixů. Na rozdíl od mnoha bakteriálních transportérů (majících na svědomí rezistenci vůči některým antibiotikům), které nejčastěji tvoří homodimery, jsou u PGP všechny čtyři

domény součástí jediného polypeptidu a PGP je funkční jako monomer [166]. Není překvapivé, že inhibice těchto transportérů je velmi lákavým přístupem k překonání MDR a zefektivnění chemoterapie. Nicméně mnoho inhibitorů vykazuje silné vedlejší účinky a toxicitu. Ukazuje se, že vhodným inhibitorem by mohl být disulfiram, který je zároveň velmi dobře tolerován i při vysokých koncentracích a dlouhodobém užívání [167]. Bylo prokázáno, že disulfiram inhibuje PGP jiným mechanismem než k tomu vytvořená léčiva (jako např. cyklosporin A, nebo valsopodar). Disulfiram brání maturaci PGP a posttranslačním úpravám, což snižuje jeho zakomponování do plazmatické membrány [168]. Navíc disulfiram interaguje i se substrátovým místem vázajícím léčivo a s ATP-vázajícím místem, které inhibuje pomocí tvorby disulfidické vazby mezi cysteinovými reziduy. Tyto účinky vykazuje u PGP a MRP1, navíc v koncentracích, které jsou daleko pod limitem toxicity [169].

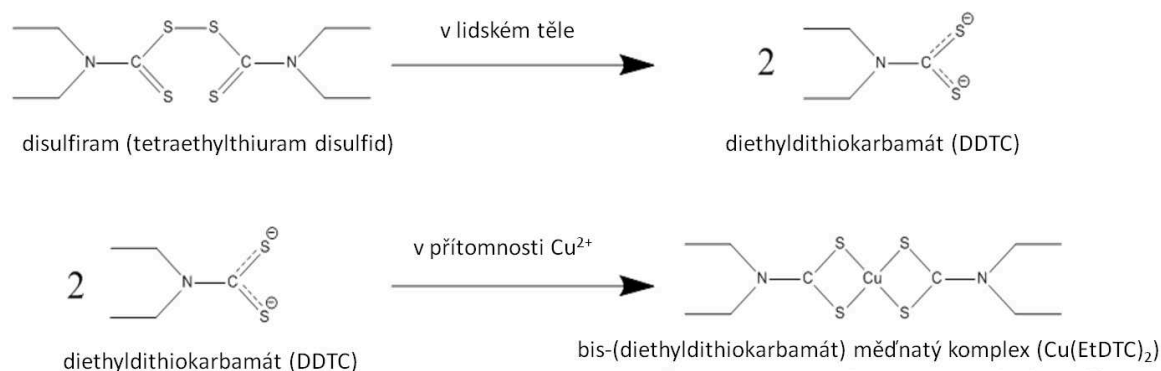
### **2.6.3 Inhibice tvorby metastází a angiogeneze**

Disulfiram zároveň vykazuje aktivitu i proti dalším zásadním fenoménům spojených s pevnými nádory: tvorbě metastází a angiogenezi. Schopnost nádoru invadovat do okolních tkání je závislá na extracelulární matrix a enzymech, které jsou schopny ji rozkládat - matrixových metaloproteinázách (MM). Disulfiram inhibuje jak aktivitu, tak expresi MM-2 a MM-9, což bylo prokázáno na buňkách osteosarkomu [170], rakoviny plic a močového měchýře, kde se zároveň prokázalo, že disulfiram inhibuje i angiogenezi [171]. Příčinou účinku disulfiramu může být jeho inhibice superoxid dismutázy, která hraje důležitou roli při formaci nových cév [172]. Další možné vysvětlení přináší studie [173], kde byl pozorován efekt PDTC na progresi rakoviny prsu. Jak již bylo řečeno, disulfiram i dithiokarbamáty dokážou inhibovat signalizaci NF- $\kappa$ B, který mimo jiné zodpovídá za expresi důležitého růstového faktoru angiogeneze VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Při aplikaci PDTC tedy došlo ke snížení exprese VEGF, a tak k výraznému utlumení tvorby cév a růstu nádoru.

### **2.6.4 Inhibice proteazomu**

Nové světlo do pátrání po mechanismu protirakovinného účinku disulfiramu přinesla skupina prof. Q. P. Doua z Detroitu, která prokázala, že v komplexu s mědí je disulfiram účinným inhibitorem proteazomu [174]. Po požití Antabusu v těle vzniká

diethyldithiokarbamat, který reaguje s mědí v krevní plazmě za tvorby komplexu  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  (Obr. 7.). Právě tento komplex se ukázal jako silný inhibitor 26S proteazomu na rozdíl od samotného disulfiramu, který ani při relativně vysokých koncentracích nebyl inhibice schopen. Protirůstové a apoptotické účinky komplexu  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  jsou spojeny s jeho schopností buněčný 26S proteazom. Tyto účinky byly prokázány na buněčných liniích a xenograftu odvozeného od rakoviny prsu [174]. V té době už bylo známo, že PDTC, je schopen s mědí tvořit komplex  $\text{Cu}(\text{PDTC})_2$ , který vykazuje stejné schopnosti, jaké byly později zjištěny u  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ , tedy inhibovat proteazom, buněčnou proliferaci a indukovat apoptózu u linií rakoviny prsu [175] a rakoviny prostaty [176]. Inhibiční účinek na proteazom byl zjištěn i u komplexu  $\text{Zn}(\text{PDTC})_2$ , po jehož aplikaci došlo k akumulaci proteinů s krátkou životností, p21, p53, tedy substrátů proteazomu [177]. Komplexy s mědí se ukázaly jako aktivnější než se zinkem vůči purifikovanému 20S i proti 26S proteazomu *in vivo* [178]. V mnoha studiích zabývajících se aktivitou komplexů ovšem nebyly používány syntetické a chemicky čisté látky, ale naopak směsi dithiokarbamatů a kationtů kovů, což znesnadňuje interpretaci výsledků. Nejen měďnaté nebo zinečnaté, ale i komplexy dithiokarbamatů se zlatem se ukázaly jako velmi účinné. Na několika buněčných liniích karcinomu prsu vykazovaly protirůstovou aktivitu, stimulaci apoptózy a inhibici 26S proteazomu *in vivo* a také purifikovaného 20S [179].



**Obr. 7.** Schéma vzniku komplexu disulfiramu s mědí v lidském těle.

Již od samého počátku výzkumu dithiokarbamátů jako inhibitorů proteazomu se zdálo, že mechanismus jejich interakce s proteazomem je jiný než u doposud jediného klinicky užívaného inhibitoru bortezomibu, který inhibuje katalytickou jednotku  $\beta 5$ . Lövborg *et al.* [180] prokázali, že disulfiram ani PDTC nedokážou inhibovat 20S proteazom, dokonce ani po přidání  $\text{Cu}^{2+}$  nebo  $\text{Zn}^{2+}$  kationtů. Autoři zde spekulovali o možnosti, že disulfiram reaguje s regulační podjednotkou 26S proteazomu. Je možné, že za aktivitou komplexu dithiokarbamátů s kovy stojí jejich schopnost inhibovat 19S regulační část, konkrétně podjednotku víka Poh1 (Rpn11), deubikvitinázu s JAMM doménou. Tato hypotéza je založena na pozorování vlastností komplexů s kovy, UPS a JAMM doménových proteinů [155]. Navíc byla výrazně podpořena následnou studií [181], ve které byla prokázána různá schopnost  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  a  $\text{Zn}(\text{EtDTC})_2$  komplexů inhibovat chymotrypsinu podobnou aktivitu u purifikovaného 20S oproti 26S proteazomu nacházejícího se v buňkách. U obou komplexů byla tato aktivita vůči 20S i při více než dvojnásobné koncentraci takřka třetinová v porovnání s efektem na 26S, jehož součástí je i JAMM doménová Poh1. Přesný mechanismus interakce komplexů dithiokarbamátů a kovů s JAMM doménou by mohl být podobný tomu, jaký byl pozorován u karboxypeptidázy A obsahující doménu velmi podobnou JAMM, jež byla inhibována  $\text{Zn}(\text{OH})\text{Cl}$  [181].

### 2.6.5 JAMM doména

Vedle toho, že je Poh1 nezbytná pro správné složení 19S proteazomu, pro stabilizaci víka a jeho asociaci s bází 19S, je Poh1 nepostradatelná také pro katalytický účinek proteazomu. Metaloizopeptidázová aktivita Poh1 zprostředkovává deubikvitinaci substrátu před jeho vlastním vstupem do 20S a následnou degradací [182]. Funkční JAMM motiv Poh1 podjednotky je nezbytný pro správnou funkci 26S proteazomu a viabilitu buněk. Při jeho mutaci, nebo inhibici Poh1 pomocí RNA interference (RNAi), došlo k výrazné redukci životaschopnosti buněk. JAMM doména se tak jeví jako velmi slibný cíl v protinádorové terapii [183]. Navíc inhibice Poh1 díky RNAi vedla ke drastickému snížení proliferace buněk a aktivity proteazomu, což ovšem nebylo pozorováno při inhibici zbylých dvou DUB (Uch37 a Usp14), které jsou součástí 26S proteazomu [184]. Roli Poh1 jakožto nadějného cíle protirakovinné léčby podporují i výsledky studie [185], při níž RNAi Poh1 vedla k výraznému utlumení proliferace, zastavení buněčného cyklu a navození senescence u širokého spektra buněčných kultur

různých rakovin. Inhibice Poh1 způsobila snížení hladiny cyklinů D1, B1 a CDK1 a naopak zvýšila množství p21, p27 a aktivitu pRb (Retinoblastoma protein), což vedlo k zastavení buněčného cyklu v G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> bodě. Toto pozorování také podporuje hypotézu, že inhibice 19S regulační části může mít rozdílný účinek než inhibice 20S katalytické partikule, při které totiž dochází (ať už působením bortezomibu, nebo RNAi proti β5 podjednotce) k zastavení buněčného cyklu v G<sub>2</sub>-M bodě. I díky mnoha různým neproteolytickým funkcím 19S nebo 20S proteazomu [186] může jejich inhibice ovlivňovat rozdílné proteiny, což může mít zásadní význam na jejich terapeutickou aktivitu [185]. Toto může být jednou z příčin zřejmého rozdílu v účinnosti bortezomibu a předpokládané účinnosti disulfiramu vůči pevným nádorům.

JAMM doména jakožto možný cíl komplexů dithiokarbamátů s kovy se ovšem nenachází pouze u Poh1 ve víku proteazomu, ale je obsažena i v CSN5 (Jab1), podjednotce komplexu zvaného COP-9 signalozom (CSN), jehož struktura velmi připomíná víko proteazomu. CSN5 a Poh1 si jsou velice podobné strukturou i izopeptidázovou aktivitou, za kterou zodpovídá právě JAMM doména [187]. CSN je u savců spojena s mnoha zásadními procesy, jako je kontrola checkpointů a buněčného cyklu, regulace signalizace a transkripce, nebo vývoje. Nejvýznamnějším mechanismem účinku CSN je jeho interakce s UPS, předně regulací rozsáhlé rodiny cullin-RING-E3 ubikvitin ligáz (CRL) [188]. CRL jsou z několika jednotek složené E3 ligázy podílející se na regulaci významné části celého buněčného proteomu včetně mnoha tumorových supresorů nebo protoonkogenů. Jsou regulovány zejména kovalentní modifikací ubikvitinu podobným proteinem NEDD8, který zvyšuje ubikvitinační schopnost CRL. Naopak inhibice těchto E3 ligáz je umožněna odštěpením NEDD8, tzv. denedylací, kterou zprostředkovává JAMM doména CSN5 jednotky COP-9 signalozomu [189]. Logicky se tedy předpokládalo, že CSN je negativním regulátorem CRL a že jeho inhibice povede ke zvýšení aktivity E3 ligáz. Nicméně experimentální výsledky potvrdily pravý opak, tedy, že CSN je nutný pro aktivaci CRL [190]. Možným vysvětlením tohoto paradoxu, by mohlo být, že CSN hraje roli ve skládání komplexu CRL [191]. CSN zasahuje do UPS také díky regulaci jiné ubikvitin E3 ligázy, COP1 [188], která je důležitým negativním regulátorem p53 díky jeho přímé ubikvitinaci [192]. Tumorový supresor p53 se vedle toho může vázat s CSN5 jednotkou COP-9 signalozomu, což vede k jeho fosforylaci, která umožní následnou ubikvitinaci a degradaci v proteazomu [193]. Dalším důležitým proteinem kontrolujícím buněčný



cyklus, který je rovněž negativně regulován CSN5, je p27 [194]. CSN5 (ale i jiné jednotky COP-9 signalozomu) indukuje jaderný export p27 do cytoplazmy, čímž zamezuje jeho akumulaci v jádře a zastavení buněčného cyklu, popřípadě umožňuje jeho degradaci [195]. I díky výše zmíněným funkcím je CSN důležitý pro mnoho pochodů úzce spojených se vznikem a progresí rakoviny. Zejména CSN5 může sloužit jako prognostický faktor u mnoha maligních onemocnění a jeho výrazná amplifikace je příznačná pro hepatocelulární karcinom [196]. Jako účinná se ukázala inhibice CSN5 pomocí RNAi, která vedla k zamezení proliferace a indukce apoptózy u buněčných linií nádoru pankreatu [197]. Zároveň bylo prokázáno, že amplifikace a izopeptidázová aktivita CSN5 jsou nutné pro transformaci a progresi u rakoviny prsu [198]. Tyto poznatky svědčí o tom, že COP-9 signalozom, ale zejména JAMM doména CSN5 jednotky, by mohly být velmi nadějnými a efektivními terapeutickými cíly.

#### **2.6.6 Aktivita disulfiramu *in vivo***

Protinádorová aktivita Antabusu, nebo jeho komplexů s kovy, již byla prokázána u několika onkologických onemocnění. Účinek proti rakovině prsu potvrzuje již dříve zmíněné [149] pozorování doktora Lewisona, úspěšná druhá fáze klinických testů [154] a experimenty, které provedl prof. Dou se svou skupinou [174-175, 181]. Disulfiram aplikovaný s kovy ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) také inhibuje proliferaci buněk melanomu, tlumí angiogenezi u modelů myších xenograftů a zejména se ukázal být výjimečně aktivním proti metastázám u jedné pacientky s velmi pokročilým stádiem onemocnění. V téměř beznadějném stavu ji začal být podáván Antabus a glukonát zinečnatý, což vedlo k takřka zázračné stabilizaci onemocnění a vymizení metastáz v následujících třech měsících [199]. Disulfiram by také mohl být efektivním lékem proti rakovině prostaty [200]. Přestože v databázi MEDLINE není pravděpodobně záznam o přímém efektu Antabusu na rakovinu žaludku, práce [201] dokazující, že PDTC inhibuje NF- $\kappa$ B a proliferaci u buněčných linií rakoviny žaludku, naznačuje, že by mohl být účinný. Na základě těchto velmi nadějných výsledků byly zahájeny tři klinické testy Antabusu vůči rakovinám, které lze nalézt na stránkách amerického NCI (National Cancer Institute) [202]. Testuje se účinek samotného disulfiramu na rakovinu prostaty, kombinace disulfiramu s oxidem arzenitým proti melanomu a podávání disulfiramu a glukonátu měďnatého u pacientů s primárními i sekundárními nádory jater. Zavádění Antabusu do lékařské praxe jakožto perspektivního léku proti pevným nádorovým onemocněním s

sebou přináší nové výhody, ale zároveň také možné překážky. Nicméně Antabus by se mohl stát prvním neziskovým lékem používaným k léčbě rakoviny [203-204].

## 2.7 Antabus jako neziskový lék

Významné pokroky v chápání molekulární podstaty onemocnění s sebou přinesly také nové nadějně léčebné přístupy a terapeutické cíle. Nicméně i přes neustále rostoucí snahu a finanční podporu výzkumu a vývoje (R&D, research and development) nových léků, nedochází ke zrychlení bolestně pomalého a neefektivního zavádění léků do praxe. Jednou z příčin tohoto neuspokojivého stavu může být vedle rostoucích požadavků a konkurence i přeorientování výzkumu na obtížnější cíle a oblasti vyznačující se sníženou pravděpodobností na úspěch [205]. Přestože roční investice do R&D nepřetržitě stoupají a v roce 2008 dosáhly závratných 50 mld. USD, nepromítla se tato finanční ani technologická podpora do zvýšené produktivity, a množství ročně schválených léků je stejné jako před půl stoletím. Navíc náklady na zavedení jednoho léku na trh stoupají logaritmickou řadou s ročním přírůstkem asi 13,4% a dnes se odhadují na více než 1 mld. USD [206]. V roce 2010 bylo FDA schváleno 21 nových léků, což je mírný podprůměr. Pouze dva z těchto nově zavedených léků jsou určeny proti rakovinným onemocněním [207]. Šance protinádorových léků na úspěšné schválení se odhaduje pouze na 10% a vysoké množství nezdařených klinických testů zejména druhé a třetí fáze stojí za enormními náklady, které vyústí ve velmi vysokou cenu na trh uvedených léčiv [208]. Nejvyšší pravděpodobnost nezdaru je příznačná pro druhou fázi, kde byla mezi lety 2008-2010 až 82%, přičemž hlavním důvodem byla nízká efektivita léku [209]. U třetí fáze jsou pravděpodobnosti neúspěchu mnohem optimističtější, nicméně stále velmi nepříznivé, neboť se pohybují kolem 50%, za kterými stojí vedle slabé účinnosti také nežádoucí vedlejší účinky [210]. Nezdary klinických testů a zejména jejich časová a finanční náročnost jsou jedněmi z hlavních příčin bolestně nízké produktivity R&D, a proto by možným řešením tohoto problému mohlo být zavedení nového konceptu klinických testů, jenž by byl více přizpůsobivý, flexibilní, založený na modelech a simulacích, umožňující vhodnější skladbu pacientů díky biomarkerům a myšlenke personalizované medicíny a maximální využití nabytých informací [211].

Dalším velmi nadějným přístupem k překonání enormní finanční a časové náročnosti nutné k zavedení léčiva na trh, která mnohdy šplhá až k 15 letům, je hledání nového využití pro již používané, nebo naopak opuštěné léky. Díky známé farmakokinetice léčiva, vhodnému dávkování a ověřeným vedlejším účinkům může nasazení starého léku proti jiné nemoci ušetřit významnou část finančních a časových nákladů, které by byly nutné pro vývoj zcela nového léčiva [212]. Neočekávané pozitivní vedlejší účinky mohou být objeveny už ve fázi klinických testů, nebo až po několika desítkách let jeho užívání. Známým příkladem je thalidomid, který byl původně určen k léčbě ranní nevolnosti těhotných žen, ale díky závažným vedlejším účinkům na plod byl stáhnut z prodeje. Téměř po čtyřiceti letech byla náhodou objevena jeho aktivita proti některým komplikacím spojených s malomocenstvím, a pro tyto účely byl také schválen FDA. Nyní se zase ukazuje, že by mohl být velmi účinným při léčbě některých onkologických onemocnění, zvláště mnohočetného myelomu [212]. K přínosnému využití potenciálu, jenž se ukrývá ve starších lécích, bude nutné zavedení systematického přístupu, který by mohl být založen na dostupné databázi všech léků a známých informacích o nich [213]. Zatímco účelem klasické farmakovigilance je sledování nežádoucích vedlejších účinků, nový model navrhuje, aby se zaměřila také na případné pozitivní aktivity léků, informace o nichž by mohly být efektivně rozšiřovány díky rozvíjejícím se informačním technologiím. Prospěšné vedlejší účinky by měly být objasněny nalezením konkrétního cíle a dráhy, která je lékem ovlivněna [212]. Jak se ukazuje, navzdory tomu, že jsou léky vyvíjeny jako selektivní, mohou mít v buňce více různých cílů (jak to bylo mimo jiné nedávno prokázáno u bortezomibu [214]). Mohou tedy mít mimo „on-label“ účinku (tedy účinku, kvůli kterému byl lék schválen) i tzv. „off-label“ účinek, který stojí za vedlejším pozitivním účinkem. Tato vlastnost může vysvětlovat negativní i pozitivní vedlejší efekty léčiva, nebo dokonce může stát za jeho on-label účinkem [215]. Koncept nového využití zaběhlých léků získává stále širší podporu i u NIH (National Institutes of Health) a FDA [216], což potvrzují i ředitel NIH Francis S. Collins, který hodlá založit v rámci NIH ústav pro translační medicínu, jehož náplní by mělo být objevování off-label účinků starých léků [217].

Hledání dalšího využití pro již známé léky může být velmi důležité a plodné zvláště pro opomíjená a méně častá onemocnění, nebo nemoci typické pro třetí svět [213]. Přestože je infekce *H. pylori* klasifikována jako karcinogen první třídy a je velmi úzce spojena s několika závažnými onemocněními včetně rakoviny žaludku, je mnoha

vládními i soukromými společnostmi poměrně zanedbávána a opomíjena. Obdobná je situace u rakoviny žaludku, která jakožto druhá nejzávažnější rakovina stojí celosvětově za 800 tisíci úmrtími ročně [1]. Navzdory tomu, že má na svědomí mnohem více životů než např. rakovina prsu nebo prostaty, jsou investice na výzkum této rakoviny z rozpočtu NCI (National Cancer Institute) šedesátkrát respektive třicetkrát menší než investice do rakoviny prsu nebo prostaty [218]. Není překvapivé, že velké farmaceutické firmy nemají příliš velký zájem investovat nemalé částky do vývoje léčiv proti těm nemocím, které nejsou finančně lukrativní, a neboť jsou příznačně zejména pro třetí svět, neskýtají potenciální naději na vrácení nákladů a zisk. Při řešení tohoto významného problému by mohly hrát důležitou roli neziskové soukromé nebo vládní organizace [219]. Jako významná se také ukazuje rostoucí spolupráce mezi soukromými a veřejnými společnostmi [220]. Zásadní úloha neziskových a charitativních nebo vládních organizací při R&D by mohla být ve financování nákladných druhých a třetích fází klinických testů nezbytných pro zavedení již užívaného léčiva proti jinému onemocnění. Cena takto vyvinutého léku by mohla být velmi nízká a všem dostupná. Prvním příkladem takového neziskového léku proti rakovině by mohl být Antabus, původně protialkoholický lék, který vykazuje pozoruhodnou aktivitu vůči pevným nádorům [203-204] (ostatně všechny tři doposud probíhající klinické testy Antabusu proti rakovinám sponzorují univerzity: University of California, Johns Hopkins University a University of Utah [221]). Názorným příkladem takovéto iniciativy může být společnost GlobalCures, kterou založil profesor z Harvard School of Medicine Vikas P. Sukhatme a jeho žena Vidula V. Sukhatme. Tato nezisková organizace si klade za cíl nalézt nejvhodnější terapii proti onkologickým onemocněním a sponzorování klinických testů nadějných a vědecky podložených, avšak nepatentovatelných nebo komerčně nezajímavých léků, jejichž financování a vývoj farmaceutickými firmami je velmi nepravděpodobný [222].

S výjimkou Japonska jsou rakovinou žaludku postiženy zejména rozvojové státy se dvěma třetinami všech případů, přičemž jen v Číně je celých 42% celosvětového výskytu této nemoci. Vedle Jihovýchodní Asie je rakovina žaludku velmi rozšířená také ve Střední a Jižní Americe, střední Africe a Východní Evropě [1]. Navíc v těchto státech, kde prevalence infekce *H. pylori* dosahuje 70-95%, je léčba této infekce značně neúspěšná, zejména díky silnému výskytu rezistentních kmenů bakterií. Po prvním vyléčení také často dochází k návratu infekce, k čemuž např. v Peru dochází až u 73%

případů [218]. Z výše uvedeného vyplývá, že nové, účinné a cenově dostupné léky jsou nutné předně pro státy třetího světa, aby dokázaly čelit hrozbě rakoviny žaludku, která se dle odhadů WHO (World Health Organization) [223] může zařadit do dvaceti let mezi 10 celosvětově nejčastějších příčin smrti.

Pro úspěch Antabusu a jeho zavedení jako neziskového léku proti rakovinám bude nezbytná širší vědecká i společenská podpora. Je nutné, aby významné zdravotnické organizace jako je WHO nebo UICC (Union for International Cancer Control) podporovaly aktivity, které přináší GlobalCures, stejně jako je důležitá změna celospolečenského smýšlení a odklon od zavedeného R&D, který se ukazuje jako bolestně neefektivní [224].

### **3 CÍL PRÁCE**

Bakalářská práce se snaží pojmout teoretické znalosti o rakovině žaludku, ubikvitin- proteazomovém systému a jeho roli při rakovině, či její léčbě, až po problematiku vývoje nových léčiv, nebo naopak znovuobjevování těch starších. Na základě těchto znalostí pak v experimentální části ověřit toxicitu látek zasahujících do ubikvitin-proteazomového systému, tedy bortezomibu a komplexu disulfiramu s mědí, vůči buněčné linii odvozené od rakoviny žaludku.

## 4 MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 Buněčná kultura

Pro zjištění cytotoxicity zkoumaných látek byla použita buněčná linie odvozená od rakoviny žaludku OACP4 C pořízená od Health Protection Agency Culture Collection [225]. Tato adherentní linie byla získána od 55letého bělocha s nádorem v kardiální části žaludku.

### 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

diethyldithiokarbamát sodný trihydrát, 22,868-0, Sigma-Aldrich

Triton-X 100, 37240, Serva

RPMI-1640 Medium; With sodium bicarbonate, without L-glutamine, liquid, sterile-filtered, cell culture tested, R0883-6X500ML, Sigma-Aldrich

Penicilinn/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

MEM Non-essential Amino Acid Solution (100×), M7145-100ML, Sigma-Aldrich

Trypanová modř, T6146-256, Sigma-Aldrich

Trypsin-EDTA solution; 0.25%, 2.5 g porcine trypsin and 0.2 g EDTA . 4Na per liter of Hanks' Balanced Salt Solution with phenol red, sterile-filtered, cell culture tested, T4049-500ML, 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,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  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<sub>3</sub>  
deionizovaná voda (pomocí přístroje Aqua osmotic)  
dezinfekce Izorapid

### **4.3 Přístrojové vybavení**

Autokláv PS20A Chirana, ČR

Box skříňový mrazicí (-80) SAN Sanyo, Japonsko

Inkubátor Contherm, Nový zeland

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  $\mu$ M, 0,5-10  $\mu$ M, 2-20  $\mu$ M, 10-100  $\mu$ M, 50-200  $\mu$ M, 100-1000  $\mu$ M)  
Eppendorf

Pipeta multi-kanálová (30-300  $\mu$ M), biohit Proline plus

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

Třepačka reax Top Heidolf, Německo

Mikroskop a kamera

Membránová vývěva, KNF lab, Francie

### **4.4 Materiál**

1,5ml mikroskopické kumavky (Tubes for you)

0,5ml mikroskopické kumavky (Tubes for you)

2 ml mikroskopické kumavky (Tubes for you)

Kultivační destičky 96 jamkové (Orange Scientific)

Kultivační destičky 6 jamkové (Orange Scientific)



Kultivační láhev 25 cm,filter cap (Orange Scientific)  
Kultivační láhev 75 cm,filter cap (Orange Scientific)  
Kultivační láhev 150 cm,filter cap (Orange Scientific)  
50ml centrifugační zkumavky, konické (Orange Scientific)  
15ml centrifugační zkumavky, konické (Orange Scientific)  
Stříkačka plastová z PP pro jednorázové použití 2ml (Chirana)  
Stříkačka plastová z PP pro jednorázové použití 20ml (Chirana)  
Immobilon<sup>®</sup>-P Polyvinylidene Difluoride membranes (Millipore)  
epTIPS 50 - 1 000  $\mu$ l, 2 x 500 špiček (Eppendorf)  
epTIPS 0,1 - 10  $\mu$ l, 2 x 500 špiček (Eppendorf)  
epTIPS 2 - 200  $\mu$ l, 2 x 500 špiček (Eppendorf)

#### **4.5 Kultivace buněčné linie OACP4 C**

Buněčná linie byla kultivována v 75 ml kultivačních nádobách umístěných v inkubátoru při 37°C a 5% koncentraci CO<sub>2</sub>. Bylo použito kultivační médium RPMI 1640 s přidanými roztoky do výsledné koncentrace 10% FBS, 1% L-glutamin, 1% Penicilin/Streptomycin, 1% esenciální aminokyseliny. Při experimentech bylo s linií zacházeno ve sterilních podmínkách laminárního boxu.

#### **4.6 Pasážování a počítání buněk**

Z kultivační láhve bylo odsáto staré médium a láhev byla promyta 5 ml PBS 1x, které bylo opět odsáto, a následně byly buňky inkubovány 2 minuty s 1 ml trypsinu při 37°C. Trypsinizace byla zkontrolována mikroskopicky. K buňkám bylo přidáno 9 ml média a všechny obsah byl přepipetován do 50 ml zkumavky. Buněčná suspenze mohla být následně použita pro experimenty, počítání buněk, jejich opětovnou kultivaci nebo zamražení. Buňky byly pasážovány při dosažení asi 80% konfluency, tedy asi dvakrát týdně.

Pro počítání buněk bylo odebráno 10  $\mu$ l ze suspenze a přidáno k nim 90  $\mu$ l trypanové modři. Po důsledném promíchání bylo nanášeno po 5  $\mu$ l na Bürkerovu komůrku a spočítáno pod mikroskopem. Byl zaznamenán počet buněk ve čtvercích ohraničených dvěma čarami pro deset opakování, z nichž byl vypočítán průměr. Ten byl vynásoben  $10^5$  a výsledné číslo udávalo počet buněk na 1 ml suspenze.

#### **4.7 Rozmrazování a zamrazování buněk**

Pro rozmrazení buněk bylo k obsahu kryozkumavky postupně přidáváno po 1 ml média a vzniklá směs byla přepipetována do malé 25 ml kultivační nádoby. Další den bylo buňkám vyměněno médium.

Při zamrazování byly buňky nejdříve zcentrifugovány (15000 rpm, 3 minuty), bylo odsáto médium a pelet resuspendován roztokem FBS/DMSO (9:1) na požadovanou koncentraci (2 miliony buněk na 1 ml) a 1 ml směsi byl napipetován do kryozkumavky, která byla následně uskladněna v mrazáku ( $-80^{\circ}\text{C}$ ).

#### **4.8 Určení vlivu zkoumaných látek na viabilitu buněk**

Pro zjištění vlivu testovaných látek, tzn. bortezomibu,  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  komplexu, diethyldithiokarbamátu a chloridu měďnatého, na životnost a dělení buněk bylo užito MTT testu. Tato metoda je založena na redukci MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid) na barevný formazan. Reakce je katalyzována dehydrogenázovým systémem mitochondrií, a probíhá tedy pouze v živých buňkách. Množství barevného produktu formazanu je tudíž přímo úměrná viabilitě buněk a jejich počtu. Výsledný formazan je rozpuštěn a stanoven spektrofotometricky [226].

Sledované látky byly rozpuštěny v DMSO (v případě bortezomibu a  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ ), nebo v deionizované vodě (diethyldithiokarbamát sodný trihydrát, chlorid měďnatý) a přidány do média v požadované koncentraci (čtyři různé koncentrace pro každou látku). V důsledku nestability  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  komplexu byl před každým experimentem připraven čerstvý zásobní roztok. 200  $\mu$ l buněčné suspenze bylo nanášeno na 96 jamkovou destičku v počtu asi 25000 buněk na jamku, pro každou

koncentraci látky vždy v tripletu. Druhý den byla mikroskopicky zkontrolována rovnoměrnost výsevu buněk a v novém médiu byly aplikovány testované látky. Jako pozitivní kontrola byl použit roztok Tritonu (630  $\mu$ l média a 70  $\mu$ l 20% Triton-X 100) a pro kontrolu vlivu rozpouštědla roztok DMSO 1:1000 nebo deionizované vody o stejné koncentraci. Buňky byly se zkoumanými látkami inkubovány 24 hodin. Po uplynulé době bylo z destičky vyklepnuto médium, promyto 100  $\mu$ l PBS 1x a opět vyklepnuto. Do každé jamky bylo poté napipetováno 100  $\mu$ l média s 10x zředěným roztokem MTT (3mg/ml) a destička byla hodinu inkubována při 37°C. Roztok byl poté opět vyklepnut a vzniklé fialové krystalky formazanu byly rozpuštěny ve 100  $\mu$ l 1% roztoku  $\text{NH}_3$  v DMSO. Po rozpuštění byla změřena absorbance při vlnové délce 570 nm. Viabilita buněk byla počítána vzhledem ke kontrole (vlivu rozpouštědla, tedy DMSO nebo deionizované vodě).

Pro zjištění vlivu zkoumaných látek na morfologii buněk byla OACP4C linie kultivována na 6 jamkové destičce (120 tisíc buněk na jamku) po 24 hodin s látkami o koncentraci odpovídající jejich  $\text{IC}_{50}$ . Jako negativní kontrola byly požitý buňky kultivované v samotném médiu. Poté byly buňky propláchnuty 1x PBS a vyfoceny v mikroskopu s kamerou.

#### **4.9 Zpracování výsledků**

Každý MTT test byl proveden ve třech nezávislých opakováních. U jednotlivých látek byla pro každé opakování vypočtena hodnota  $\text{IC}_{50}$  pomocí lineární regrese a z výsledků byl vypočten aritmetický průměr a směrodatná odchylka programem MS Office Excel. Pomocí téhož programu byly výsledky zpracovány graficky.

#### **4.10 Tvorba obrázků**

Obrázky, grafy a chemické vzorce byly vytvořeny za použití programů MS Office, CorelDraw 09 a ChemDraw 12.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Určení vlivu zkoumaných látek na viabilitu buněk

Pro zjištění cytotoxicity testovaných látek vůči buněčné linii OACP4 C odvozené od rakoviny žaludku byly buňky vystaveny látkám vždy po 24 hodin. Vliv látek na viabilitu buněk byl zjištěn pomocí MTT testu založeném na jeho redukci na barevný formazan, který byl následně stanoven spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm. Pro každou látku byl vybrán rozsah čtyř koncentrací. Pokusy byly provedeny ve třech nezávislých opakováních, pro každou koncentraci látky v tripletu, z něhož byl vypočítán aritmetický průměr. Jako negativní kontrola (100% viabilita) byly použity buňky vystavené působení rozpouštědla o koncentraci 1% DMSO nebo deionizované vody. Z výsledků každého opakování byly vypočteny hodnoty viability při dané koncentraci a hodnota  $IC_{50}$ , tedy koncentrace látky, při které přežívalo 50% buněk. Z těchto hodnot byl následně vypočítán aritmetický průměr a směrodatná odchylka (SD).

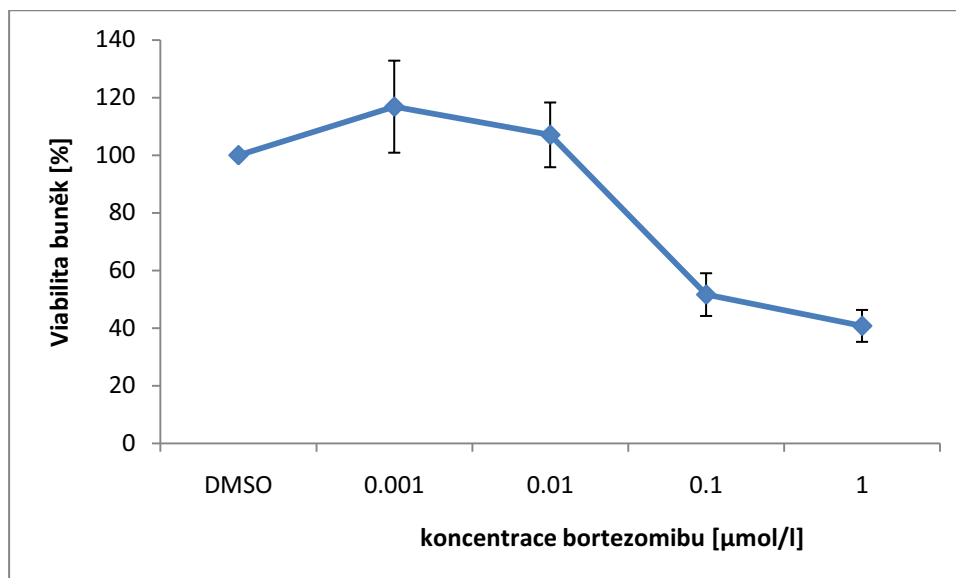
#### 5.1.1 Určení vlivu bortezomibu na viabilitu buněk

Pro zjištění zdali je buněčná linie OACP4 C citlivá vůči inhibici 20S proteazomu, byly buňky vystaveny bortezomibu. Jeho roztok byl zředěn v DMSO na požadované koncentrace. Výsledky experimentů jsou shrnuty v tabulce (Tab. 1.). Z grafu je patrné, že bortezomib je silně toxický již při nanomolárních koncentracích (Obr. 8.), s hodnotou  $IC_{50} = 0,78 \mu\text{mol/l}$  (Tab. 5.).

Tab. 1. Vliv bortezomibu na viabilitu buněk.

koncentrace [ $\mu\text{mol/l}$ ]	viabilita buněk [%]				
	1. opakování	2. opakování	3. opakování	průměr	SD
0.001	113.9	137.7	98.9	116.8	16.0
0.01	120.2	108.2	92.7	107.0	11.2
0.1	62.1	46.3	46.4	51.6	7.4
1	46.1	33.1	43.0	40.7	5.5

(SD = směrodatná odchylka)



**Obr. 8.** Vliv bortezomibu na viabilitu buněk (znázorněn průměr +/- SD).

### 5.1.2 Určení vlivu $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ komplexu na viabilitu buněk

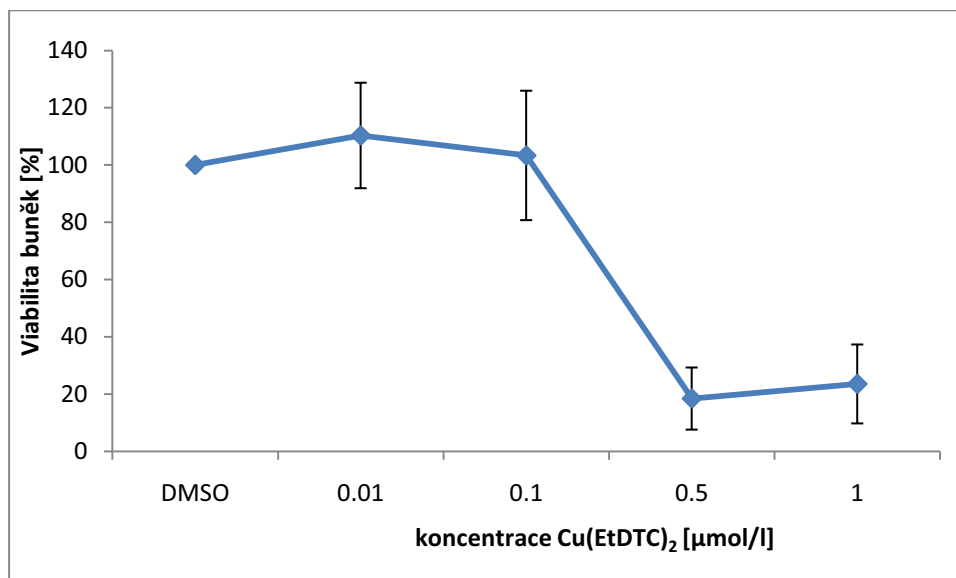
Případná toxicita komplexu disulfiramu s mědí vůči buněčné linii odvozené od rakoviny žaludku byla testována syntetickým  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  komplexem rozpuštěným do požadovaných koncentrací v DMSO. Z důvodů případné nestability komplexu v roztoku byl k experimentům použit vždy čerstvě připravený zásobní roztok. Výsledky jsou uvedeny v tabulce (Tab. 2.).

Tab. 2. Vliv  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  komplexu na viabilitu buněk.

koncentrace [μmol/l]	viabilita buněk [%]				
	1. opakování	2. opakování	3. opakování	průměr	SD
0.01	84.4	125.6	120.9	110.3	18.4
0.1	72.3	112.3	125.5	103.3	22.6
0.5	33.7	10.1	11.4	18.4	10.8
1	42.9	12.0	15.6	23.5	13.8

(SD = směrodatná odchylka)

Z grafu (Obr. 9.) lze vyčíst, že zatímco velmi nízké koncentrace (0,01 μmol/l a 0,1 μmol/l)  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  komplexu nemají na viabilitu buněk výraznější vliv, relativně vyšší koncentrace (0,5 μmol/l a 1 μmol/l) jsou pro OACP4 C buňky velmi toxické, s hodnotou  $\text{IC}_{50} = 0,55$  μmol/l, tedy dokonce ještě nižší než u bortezomibu (Tab. 5.).



**Obr. 9.** Vliv Cu(EtDTC)<sub>2</sub> komplexu na viabilitu buněk (znázorněn průměr +/- SD).

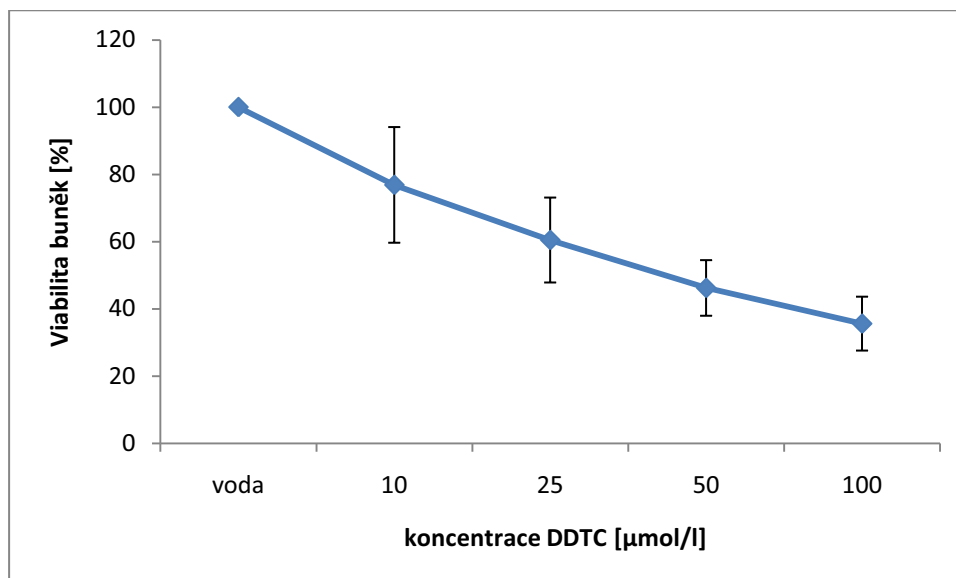
### 5.1.3 Určení vlivu DDTC na viabilitu buněk

Pro srovnání byla také zjištěna toxicita samotného DDTC. Sodná sůl trihydrátu diethyldithiokarbamátu byla rozpuštěna a zředěna na požadované koncentrace v deionizované vodě. K poklesu viability buněk docházelo až při použití koncentrací DDTC o několik řádů vyšších než v případě Cu(EtDTC)<sub>2</sub> komplexu (Tab. 3.). I přes vystavení buněk relativně vysokým koncentracím DDTC (100 μmol/l) nedošlo k tak výraznému snížení jejich viability, jaké bylo pozorováno u Cu(EtDTC)<sub>2</sub> (Obr. 10.). Hodnota IC<sub>50</sub> byla určena na 60,5 μmol/l (Tab. 5.).

Tab. 3. Vliv DDTC na viabilitu buněk.

koncentrace [μmol/l]	viabilita buněk [%]				
	1. opakování	2. opakování	3. opakování	průměr	SD
10	68.8	100.8	61.0	76.9	17.2
25	62.7	44.0	74.7	60.5	12.6
50	48.3	35.2	55.1	46.2	8.3
100	46.7	31.9	28.1	35.6	8.0

(SD = směrodatná odchylka)



**Obr. 10.** Vliv DDTc na viabilitu buněk (znázorněn průměr +/- SD).

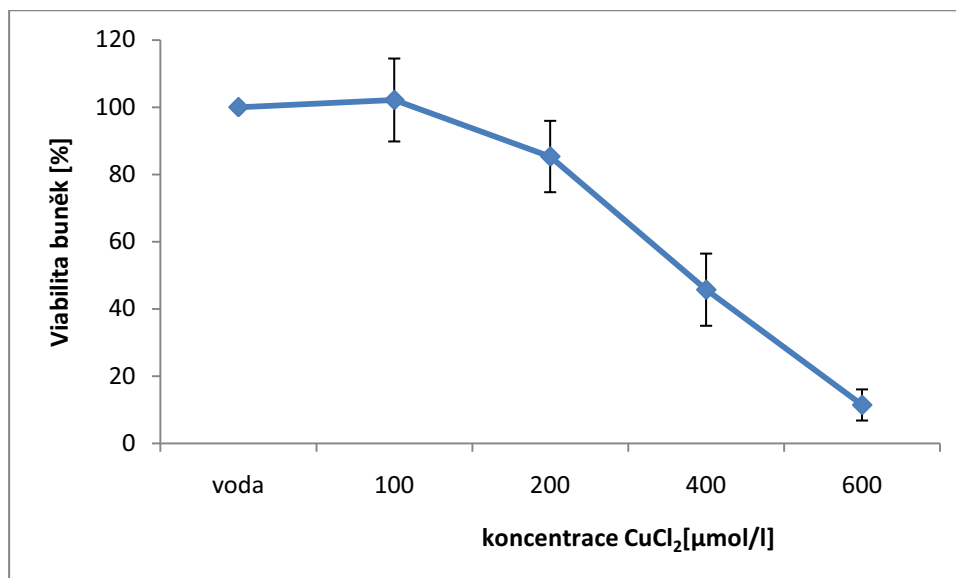
#### 5.1.4 Určení vlivu $\text{CuCl}_2$ na viabilitu buněk

Rovněž pro kontrolu byla ověřena toxicita měďnatých iontů. Chlorid měďnatý dihydrát byl rozpuštěn a zředěn v deionizované vodě na požadované koncentrace. Ke snížení viability buněk docházelo až při velmi vysokých koncentracích (Tab. 4.). Při vystavení buněk maximální koncentraci ( $600 \mu\text{mol/l}$ ) bylo možno pozorovat výrazný pokles viability srovnatelný s  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  (Obr. 11.). Hodnota  $\text{IC}_{50}$  byla určena na  $387,14 \mu\text{mol/l}$  (Tab. 5.).

Tab. 4. Vliv  $\text{CuCl}_2$  na viabilitu buněk.

koncentrace [µmol/l]	viabilita buněk [%]				
	1. opakování	2. opakování	3. opakování	průměr	SD
100	93.3	93.4	119.6	102.1	12.3
200	71.2	96.9	87.8	85.3	10.6
400	60.4	41.7	35.0	45.7	10.7
600	15.6	13.6	4.9	11.4	4.6

(SD = směrodatná odchylka)



**Obr. 11.** Vliv CuCl<sub>2</sub> na viabilitu buněk (znázorněn průměr +/- SD).

### 5.1.5 Určení hodnot IC<sub>50</sub> pro zkoumané látky

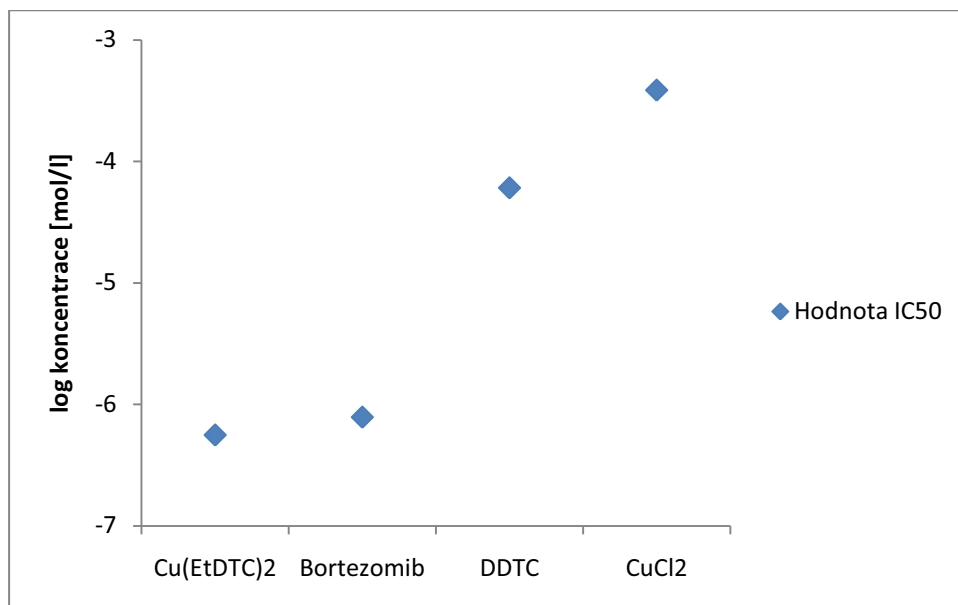
Z každého opakování experimentu byla zjištěna hodnota IC<sub>50</sub> pomocí lineární regrese. Z těchto hodnot byl vypočten aritmetický průměr a směrodatná odchylka (Tab. 5.). Z grafického znázornění (Obr. 12.) je patrné, že se hodnoty IC<sub>50</sub> výrazně lišily, dokonce v rámci několika řádů. Velmi nízkým IC<sub>50</sub> se vyznačují oba inhibitory proteazomu, Cu(EtDTC)<sub>2</sub> komplex a bortezomib, naopak o dva, respektive o tři řády vyšší je hodnota IC<sub>50</sub> pro DDTC a CuCl<sub>2</sub>.

Tab. 5. Hodnoty IC<sub>50</sub> pro zkoumané látky.

látka	hodnota IC <sub>50</sub> [μmol/l]				
	1. opakování	2. opakování	3. opakování	průměr	SD
Bortezomib	0.87	0.70	0.76	0.78	0.08
Cu(EtDTC) <sub>2</sub>	0.59	0.52	0.55	0.55	0.03
DDTC	73.50	51.30	56.80	60.50	11.50
CuCl <sub>2</sub>	395.91	389.04	376.48	387.14	9.85

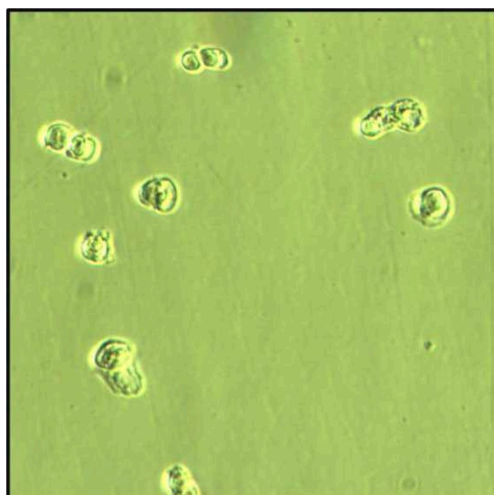
(SD = směrodatná odchylka)



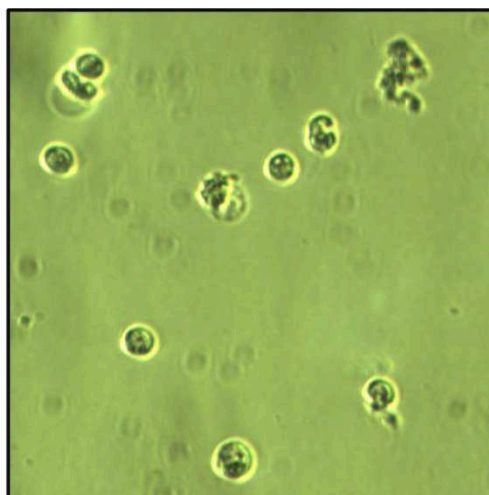


**Obr. 12.** Srovnání hodnot  $IC_{50}$  zkoumaných látek.

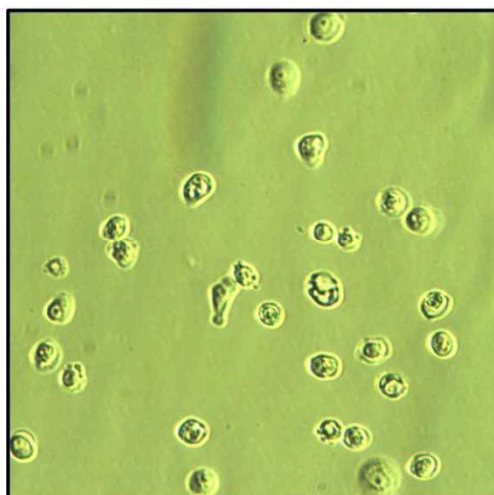
Po zjištění hodnot  $IC_{50}$  byly buňky kultivovány 24 hodin s testovanými látkami o koncentraci rovné  $IC_{50}$ , aby mohla být zachycena jejich morfologie (Obr. 13.). Je patrné, že látky výrazně snížily počet a hustotu buněk a způsobily výrazné morfologické změny. Jako kontrola byly použity buňky kultivované v samotném médiu.



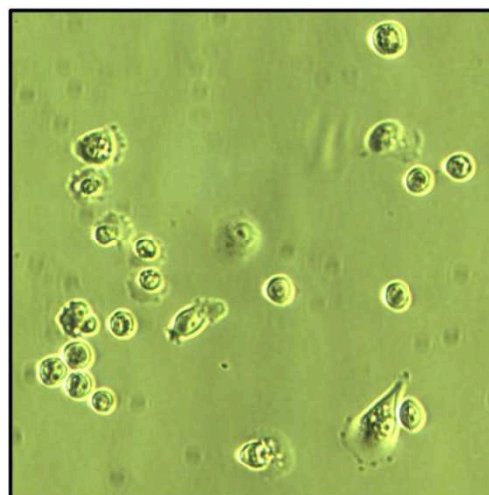
Bortezomib (0.78  $\mu\text{mol/l}$ )



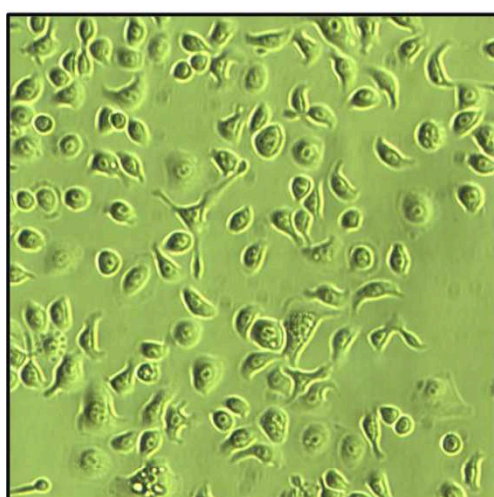
$\text{Cu(EtDTC)}_2$  (0.55  $\mu\text{mol/l}$ )



DDTc (60.50  $\mu\text{mol/l}$ )



$\text{CuCl}_2$  (378.14  $\mu\text{mol/l}$ )



Kontrola

**Obr. 13.** Morfologie OACP4 C buněk po 24 hodinové kultivaci s testovanými látkami o koncentraci rovné  $\text{IC}_{50}$ . (Zvětšení: 10x10)

## 6 DISKUZE

Cílem experimentální části práce bylo ověřit toxicitu testovaných látek vůči OACP4 C buněčné linii odvozené od rakoviny žaludku a účinky jednotlivých látek vzájemně srovnat. Z naměřených hodnot  $IC_{50}$  pro inhibitory proteazomu, bortezomib a komplex disulfiramu s mědí ( $Cu(EtDTC)_2$ ), je patrné, že se inhibice proteazomu ukazuje jako velmi efektivní, minimálně v *in vitro* podmínkách tohoto experimentu.

Pro srovnání s  $Cu(EtDTC)_2$  komplexem byla v rámci experimentální práce zjišťována také toxicita diethyldithiokarbamátu (DDTC) a měďnatých iontů (tedy  $CuCl_2$ ). V případě DDTC byla hodnota  $IC_{50}$  určena na koncentraci 60,5  $\mu\text{mol/l}$  (Tab. 5.). DDTC je látka velmi reaktivní, u které bylo pozorováno mnoho různých cílů v buňce, s nimiž je schopen interagovat [155]. I proto je velmi obtížné se bez dalších experimentů přesněji zabývat možnými mechanismy, které vedly ke snížení viability buněk. Dokonce je možné, že za toxicitu byl alespoň částečně odpovědný  $Cu(EtDTC)_2$  komplex, který vznikal při reakci DDTC s mědí v médiu či buňkách. V případě  $CuCl_2$  byla hodnota  $IC_{50}$  nejvyšší, 387,14  $\mu\text{mol/l}$  (Tab. 5.), a jistě je na místě pochyba, že by se v případě  $Cu^{2+}$  iontů jednalo o selektivní aktivitu pouze vůči transformovaným buňkám. Naopak o mědi je velmi dobře známo, že působí spíše pozitivně na rozvoj nádoru, například podporou angiogeneze [227]. Snížení viability buněk mohlo být zapříčiněno oxidativním stresem indukovaným  $Cu^{2+}$  ionty.

Doposud jediný klinicky používaný lék zasahující UPS, bortezomib, vykazuje účinnost proti celé řadě rakovinných buněčných linií, což bylo potvrzeno i v této práci s linií OACP4 C. Bortezomib je silně toxický již v nanomolárních koncentracích (Obr. 8.) a hodnota  $IC_{50}$  byla určena na 0,78  $\mu\text{mol/l}$  (Tab. 5.). Tato hodnota koreluje s jinými publikovanými údaji, ve kterých byl studován vliv bortezomibu na několik linií odvozených od rakoviny žaludku (SNU638, MUGC3, NKN28) s  $IC_{50} \sim 0,2 \mu\text{mol/l}$  pro všechny tři buněčné linie [46]. Aplikace bortezomibu také vedla k akumulaci inhibitoru buněčného cyklu proteinu p27 a pro-apoptického proteinu Bax [46]. Relativně vyšší hodnoty  $IC_{50}$  pro bortezomib uvádí studie [45] s buněčnými liniemi AZ521, MKN45 a NUGC3 odvozenými taktéž od rakoviny žaludku, pro něž  $IC_{50}$  dosahovala hodnot 1,29  $\mu\text{mol/l}$ , 9,44  $\mu\text{mol/l}$  a 8,63  $\mu\text{mol/l}$ . Tyto rozdíly mohou být vysvětleny poměrně výraznou odlišností jednotlivých buněčných linií. Bortezomib také snižoval aktivitu jaderného faktoru  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ), který je úzce spojen s progresí rakoviny žaludku [45].

Přestože na základě experimentů provedených v této bakalářské práci nelze tvrdit, zda je za snížení viability buněk zodpovědná apoptóza nebo nekróza, je možno usuzovat, že apoptóza. Pro tuto domněnku svědčí jednak studie [46], kde po aplikaci bortezomibu byla detekována apoptóza a akumulace proteinu Bax, jednak fakt, že inhibitory 20S proteazomu obecně apoptózu indukují [43]. Jako důkaz apoptózy by mohlo sloužit prokázání štípání proteinu PARP (Poly ADP- ribosyl Transferase).

Výsledky této práce, stejně jako studie [45-46], naznačují, že by bortezomib mohl být vhodnou terapií proti rakovině žaludku. Nicméně druhá fáze klinického testu ukázala, že bortezomib nevykazuje téměř žádnou aktivitu vůči nádoru žaludku [50], stejně jako vůči velké většině ostatních pevných nádorů. Na otázku, je-li tato nízká aktivita proti pevným nádorům příznačná pouze pro bortezomib, nebo zda platí všeobecně pro inhibitory 20S proteazomu, by mohly napovědět výsledky právě probíhajících klinických testů druhé generace 20S proteazomálních inhibitorů, marizomibu a carfilzomibu [56-57]. Pokud by také nebyly příliš dobré, bylo by možno vyvodit, že inhibice 20S není účinná u pacientů s pevnými nádory. I proto je nutný vývoj třetí generace inhibitorů proteazomu, které nemají svůj cíl přímo v centrální části 20S, ale např. v regulačním 19S proteazomu [228].

Mezi takové látky je zřejmě možné zařadit také komplex disulfiramu s mědí ( $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ ), jehož cílem je pravděpodobně deubikvitináza Poh1, podjednotka víka 19S proteazomu [181]. Příkladem třetí generace inhibitorů proteazomu je také molekula zvaná b-AP15, která inhibuje UCHL5 a USP14, deubikvitinázy asociované s 19S [229]. b-AP15 vykazuje silnou aktivitu mimo jiné proti čtyřem různým xenograftům odvozeným od spinocelulárního karcinomu a karcinomů plic, prsou a tlustého střeva, což naznačuje, že tento způsob inhibice proteazomu by mohl být účinný i u pevných nádorů *in vivo* [229]. Je známo, že také disulfiram nebo jeho metabolity jsou velmi účinné proti pevným nádorům *in vivo* a to dokonce i u lidských pacientů. To potvrzuje jednak studie, kde perorální podávání disulfiramu myším s xenograftem rakoviny prsu výrazně snížilo velikost nádoru [174], ale zejména klinická studie druhé fáze se 64 pacientkami trpícími rakovinou prsu, kterým byl podáván metabolit disulfiramu, diethyldithiokarbamát [154]. Tato prokazatelná aktivita *in vivo* podává silný důvod, aby se ve výzkumu této látky pokračovalo a byl o ni větší zájem než doposud.

Vzhledem k metabolismu a vysoké reaktivitě disulfiramu je poměrně složité přesně určit konkrétní chemickou látku, která je zodpovědná za protirakovinnou aktivitu. Disulfiram a diethyldithiokarbamáty jsou silnými chelátory kovů *in vivo*, což bylo pozorováno i u lidských pacientů [230-231]. Dochází tak ke tvorbě komplexu disulfiramu s mědí ( $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ ). Důležité poznatky k otázce protirakovinné aktivity disulfiramu přináší doposud nepublikovaná studie na myších se xenografty rakoviny prsu [232]. Bylo zde opět potvrzeno, že podávání disulfiramu tlumí růst nádoru, ale také, že je tato aktivita disulfiramu výrazně umocněna při současném podávání glukonátu měďnatého. Tím dochází ke zvýšené tvorbě  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  komplexu, ale tudíž i ke snížení koncentrace disulfiramu, nebo jeho metabolitů, např. diethyldithiokarbamátu. Tyto výsledky silně podporují hypotézu, že za aktivitou disulfiramu stojí ve skutečnosti  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  komplex, neboť pokud by za ní byl odpovědný samotný disulfiram, či diethyldithiokarbamát, mělo by po přidání mědi dojít k útlumu protirakovinné aktivity, což se nestalo, právě naopak. Proto by se v dalších experimentech měl studovat zejména  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  komplex a jeho aktivita, což bylo také hlavní náplní této práce.

Protirakovinný účinek  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  komplexu byl potvrzen také na buněčné linii OACP4 C odvozené od rakoviny žaludku. Pomocí MTT testu byla určena hodnota  $\text{IC}_{50}$  na 0,55  $\mu\text{mol/l}$  (Tab. 5.), tedy mírně nižší než u bortezomibu. Na rozdíl od něj ale  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  již při nanomolárních koncentracích (500 nmol/l) výrazně snížil viabilitu buněk asi na 20% kontroly (Obr. 9.). Hodnota  $\text{IC}_{50}$   $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  komplexu je také asi o dva řády nižší než  $\text{IC}_{50}$  diethyldithiokarbamátu, látky vznikající v těle po požití disulfiramu (Tab. 5.), což podporuje myšlenku, že aktivní látkou *in vivo* je měďnatý komplex. Zároveň je  $\text{IC}_{50}$   $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  výrazně nižší než  $\text{IC}_{50}$  pro  $\text{CuCl}_2$  (Tab. 5.), což prokazatelně vylučuje možnost, že by cytotoxicita komplexu byla způsobena samotnými měďnatými ionty. Podobně jako u bortezomibu nelze bez potřebných testů rozhodnout, zda bylo snížení viability způsobeno apoptózou nebo nekrózou. Pro apoptózu svědčí fakt, že byla detekována v jiných studiích při aplikaci komplexu [174], a také pozorování útvarů v buňkách (Obr. 13.), které by mohly být apoptickými tělísky, což ovšem nelze s určitostí tvrdit.  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  komplex byl popsán jako inhibitor 26S proteazomu, a přestože by bylo zapotřebí dalších experimentů, aby to bylo možno s jistotou tvrdit, je velmi pravděpodobné, že inhibice proteazomu se přinejmenším spolupodílí na jeho cytotoxickém účinku. Inhibice proteazomu mnohdy vede mimo jiné k akumulaci proteinu p27, jehož nízká hladina je spojena s progresí a horší prognózou u

rakoviny žaludku [233]. Slabá exprese p27 je způsobena právě jeho zvýšenou ubikvitinací a degradací v proteazomu [234]. Dokonce bylo pozorováno, že infekce *H. pylori*, tedy jeden z hlavních rizikových faktorů rakoviny žaludku, umocňuje degradaci p27 v proteazomu, jak u chronické gastritidy, tak u nádorových buněk, což vede k progresi onemocnění [235]. Zároveň *H. pylori* indukuje cytoplazmatickou lokalizaci p27, s čímž je spojena horší prognóza [236]. Exprese p27 také působí proti patogenezi zprostředkované CagA proteinem, hlavním faktorem virulence *H. pylori* [237].

Jelikož jsou  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  komplexem pravděpodobně inhibovány proteiny obsahující JAMM doménu, nabízí se vedle proteazomální Poh1 další cíl v podobě CSN5, tedy podjednotky COP9 signalozomu. Tato aktivita komplexu může mít velmi široké účinky, neboť CSN5 svojí izopeptidázovou aktivitou reguluje největší rodinu E3 ubikvitin ligáz, CRL E3 ligázy (Cullin-RING ligase), tím že od nich odštěpuje ubikvitinu podobný protein NEDD8, tzv. denedylaci [189]. Mezi CRL ligázy patří také komplex SCF (Skp1/Cullin/F-box) ligáz, jejíž jedna forma ( $\text{SCF}^{\text{Skp}2}$ ) zprostředkovává ubikvitinaci a následnou degradaci právě p27 [238]. CSN5 byl identifikován jako onkogen u rakoviny prsu [198] a je známo, že indukuje degradaci p27 v proteazomu a jeho cytoplazmatickou lokalizaci u několika typů pevných nádorů [194-195, 239-240]. Otázkou ovšem zůstává do jaké míry je tato aktivita CNS5 vůči p27 závislá na JAMM doméně. Nicméně je zřejmé, že denedylační aktivita CNS5 je nutná pro správnou funkci CRL ligáz [241]. Cullin1, jeden z proteinů SCF komplexu, na který je vázán NEDD8, je výrazně nadexprimován u několika typů pevných nádorů, včetně rakoviny žaludku, přičemž míra exprese pozitivně koreluje s pokročilostí onemocnění a naopak negativně s prognózou pacientů s rakovinou žaludku [242]. Vypnutí genu pro Cullin1 také vedlo k zastavení buněčného cyklu a výraznému zvýšení hladiny p27 [242]. To vše naznačuje, že SCF ligázy, které jsou regulovány CSN5, mohou hrát velmi důležitou roli při progresi nádoru. Vedle p27 zodpovídají SCF E3 ligázy také za degradaci jiných, z hlediska rakoviny žaludku důležitých proteinů, mimo jiné I $\kappa$ B nebo  $\beta$ -kateninu, které jsou ubikvitinovány  $\text{SCF}^{\beta\text{TrCP}}$  ligázou [238]. Vedle Cullinu1 mohou být neddylovány i jiné proteiny, např. p53 nebo MDM2, a není tedy překvapivé, že narušení procesů spojených s NEDD8 může mít negativní dopad na buněčný cyklus a vývoj [243]. V případě rakoviny žaludku bylo prokázáno, že na rozdíl od zdravé tkáně zde dochází ke snížené neddylaci NEMO (NF- $\kappa$ B Essential Modulator), což má za následek umocněnou degradaci I $\kappa$ B v proteazomu a aktivaci NF- $\kappa$ B [244]. Není ovšem

jisté, jaký by měla inhibice JAMM doménové CSN5 vliv na deneddylaci jiných proteinů s navázaným NEDD8 než Cullin1, neboť už byla objevena i jiná proteáza s deneddylační aktivitou [245].

Výše uvedené nabízí jen jeden z mnoha možných efektů aplikace  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  komplexu jako možného inhibitoru JAMM doménových proteinů. O jeho aktivitě na buněčné úrovni je známo velmi málo, ale silná toxicita vůči rakovinným buňkám je dostatečnou motivací pro další experimenty. Budoucí výzkum  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  komplexu vůči rakovině žaludku by mohl zahrnovat určení hodnot  $\text{IC}_{50}$  i pro jiné buněčné linie odvozené od nádoru žaludku a zjištění toxicity vůči normálním netransformovaným buňkám. V případě pozitivních výsledků by se vedle rozšiřování molekulárních aspektů aktivity komplexu mohl ověřit účinek i na myších xenograftech. Poté by mohl být nasazen do první fáze klinických testů s režimem, který je užíván v právě probíhajícím testu disulfiramu s přídavky glukonátu měďnatého u pacientů s nádory zasahujícími játra [221].

## 7 ZÁVĚR

Bakalářská práce byla zaměřena zejména na rozsáhlou literární rešerši, která se snaží zachytit současný stav poznání týkajícího se rakoviny žaludku a možnostmi její léčby, ubikvitin-proteazomového systému (UPS) a léku Velcade (bortezomibu), který je prvním léčivem zasahujícím do UPS. Dále bylo rozvedeno téma o jaderném faktoru  $\kappa B$ , který představuje jeden z mnoha mostů, který spojuje rakovinu žaludku a důležitost UPS v jejím vývoji a progresi. Hlavní část teoretické části se věnovala léku Antabusu (disulfiram) používanému po desítky let při léčbě alkoholismu, který má ovšem i nadějnou protirakovinnou aktivitu. Byly diskutovány možné cíle a mechanismy, které se podílí na této aktivitě, jako je inhibice angiogeneze, mnohočetné lékové rezistence nebo tvorby metastází. Pozornost byla ovšem věnována hlavně komplexu disulfiram s mědí ( $Cu(EtDTC)_2$ ), kterému je připisován selektivní protinádorový účinek díky inhibici proteazomu. Se snahou prosadit disulfiram jako lék proti rakovině ovšem vyvstávají určité problémy, ale zároveň i příležitost jej zavést jako první neziskový lék určený proti zhoubným onemocněním. Tyto problémy, stejně jako i jiné týkající se vývoje nových léků, jsou shrnuty v závěrečné kapitole teoretické části.

Na základě teoretických znalostí byl navrhnout experiment, který měl za hlavní cíl určit a srovnat toxicitu bortezomibu a  $Cu(EtDTC)_2$  komplexu u buněk rakoviny žaludku. Byl testován vliv obou látek po 24 hodinovém působení na OACP4 C buněčnou linii odvozenou od rakoviny žaludku. Bortezomib i  $Cu(EtDTC)_2$  komplex se ukázaly jako silně toxické již v nanomolárních koncentracích, s hodnotou  $IC_{50}$  0,78  $\mu\text{mol/l}$  pro bortezomib a 0,55  $\mu\text{mol/l}$  pro komplex. Pro srovnání byla také určena toxicita diethyldithiokarbamátu a měďnatých iontů, jejichž účinek se ukázal být výrazně slabší s hodnotou  $IC_{50}$  o několik řádů vyšší.

Z výsledků vyplývá, že inhibitory proteazomu vykazují silnou aktivitu vůči OACP4 C linii. Pro bortezomib byl již tento *in vitro* účinek popsán na jiných liniích rakoviny žaludku. Nicméně podobně jako u většiny ostatních pevných nádorů, v klinickém testu druhé fáze s pacienty trpícími rakovinou žaludku zcela propadl. Naopak o  $Cu(EtDTC)_2$  komplexu je známo, že je pravděpodobně účinný proti pevným nádorům *in vivo* a že proteazom inhibuje způsobem odlišným než bortezomib. Disulfiram, jakožto nepatentovatelné léčivo, by se mohl stát prvním neziskovým lékem proti nádorovým onemocněním. Cenově dostupné léky jsou nezbytné nejen pro kolabující zdravotnické



systemy vyspělého světa, ale zejména pro rozvojové země, které si nová a drahá léčiva nemohou dovolit. I proto by mohl být disulfiram pro rakovinu žaludku, nemoc rozšířenou zejména ve třetím světě, velkou výzvou.

Tato bakalářská práce je mimo jiné podkladem pro další pokračování výzkumu účinku komplexu disulfiramu s mědí proti rakovině, a to jak na teoretické, tak i praktické rovině. Další výzkum se bude odehrávat na půdě Barbara Ann Karmanos Cancer Institute v Detroitu v laboratoři prof. Q Ping Doua, který se dlouhodobě zabývá komplexy kovů jako inhibitorů proteazomu a možných protirakovinných léčiv, a jehož zvací dopis je uveden v příloze.

## 8 ZDROJE

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005, 55:74-108.
- [2] <http://www.svod.cz> (březen 2011)
- [3] Hogan AM, Collins D, Baird AW, Winter DC. Estrogen and gastrointestinal malignancy. *Mol Cell Endocrinol.* 2009, 307:19-24.
- [4] Verdecchia A, Corazziari I, Gatta G, Lisi D, Faivre J, Forman D. Explaining gastric cancer survival differences among European countries. *Int J Cancer.* 2004, 109:737-41.
- [5] Catalano V, Labianca R, Beretta GD, Gatta G, Braud F, Custem E. Gastric cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2009, 71:127-164.
- [6] Correia M, Machado JC, Ristimäki A. Basic aspekt of gastrin cancer. *Helicobacter.* 2009, 14 Suppl 1:36-40.
- [7] Oliveira C, Seruca R, Carneiro F. Hereditary gastrin cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2009, 23:147-57.
- [8] Kelly JR, Duggan JM. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Clin Epidemiol.* 2003, 56:1-9.
- [9] Liu C, Russell RM. Nutrition and gastrin cancer risk: an update. *Nutr Rev.* 2008, 66:237-49.
- [10] Power DG, Kelsen DP, Shah MA. Advanced gastric cancer-slow but steady progress. *Cancer Treat Rev.* 2010, 36:384-92.
- [11] Sinning C, Schaefer N, Standop J, Hirner A, Wolff M. Gastric stump carcinoma - Epidemiology and current concepts in pathogenesis and treatment. *EJSO.* 2007, 33: 133-139.
- [12] Roth AD. Curative treatment of gastric cancer: towards a multidisciplinary approach?. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2003, 46:59-100.
- [13] Wagner AD, Unverzagt S, Grothe W, Kleber G, Grothey A, Haerting J, Fleig WE. Chemotherapy for advanced gastric cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010, 3:CD004064.
- [14] Morabito A, Carillio G, Longo R. Systemic treatment of gastric cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2009, 70:216-34.

- [15] Wistuba II, Gelovani JG, Jacoby JJ, Davis SE, Herbst RS. Methodological and practical challenges for personalized cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011, 8:135-41.
- [16] Peterson C. Drug therapy of cancer. *Eur J Clin Pharmacol*. 2011. *in press*
- [17] de Bono JS, Ashworth A. Translating cancer research into targeted therapeutics. *Nature*. 2010, 467:543-9.
- [18] Tursz T, Andre F, Lazar V, Lacroix L, Soria JC. Implications of personalized medicine-perspective from a cancer center. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011, 8:177-83.
- [19] Voltz E, Gronemeyer H. A new era of cancer therapy: cancer cell targeted therapies are coming of age. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008, 40:1-8.
- [20] Boku N. Perspectives for personalization in chemotherapy of advanced gastric cancer. *Discov Med*. 2010, 9:84-9.
- [21] Scartozzi M, Pistelli M, Bittoni A, Giampieri R, Galizia E, Berardi R, Faloppi L, Del Prete M, Cascinu S. Novel perspectives for the treatment of gastric cancer: from a global approach to a personalized strategy. *Curr Oncol Rep*. 2010, 12:175-85.
- [22] Valverde CM, Macarulla T, Casado E, Ramos FJ, Martinelli E, Tabernero J. Novel targets in gastric and esophageal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006, 59:128-38.
- [23] Arkenau HT. Gastric cancer in the era of molecularly targeted agents: current drug development strategies. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009, 135:855-66.
- [24] Ohtsu A. Chemotherapy for metastatic gastric cancer: past, present, and future. *J Gastroenterol*. 2008, 43:256-64.
- [25] Tai W, Mahato R, Cheng K. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. *J Control Release*. 2010, 146:264-75.
- [26] Gravalos C, Jimeno A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol*. 2008, 19:1523-9.
- [27] De Vita F, Giuliani F, Silvestris N, Catalano G, Ciardiello F, Orditura M. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in gastric cancer: a new therapeutic target. *Cancer Treat Rev*. 2010, 36:11-5.
- [28] Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003, 3:401-10.
- [29] Iwasaki J, Nihira S. Anti-angiogenic therapy against gastrointestinal tract cancers. *Jpn J Clin Oncol*. 2009, 39:543-51.

- [30] Shim KN, Jung SA, Joo YH, Yoo K. Clinical significance of tissue levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in gastric cancer. *J Gastroenterol*. 2007, 42:120-8.
- [31] Zhang M, Zhu GY, Gao HY, Zhao SP, Xue Y. Expression of tissue levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in gastric adenocarcinoma. *J Surg Oncol*. 2011, 103:243-7.
- [32] Chu D, Zhang Z, Li Y, Zheng J, Dong G, Wang W, Ji G. Matrix metalloproteinase-9 is associated with disease-free survival and overall survival in patients with gastric cancer. *Int J Cancer*. 2010, in press.
- [33] Bramhall SR, Hallissey MT, Whiting J, Scholefield J, Tierney G, Stuart RC, Hawkins RE, McCulloch P, Maughan T, Brown PD, Baillet M, Fielding JW. Marimastat as maintenance therapy for patients with advanced gastric cancer: a randomised trial. *Br J Cancer*. 2002, 86:1864-70.
- [34] Kimata M, Otani Y, Kubota T, Igarashi N, Yokoyama T, Wada N, Yoshimizu N, Fujii M, Kameyama K, Okada Y, Kumai K, Kitajima M. Matrix metalloproteinase inhibitor, marimastat, decreases peritoneal spread of gastric carcinoma in nude mice. *Jpn J Cancer Res*. 2002, 93:834-41.
- [35] Schwartz GK, Ilson D, Saltz L, O'Reilly E, Tong W, Maslak P, Werner J, Perkins P, Stoltz M, Kelsen D. Phase II study of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol administered to patients with advanced gastric carcinoma. *J Clin Oncol*. 2001, 19:1985-92.
- [36] Dar AA, Zaika A, Piazuelo MB, Correa P, Koyama T, Belkhir A, Washington K, Castells A, Pera M, El-Rifai W. Frequent overexpression of Aurora Kinase A in upper gastrointestinal adenocarcinomas correlates with potent antiapoptotic functions. *Cancer*. 2008, 112:1688-98.
- [37] Adams J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer*. 2004, 4:349-60.
- [38] Adams J. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell*. 2004, 5:417-21.
- [39] Jung L, Holle L, Dalton WS. Discovery, Development, and clinical applications of bortezomib. *Oncology*. 2004, 18:4-13.
- [40] Sánchez-Serrano I. Success in translational research: lessons from the development of bortezomib. *Nat Rev Drug Discov*. 2006, 5:107-14.
- [41] Montagut C, Rovira A, Albanell J. The proteasome: a novel target for anticancer therapy. *Clin Transl Oncol*. 2006, 8:313-7.
- [42] Cvek B, Dvorak Z. The ubiquitin-proteasome system (UPS) and the mechanism of action of bortezomib. *Curr Pharm Des*. 2011, 17:1483-99.

- [43] McConkey DJ, Zhu K. Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug Resist Updat*. 2008, 11:164-79.
- [44] Orłowski RZ, Kuhn DJ. Proteasome inhibitors in cancer therapy: lessons from the first decade. *Clin Cancer Res*. 2008, 14:1649-57.
- [45] Fujita T, Doihara H, Washio K, Ino H, Murakami M, Naito M, Shimizu N. Antitumor effects and drug interactions of the proteasome inhibitor bortezomib (PS341) in gastric cancer cells. *Anticancer Drugs*. 2007, 18:677-86.
- [46] Bae SH, Ryoo HM, Kim MK, Lee KH, Sin JI, Hyun MS. Effects of the proteasome inhibitor bortezomib alone and in combination with chemotherapeutic agents in gastric cancer cell lines. *Oncol Rep*. 2008, 19:1027-32.
- [47] Aghajanian C, Soignet S, Dizon DS, Pien CS, Adams J, Elliott PJ, Sabbatini P, Miller V, Hensley ML, Pezzulli S, Canales C, Daud A, Spriggs DR. A phase I trial of the novel proteasome inhibitor PS341 in advanced solid tumor malignancies. *Clin Cancer Res*. 2002, 8:2505-11.
- [48] Ocean AJ, Schnoll-Sussman F, Chen X, Holloway S, Matthews N, Christos P, Mazumdar M, Wright J, Wadler S. Phase II study of PS-341 (VELCADE, bortezomib) with or without irinotecan in patients (pts) with advanced gastric adenocarcinomas (AGA). *Proc GI ASCO*. 2007, 45.
- [49] Jatoi A, Dakhil SR, Foster NR, Ma C, Rowland KM Jr, Moore DF Jr, Jaslowski AJ, Thomas SP, Hauge MD, Flynn PJ, Stella PJ, Alberts SR. Bortezomib, paclitaxel, and carboplatin as a first-line regimen for patients with metastatic esophageal, gastric, and gastroesophageal cancer: phase II results from the North Central Cancer Treatment Group (N044B). *J Thorac Oncol*. 2008, 3:516-20.
- [50] Shah MA, Power DG, Kindler HL, Holen KD, Kemeny MM, Ilson DH, Tang L, Capanu M, Wright JJ, Kelsen DP. A multicenter, phase II study of bortezomib (PS-341) in patients with unresectable or metastatic gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma. *Invest New Drugs*. 2011,29:1475-81.
- [51] Markovic SN, Geyer SM, Dawkins F, Sharfman W, Albertini M, Maples W, Fracasso PM, Fitch T, Lorusso P, Adjei AA, Erlichman C. A phase II study of bortezomib in the treatment of metastatic malignant melanoma. *Cancer*. 2005, 103:2584-9.
- [52] Maki RG, Kraft AS, Scheu K, Yamada J, Wadler S, Antonescu CR, Wright JJ, Schwartz GK. A multicenter Phase II study of bortezomib in recurrent or metastatic sarcomas. *Cancer*. 2005, 103:1431-8.
- [53] Mackay H, Hedley D, Major P, Townsley C, Mackenzie M, Vincent M, Degendorfer P, Tsao MS, Nicklee T, Birle D, Wright J, Siu L, Moore M, Oza A. A phase II trial with pharmacodynamic endpoints of the proteasome inhibitor

- bortezomib in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2005, 11:5526-33.
- [54] Engel RH, Brown JA, Von Roenn JH, O'Regan RM, Bergan R, Badve S, Rademaker A, Gradishar WJ. A phase II study of single agent bortezomib in patients with metastatic breast cancer: a single institution experience. *Cancer Invest.* 2007, 25:733-7.
- [55] Arastu-Kapur S, Anderl JL, Kraus M, Parlati F, Shenk KD, Lee SJ, Muchamuel T, Bennett MK, Driessen C, Ball AJ, Kirk CJ. Nonproteasomal targets of the proteasome inhibitors bortezomib and carfilzomib: a link to clinical adverse events. *Clin Cancer Res.* 2011, 17:2734-43.
- [56] C Potts B, X Albitar M, C Anderson K, Baritaki S, Berkers C, Bonavida B, Chandra J, Chauhan D, C Cusack J Jr, Fenical W, M Ghobrial I, Groll M, R Jensen P, S Lam K, K Lloyd G, McBride W, J McConkey D, P Miller C, T C Neuteboom S, Oki Y, Ova H, Pajonk F, G Richardson P, M Roccaro A, M Sloss C, A Spear M, Valashi E, Younes A, Palladino MA. Marizomib, a proteasome inhibitor for all seasons: preclinical profile and a framework for clinical trials. *Curr Cancer Drug Targets.* 2011, 11:254-84.
- [57] J Kuhn D, Z Orlowski R, C Bjorklund C. Second generation proteasome inhibitors: carfilzomib and immunoproteasome-specific inhibitors (IPSIs). *Curr Cancer Drug Targets.* 2011, 11:285-95.
- [58] Reinstein E, Ciechanover A. Narrative review: protein degradation and human diseases: the ubiquitin connection. *Ann Intern Med.* 2006, 145:676-84.
- [59] Wilkinson KD. Ubiquitin: a Nobel protein. *Cell.* 2004, 119:741-5.
- [60] 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, 74:54-8.
- [61] Ciechanover A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005, 6:79-87.
- [62] Goldberg AL. Nobel committee tags ubiquitin for distinction. *Neuron.* 2005, 45:339-44.
- [63] Zwickl P, Voges D, Baumeister W. The proteasome: a macromolecular assembly designed for controlled proteolysis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1999, 354:1501-11.
- [64] Adams J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat Rev.* 2003, Suppl 1:3-9.
- [65] Bedford L, Paine S, Sheppard PW, Mayer RJ, Roelofs J. Assembly, structure, and function of the 26S proteasome. *Trends Cell Biol.* 2010, 20:391-401.

- [66] Wójcik C, DeMartino GN. Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003, 35:579-89.
- [67] Tanaka K. The proteasome: overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2009, 85:12-36.
- [68] Pickart CM. Back to the future with ubiquitin. *Cell.* 2004, 116:181-90.
- [69] Ciechanover A, Iwai K. The ubiquitin system: from basic mechanisms to the patient bed. *IUBMB Life.* 2004, 56:193-201.
- [70] Li W, Ye Y. Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms. *Cell Mol Life Sci.* 2008, 65:2397-406.
- [71] Welchman RL, Gordon C, Mayer RJ. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005, 6:599-609.
- [72] Schwartz AL, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. *Annu Rev Med.* 1999, 50:57-74.
- [73] Pickart CM, Eddins MJ. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 2004, 1695:55-72.
- [74] Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, Chandu D. The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci.* 2006, 31:137-55.
- [75] Ye Y, Rape M. Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009, 10:755-64.
- [76] Rotin D, Kumar S. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009, 10:398-409.
- [77] Chasapis CT, Spyroulias GA. RING finger E(3) ubiquitin ligases: structure and drug discovery. *Curr Pharm Des.* 2009, 15:3716-31.
- [78] Deshaies RJ, Joazeiro CA. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem.* 2009, 78:399-434.
- [79] Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell.* 1999, 96:635-44.
- [80] Ikeda F, Dikic I. Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series. *EMBO Rep.* 2008, 9:536-42.
- [81] Saeki Y, Kudo T, Sone T, Kikuchi Y, Yokosawa H, Toh-e A, Tanaka K. Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome. *EMBO J.* 2009, 28:359-71.

- [82] Sowa ME, Bennett EJ, Gygi SP, Harper JW. Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape. *Cell*. 2009, 138:389-403.
- [83] Komander D, Clague MJ, Urbé S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009, 10:550-63.
- [84] Cooper EM, Cutcliffe C, Kristiansen TZ, Pandey A, Pickart CM, Cohen RE. K63-specific deubiquitination by two JAMM/MPN+ complexes: BRISC-associated Brcc36 and proteasomal Poh1. *EMBO J*. 2009, 28:621-31.
- [85] Pickart CM, Cohen RE. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004, 5:177-87.
- [86] Jung T, Catalgol B, Grune T. The proteasomal system. *Mol Aspects Med*. 2009, 30:191-296.
- [87] Kim HM, Yu Y, Cheng Y. Structure characterization of the 26S proteasome. *Biochim Biophys Acta*. 2011, 1809:67-79.
- [88] Tanaka K. Molecular biology of the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998, 247:537-41.
- [89] Finley D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem*. 2009, 78:477-513.
- [90] Wolf DH, Hilt W. The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta*. 2004, 1695:19-31.
- [91] Bochtler M, Ditzel L, Groll M, Hartmann C, Huber R. The proteasome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 1999, 28:295-317.
- [92] Sharon M, Taverner T, Ambroggio XI, Deshaies RJ, Robinson CV. Structural organization of the 19S proteasome lid: insights from MS of intact complexes. *PLoS Biol*. 2006, 4:e267.
- [93] Tanaka K. Proteasomes: structure and biology. *J Biochem*. 1998, 123:195-204.
- [94] Xie Y. Structure, assembly and homeostatic regulation of the 26S proteasome. *J Mol Cell Biol*. 2010, 2:308-17.
- [95] Demartino GN, Gillette TG. Proteasomes: machines for all reasons. *Cell*. 2007, 129:659-62.
- [96] Goldberg AL, Cascio P, Saric T, Rock KL. The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol Immunol*. 2002, 39:147-64.
- [97] Murata S, Yashiroda H, Tanaka K. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009, 10:104-15.



- [98] Gallastegui N, Groll M. The 26S proteasome: assembly and function of a destructive machine. *Trends Biochem Sci.* 2010, 35:634-42.
- [99] Besche HC, Peth A, Goldberg AL. Getting to first base in proteasome assembly. *Cell.* 2009, 138:25-8.
- [100] Jariel-Encontre I, Bossis G, Piechaczyk M. Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. *Biochim Biophys Acta.* 2008, 1786:153-77.
- [101] Baugh JM, Viktorova EG, Pilipenko EV. Proteasomes can degrade a significant proportion of cellular proteins independent of ubiquitination. *J Mol Biol.* 2009, 386:814-27.
- [102] Bedford L, Lowe J, Dick LR, Mayer RJ, Brownell JE. Ubiquitin-like protein conjugation and the ubiquitin-proteasome system as drug targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2011, 10:29-46.
- [103] Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell.* 2004, 6:203-8.
- [104] Amit S, Ben-Neriah Y. NF-kappaB activation in cancer: a challenge for ubiquitination- and proteasome-based therapeutic approach. *Semin Cancer Biol.* 2003, 13:15-28.
- [105] Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene.* 2006, 25:6680-4.
- [106] Bassères DS, Baldwin AS. Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene.* 2006, 25:6817-30.
- [107] Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 2004, 18:2195-224.
- [108] Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell.* 2002, 109 Suppl:S81-96.
- [109] Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell.* 2008, 132:344-62.
- [110] Wietek C, O'Neill LA. Diversity and regulation in the NF-kappaB system. *Trends Biochem Sci.* 2007, 32:311-9.
- [111] Gilmore TD, Herscovitch M. Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting. *Oncogene.* 2006, 25:6887-99.
- [112] Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007, 8:49-62.

- [113] Wu CJ, Conze DB, Li T, Srinivasula SM, Ashwell JD. Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation. *Nat Cell Biol.* 2006, 8:398-406.
- [114] Ea CK, Deng L, Xia ZP, Pineda G, Chen ZJ. Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell.* 2006, 22:245-57.
- [115] Sun SC. Non-canonical NF-kB signaling pathway. *Cell Res.* 2011, 21:71-85.
- [116] Wertz IE, Dixit VM. Signaling to NF-kappaB: regulation by ubiquitination. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010, 2:a003350.
- [117] Brzóska K, Szumiel I. Signalling loops and linear pathways: NF-kappaB activation in response to genotoxic stress. *Mutagenesis.* 2009, 24:1-8.
- [118] Wu ZH, Shi Y, Tibbetts RS, Miyamoto S. Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli. *Science.* 2006, 311:1141-6.
- [119] Wu ZH, Wong ET, Shi Y, Niu J, Chen Z, Miyamoto S, Tergaonkar V. ATM- and NEMO-dependent ELKS ubiquitination coordinates TAK1-mediated IKK activation in response to genotoxic stress. *Mol Cell.* 2010, 40:75-86.
- [120] Hadian K, Krappmann D. Signals from the nucleus: activation of NF-kappaB by cytosolic ATM in the DNA damage response. *Sci Signal.* 2011, 4:pe2.
- [121] Wuerzberger-Davis SM, Nakamura Y, Seufzer BJ, Miyamoto S. NF-kappaB activation by combinations of NEMO SUMOylation and ATM activation stresses in the absence of DNA damage. *Oncogene.* 2007, 26:641-51.
- [122] Newton K, Matsumoto ML, Wertz IE, Kirkpatrick DS, Lill JR, Tan J, Dugger D, Gordon N, Sidhu SS, Fellouse FA, Komuves L, French DM, Ferrando RE, Lam C, Compaan D, Yu C, Bosanac I, Hymowitz SG, Kelley RF, Dixit VM. Ubiquitin chain editing revealed by polyubiquitin linkage-specific antibodies. *Cell.* 2008, 134:668-78.
- [123] Baud V, Derudder E. Control of NF-kB Activity by Proteolysis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2011, 349:97-114.
- [124] Karin M, Yamamoto Y, Wang QM. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2004, 3:17-26.
- [125] Pacifico F, Leonardi A. NF-kappaB in solid tumors. *Biochem Pharmacol.* 2006, 72:1142-52.
- [126] Sasaki N, Morisaki T, Hashizume K, Yao T, Tsuneyoshi M, Noshiro H, Nakamura K, Yamanaka T, Uchiyama A, Tanaka M, Katano M. Nuclear factor-kappaB p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human gastric carcinoma tissue. *Clin Cancer Res.* 2001, 7:4136-42.

- [127] Karin M. Inflammation and cancer: the long reach of Ras. *Nat Med.* 2005, 11:20-1.
- [128] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002, 420:860-7.
- [129] Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature.* 2006, 441:431-6.
- [130] Keates S, Hitti YS, Upton M, Kelly CP. Helicobacter pylori infection activates NF-kappa B in gastric epithelial cells. *Gastroenterology.* 1997, 113:1099-109.
- [131] Maeda S, Yoshida H, Ogura K, Mitsuno Y, Hirata Y, Yamaji Y, Akanuma M, Shiratori Y, Omata M. H. pylori activates NF-kappaB through a signaling pathway involving IkappaB kinases, NF-kappaB-inducing kinase, TRAF2, and TRAF6 in gastric cancer cells. *Gastroenterology.* 2000, 119:97-108.
- [132] Glocker E, Lange C, Covacci A, Bereswill S, Kist M, Pahl HL. Proteins encoded by the cag pathogenicity island of Helicobacter pylori are required for NF-kappaB activation. *Infect Immun.* 1998, 66:2346-8.
- [133] Maeda S, Amarsanaa J, Mitsuno Y, Hirata Y, Akanuma M, Ikenoue T, Ogura K, Yoshida H, Shiratori Y, Omata M. Relationship between nuclear factor-kappaB activation and virulence factors of Helicobacter pylori in Japanese clinical isolates. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002, 17:556-62.
- [134] Suganuma M, Kurusu M, Suzuki K, Nishizono A, Murakami K, Fujioka T, Fujiki H. New tumor necrosis factor-alpha-inducing protein released from Helicobacter pylori for gastric cancer progression. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005, 131:305-13.
- [135] Yanai A, Maeda S, Shibata W, Hikiba Y, Sakamoto K, Nakagawa H, Ohmae T, Hirata Y, Ogura K, Muto S, Itai A, Omata M. Activation of IkappaB kinase and NF-kappaB is essential for Helicobacter pylori-induced chronic gastritis in Mongolian gerbils. *Infect Immun.* 2008, 76:781-7.
- [136] Tsujimoto H, Ono S, Ichikura T, Matsumoto Y, Yamamoto J, Hase K. Roles of inflammatory cytokines in the progression of gastric cancer: friends or foes? *Gastric Cancer.* 2010, 13:212-21.
- [137] Bersani F, Taulli R, Accornero P, Morotti A, Miretti S, Crepaldi T, Ponzetto C. Bortezomib-mediated proteasome inhibition as a potential strategy for the treatment of rhabdomyosarcoma. *Eur J Cancer.* 2008, 44:876-84.
- [138] Allen C, Saigal K, Nottingham L, Arun P, Chen Z, Van Waes C. Bortezomib-induced apoptosis with limited clinical response is accompanied by inhibition of canonical but not alternative nuclear factor- $\kappa$ B subunits in head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 2008, 14:4175-85.

- [139] Németh ZH, Wong HR, Odoms K, Deitch EA, Szabó C, Vizi ES, Haskó G. Proteasome inhibitors induce inhibitory kappa B (I kappa B) kinase activation, I kappa B alpha degradation, and nuclear factor kappa B activation in HT-29 cells. *Mol Pharmacol*. 2004, 65:342-9.
- [140] Hideshima T, Ikeda H, Chauhan D, Okawa Y, Raje N, Podar K, Mitsiades C, Munshi NC, Richardson PG, Carrasco RD, Anderson KC. Bortezomib induces canonical nuclear factor-kappaB activation in multiple myeloma cells. *Blood*. 2009, 114:1046-52.
- [141] Perkins ND. NF-kappaB: tumor promoter or suppressor? *Trends Cell Biol*. 2004, 14:64-9.
- [142] Luedde T, Beraza N, Kotsikoris V, van Loo G, Nenci A, De Vos R, Roskams T, Trautwein C, Pasparakis M. Deletion of NEMO/IKKgamma in liver parenchymal cells causes steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell*. 2007, 11:119-32.
- [143] Luedde T, Heinrichsdorff J, de Lorenzi R, De Vos R, Roskams T, Pasparakis M. IKK1 and IKK2 cooperate to maintain bile duct integrity in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008, 105:9733-8.
- [144] He G, Karin M. NF-κB and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer. *Cell Res*. 2011, 21:159-68.
- [145] Cvek B. Targeting malignancies with disulfiram (Antabuse): multidrug resistance, angiogenesis, and proteasome. *Curr Cancer Drug Targets*. 2011, 11:332-7.
- [146] Suh JJ, Pettinati HM, Kampman KM, O'Brien CP. The status of disulfiram: a half of a century later. *J Clin Psychopharmacol*. 2006, 26:290-302.
- [147] Williams, E. E. Effects of alcohol on workers with carbon disulfide. *JAMA* 1937, 109: 1472.
- [148] Vallari RC, Pietruszko R. Human aldehyde dehydrogenase: mechanism of inhibition of disulfiram. *Science*. 1982 May 7;216(4546):637-9.
- [149] Lewison EF. Spontaneous regression of breast cancer. *Progr Clin Biol Res* 1977, 12:47-53.
- [150] Hersh EM, Brewton G, Abrams D, Bartlett J, Galpin J, Gill P, et al. Ditiocarb sodium (diethyldithiocarbamate) therapy in patients with symptomatic HIV infection and AIDS. A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study. *JAMA*. 1991, 265:1538-44.
- [151] Cvek B. Failure of ditiocarb (diethyldithiocarbamate) therapy: was diet the reason? *Curr HIV Res*. 2009, 7:254.

- [152] Murthy MS, Rao LN, Khandekar JD, Scanlon EF. Enhanced therapeutic efficacy of cisplatin by combination with diethyldithiocarbamate and hyperthermia in a mouse model. *Cancer Res.* 1987, 47:774-9.
- [153] Perchellet JP, Abney NL, Thomas RM, Perchellet EM, Maatta EA. Inhibition of multistage tumor promotion in mouse skin by diethyldithiocarbamate. *Cancer Res.* 1987, 47:6302-9.
- [154] Dufour P, Lang JM, Giron C, Duclos B, Haehnel P, Jaeck D, Jung JM, Oberling F. Sodium dithiocarbamate as adjuvant immunotherapy for high risk breast cancer: a randomized study. *Biotherapy.* 1993, 6:9-12.
- [155] Cvek B, Dvorak Z. Targeting of nuclear factor-kappaB and proteasome by dithiocarbamate complexes with metals. *Curr Pharm Des.* 2007, 13:3155-67.
- [156] Kim CH, Kim JH, Moon SJ, Hsu CY, Seo JT, Ahn YS. Biphasic effects of dithiocarbamates on the activity of nuclear factor-kappaB. *Eur J Pharmacol.* 2000, 392:133-6.
- [157] Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer.* 2005, 5:297-309.
- [158] Li F, Sethi G. Targeting transcription factor NF-kappaB to overcome chemoresistance and radioresistance in cancer therapy. *Biochim Biophys Acta.* 2010, 1805:167-80.
- [159] Wang W, McLeod HL, Cassidy J. Disulfiram-mediated inhibition of NF-kappaB activity enhances cytotoxicity of 5-fluorouracil in human colorectal cancer cell lines. *Int J Cancer.* 2003, 104:504-11.
- [160] Guo X, Xu B, Pandey S, Goessl E, Brown J, Armesilla AL, Darling JL, Wang W. Disulfiram/copper complex inhibiting NF-kappaB activity and potentiating cytotoxic effect of gemcitabine on colon and breast cancer cell lines. *Cancer Lett.* 2010, 290:104-13.
- [161] Morais C, Gobe G, Johnson DW, Healy H. Inhibition of nuclear factor kappa B transcription activity drives a synergistic effect of pyrrolidine dithiocarbamate and cisplatin for treatment of renal cell carcinoma. *Apoptosis.* 2010, 15:412-25.
- [162] Arlt A, Vorndamm J, Breitenbroich M, Fölsch UR, Kalthoff H, Schmidt WE, Schäfer H. Inhibition of NF-kappaB sensitizes human pancreatic carcinoma cells to apoptosis induced by etoposide (VP16) or doxorubicin. *Oncogene.* 2001, 20:859-68.
- [163] Mabuchi S, Ohmichi M, Nishio Y, Hayasaka T, Kimura A, Ohta T, Saito M, Kawagoe J, Takahashi K, Yada-Hashimoto N, Sakata M, Motoyama T, Kurachi H, Tasaka K, Murata Y. Inhibition of NF-kappaB increases the efficacy of cisplatin in in vitro and in vivo ovarian cancer models. *J Biol Chem.* 2004, 279:23477-85.

- [164] Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*. 2002, 2:48-58.
- [165] Fletcher JI, Haber M, Henderson MJ, Norris MD. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat Rev Cancer*. 2010, 10:147-56.
- [166] Higgins CF. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature*. 2007, 446:749-57.
- [167] Sauna ZE, Shukla S, Ambudkar SV. Disulfiram, an old drug with new potential therapeutic uses for human cancers and fungal infections. *Mol Biosyst*. 2005, 1:127-34.
- [168] Loo TW, Clarke DM. Blockage of drug resistance in vitro by disulfiram, a drug used to treat alcoholism. *J Natl Cancer Inst*. 2000, 92:898-902.
- [169] Sauna ZE, Peng XH, Nandigama K, Tekle S, Ambudkar SV. The molecular basis of the action of disulfiram as a modulator of the multidrug resistance-linked ATP binding cassette transporters MDR1 (ABCB1) and MRP1 (ABCC1). *Mol Pharmacol*. 2004, 65:675-84.
- [170] Cho HJ, Lee TS, Park JB, Park KK, Choe JY, Sin DI, Park YY, Moon YS, Lee KG, Yeo JH, Han SM, Cho YS, Choi MR, Park NG, Lee YS, Chang YC. Disulfiram suppresses invasive ability of osteosarcoma cells via the inhibition of MMP-2 and MMP-9 expression. *J Biochem Mol Biol*. 2007, 40:1069-76.
- [171] Shian SG, Kao YR, Wu FY, Wu CW. Inhibition of invasion and angiogenesis by zinc-chelating agent disulfiram. *Mol Pharmacol*. 2003, 64:1076-84.
- [172] Marikovsky M, Nevo N, Vadai E, Harris-Cerruti C. Cu/Zn superoxide dismutase plays a role in angiogenesis. *Int J Cancer*. 2002, 97:34-41.
- [173] Gu JW, Young E, Busby B, Covington J, Tan W, Johnson JW. Oral administration of pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) inhibits VEGF expression, tumor angiogenesis and growth of breast cancer in female mice. *Cancer Biol Ther*. 2009, 8:514-521.
- [174] Chen D, Cui QC, Yang H, Dou QP. Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug and copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures and xenografts via inhibition of the proteasome activity. *Cancer Res*. 2006, 66:10425-33.
- [175] Daniel KG, Chen D, Orlu S, Cui QC, Miller FR, Dou QP. Cloroquinol and pyrrolidine dithiocarbamate complex with copper to form proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res*. 2005, 7:R897-908.
- [176] Chen D, Peng F, Cui QC, Daniel KG, Orlu S, Liu J, Dou QP. Inhibition of prostate cancer cellular proteasome activity by a pyrrolidine dithiocarbamate-

copper complex is associated with suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Front Biosci.* 2005, 10:2932-9.

- [177] Kim I, Kim CH, Kim JH, Lee J, Choi JJ, Chen ZA, Lee MG, Chung KC, Hsu CY, Ahn YS. Pyrrolidine dithiocarbamate and zinc inhibit proteasome-dependent proteolysis. *Exp Cell Res.* 2004, 298:229-38.
- [178] Milacic V, Chen D, Giovagnini L, Diez A, Fregona D, Dou QP. Pyrrolidine dithiocarbamate-zinc(II) and -copper(II) complexes induce apoptosis in tumor cells by inhibiting the proteasomal activity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008, 231:24-33.
- [179] Milacic V, Chen D, Ronconi L, Landis-Piwowar KR, Fregona D, Dou QP. A novel anticancer gold(III) dithiocarbamate compound inhibits the activity of a purified 20S proteasome and 26S proteasome in human breast cancer cell cultures and xenografts. *Cancer Res.* 2006, 66:10478-86.
- [180] Lövborg H, Oberg F, Rickardson L, Gullbo J, Nygren P, Larsson R. Inhibition of proteasome activity, nuclear factor-KappaB translocation and cell survival by the antialcoholism drug disulfiram. *Int J Cancer.* 2006, 118:1577-80.
- [181] 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, 51:6256-8.
- [182] Verma R, Aravind L, Oania R, McDonald WH, Yates JR 3rd, Koonin EV, Deshaies RJ. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science.* 2002, 298:611-5.
- [183] Gallery M, Blank JL, Lin Y, Gutierrez JA, Pulido JC, Rappoli D, Badola S, Rolfe M, Macbeth KJ. The JAMM motif of human deubiquitinase Pdh1 is essential for cell viability. *Mol Cancer Ther.* 2007, 6:262-8.
- [184] Koulich E, Li X, DeMartino GN. Relative structural and functional roles of multiple deubiquitylating proteins associated with mammalian 26S proteasome. *Mol Biol Cell.* 2008, 19:1072-82.
- [185] Byrne A, McLaren RP, Mason P, Chai L, Dufault MR, Huang Y, Liang B, Gans JD, Zhang M, Carter K, Gladysheva TB, Teicher BA, Biemann HP, Booker M, Goldberg MA, Klinger KW, Lillie J, Madden SL, Jiang Y. Knockdown of human deubiquitinase PSMD14 induces cell cycle arrest and senescence. *Exp Cell Res.* 2010, 316:258-71.
- [186] Kwak J, Workman JL, Lee D. The proteasome and its regulatory roles in gene expression. *Biochim Biophys Acta.* 2011, 1809:88-96.
- [187] Ambroggio XI, Rees DC, Deshaies RJ. JAMM: a metalloprotease-like zinc site in the proteasome and signalosome. *PLoS Biol.* 2004, 2:E2.

- [188] Kato JY, Yoneda-Kato N. Mammalian COP9 signalosome. *Genes Cells*. 2009, 14:1209-25.
- [189] Petroski MD, Deshaies RJ. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005, 6:9-20.
- [190] Cope GA, Suh GS, Aravind L, Schwarz SE, Zipursky SL, Koonin EV, Deshaies RJ. Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cull1. *Science*. 2002, 298:608-11.
- [191] Cope GA, Deshaies RJ. COP9 signalosome: a multifunctional regulator of SCF and other cullin-based ubiquitin ligases. *Cell*. 2003, 114:663-71.
- [192] Dornan D, Wertz I, Shimizu H, Arnott D, Frantz GD, Dowd P, O'Rourke K, Koeppen H, Dixit VM. The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. *Nature*. 2004, 429:86-92.
- [193] Bech-Otschir D, Seeger M, Dubiel W. The COP9 signalosome: at the interface between signal transduction and ubiquitin-dependent proteolysis. *J Cell Sci*. 2002, 115:467-73.
- [194] Tomoda K, Kubota Y, Kato J. Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature*. 1999, 398:160-5.
- [195] Tomoda K, Kubota Y, Arata Y, Mori S, Maeda M, Tanaka T, Yoshida M, Yoneda-Kato N, Kato JY. The cytoplasmic shuttling and subsequent degradation of p27Kip1 mediated by Jab1/CSN5 and the COP9 signalosome complex. *J Biol Chem*. 2002, 277:2302-10.
- [196] Richardson KS, Zundel W. The emerging role of the COP9 signalosome in cancer. *Mol Cancer Res*. 2005, 3:645-53.
- [197] Fukumoto A, Tomoda K, Yoneda-Kato N, Nakajima Y, Kato JY. Depletion of Jab1 inhibits proliferation of pancreatic cancer cell lines. *FEBS Lett*. 2006, 580:5836-44.
- [198] Adler AS, Littlepage LE, Lin M, Kawahara TL, Wong DJ, Werb Z, Chang HY. CSN5 isopeptidase activity links COP9 signalosome activation to breast cancer progression. *Cancer Res*. 2008, 68:506-15.
- [199] Brar SS, Grigg C, Wilson KS, Holder WD Jr, Dreau D, Austin C, Foster M, Ghio AJ, Whorton AR, Stowell GW, Whittall LB, Whittle RR, White DP, Kennedy TP. Disulfiram inhibits activating transcription factor/cyclic AMP-responsive element binding protein and human melanoma growth in a metal-dependent manner in vitro, in mice and in a patient with metastatic disease. *Mol Cancer Ther*. 2004, 3:1049-60.
- [200] Iljin K, Ketola K, Vainio P, Halonen P, Kohonen P, Fey V, Grafström RC, Perälä M, Kallioniemi O. High-throughput cell-based screening of 4910 known



- drugs and drug-like small molecules identifies disulfiram as an inhibitor of prostate cancer cell growth. *Clin Cancer Res.* 2009, 15:6070-8.
- [201] Li Q, Yu YY, Zhu ZG, Ji YB, Zhang Y, Liu BY, Chen XH, Lin YZ. Effect of NF-kappaB constitutive activation on proliferation and apoptosis of gastric cancer cell lines. *Eur Surg Res.* 2005, 37:105-10.
- [202] <http://www.cancer.gov/clinicaltrials> (květen 2011)
- [203] Cvek B. Antabuse (disulfiram) as a pilot case of nonprofit drug. *Int J Cancer.* 2010, 127:2486.
- [204] Cvek B. Nonprofit drugs as the salvation of the world's healthcare systems: the case of Antabuse (disulfiram). *Drug Discov Today.* 2011, *in press.*
- [205] Pammolli F, Magazzini L, Riccaboni M. The productivity crisis in pharmaceutical R&D. *Nat Rev Drug Discov.* 2011, 10:428-38.
- [206] Munos B. Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. *Nat Rev Drug Discov.* 2009, 8:959-68.
- [207] Mullard A. 2010 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Discov.* 2011, 10:82-5.
- [208] Hait WN. Anticancer drug development: the grand challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2010, 9:253-4.
- [209] Arrowsmith J. Trial watch: Phase II failures: 2008-2010. *Nat Rev Drug Discov.* 2011, 10:328-9.
- [210] Arrowsmith J. Trial watch: phase III and submission failures: 2007-2010. *Nat Rev Drug Discov.* 2011 Feb;10(2):87.
- [211] Orloff J, Douglas F, Pinheiro J, Levinson S, Branson M, Chaturvedi P, Ette E, Gallo P, Hirsch G, Mehta C, Patel N, Sabir S, Springs S, Stanski D, Evers MR, Fleming E, Singh N, Tramontin T, Golub H. The future of drug development: advancing clinical trial design. *Nat Rev Drug Discov.* 2009, 8:949-57.
- [212] Boguski MS, Mandl KD, Sukhatme VP. Drug discovery. Repurposing with a difference. *Science.* 2009, 324:1394-5.
- [213] Chong CR, Sullivan DJ Jr. New uses for old drugs. *Nature.* 2007, 448:645-6.
- [214] Arastu-Kapur S, Anderl JL, Kraus M, Parlati F, Shenk KD, Lee SJ, Muchamuel T, Bennett MK, Driessen C, Ball AJ, Kirk CJ. Nonproteasomal targets of the proteasome inhibitors bortezomib and carfilzomib: a link to clinical adverse events. *Clin Cancer Res.* 2011, 17:2734-43.
- [215] Keiser MJ, Setola V, Irwin JJ, Laggner C, Abbas AI, Hufeisen SJ, Jensen NH, Kuijter MB, Matos RC, Tran TB, Whaley R, Glennon RA, Hert J, Thomas KL,

- Edwards DD, Shoichet BK, Roth BL. Predicting new molecular targets for known drugs. *Nature*. 2009, 462:175-81.
- [216] Mullard A. Could pharma open its drug freezers? *Nat Rev Drug Discov*. 2011, 10:399-400.
- [217] Collins FS. Mining for therapeutic gold. *Nat Rev Drug Discov*. 2011, 10:397.
- [218] Rimbara E, Fischbach LA, Graham DY; Medscape. Optimal therapy for *Helicobacter pylori* infections. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011, 8:79-88.
- [219] Matter A, Keller TH. Impact of non-profit organizations on drug discovery: opportunities, gaps, solutions. *Drug Discov Today*. 2008, 13:347-52.
- [220] Cohen J. Global health. Public-private partnerships proliferate. *Science*. 2006, 311:167.
- [221] <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00742911> (květen 2011)
- [222] <http://www.global-cures.org/> (květen 2011)
- [223] Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*. 2006, 3:e442.
- [224] Cvek B. Antabuse repurposing: We need more knowledge and wide international support. *Int J Cancer*. 2011, 129:1286-7.
- [225] [http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=11012005&collection=ecacc\\_gc](http://www.hpacultures.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=11012005&collection=ecacc_gc) (březen 2012)
- [226] Hatok J, Babusikova E, Matakova T, Mistuna D, Dobrota D, Racay P. In vitro assays for the evaluation of drug resistance in tumor cells. *Clin Exp Med*. 2009, 9:1-7.
- [227] Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011, 283:65-87.
- [228] Mullard A. Next-generation proteasome blockers promise safer cancer therapy. *Nat Med*. 2012, 18:7.
- [229] D'Arcy P, Brnjic S, Olofsson MH, Fryknäs M, Lindsten K, De Cesare M, Perego P, Sadeghi B, Hassan M, Larsson R, Linder S. Inhibition of proteasome deubiquitinating activity as a new cancer therapy. *Nat Med*. 2011, 17:1636-40.
- [230] Johansson B. A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of disulfiram and its metabolites. *Acta Psychiatr Scand Suppl*. 1992;369:15-26.
- [231] Johansson B, Stankiewicz Z. Bis-(diethyldithiocarbamate) copper complex: a new metabolite of disulfiram? *Biochem Pharmacol*. 1985, 34:2989-91.

- [232] Mgr. Boris Cvek, Ph.D., nepublikované výsledky
- [233] Nitti D, Belluco C, Mammano E, Marchet A, Ambrosi A, Mencarelli R, Segato P, Lise M. Low level of p27(Kip1) protein expression in gastric adenocarcinoma is associated with disease progression and poor outcome. *J Surg Oncol.* 2002, 81:167-76.
- [234] Masuda TA, Inoue H, Sonoda H, Mine S, Yoshikawa Y, Nakayama K, Nakayama K, Mori M. Clinical and biological significance of S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) gene expression in gastric carcinoma: modulation of malignant phenotype by Skp2 overexpression, possibly via p27 proteolysis. *Cancer Res.* 2002, 62:3819-25.
- [235] Eguchi H, Herschenhou N, Kuzushita N, Moss SF. Helicobacter pylori increases proteasome-mediated degradation of p27(kip1) in gastric epithelial cells. *Cancer Res.* 2003, 63:4739-46.
- [236] Wen S, So Y, Singh K, Slingerland JM, Resnick MB, Zhang S, Ruiz V, Moss SF. Promotion of cytoplasmic mislocalization of p27 by Helicobacter pylori in gastric cancer. *Oncogene.* 2011, *in press.*
- [237] Jin S, Wu M, Cao H, Ying S, Hua J, Chen Y. p27(kip1) Upregulated by hnRNPC1/2 Antagonizes CagA (a Virulence Factor of Helicobacter pylori)-Mediated Pathogenesis. *Helicobacter.* 2012, 17:140-7.
- [238] Lee J, Zhou P. Cullins and cancer. *Genes Cancer.* 2010, 1:690-9.
- [239] Kouvaraki MA, Korapati AL, Rassidakis GZ, Tian L, Zhang Q, Chiao P, Ho L, Evans DB, Claret FX. Potential role of Jun activation domain-binding protein 1 as a negative regulator of p27kip1 in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2006, 66:8581-9.
- [240] Pan Y, Zhang Q, Tian L, Wang X, Fan X, Zhang H, Claret FX, Yang H. Jab1/CSN5 Negatively Regulates p27 and Plays a Role in the Pathogenesis of Nasopharyngeal Carcinoma. *Cancer Res.* 2012, *in press.*
- [241] Wee S, Geyer RK, Toda T, Wolf DA. CSN facilitates Cullin-RING ubiquitin ligase function by counteracting autocatalytic adapter instability. *Nat Cell Biol.* 2005, 7:387-91.
- [242] Bai J, Zhou Y, Chen G, Zeng J, Ding J, Tan Y, Zhou J, Li G. Overexpression of Cullin1 is associated with poor prognosis of patients with gastric cancer. *Hum Pathol.* 2011, 42:375-83.
- [243] Soucy TA, Dick LR, Smith PG, Milhollen MA, Brownell JE. The NEDD8 Conjugation Pathway and Its Relevance in Cancer Biology and Therapy. *Genes Cancer.* 2010, 1:708-16.

- [244] Noguchi K, Okumura F, Takahashi N, Kataoka A, Kamiyama T, Todo S, Hatakeyama S. TRIM40 promotes neddylation of IKK $\gamma$  and is downregulated in gastrointestinal cancers. *Carcinogenesis*. 2011, 32:995-1004.
- [245] Chan Y, Yoon J, Wu JT, Kim HJ, Pan KT, Yim J, Chien CT. DEN1 deneddylates non-cullin proteins in vivo. *J Cell Sci*. 2008, 121:3218-23.

## 9 SEZNAM ZKRATEK

19S RP	Regulační část proteazomu
20S CP	Základní část (Core Particle) proteazomu
5-FU	Fluoruracil
ABC	ATP-binding Cassette
AMP	Adenosinmonofosfát
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adenosintrifosfát
AURKA	Aurora kináza A
<i>cag</i>	Cytotoxic-associated Antigen
CDK	Cyklin dependentní kináza
CHK1/2	Check-point kináza 1/2
CML	Chronická myeloidní leukémie
CRL	Cullin-RING ubikvitin E3 ligázy
Cu(EtDTC) <sub>2</sub>	Bis-(diethyldithiokarbamát) měďnatý komplex
Cu(PDTC) <sub>2</sub>	Pyrrolidindithiokarbamát měďnatý komplex
DDTC	Diethyldithiokarbamát
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DSB	Dvouřetězcové zlomy DNA
DUB	Deubikvitináza
EGF	Epidermální růstový faktor
EGRF	Epidermální receptor růstového faktoru
ELKS	Protein bohatý na glutamát (E), leucin (L), lyzin (K) a serin (S)
EMA	European Medicines Agency
ERK1/2	Extracelulární signál regulující kináza
FBS	Fetální bovinní sérum
FDA	Food and Drug Administration

HCC	Hepatocelulární karcinom jater
HECT	Homologous to E6-Associated Protein C-Terminus
HER-2	Receptor 2 lidského epidermálního růstového faktoru
HIV	Human Immunodeficiency Virus
Hsp90	Protein teplotního šoku 90
IC <sub>50</sub>	Half Maximal Inhibitory Concentration
IκB	Inhibitor κB
IKK	IκB kináza
IL-1/8	Interleukin 1/8
Jab1/CNS5	Jun activating binding protein / COP9 signalosome subunit 5
JAMM	Jab1/MPN/Mov34 metaloenzym doména
MDR	Mnohočetná léková rezistence
MDR1	Multidrug Resistance Protein1
MHC1	Hlavní histokompatibilní komplex 1
MJD	proteázy Machadovy-Josephovy nemoci
MMP	Matrix metaloproteináza
MRP1	Multidrug Resistance-associated Protein1
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid
MXR	Mitoxantrone-resistance Protein
NCI	National Cancer Institute
NEDD8	Neural Precursor Cell Expressed Developmentally Down-regulated 8
NEMO	NF-κB Essential Modulator
NES	Jaderná exportní sekvence
NF-κB	Jaderný faktor κB
NIH	National Institutes of Health
NLS	Jaderná lokalizační sekvence
OTU	proteázy vaječnickových tumorů
PA	Proteazomová aktivátor
PAI	Pathogenicity Island

PDTC	Pyrrolidindithiokarbamát
PGP	Permeability glokoprotein
polyUb	Polyubikvitinový řetězec
R&D	Výzkum a vývoj
Rb	Retinoblastomový protein
RHD	Rel Homology Domain
RING	Really Interesting New Gene
RIP1	Receptor Interacting Protein
RNA	Ribonukleová kyselina
RNAi	RNA interference
Rpn	Podjednotka regulační části proteazomu (Regulatory Particle non-ATPase)
Rpt ATPase)	Podjednotka regulační části proteazomu (Regulatory Particle Triple-A ATPase)
SCF	Skp1/Cullin/F-box E3 ligáza
SRCC	Signet-ring Cell Carcinoma
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
TAK1	Transforming Growth Factor $\beta$ -activated Kinase
TLR	Toll-like Receptor
TNF- $\alpha$	Tumor nekrotizující faktor $\alpha$
UCH	Ubikvitin C-terminální hydrolázy
UICC	Union for International Cancer Control
UMP1	Ubikvitinační maturační protein 1
UPS	Ubikvitin-proteazomový systém
USD	Americký dolar
USP	ubikvitin specifické proteázy
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor
VEGFR	Receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru
WHO	World Health Organization
Zn(EtDTC) <sub>2</sub>	Bis-(diethyldithiokarbamát) zinečnatý komplex
Zn(PDTC) <sub>2</sub>	Pyrrolidindithiokarbamát zinečnatý komplex

## 10 PŘÍLOHY

Téma bakalářské práce, tedy protirakovinná aktivita komplexu disulfiramů s mědí, je dále rozvíjeno na teoretické i praktické úrovni. Příkladem může být článek *Diethyldithiocarbamate complex with copper: the mechanism of action in cancer cells* odeslaný do mezinárodního imapktovaného časopisu *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*. Tento článek úspěšně prošel oponentským řízením a nyní čeká na závěrečné úpravy.

Laboratorní výzkum se bude rozvíjet v rámci spolupráce se skupinou prof. Q Ping Doua z Barbara Ann Karmanos Cancer Institute v Detroitu, jehož zvací dopis na tříměsíční stáž je zde přiložen.



B A R B A R A A N N  
**KARMANOS**  
CANCER INSTITUTE  
Wayne State University

December 2, 2011

Mr. Zdenek Skrott  
Ruzdka 352  
756 25  
Czech Republic

Dear Mr. Skrott,

I am writing to invite you to join my laboratory from June 18<sup>th</sup>, 2012 to September 12<sup>th</sup>, 2012. You will participate in a joint research collaborative project that has been established between Dr. Boris Cvek at Department of Cell Biology and Genetics, Palacký University and myself in the Department of Oncology and Karmanos Cancer Institute, School of Medicine at Wayne State University (WSU). In my understanding, this joint research project is also a part of your M.S. thesis at the Palacký University. This collaboration has been established and Dr. Cvek and I have been working together for four years.

I have interacted with you for several times. I was impressed by your English and believe that you should have no problems communicating with co-workers in my laboratory and our department. I also believe that you have obtained good training in basic lab skills and knowledge required for your research project.

During the time you stay in Wayne State University, you will not pay any tuition to WSU since you are not a Wayne State University graduate student. I also understand that Dr. Cvek's research grant (2011-2014 OP VK CZ.1.07/2.3.00/20.0062) will cover your round trip tickets and living expenses while you stay at Detroit.

I look forward to welcoming you in my laboratory in the near future!

Sincerely yours,



Qing Ping Dou, Ph.D.  
Professor and Co-Leader  
Developmental Therapeutics Program  
Barbara Ann Karmanos Cancer Institute  
Departments of Oncology, Pharmacology and Pathology  
School of Medicine  
Wayne State University  
540.1 Hudson Webber Cancer Research Building  
Mail code HW05AO  
4100 John R Road  
Detroit, MI 48201-2013  
Tel: 313-576-8301 (Office); 313-576-8299 (Adm. Assistant); 313-576-8264, -8248, -8249 (Lab)  
Fax: 313-576-8307 (Office); 313-576-8928 (Adm. Assistant)  
E-mail: [doup@karmanos.org](mailto:doup@karmanos.org)

4100 John R  
Detroit, Michigan 48201  
1-800-KARMANOS (1-800-527-6266)  
[info@karmanos.org](mailto:info@karmanos.org) | [www.karmanos.org](http://www.karmanos.org)



# Diethyldithiocarbamate complex with copper: the mechanism of action in cancer cells

Zdenek Skrott\* and Boris Cvek

Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Slechtitelu 11, 78371 Olomouc, Czech Republic

*Correspondence:* Zdenek Skrott, Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Slechtitelu 11, 78371 Olomouc, Czech Republic. Tel: 420 585634901, Fax: 420 585634905, E-mail: [zdenek.skrott@centrum.cz](mailto:zdenek.skrott@centrum.cz)

## **ABSTRACT**

The idea of “repurposing” of existing drugs provides an effective way to develop and identify new therapies. Disulfiram (Antabuse), a drug commonly used for the treatment of alcoholism, shows promising anticancer activity in both preclinical and clinical studies. In the human body, disulfiram is rapidly converted to its reduced metabolite, diethyldithiocarbamate. If copper ions are available, a bis(diethyldithiocarbamate)-copper(II) complex is formed. Disulfiram’s selective anticancer activity is attributed to the copper(II) complex’s ability to inhibit the cellular proteasome. It is assumed that the complex inhibits the proteasome by a mechanism that is distinct to the clinically used drug bortezomib, targeting the 19S rather than

the 20S proteasome. This difference could be explained by inhibition of the JAMM domain of the POH1 subunit within the lid of the 19S proteasome.

**Keywords:** Breast cancer, Copper, Disulfiram, JAMM domain, Proteasome

## INTRODUCTION

Disulfiram (Antabuse, tetraethylthiuram disulfide) has been used worldwide for alcohol aversion therapy since the 1950s [1], although the reason for its efficacy, i.e., aldehyde dehydrogenase inhibition, was not fully understood until many years later [2]. Dr. E.F. Lewison discovered another clinically important application of disulfiram in 1977 [3]. He observed complete remission of a metastatic breast cancer tumor in a severely alcoholic patient taking disulfiram. The anticancer activity of disulfiram has been confirmed in further studies; it was shown to suppress the progression of chemically induced cancers of the forestomach, large intestine [4] and urinary bladder [5-6] in rats. Additionally, in a phase II placebo-controlled clinical trial, the main metabolite of disulfiram, diethyldithiocarbamate (EtDTC), known as ditiocarb, was successfully used as an adjuvant therapy for non-metastatic, high-risk breast cancer [7]. There are many possible explanations for disulfiram's effectiveness as a cancer therapeutic [8]. First, disulfiram, and consequently EtDTC, are potent inhibitors of nuclear-factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), a key pro-survival factor in cancer cells [9-10]. In fact, disulfiram-mediated inhibition of NF- $\kappa$ B led to increased cytotoxicity of 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines [11]. Second, disulfiram can overcome multidrug resistance by directly targeting P-glycoprotein and its maturation [12-13]. Moreover,

disulfiram is able to attenuate key phenomena that are closely related to tumor progression, including both angiogenesis and cell invasion [14-15].

Interestingly, recent studies [16-17] have shown that the anticancer activity of disulfiram increases considerably in the presence of copper or zinc ions *in vitro* as well as *in vivo* [18]. The simultaneous oral administration of zinc gluconate and disulfiram induced significant reduction in hepatic metastasis and clinical remission in patient with metastatic ocular melanoma [18]. Likewise, the addition of cupric ions potentiated a chemosensitizing effect of disulfiram on conventional chemotherapeutic agents in breast, colon [19] and leukemia cancer cell lines [20]. The potent antitumor activity is attributed to the complex [17, 21] formed from the reaction between disulfiram (or EtDTC) and bivalent copper or zinc [17, 21]. However, the exact mechanism of action of the complex that is involved in its toxicity against cancer cells is unknown. Many published studies aiming to elucidate the mechanism of action of the complex rely on various mixtures of EtDTC or pyrrolidine dithiocarbamate (PyDTC) and metal ions [22-27]. The use of mixtures with undefined stoichiometry instead of synthetic and thoroughly characterized complexes provides an extra challenge and makes difficult the assessment of results.

## **COMPLEX FORMATION IN THE HUMAN BODY**

Following ingestion, disulfiram is rapidly converted to its reduced metabolite EtDTC in the acidic environment of the stomach or in the bloodstream by the glutathione reductase system of erythrocytes [28]. It is well established that EtDTC is able to form coordination complexes with various transitions metal ions, including copper(II) and zinc(II) [29]. If cupric ions are available, the bis(diethyldithiocarbamate)-copper complex ( $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ ) is formed in the human body (Fig. 1.) [28]. Moreover, EtDTC is able to sequester copper ions from the active

site of superoxide dismutase, forming the  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  complex [30-31]. Similarly, disulfiram added to fresh blood and plasma reacts with cupric ions bound to plasma proteins to form the  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  complex. The *in vivo* formation of the complex in patients taking disulfiram has also been observed. Low concentrations of the complex in the plasma obtained from patients treated with disulfiram may be due to the lipophilic character of the complex resulting in its distribution through the cell membrane or its decomposition into tissue [32]. Because  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  is a lipophilic and stable compound, it is the most absorbed form of disulfiram [33]. In addition, 30 min after intraperitoneal injection of EtDTC (500 mg/kg), EtDTC was shown to chelate copper ions *in vivo*, form the  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  complex and permeate the blood-brain barrier in rats [34]. Consequently, administration of EtDTC or disulfiram in animals resulted in copper accumulation in several tissues, including the nervous system [35-37]. In addition, disulfiram markedly increased the *in vitro* intracellular copper content in primary astrocytes [23] and melanoma cells, which thereby induced apoptosis in the melanoma cells but not in normal melanocytes [16]. It is suggested that  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  selective toxicity to cancer cells is caused by its ability to inhibit the cellular proteasome [17, 21]. Nevertheless, further experiments using synthetic  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  rather than mixtures of disulfiram or EtDTC and metals are needed to uncover the exact mechanism involved in its antineoplastic and apoptosis-inducing effect.

## **BIOLOGICAL EFFECTS OF A MIXTURE OF DIETHYLDITHIOCARBAMATE AND COPPER(II)**

Although it is more suitable to utilize a discrete and thoroughly characterized substance [38], mixtures of ligand and metal ions have been employed in several studies [23-27]. This

practice leads to difficulty in determining what causes the observed results (the complex, the ligand or the metal and products of their reactions with other chemicals in the medium), especially when nonstoichiometric amounts that deviate from the optimal (i.e., 2:1 ligand to copper) molar ratio are used [23-24, 27]. Importantly, both EtDTC (or disulfiram) and copper ions are highly reactive compounds with pleiotropic effects on cell metabolism and survival [39-40]. In accordance with a disruption in the redox balance, which has been observed after applying a EtDTC-Cu(II) mixture [22-23] or a PyDTC-Cu(II) mixture [24], both dithiocarbamates and the metal alone exhibit strong oxidative activity [41-42]. Furthermore, it is well known that EtDTC and disulfiram are potent inhibitors of the essential antioxidant enzyme, CuZn superoxide dismutase (SOD-1) [30-31, 43-45], which markedly increases the level of reactive oxygen species (ROS), namely, superoxide radical ( $O_2^{\cdot-}$ ), in the cell [46-47]. An elevation of the cellular superoxide concentration induced by EtDTC has been reported to be responsible for stimulating pro-apoptotic bax mRNA expression, causing subsequent apoptosis in rat cardiac myocytes [48] and triggering apoptosis in vascular smooth muscle cells [49]. Consequently, SOD inhibition caused free radical-mediated damage to mitochondrial membranes, the release of cytochrome c and apoptosis of cancer cells; thus, utilizing SOD as a target for the selective killing of cancer cells has already been proposed [45, 50].

Another important guard of cell redox homeostasis, with which EtDTC interacts, is the glutathione system. As the most abundant non-protein thiol, glutathione (GSH) has important roles in redox regulation and apoptosis [51]. Under oxidizing conditions, GSH is oxidized to its disulphide form, GSSH, and the GSH/GSSH ratio decreases. GSSH can be reduced back to GSH by glutathione reductase (GR) [52]. According to published studies, both the EtDTC-Cu(II) and PyDTC-Cu(II) mixtures depleted GSH content, thereby increasing free radical

production in primary astrocytes and HL-60 cells [23-24]. Importantly, the studies report that dithiocarbamates *per se* have similar effects. Disulfiram was found to rapidly decrease GSH levels *in vitro* [53], and disulfiram administration in rat brains caused GSH decline with a concomitant increase in GSSH levels [54-55], formation of disulfiram-glutathione conjugates [56] and inhibition of GR activity [54-55]. PyDTC has shown an analogous impact on GSH content *in vivo* [57]. In contrast, another study [58] showed that a high dose of disulfiram (200  $\mu$ M) significantly increases GR activity in a cell-free system, and despite their pro-oxidative properties, dithiocarbamates have long been used as antioxidants [59-61]. These evident discrepancies on the impact of disulfiram on GR activity are most likely caused by the distinct conditions of each experiment because GR could be inhibited by some metabolite of disulfiram, which is unlikely in a cell-free system [32]. Furthermore, the effect of dithiocarbamates has been shown to be dependent on cell type [62], concentration [63], medium [64-65], presence of Cu(II) or Zn(II) [62] and even the density of the cell cultures [62, 64].

Apart from dithiocarbamates, copper ions also interact with GSH to form a redox-active complex [66-68], and even low concentrations (10  $\mu$ M) of copper(II) can decrease the GSH content [69] of the cell. GSH depletion is often considered a byproduct of oxidative stress during the process of cell death; recent discoveries suggest that GSH depletion is a critical regulator of apoptosis [70], and GSH depletion was observed independently of ROS during apoptosis [71]. Thus, a proper explanation of the above-mentioned results cannot be based only on the decrease of GSH levels, and is likely more complex than oxidative stress. Furthermore, co-treatment of the cell with an EtDTC-Cu(II) mixture or a PyDTC-Cu(II) mixture and N-acetylcysteine (NAC), a precursor of GSH, was less sufficient at inducing apoptosis [23-24]; however NAC has also been shown to block intracellular accumulation of

copper [64] that potentiates the toxicity of dithiocarbamates [16, 22-23, 72]. Despite acting as a potent antioxidant, it is possible that NAC directly modifies certain signaling proteins and promotes cell growth and survival pathways [73]. Hence, the suggestion that oxidative stress is important in the process of apoptosis based on the role of GSH and NAC role might be misleading.

The exact mechanism involved in the production of ROS in response to an EtDTC-Cu(II) mixture remains a largely open question. It is well established that copper(II) ions are able to induce ROS formation via Fenton reactions [74]. In the presence of superoxide or cellular reductants, the cupric ion can be reduced to cuprous ion, which is capable of catalyzing the generation of hydroxyl radicals [74]. However, EtDTC has been shown to inhibit significantly copper-catalyzed ROS generation via the Fenton reaction in human cerebrospinal fluid [75]. In addition, because it is highly redox active, any intracellular free copper is likely limited to far less than one free copper ion per cell, suggesting extensive copper-chelating overcapacity in the cell [76].

We propose yet another possible explanation for the oxidative stress observed in cells treated with a mixture of EtDTC-Cu(II). The oxidative stress may be just one of the consequences of inhibition of the cellular proteasome, as both the EtDTC-Cu(II) mixture and Cu(EtDTC)<sub>2</sub> complex are potent inhibitors of the proteasome [17, 21].

## **PROTEASOME AND OXIDATIVE STRESS**

Prior to degradation, proteins are usually tagged with multiple ubiquitin molecules through a series of three enzymatic activities by ubiquitin activating (E1), ubiquitin conjugating (E2) and ubiquitin ligase (E3) enzymes [77]. Proteins attached by a polyubiquitin chain are



recognized by the 26S proteasome and subsequently hydrolyzed (Fig. 2.). The 26S proteasome is composed of a one or two 19S regulatory particles (RP) bound to a 20S core particle (CP). The 19S RPs are responsible for substrate recognition, unfolding and deubiquitination [78], whereas the 20S CP facilitates degradation of proteins translocated from 19S. CP has a barrel-shaped structure and contains two pairs of three proteolytic subunits:  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  and  $\beta 5$  with caspase-like (C-like), trypsin-like (T-like) and chymotrypsin-like (CT-like) activities, respectively [79]. The overall machinery of ubiquitination, as well as deubiquitination and proteasomal degradation, is known as the ubiquitin-proteasome system (UPS) [80].

Protein degradation by the proteasome is a fundamental process in maintaining the viability and homeostasis of the cell. In addition to the degradation of short-lived regulatory proteins, the proteasome prevents the accumulation of non-functional, damaged or misfolded, and potentially toxic proteins. This process is particularly important in protecting the cell against unfavorable conditions, including oxidative stress [81]. Just as the ubiquitin-proteasome system (UPS) regulates cellular redox status, it is also affected by redox imbalance in the cell. Mild oxidative stress can impair the proteasome, and it appears that the 26S proteasome is more susceptible than the 20S proteasome [82], as oxidative stress causes the 26S proteasome to dissociate into 19S and 20S [83], which is responsible for degrading oxidatively damaged proteins [84]. Importantly, both inhibition of purified 20S proteasome by EtDTC-Cu(II) [17] and PyDTC-Cu(II) mixtures [85] and the results of a study in which ROS scavengers were insufficient to overcome the proteasome-inhibitory activity of a neocuproine-Cu mixture [86], suggest that copper complexes are able to inhibit the cellular proteasome directly, independently of ROS [86].

However, inhibition of the proteasome by various compounds could lead to oxidative stress. This result was reported for several cell lines and multiple of proteasome inhibitors, including bortezomib [87-92], MG132 [93-95], lactacystin [95-97], aLLN [95], MG262 [95], carbobenzoxy-Leu-Leu-Leu-aldehyde [97] and *N*-benzyloxycarbonyl-Ile-Glu (*O*-*t*-butyl)-Ala-leucinal [98]. ROS generation by proteasome inhibitors induces c-Jun N-terminal kinase (JNK) [92] and activator protein-1 (AP-1) activation [95], loss of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) [87, 91-94, 97-98], cytochrome-c release [87, 90-92, 97-98], caspase-3 activation [87-93, 97] and subsequent apoptosis. Similar events (e.g., JNK and AP-1 activation, decreased  $\Delta\Psi_m$  and caspase-3 activation) were observed in cells treated with mixtures of EtDTC-Cu(II) [23] or PyDTC-Cu(II) [24]. However, bortezomib also did not increase ROS generation, and several antioxidants failed to protect cells from bortezomib-induced apoptosis [99], suggesting the tissue- and cell line-specific involvement of ROS in apoptosis is caused by the inhibition of the proteasome.

Because proteasomes eliminate misfolded or unassembled proteins in a process known as endoplasmic reticulum (ER)-associated protein degradation (ERAD) [100], they protect cells from ER stress leading to unfolded protein response (UPR) [101], which can trigger apoptosis if unmitigated [102-103]. Not surprisingly, inhibition of the proteasome resulted in UPR-associated cell death in several cell lines [104-110]. Interestingly, involvement of UPR in apoptosis has also been reported in cells treated with a PyDTC-Cu(II) [27] or disulfiram-Cu(II) mixture [111] and other copper compounds [111-113].

## MECHANISM OF PROTEASOME INHIBITION BY THE $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ COMPLEX

Targeting UPS in cancer therapy is a new and promising approach used by the first-in-class drug bortezomib (Velcade), which reversibly inhibits the active sites in the 20S proteasome [114]. The obscurity of the antitumor and chemosensitizing activity of disulfiram has been uncovered in a study [17] in which disulfiram was shown to inhibit the cellular proteasome in the presence of copper. In contrast to disulfiram alone, a disulfiram-Cu(II) mixture potently inhibited the CT-like activity of the purified 20S proteasome (with an  $\text{IC}_{50}$  value of  $\sim 7.5 \mu\text{M}$ ). Similarly, inhibition of the CT-like activity of the cellular 26S proteasome was observed in malignant MDA-MB-231 and MCF10DCIS.com breast cells treated with the disulfiram-Cu(II) mixture, whereas inhibition was not seen in normal immortalized MCF-10A cells. Importantly, inhibition of the cellular proteasome preceded induction of apoptosis and resulted in the accumulation of tumor suppressor proteins p27 and bax, which are natural proteasome substrates, indicating that the apoptosis was induced by proteasome inhibition. The proteasome-inhibitory, apoptosis-inducing and antitumor activity of disulfiram has been confirmed *in vivo* in human breast tumor xenografts containing higher levels of copper [17].

Interestingly, in sharp contrast to the disulfiram-Cu(II) mixture, a synthetic  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  complex was not able to inhibit CT-like activity of the purified 20S proteasome, yielding an  $\text{IC}_{50}$  value of  $>50 \mu\text{M}$  [21]. However, even at a much lower concentration ( $20 \mu\text{M}$ ), the  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  complex inhibited  $\sim 90\%$  of cellular 26S proteasome activity in MDA-MB-231 cells [21]. One explanation for this antagonistic behavior on 20S by the disulfiram-Cu(II) mixture versus the synthetic  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  complex could be the ability of copper (II) ions to independently inhibit the 20S proteasome, as demonstrated elsewhere [17, 85-86]. Likewise, while  $50 \mu\text{M}$  of a PyDTC-Cu(II) mixture inhibited the CT-like activity of the purified

proteasome by ~ 90%, the same concentration of Cu(PyDTC)<sub>2</sub> complex caused only partial (40%) inhibition [85]. Furthermore, by increasing the concentration of PyDTC to match a fixed concentration of Cu(II) ions, the potency of these mixtures to inhibit purified 20S proteasome significantly decreased [85].

These results indicate that, unlike bortezomib, the target of the Cu(EtDTC)<sub>2</sub> complex is the 26S proteasome rather than the 20S. We have previously reported that a possible target could be the JAMM domain of the POH1 subunit (RPN11 in yeast) within the lid of the 19S proteasome [39, 115], and a mechanism was proposed elsewhere [21]. POH1, a member of the JAMM (JAB1/MPN/Mov34 metalloenzyme) domain deubiquitinases, is responsible for releasing the polyubiquitin chain attached to a substrate before its translocation and degradation in 20S CP; thus it is necessary for activity of the 26S proteasome [116-117] and viability of the cell [118-119]. Moreover, the JAMM domain motif is located in the CSN5 subunit of the COP9 signalosome complex, [120] which has an emerging role in cancer [121] and is a negative regulator of many tumor suppressors, including p27 [122]. Furthermore, CSN5 isopeptidase activity is essential for breast epithelial transformation and progression, suggesting it may be a potential breast cancer oncogene and therapeutic target [123].

Although only 20S proteasome inhibitors are being tested in ongoing clinical trials, UPS provides many promising opportunities to treat cancer [124], and targeting deubiquitinases is undoubtedly one of them [125]. Several members of the JAMM class, including POH1 or CSN5, might make good drug targets. In particular, targeting the POH1 subunit introduces a new approach to proteasome inhibition [126]. This idea has been supported by a recent study [127] where inhibition of another two deubiquitinases associated with the 26S proteasome, USP14 and UCH37, induced tumor cell apoptosis and *in vivo* inhibition of tumor progression.

## CONCLUSION

Finally, EtDTC shows promising activity against solid tumors that has been confirmed in a phase II clinical trial with high-risk breast cancer patients. Moreover, a combination of oral zinc gluconate and disulfiram induced clinical remission of hepatic metastasis in patient with ocular melanoma. These achievements led to an ongoing clinical trial at the Huntsman Cancer Institute in Utah (ClinicalTrials.gov Identifier NCT00742911) that elucidated the effect of simultaneous administration of disulfiram and copper gluconate on cancers involving the liver. Consequently, the toxicity of disulfiram or EtDTC (summarized in Fig. 3.) considerably increases in the presence of copper, suggesting that the active compound is actually the  $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  complex, and it acts as a potent inhibitor of the cellular proteasome. In addition, disulfiram's targets, multidrug resistance, angiogenesis, invasion and anticancer activity as a DNA demethylating agent [128] or inhibitor of RING-Finger E3 ubiquitin ligases have been described [129]. Nevertheless, further studies and larger clinical trials are required to utilize disulfiram in clinics as an anticancer therapy. The term "repurposing" refers to the identification of new uses for existing drugs, and it has been proposed to provide an effective way to develop new chemotherapeutics [130-131]. According to Francis S. Collins, the director of the NIH (National Institutes of Health), drug rescue and repurposing will be an important focus of the NIH's proposed National Center for Advancing Translational Sciences [132]. Importantly, disulfiram is a generic and unpatentable drug; therefore, the research and trials will be financed by a government, non-profit organization or charity (such as GlobalCures), leading to approval of disulfiram as the first non-profit drug against cancer [133].

## **ACKNOWLEDGEMENT**

This work was financed by project OP VK CZ.1.07/2.3.00/20.0062 “An inexpensive drug Antabuse as anticancer remedy: mechanism of action and clinical trials” from resources of European Union and the Czech Republic.

## **ABBREVIATIONS**

$\Delta\Psi_m$  = mitochondrial membrane potential

AP-1 = activator protein 1

C-like = caspase-like

CP = core particle of the proteasome

CT-like = chymotrypsin-like

$\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$  = bis(diethyldithiocarbamate)-copper complex

DNA = deoxyribonucleic acid

ER = endoplasmic reticulum

ERAD = ER-associated protein degradation

EtDTC = diethyldithiocarbamate

GR = glutathione reductase

GSH = glutathione (reduced form)

GSSH = glutathione (oxidized form)

$\text{IC}_{50}$  = half maximal inhibitory concentration

JAMM = JAB1/MPN/Mov34 metalloenzyme

JNK = c-Jun N-terminal kinase

NAC = N-acetylcysteine

NF- $\kappa$ B = nuclear-factor  $\kappa$ B

NIH = National Institutes of Health

O<sub>2</sub><sup>-•</sup> = superoxide radical

P-glycoprotein = permeability glycoprotein

PyDTC = pyrrolidine dithiocarbamate

RP = regulatory particle of the proteasome

ROS = reactive oxygen species

SOD-1 = CuZn superoxide dismutase

T-like = trypsin-like

UPR = unfolded protein response

UPS = ubiquitin-proteasome system

## REFERENCES

[1] Suh, J.J.; Pettinati, H.M.; Kampman, K.M.; O'Brien, C.P. The status of disulfiram: a half of a century later. *J. Clin. Psychopharmacol.*, **2006**, *26*, 290-302.

[2] Vallari, R.C.; Pietruszko, R. Human aldehyde dehydrogenase: mechanism of inhibition of disulfiram. *Science*, **1982**, *216*, 637-639.

[3] Lewison, E.F. Spontaneous regression of breast cancer. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **1977**, *12*, 47-53.

[4] Wattenberg, L.W. Inhibition of chemical carcinogenesis. *J. Natl. Cancer. Inst.*, **1978**, *60*, 11-18.

- [5] Irving, C.C.; Tice, A.J.; Murphy, W.M. Inhibition of N-n-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder cancer in rats by administration of disulfiram in the diet. *Cancer. Res.*, **1979**, *39*, 3040-3043.
- [6] Irving, C.C.; Daniel, D.S.; Murphy, W.M. The effect of disulfiram on the carcinogenicity of N-butyl-N-(3-carboxypropyl)nitrosamine in the rat. *Carcinogenesis*, **1983**, *4*, 617-620.
- [7] Dufour, P.; Lang, J.M.; Giron, C.; Duclos, B.; Haehnel, P.; Jaeck, D.; Jung, J.M.; Oberling, F. Sodium dithiocarb as adjuvant immunotherapy for high risk breast cancer: a randomized study. *Biotherapy*, **1993**, *6*, 9-12.
- [8] Cvek, B. Targeting malignancies with disulfiram (Antabuse): multidrug resistance, angiogenesis, and proteasome. *Curr. Cancer. Drug. Targets.*, **2011**, *11*, 332-337.
- [9] Schreck, R.; Meier, B.; Männel, D.N.; Dröge, W.; Baeuerle, P.A. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *J. Exp. Med.*, **1992**, *175*, 1181-1194.
- [10] Lövborg, H.; Oberg, F.; Rickardson, L.; Gullbo, J.; Nygren, P.; Larsson, R. Inhibition of proteasome activity, nuclear factor-KappaB translocation and cell survival by the antialcoholism drug disulfiram. *Int. J. Cancer.*, **2006**, *118*, 1577-1580.
- [11] Wang, W.; McLeod, H.L.; Cassidy, J. Disulfiram-mediated inhibition of NF-kappaB activity enhances cytotoxicity of 5-fluorouracil in human colorectal cancer cell lines. *Int. J. Cancer*, **2003**, *104*, 504-511.
- [12] Loo, T.W.; Clarke, D.M. Blockage of drug resistance in vitro by disulfiram, a drug used to treat alcoholism. *J. Natl. Cancer Inst.*, **2000**, *92*, 898-902.
- [13] Sauna, Z.E.; Peng, X.H.; Nandigama, K.; Tekle, S.; Ambudkar, S.V. The molecular basis of the action of disulfiram as a modulator of the multidrug resistance-linked ATP binding cassette transporters MDR1 (ABCB1) and MRP1 (ABCC1). *Mol. Pharmacol.*, **2004**, *65*, 675-684.
- [14] Cho, H.J.; Lee, T.S.; Park, J.B.; Park, K.K.; Choe, J.Y.; Sin, D.I.; Park, Y.Y.; Moon, Y.S.; Lee, K.G.; Yeo, J.H.; Han, S.M.; Cho, Y.S.; Choi, M.R.; Park, N.G.; Lee, Y.S.; Chang, Y.C. Disulfiram suppresses invasive ability of osteosarcoma cells via the inhibition of MMP-2 and MMP-9 expression. *J. Biochem. Mol. Biol.*, **2007**, *40*, 1069-1076.
- [15] Shian, S.G.; Kao, Y.R.; Wu, F.Y.; Wu, C.W. Inhibition of invasion and angiogenesis by zinc-chelating agent disulfiram. *Mol. Pharmacol.*, **2003**, *64*, 1076-1084.
- [16] Cen, D.; Brayton, D.; Shahandeh, B.; Meyskens, F.L. Jr; Farmer, P.J. Disulfiram facilitates intracellular Cu uptake and induces apoptosis in human melanoma cells. *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 6914-6920.



- [17] Chen, D.; Cui, Q.C.; Yang, H.; Dou, Q.P. Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug and copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures and xenografts via inhibition of the proteasome activity. *Cancer Res.*, **2006**, *66*, 10425-10433.
- [18] Brar, S.S.; Grigg, C.; Wilson, K.S.; Holder, W.D. Jr; Dreau, D.; Austin, C.; Foster, M.; Ghio, A.J.; Whorton, A.R.; Stowell, G.W.; Whittall, L.B.; Whittle, R.R.; White, D.P.; Kennedy, T.P. 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*, 1049-1060.
- [19] Guo, X.; Xu, B.; Pandey, S.; Goessl, E.; Brown, J.; Armesilla, A.L.; Darling, J.L.; Wang, W. Disulfiram/copper complex inhibiting NFkappaB activity and potentiating cytotoxic effect of gemcitabine on colon and breast cancer cell lines. *Cancer Lett.*, **2010**, *290*, 104-113.
- [20] Xu, B.; Shi, P.; Fombon, I.S.; Zhang, Y.; Huang, F.; Wang, W.; Zhou, S. Disulfiram/copper complex activated JNK/c-jun pathway and sensitized cytotoxicity of doxorubicin in doxorubicin resistant leukemia HL60 cells. *Blood Cells Mol. Dis.*, **2011**, *in press*.
- [21] Cvek, B.; Milacic, V.; Taraba, J.; Dou, Q.P. Ni(II), Cu(II), and Zn(II) diethyldithiocarbamate complexes show various activities against the proteasome in breast cancer cells. *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 6256-6258.
- [22] Viola-Rhenals, M.; Rieber, M.S.; Rieber, M. Role of peroxidases, thiols and Bak/Bax in tumor cell susceptibility to Cu[DEDTC]<sub>2</sub>. *Biochem. Pharmacol.*, **2007**, *74*, 841-850.
- [23] Chen, S.H.; Liu, S.H.; Liang, Y.C.; Lin, J.K.; Lin-Shiau, S.Y.; Oxidative stress and c-Jun-amino-terminal kinase activation involved in apoptosis of primary astrocytes induced by disulfiram-Cu(2+) complex. *Eur. J. Pharmacol.*, **2001**, *414*, 177-188.
- [24] Chen, S.H.; Lin, J.K.; Liang, Y.C.; Pan, M.H.; Liu, S.H.; Lin-Shiau, S.Y. Involvement of activating transcription factors JNK, NF-kappaB, and AP-1 in apoptosis induced by pyrrolidine dithiocarbamate/Cu complex. *Eur. J. Pharmacol.*, **2008**, *594*, 9-17.
- [25] Daniel, K.G.; Chen, D.; Orlu, S.; Cui, Q.C.; Miller, F.R.; Dou, Q.P. Clioquinol and pyrrolidine dithiocarbamate complex with copper to form proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res.*, **2005**, *7*, R897-R908.
- [26] Chen, D.; Peng, F.; Cui, Q.C.; Daniel, K.G.; Orlu, S.; Liu, J.; Dou, Q.P. Inhibition of prostate cancer cellular proteasome activity by a pyrrolidine dithiocarbamate-copper complex is associated with suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Front. Biosci.*, **2005**, *10*, 2932-2939.
- [27] Chen, Y.W.; Chen, K.L.; Chen, C.H.; Wu, H.C.; Su, C.C.; Wu, C.C.; Way, T.D.; Hung, D.Z.; Yen, C.C.; Yang, Y.T.; Lu, T.H. Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTTC)/Cu complex induces lung epithelial cell apoptosis through mitochondria and ER-stress pathways. *Toxicol. Lett.*, **2010**, *199*, 333-340.

- [28] Johansson, B. A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of disulfiram and its metabolites. *Acta Psychiatr. Scand. Suppl.*, **1992**, 369, 15-26.
- [29] Hogarth, G. In: *Progress in Inorganic Chemistry*; Kenneth. D. Karlin, Ed; John Wiley & Sons, Inc.: NJ, USA, **2005**; Vol. 53, pp. 71-561.
- [30] Cocco, D.; Calabrese, L.; Rigo, A.; Argese, E.; Rotilio, G. Re-examination of the reaction of diethyldithiocarbamate with the copper of superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, **1981**, 256, 8983-8986.
- [31] Misra, H.P. Reaction of copper-zinc superoxide dismutase with diethyldithiocarbamate. *J. Biol. Chem.*, **1979**, 254, 11623-11628.
- [32] Johansson, B.; Stankiewicz, Z. Bis-(diethyldithiocarbamate) copper complex: a new metabolite of disulfiram? *Biochem. Pharmacol.*, **1985**, 34, 2989-2991.
- [33] Nelson, L.; Lewin, N.; Howland, M.A.; Hoffman, R.; Goldfrank, L.; Flomenbaum, N. *Goldfrank's Toxicologic Emergencies*, 9<sup>th</sup> ed.; McGraw-Hill: New York, **2010**.
- [34] Suzuki, Y.; Fujii, S.; Tominaga, T.; Yoshimoto, T.; Yoshimura, T.; Kamada, H. The origin of an EPR signal observed in dithiocarbamate-loaded tissues. Copper(II)-dithiocarbamate complexes account for the narrow hyperfine lines. *Biochim. Biophys. Acta*, **1997**, 1335, 242-245.
- [35] Tonkin, E.G.; Valentine, H.L.; Milatovic, D.M.; Valentine, W.M. N,N-diethyldithiocarbamate produces copper accumulation, lipid peroxidation, and myelin injury in rat peripheral nerve. *Toxicol. Sci.*, **2004**, 81, 160-171.
- [36] Delmaestro, E.; Trombetta, L.D. The effects of disulfiram on the hippocampus and cerebellum of the rat brain: a study on oxidative stress. *Toxicol. Lett.*, **1995**, 75, 235-243.
- [37] Szerdahelyi, P.; Kása, P. Regional differences in the uptake of exogenous copper into rat brain after acute treatment with sodium diethyldithiocarbamate. A histochemical and atomic absorption spectrophotometric study. *Histochemistry*, **1987**, 86, 627-632.
- [38] Tisato, F.; Marzano, C.; Porchia, M.; Pellei, M.; Santini, C. Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies. *Med. Res. Rev.*, **2010**, 30, 708-749.
- [39] Cvek, B.; Dvorak, Z. Targeting of nuclear factor-kappaB and proteasome by dithiocarbamate complexes with metals. *Curr. Pharm. Des.*, **2007**, 13, 3155-3167.
- [40] Valko, M.; Morris, H.; Cronin, M.T. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.*, **2005**, 12, 1161-1208.

- [41] Cen, D.; Gonzalez, R.I.; Buckmeier, J.A.; Kahlon, R.S.; Tohidian, N.B.; Meyskens, F.L. Jr. Disulfiram induces apoptosis in human melanoma cells: a redox-related process. *Mol. Cancer Ther.*, **2002**, *1*, 197-204.
- [42] Jomova, K.; Valko, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, **2011**, *283*, 65-87.
- [43] Heikkila, R.E.; Cabbat, F.S.; Cohen, G. In vivo inhibition of superoxide dismutase in mice by diethyldithiocarbamate. *J. Biol. Chem.*, **1976**, *251*, 2182-2185.
- [44] Forman, H.J.; York, J.L.; Fisher, A.B. Mechanism for the potentiation of oxygen toxicity by disulfiram. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1980**, *212*, 452-455.
- [45] Marikovsky, M.; Nevo, N.; Vadai, E.; Harris-Cerruti, C. Cu/Zn superoxide dismutase plays a role in angiogenesis. *Int. J. Cancer*, **2002**, *97*, 34-41.
- [46] Didion, S.P.; Hathaway, C.A.; Faraci, F.M. Superoxide levels and function of cerebral blood vessels after inhibition of CuZn-SOD. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **2001**, *281*, H1697-H1703.
- [47] Qiu, L.; Ding, L.; Huang, J.; Wang, D.; Zhang, J.; Guo, B. Induction of copper/zinc-superoxide dismutase by CCL5/CCR5 activation causes tumour necrosis factor-alpha and reactive oxygen species production in macrophages. *Immunology*, **2009**, *128*(1 Suppl), e325-e334.
- [48] Siwik, D.A.; Tzortzis, J.D.; Pimental, D.R.; Chang, D.L.; Pagano, P.J.; Singh, K.; Sawyer, D.B.; Colucci, W.S. Inhibition of copper-zinc superoxide dismutase induces cell growth, hypertrophic phenotype, and apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes in vitro. *Circ. Res.*, **1999**, *85*, 147-53.
- [49] Li, J.; Li, P.F.; Dietz, R.; von Harsdorf, R. Intracellular superoxide induces apoptosis in VSMCs: role of mitochondrial membrane potential, cytochrome C and caspases. *Apoptosis*, **2002**, *7*, 511-517.
- [50] Huang, P.; Feng, L.; Oldham, E.A.; Keating, M.J.; Plunkett, W. Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature*, **2000**, *407*, 390-395.
- [51] Circu, M.L.; Aw, T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.*, **2010**, *48*, 749-762.
- [52] Circu, M.L.; Aw, T.Y. Glutathione and apoptosis. *Free Radic. Res.* **2008**, *42*, 689-706.
- [53] Ohno, Y.; Hirota, K.; Kawanishi, T.; Takanaka, A. Loss of viability after disulfiram treatment without preceding depletion of intracellular GSH. *J. Toxicol. Sci.*, **1990**, *15*, 63-73.
- [54] Nagendra, S.N.; Shetty, K.T.; Rao, K.M.; Rao, B.S. Effect of disulfiram administration on rat brain glutathione metabolism. *Alcohol*, **1994**, *11*, 7-10.

- [55] Ningaraj, N.S.; Rao, M.K. Disulfiram augments oxidative stress in rat brain following bilateral carotid artery occlusion. *J. Biomed. Sci.*, **1998**, *5*, 226-230.
- [56] Jin, L.; Davis, M.R.; Hu, P.; Baillie, T.A. Identification of novel glutathione conjugates of disulfiram and diethyldithiocarbamate in rat bile by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Evidence for metabolic activation of disulfiram in vivo. *Chem. Res. Toxicol.*, **1994**, *7*, 526-533.
- [57] Di Nicuolo, F.; Serini, S.; Boninsegna, A.; Palozza, P.; Calviello, G. Redox regulation of cell proliferation by pyrrolidine dithiocarbamate in murine thymoma cells transplanted in vivo. *Free Radic. Biol. Med.*, **2001**, *31*, 1424-1431.
- [58] Grosicka-Maciąg, E.; Kurpios-Piec, D.; Grzela, T.; Czczot, H.; Skrzycki, M.; Szumiło, M.; Rahden-Staroń, I. Protective effect of N-acetyl-L-cysteine against disulfiram-induced oxidative stress and apoptosis in V79 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2010**, *248*, 210-216.
- [59] Somers, P.K.; Medford, R.M.; Saxena, U. Dithiocarbamates: effects on lipid hydroperoxides and vascular inflammatory gene expression. *Free Radic. Biol. Med.*, **2000**, *28*, 1532-1537.
- [60] Nathens, A.B.; Bitar, R.; Davreux, C.; Bujard, M.; Marshall, J.C.; Dackiw, A.P.; Watson, R.W.; Rotstein, O.D. Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates endotoxin-induced acute lung injury. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **1997**, *17*, 608-616.
- [61] Szotowski, B.; Antoniak, S.; Goldin-Lang, P.; Tran, Q.V.; Pels, K.; Rosenthal, P.; Bogdanov, V.Y.; Borchert, H.H.; Schultheiss, H.P.; Rauch, U. Antioxidative treatment inhibits the release of thrombogenic tissue factor from irradiation- and cytokine-induced endothelial cells. *Cardiovasc. Res.*, **2007**, *73*, 806-812.
- [62] Erl, W.; Weber, C.; Hansson, G.K. Pyrrolidine dithiocarbamate-induced apoptosis depends on cell type, density, and the presence of Cu(2+) and Zn(2+). *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **2000**, *278*, C1116-C1125.
- [63] Kim, C.H.; Kim, J.H.; Moon, S.J.; Hsu, C.Y.; Seo, J.T.; Ahn, Y.S. Biphasic effects of dithiocarbamates on the activity of nuclear factor-kappaB. *Eur. J. Pharmacol.*, **2000**, *392*, 133-136.
- [64] Navrátilová, J.; Jungová, P.; Vanhara, P.; Preisler, J.; Kanicky, V.; Smarda, J. Copper ions regulate cytotoxicity of disulfiram to myeloid leukemia cells. *Int. J. Mol. Med.*, **2009**, *24*, 661-670.
- [65] Oh da, H.; Bang, J.S.; Choi, H.M.; Yang, H.I.; Yoo, M.C.; Kim, K.S. Fetal bovine serum requirement for pyrrolidine dithiocarbamate-induced apoptotic cell death of MCF-7 breast tumor cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **2010**, *649*, 135-139.

- [66] Speisky, H.; Gómez, M.; Carrasco-Pozo, C.; Pastene, E.; Lopez-Alarcón, C.; Olea-Azar, C. Cu(I)-glutathione complex: a potential source of superoxide radicals generation. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 6568-6574.
- [67] Speisky, H.; Gómez, M.; Burgos-Bravo, F.; López-Alarcón, C.; Jullian, C.; Olea-Azar, C.; Aliaga, M.E. Generation of superoxide radicals by copper-glutathione complexes: redox-consequences associated with their interaction with reduced glutathione. *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, *17*, 1803-1810.
- [68] Aliaga, M.E.; López-Alarcón, C.; Barriga, G.; Olea-Azar, C.; Speisky, H. Redox-active complexes formed during the interaction between glutathione and mercury and/or copper ions. *J. Inorg. Biochem.*, **2010**, *104*, 1084-1090.
- [69] Hansen, J.M.; Zhang, H.; Jones, D.P. Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2, and glutathione by metal ions. *Free Radic. Biol. Med.*, **2006**, *40*, 138-145.
- [70] Franco, R.; Cidlowski, J.A. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ.*, **2009**, *16*, 1303-1314.
- [71] Franco, R.; Panayiotidis, M.I.; Cidlowski, J.A. Glutathione depletion is necessary for apoptosis in lymphoid cells independent of reactive oxygen species formation. *J. Biol. Chem.*, **2007**, *282*, 30452-30465.
- [72] Chen, S.H.; Liu, S.H.; Liang, Y.C.; Lin, J.K.; Lin-Shiau, S.Y. Death signaling pathway induced by pyrrolidine dithiocarbamate-Cu(2+) complex in the cultured rat cortical astrocytes. *Glia*, **2000**, *31*, 249-261.
- [73] Zafarullah, M.; Li, W.Q.; Sylvester, J.; Ahmad, M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol. Life Sci.*, **2003**, *60*, 6-20.
- [74] Jomova, K.; Vondrakova, D.; Lawson, M.; Valko, M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol. Cell. Biochem.*, **2010**, *345*, 91-104.
- [75] Spasojević, I.; Mojović, M.; Stević, Z.; Spasić, S.D.; Jones, D.R.; Morina, A.; Spasić, M.B. Bioavailability and catalytic properties of copper and iron for Fenton chemistry in human cerebrospinal fluid. *Redox Rep.*, **2010**, *15*, 29-35.
- [76] Rae, T.D.; Schmidt, P.J.; Pufahl, R.A.; Culotta, V.C.; O'Halloran, T.V. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*, **1999**, *284*, 805-808.
- [77] Schrader, E.K.; Harstad, K.G.; Matouschek, A. Targeting proteins for degradation. *Nat. Chem. Biol.*, **2009**, *5*, 815-822.
- [78] Pickart, C.M.; Cohen, R.E. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2004**, *5*, 177-187.

- [79] Finley, D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu. Rev. Biochem.*, **2009**, *78*, 477-513.
- [80] Cvek, B.; Dvorak, Z. The ubiquitin-proteasome system (UPS) and the mechanism of action of bortezomib. *Curr. Pharm. Des.*, **2011**, *17*, 1483-1499.
- [81] Goldberg, A.L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, **2003**, *426*, 895-899.
- [82] Shang, F.; Taylor, A. Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, **2011**, *51*, 5-16.
- [83] Grune, T.; Catalgol, B.; Licht, A.; Ermak, G.; Pickering, A.M.; Ngo, J.K.; Davies, K.J. HSP70 mediates dissociation and reassociation of the 26S proteasome during adaptation to oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, **2011**, *51*, 1355-1364.
- [84] Jung, T.; Grune, T. The proteasome and its role in the degradation of oxidized proteins. *IUBMB Life*, **2008**, *60*, 743-752.
- [85] Milacic, V.; Chen, D.; Giovagnini, L.; Diez, A.; Fregona, D.; Dou, Q.P. Pyrrolidine dithiocarbamate-zinc(II) and -copper(II) complexes induce apoptosis in tumor cells by inhibiting the proteasomal activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2008**, *231*, 24-33.
- [86] Xiao, Y.; Chen, D.; Zhang, X.; Cui, Q.; Fan, Y.; Bi, C.; Dou, Q.P. Molecular study on copper-mediated tumor proteasome inhibition and cell death. *Int. J. Oncol.*, **2010**, *37*, 81-87.
- [87] Berges, C.; Haberstock, H.; Fuchs, D.; Sadeghi, M.; Opelz, G.; Daniel, V.; Naujokat, C. Proteasome inhibition activates the mitochondrial pathway of apoptosis in human CD4+ T cells. *J. Cell. Biochem.*, **2009**, *108*, 935-946.
- [88] Du, Z.X.; Zhang, H.Y.; Meng, X.; Guan, Y.; Wang, H.Q. Role of oxidative stress and intracellular glutathione in the sensitivity to apoptosis induced by proteasome inhibitor in thyroid cancer cells. *BMC Cancer*, **2009**, *9*, 56.
- [89] Fribley, A.; Zeng, Q.; Wang, C.Y. Proteasome inhibitor PS-341 induces apoptosis through induction of endoplasmic reticulum stress-reactive oxygen species in headand neck squamous cell carcinoma cells. *Mol. Cell Biol.*, **2004**, *24*, 9695-9704.
- [90] Ling, Y.H.; Liebes, L.; Zou, Y.; Perez-Soler, R. Reactive oxygen species generation and mitochondrial dysfunction in the apoptotic response to Bortezomib, a novel proteasome inhibitor, in human H460 non-small cell lung cancer cells. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 33714-33723.
- [91] Pérez-Galán, P.; Roué, G.; Villamor, N.; Montserrat, E.; Campo, E.; Colomer, D. The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood*, **2006**, *107*, 257-264.

- [92] Yu, C.; Rahmani, M.; Dent, P.; Grant, S. The hierarchical relationship between MAPK signaling and ROS generation in human leukemia cells undergoing apoptosis in response to the proteasome inhibitor Bortezomib. *Exp. Cell Res.*, **2004**, *295*, 555-566.
- [93] Han, Y.H.; Park, W.H. The changes of reactive oxygen species and glutathione by MG132, a proteasome inhibitor affect As4.1 juxtaglomerular cell growth and death. *Chem. Biol. Interact.*, **2010**, *184*, 319-327.
- [94] Han, Y.H.; Moon, H.J.; You, B.R.; Kim, S.Z.; Kim, S.H.; Park, W.H. The effects of N-acetyl cysteine on the MG132 proteasome inhibitor-treated lung cancer cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and glutathione. *Int. J. Mol. Med.*, **2010**, *25*, 657-662.
- [95] Wu, H.M.; Chi, K.H.; Lin, W.W. Proteasome inhibitors stimulate activator protein-1 pathway via reactive oxygen species production. *FEBS Lett.*, **2002**, *526*, 101-105.
- [96] Lee, M.H.; Hyun, D.H.; Jenner, P.; Halliwell, B. Effect of proteasome inhibition on cellular oxidative damage, antioxidant defences and nitric oxide production. *J. Neurochem.*, **2001**, *78*, 32-41.
- [97] Qiu, J.H.; Asai, A.; Chi, S.; Saito, N.; Hamada, H.; Kirino, T. Proteasome inhibitors induce cytochrome c-caspase-3-like protease-mediated apoptosis in cultured cortical neurons. *J. Neurosci.*, **2000**, *20*, 259-625.
- [98] Papa, L.; Gomes, E.; Rockwell, P. Reactive oxygen species induced by proteasome inhibition in neuronal cells mediate mitochondrial dysfunction and a caspase-independent cell death. *Apoptosis*, **2007**, *12*, 1389-1405.
- [99] Zou, W.; Yue, P.; Lin, N.; He, M.; Zhou, Z.; Lonial, S.; Khuri, F.R.; Wang, B.; Sun, S.Y. Vitamin C inactivates the proteasome inhibitor PS-341 in human cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, **2006**, *12*, 273-280.
- [100] Meusser, B.; Hirsch, C.; Jarosch, E.; Sommer, T. ERAD: the long road to destruction. *Nat. Cell Biol.*, **2005**, *7*, 766-772.
- [101] Vembar, S.S.; Brodsky, J.L. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2008**, *9*, 944-957.
- [102] Rasheva, V.I.; Domingos, P.M. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis*, **2009**, *14*, 996-1007.
- [103] Heath-Engel, H.M.; Chang, N.C.; Shore, G.C. The endoplasmic reticulum in apoptosis and autophagy: role of the BCL-2 protein family. *Oncogene*, **2008**, *27*, 6419-6433.
- [104] Obeng, E.A.; Carlson, L.M.; Gutman, D.M.; Harrington, W.J. Jr.; Lee, K.P.; Boise, L.H. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood*, **2006**, *107*, 4907-4916.

- [105] Nawrocki, S.T.; Carew, J.S.; Maclean, K.H.; Courage, J.F.; Huang, P.; Houghton, J.A.; Cleveland, J.L.; Giles, F.J.; McConkey, D.J. Myc regulates aggresome formation, the induction of Noxa, and apoptosis in response to the combination of bortezomib and SAHA. *Blood*, **2008**, *112*, 2917-2926.
- [106] Nawrocki, S.T.; Carew, J.S.; Pino M.S.; Highshaw, R.A.; Dunner, K. Jr.; Huang, P.; Abbruzzese, J.L.; McConkey, D.J. Bortezomib sensitizes pancreatic cancer cells to endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Cancer Res.*, **2005**, *65*, 11658-11666.
- [107] Nawrocki, S.T.; Carew, J.S.; Dunner, K. Jr.; Boise, L.H.; Chiao, P.J.; Huang, P.; Abbruzzese, J.L.; McConkey, D.J. Bortezomib inhibits PKR-like endoplasmic reticulum (ER) kinase and induces apoptosis via ER stress in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.*, **2005**, *65*, 11510-11519.
- [108] Landowski, T.H.; Megli, C.J.; Nullmeyer, K.D.; Lynch, R.M.; Dorr, R.T. Mitochondrial-mediated dysregulation of Ca<sup>2+</sup> is a critical determinant of Velcade(PS-341/bortezomib) cytotoxicity in myeloma cell lines. *Cancer Res.*, **2005**, *65*, 3828-3836.
- [109] Lee, A.H.; Iwakoshi, N.N.; Anderson, K.C.; Glimcher, L.H. Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2003**, *100*, 9946-9951.
- [110] Morgillo, F.; D'Aiuto, E.; Troiani, T.; Martinelli, E.; Cascone, T.; De Palma, R.; Orditura, M.; De Vita, F.; Ciardiello, F. Antitumor activity of bortezomib in human cancer cells with acquired resistance to anti-epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Lung Cancer*, **2011**, *71*, 283-290.
- [111] Tardito, S.; Bassanetti, I.; Bignardi, C.; Elviri, L.; Tegoni, M.; Mucchino, C.; Bussolati, O.; Franchi-Gazzola, R.; Marchiò, L. Copper binding agents acting as copper ionophores lead to caspase inhibition and paraptotic cell death in human cancer cells. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 6235-6242.
- [112] Hancock, C.N.; Stockwin, L.H.; Han, B.; Divelbiss, R.D.; Jun, J.H.; Malhotra, S.V.; Hollingshead, M.G.; Newton, D.L. A copper chelate of thiosemicarbazone NSC 689534 induces oxidative/ER stress and inhibits tumor growth in vitro and in vivo. *Free Radic. Biol. Med.*, **2011**, *50*, 110-121.
- [113] Tardito, S.; Isella, C.; Medico, E.; Marchiò, L.; Bevilacqua, E.; Hatzoglou, M.; Bussolati, O.; Franchi-Gazzola, R. The thioxotriazole copper(II) complex A0 induces endoplasmic reticulum stress and paraptotic death in human cancer cells. *J. Biol. Chem.*, **2009**, *284*, 24306-24319.
- [114] Hoeller, D.; Dikic, I. Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature*, **2009**, *458*, 438-444.



- [115] Cvek, B.; Dvorak, Z. The value of proteasome inhibition in cancer. Can the old drug, disulfiram, have a bright new future as a novel proteasome inhibitor? *Drug Discov. Today*, **2008**, *13*, 716-722.
- [116] Verma, R.; Aravind, L.; Oania, R.; McDonald, W.H.; Yates, J.R. 3rd; Koonin, E.V.; Deshaies, R.J. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science*, **2002**, *298*, 611-615.
- [117] Yao, T.; Cohen, R.E. A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature*, **2002**, *419*, 403-407.
- [118] Gallery, M.; Blank, J.L.; Lin, Y.; Gutierrez, J.A.; Pulido, J.C.; Rappoli, D.; Badola, S.; Rolfe, M.; Macbeth, K.J. The JAMM motif of human deubiquitinase Poh1 is essential for cell viability. *Mol. Cancer Ther.*, **2007**, *6*, 262-268.
- [119] Byrne, A.; McLaren, R.P.; Mason, P.; Chai, L.; Dufault, M.R.; Huang, Y.; Liang, B.; Gans, J.D.; Zhang, M.; Carter, K.; Gladysheva, T.B.; Teicher, B.A.; Biemann, H.P.; Booker, M.; Goldberg, M.A.; Klinger, K.W.; Lillie, J.; Madden, S.L.; Jiang, Y. Knockdown of human deubiquitinase PSMD14 induces cell cycle arrest and senescence. *Exp. Cell Res.*, **2010**, *316*, 258-271.
- [120] Cope, G.A.; Suh, G.S.; Aravind, L.; Schwarz, S.E.; Zipursky, S.L.; Koonin, E.V.; Deshaies, R.J. Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cull1. *Science*, **2002**, *298*, 608-611.
- [121] Richardson, K.S.; Zundel, W. The emerging role of the COP9 signalosome in cancer. *Mol. Cancer Res.*, **2005**, *3*, 645-653.
- [122] Tomoda, K.; Kubota, Y.; Kato, J. Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature*, **1999**, *398*, 160-165.
- [123] Adler, A.S.; Littlepage, L.E.; Lin, M.; Kawahara, T.L.; Wong, D.J.; Werb, Z.; Chang, H.Y. CSN5 isopeptidase activity links COP9 signalosome activation to breast cancer progression. *Cancer Res.*, **2008**, *68*, 506-515.
- [124] Eldridge, A.G.; O'Brien, T. Therapeutic strategies within the ubiquitin proteasome system. *Cell Death Differ.*, **2010**, *17*, 4-13.
- [125] Fraile, J.M.; Quesada, V.; Rodríguez, D.; Freije, J.M.; López-Otín, C. Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options. *Oncogene*, **2011**, *in press*.
- [126] Bedford, L.; Lowe, J.; Dick, L.R.; Mayer, R.J.; Brownell, J.E. Ubiquitin-like protein conjugation and the ubiquitin-proteasome system as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2011**, *10*, 29-46.

- [127] D'Arcy, P.; Brnjic, S.; Olofsson, M.H.; Fryknäs, M.; Lindsten, K.; De Cesare, M.; Perego, P.; Sadeghi, B.; Hassan, M.; Larsson, R.; Linder, S. Inhibition of proteasome deubiquitinating activity as a new cancer therapy. *Nat. Med.*, **2011**, *in press*.
- [128] Lin, J.; Haffner, M.C.; Zhang, Y.; Lee, B.H.; Brennen, W.N.; Britton, J.; Kachhap, S.K.; Shim, J.S.; Liu, J.O.; Nelson, W.G.; Yegnasubramanian, S.; Carducci, M.A. Disulfiram is a DNA demethylating agent and inhibits prostate cancer cell growth. *Prostate*, **2011**, *71*, 333-343.
- [129] R Kona, F.; Buac, D.; M Burger, A. Disulfiram, and disulfiram derivatives as novel potential anticancer drugs targeting the ubiquitin-proteasome system in both preclinical and clinical studies. *Curr. Cancer Drug Targets*, **2011**, *11*, 338-346.
- [130] Boguski, M.S.; Mandl, K.D.; Sukhatme, V.P. Drug discovery. Repurposing with a difference. *Science*, **2009**, *324*, 1394-1395.
- [131] Chong, C.R.; Sullivan, D.J. Jr. New uses for old drugs. *Nature*, **2007**, *448*, 645-646.
- [132] Collins, F.S. Mining for therapeutic gold. *Nat. Rev. Drug Discov*, **2011**, *10*, 397.
- [133] Cvek, B. Antabuse (disulfiram) as a pilot case of nonprofit drug. *Int. J. Cancer*, **2010**, *127*, 2486.