

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Antiproliferační účinky derivátů betulinu a lupeolu
na buňky odvozené od lidského maligního melanomu**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Iveta Kozarová
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Lucie Rárová, Ph.D.
Rok:	2015

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování Mgr. Lucii Rárové, Ph.D. za její cenné rady, četné konzultace, trpělivost při vedení mé diplomové práce a za poskytnuté zázemí pro bezproblémový průběh všech experimentů. Rovněž bych chtěla poděkovat paní laborantce Olze Hustákové za vstřícnost a pomoc při získání potřebných informací a podkladů a za odbornou pomoc při řešení experimentální části práce. Poděkování patří také kolektivu Laboratoře růstových regulátorů Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého za vstřícný přístup, ochotu, rady a pomoc při práci v laboratoři.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Iveta Kozarová
Název práce	Antiproliferační účinky derivátů betulinu a lupeolu na buňky odvozené od lidského maligního melanomu
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Oddělení chemické biologie a genetiky, CRH Laboratoř růstových regulátorů, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Lucie Rárová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015
Abstrakt	<p>Předložená diplomová práce se zabývá charakterizací antiproliferačních účinků přírodních lupanových triterpenů, konkrétně betulinu, lupeolu a jejich syntetických derivátů. První část práce pojednává o problematice maligního melanomu a jeho možnostech léčby, studovaných látkách a jejich cytotoxické aktivitě a o apoptotických markerech. Testované lupanové triterpeny vykazují cytotoxickou aktivitu v řádu μM. I když jsou cytotoxické pro normální buňky, ale v nižších koncentracích než na nádorové buňky <i>in vitro</i>, jedná se o významné výchozí látky pro studium derivátů lupanových triterpenů proti nádorovým buněčným liniím.</p> <p>V experimentální části práce byl sledován vliv vybraných lupanových triterpenů a jejich syntetických analogů na lidské nádorové buňky odvozené od maligního melanomu (G-361) <i>in vitro</i>. Tyto deriváty lupanových triterpenů byly vybrány na základě jejich významné toxicity a selektivity proti G-361 nádorové buněčné linii. V těchto buňkách byl studován vliv na proliferaci buněk, apoptosu a buněčný cyklus metodami Western blot, průtokovou cytometrií a biochemickým testem aktivity caspas-3/7. Bylo zjištěno, že testované lupanové triterpeny vykazují antiproliferační účinky v G-361 nádorové buněčné linii oproti jejich přírodním prekurzorům. Nicméně, nejvýznamnější účinek byl pozorován po aplikaci látky s kódovým označením 1, jež je derivát betulinu substituovaný v poloze C-3. Tento derivát způsoboval indukci programované buněčné smrti v nádorových buňkách odvozených od lidského maligního melanomu a mohl by se stát potencionálním protirakovinným léčivem.</p>

Klíčová slova	lupanové triterpeny, betulin, lupeol, maligní melanom, G-361 nádorová buněčná linie, antiproliferační, imunodetekce, průtoková cytometrie, aktivita caspas-3/7, apoptosa
Počet stran	70
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Iveta Kozarová
Title	Antiproliferative effects of derivatives of betulin and lupeol in cells derived from human malignant melanoma
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Chemical Biology and Genetics, CRH Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacký University Olomouc
Supervisor	Mgr. Lucie Rárová, Ph.D.
The year of presentation	2015
Abstract	<p>The present thesis deals with the characterization of the antiproliferative effects of natural lupane triterpenes, in particular betulin, lupeol and their synthetic derivatives. The first part relate to the issue of malignant melanoma, its treatment, studied agents, their cytotoxic activity and apoptotic markers. Tested lupane triterpenes exhibit cytotoxic activity in the order of micromolar concentrations. Although, they are cytotoxic to normal cells at lower concentrations than to tumor cells <i>in vitro</i>, they serve as important precursors to study lupane triterpenes derivatives against cancer cell lines.</p> <p>In the experimental part of the work, the influence of selected lupane triterpenes and their synthetic analogs was observed in human cancer cells derived from malignant melanoma (G-361) <i>in vitro</i>. These derivatives of lupane triterpenes were selected on the basis of their significant toxicity and selectivity against G-361 tumor cell line. The influence on the cell proliferation, apoptosis and cell cycle by western blotting, flow cytometry and biochemical assay of caspase-3/7 activity was studied in these cells.</p> <p>It was found that tested lupane triterpenes exhibited antiproliferative effects in G-361 tumor cell line compared to their natural precursors. However, the most significant effect was observed after application of compound code number 1, which is C-3 substituted betulin. This derivative caused induction of the programmed cell death in cancer cells derived from human malignant melanoma and could become a</p>

Keywords	potential anticancer drug. lupane triterpenes, betulin, lupeol, malignant melanoma, G-361 cancer cell line, antiproliferative, immunodetection, flow cytometry, activity of caspases-3/7, apoptosis
Number of pages	70
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	3
2.1	Nádorové onemocnění	3
2.1.1	Maligní melanom	5
2.1.2	Eventuality léčby maligního melanomu	7
2.1.2.1	„Single-agent“ chemoterapie	7
2.1.2.2	Polychemoterapie	8
2.1.2.3	Léčba cytokiny	9
2.1.2.4	Biochemoterapie	9
2.1.2.5	Cílená léčba	10
2.1.3	Léčba rakoviny kůže lokální farmakoterapií	10
2.2	Přírodní látky rostlinného původu	11
2.2.1	Saponiny	11
2.2.1.1	Betulinová kyselina, betulin a lupeol	13
2.2.1.2	Cytotoxická aktivita vybraných lupanových triterpenů a jejich syntetických derivátů	16
2.3	Proteiny související s apoptosou	18
2.3.1	Caspasa-3	20
2.3.2	PARP-1 [poly(ADP-ribose) polymerasa-1]	21
2.3.3	Protein p53	21
2.3.4	Mdm-2 (murine double minute-2)	22
2.3.5	Rb (retinoblastomový) protein	23
2.3.6	Bcl-2 (B-cell CLL/lymphoma 2, B-buňky CLL/lymfom 2)	23
2.3.7	Mcl-1 (myeloid cell leukemia 1, myeloidní buněčná leukémie 1)	25
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1	MATERIÁL	26
3.1.1	Použité chemikálie	26
3.1.2	Použité roztoky	27
3.1.3	Použité protilátky	28
3.1.4	Studované deriváty betulinu a lupeolu	28
3.1.5	Buněčná linie maligního melanomu a podmínky kultivace	29
3.2	METODY	30
3.2.1	Ovlivnění nádorových buněk a jejich sklizení	30
3.2.2	Příprava buněčných lysátů	31
3.2.3	Polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE), Western blot a imunodetekce proteinů na membráně	31
3.2.4	Průtoková cytometrie	33
3.2.5	Biochemická detekce aktivity caspas-3/7	33
4	VÝSLEDKY	35
4.1	Western blot analýza pro- a anti-apoptotických proteinů	35
4.2	Aktivita efektorových caspas-3/7 po ovlivnění buněk G-361 deriváty lupanových triterpenů	39
4.3	Analýza buněčného cyklu a apoptosy pomocí průtokové cytometrie po ovlivnění buněk G-361 deriváty lupanových triterpenů	41
5	DISKUSE	44

6	ZÁVĚR	49
7	LITERATURA	51
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	69

CÍLE PRÁCE

- Vypracovat přehled o problematice rakoviny, maligního melanomu, léčbě melanomu, studovaných látek (betulinová kyselina, betulin a jeho deriváty, lupeol a jeho deriváty) a apoptotických markerů.
- Cílem experimentální části bylo charakterizovat antiproliferační účinky vybraných derivátů betulinu a lupeolu na nádorovou buněčnou linii G-361 (buňky odvozené od lidského maligního melanomu) *in vitro* a stanovit buněčnou proliferaci, detekci buněčného cyklu a apoptosy průtokovou cytometrií, biochemickými testy aktivity caspas a Western blotem.

1 ÚVOD

Maligní melanom se v současné době řadí mezi nejzávažnější onemocnění s vysokou úmrtností. Každý rok zemře na toto onemocnění více než 50 000 pacientů (Pirard a Vries, 2007). Právě díky faktorům zhoršujícím životní prostředí (zvýšená expozice UV záření, nezdravý životní styl, znečištění atd.) se jeho incidence stále zvyšuje (200 000 pacientů ročně po celém světě, Mathers *et al.*, 2001). I přes široké portfolio dostupných léčiv a přes významný pokrok v medicíně zůstává prozatím jednou z nejdůležitějších možností léčby chemoterapie dakarbazinem s terapeutickou odpovědí pouze 7-25 % (Balch *et al.*, 1997; Bedikian *et al.*, 2006). Úspěšnost léčby maligního melanomu je tedy nízká a terapeutická odpověď nedostačující, proto byly v této předložené práci zkoumány nově syntetizované deriváty lupanových triterpenů, které vykazovaly významnou cytotoxickou aktivitu proti buňkám odvozeným od lidského maligního melanomu *in vitro*. Výhodou derivátů lupanových triterpenů je také lepší farmakokinetický profil a hydrofilita (Šarek *et al.*, 2011).

Triterpenoidy, především volné triterpenoidy, saponiny, fytosteroly, či jejich prekurzory se dostaly do popředí zájmu díky svým rozmanitým biologickým vlastnostem. Triterpeny patří mezi přírodní látky - terpeny (Connolly a Hill, 2005a; Connolly a Hill, 2005b; Džubák *et al.*, 2006). Přírodní látky jsou bohatým zdrojem sloučenin s protirakovinnými účinky. Právě přírodní látky a látky od nich odvozené tvoří více než 60 % protinádorových agens. Pochází původem z rostlin, mořských živočichů a mikroorganismů. Využití rostlin v léčbě lidských chorob i rakovinného onemocnění má dlouhou historii (Cragg a Newman, 2005).

Tato studie je zaměřena konkrétně na saponiny, přírodní lupanové triterpeny, mezi které se řadí kyselina betulinová, betulin a lupeol. I když jsou kyselina betulinová a další triterpeny známy dlouhou dobu, až do nedávna nebyla známa jejich selektivní cytotoxická aktivita proti buňkám lidského melanomu (Cichewicz a Kouzi, 2004; Eiznhamer a Xu, 2004; Salvador, 2010). Kyselina betulinová a betulin se nachází zejména v kůře bříz (*Betula* spp.), avšak lupeol se vyskytuje v ovoci a léčivých rostlinách (Džubák *et al.*, 2006). Cílem zkoumání nových léčiv je zvýšení terapeutického indexu látky, snížení lékové rezistence a jejich cílené působení pouze v nádorových buňkách. Vhodné modifikace jejich výchozí struktury nám mohou poskytnout analoga s velmi zvýšenou protinádorovou aktivitou. Proto jsou syntetizovány jejich deriváty, jež mohou vykazovat nižší toxicitu vůči nenádorovým

buňkám. Pro syntézu derivátů mohou být jejich prekurzory snadno modifikovány a substituovány v polohách C-3 a C-28 (Chatterjee *et al.*, 2000; Pakulski, 2005; Džubák *et al.*, 2006; Cmoch *et al.*, 2008; Pakulski *et al.*, 2009; Šarek *et al.*, 2009; Kommera *et al.*, 2011).

Maligní melanom je nádorové onemocnění kůže vznikající z melanocytů, buněk neuroektodermálního původu, buněk produkujících pigment kůže a očí. Nádor není častý, ovšem díky agresivnímu chování se řadí mezi nejzávažnější zhoubné nádory. U lidské populace je jedním z nejvíce smrtelných nádorů bez účinné léčby. Přestože je většina jedinců s diagnózou melanomu léčena chirurgickým odstraněním primárního nádoru, metastatické onemocnění vzdoruje všem současným možnostem léčby a má špatnou prognózu s mediánem přežití 6 měsíců. Před více než 20 lety byl genom melanomu podroben rozsáhlému zkoumání, jež vedlo k identifikaci několika genů podílejících se na genezi a progresi melanomu (Miller a Mihm, 2006; Dahl a Guldborg, 2007).

Dnes již existuje řada slibných nových léčiv, z nichž každé je účinné u malého procenta pacientů. V předkládané práci je uvedeno několik současných možností léčby rakoviny kůže, jako lokální farmakoterapie a léčby maligního melanomu, jako chemoterapie, polychemoterapie, biologická léčba cytokiny, biochemoterapie a cílená léčba. Standardní léčbou zatím zůstává podávání vysokých dávek interleukinu-2 a dakarbazinu. V budoucnu by pacienti mohli být léčeni na základě molekulární klasifikace nádoru selektivně cílenou léčbou, která bude určena pro podskupiny pacientů a bude založena na charakterizaci nádoru i charakterizaci imunitní odpovědi. Významný přínos v léčbě maligního melanomu představuje léčivo vemurafenib (PLX4032) a genistein. Vemurafenib je inhibitor proteinu BRAF a má protinádorové účinky proti melanomové buněčné linii nesoucí mutaci BRAF V600E, ale ne proti buňkám s nemutovaným BRAF (wild-type). Protein BRAF patří do rodiny raf/mil serin/threoninových proteinkinás a hraje roli v regulaci MAPK/ERK signální dráhy, která má vliv na buněčné dělení, diferenciaci a sekreci (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/673). Genistein je inhibitor fokální adhesivní kinasy (FAK), což je protein-tyrosinkinasa (Jilaveanu *et al.*, 2009; Chapman *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2012).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Nádorové onemocnění

Jedním z hlavních důvodů studia rakoviny je, že jedna pětina lidí zemře na toto onemocnění. Postupem času bylo objeveno mnoho proteinů, které vykazují abnormality během rakoviny a tyto abnormality mohou vést k nekontrolovatelnému růstu, zvýšenému dělení, potlačení buněčné smrti, nebo k jejich abnormálním znakům, jenž rakovinné buňky vykazují. Lidské tělo obsahuje více než 10^{14} buněk a z toho miliardy buněk každý den mutují. Avšak mutace může dát jedné z buněk selektivní výhodu, kdy rychleji roste, dělí se, přežívá snadněji než její sousední buňky a dává základ dalším mutantním klonům. Nakonec začnou mutantní klony prosperovat ze sousedních buněk. Tudíž mutace, konkrétně kompenzační mutace zajišťující přežívání nádorových buněk patří mezi tzv. „mission critical“ události (klíčové a kritické události), jejichž konvergence je nutná pro vývoj všech zhoubných nádorů. Dále je do těchto kritických událostí řazena deregulace buněčné proliferace, která je téměř ve všech případech spolu s potlačením buněčné smrti zásadní pro neoplastickou progresi. Dnes je známo, že aktivující mutace ovlivňující strukturu proteinu BRAF je součástí 40 % lidských melanomů, což má za následek konstitutivní signalizaci přes RAF k mitogenem aktivovanému proteinu (MAP)-kinasové dráhy (Evan a Vousden, 2001; Alberts *et al.*, 2008a; Davies a Samuels, 2010). Protein RAF (faktor asociovaný s RAS) je MAP kinasa kinasa kinasa (MAP3K) a je součástí MAPK/ERK dráhy. Po aktivaci proteinem RAS (GTPasa) může RAF fosforylovat a aktivovat proteinkinasy MEK1 a MEK2, které aktivují serin/threonin specifické proteinkinasy ERK1 a ERK2. Aktivované ERK jsou pleiotropní efekторы buněčné fyziologie a hrají důležitou roli v kontrole genové exprese související s buněčným dělením, apoptosou, diferenciací a buněčnou migrací (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5894).

Nádorové buňky se vyznačují dvěma dědičnými vlastnostmi: (1) reprodukují se navzdory omezování buněčného růstu a dělení normálních buněk; (2) napadnou a kolonizují oblast, která byla rezervována pro další buňky. Takto rostoucí a proliferující abnormální buňky nejsou kontrolovány a vedou ke vzniku tumoru. Dokud se nádorové buňky nešíří, mluvíme o nádoru benigním a naprostého vyléčení obvykle dosáhneme chirurgickým odstraněním. Jestliže je nádor maligní, buňky napadají okolní tkáň, mluvíme o rakovinném onemocnění. Invazivní buňky pak

vstupují do krve nebo lymfatických cév a vytvoří sekundární nádor, nazývaný metastáze. Je známo celkem šest charakteristických znaků maligního nádoru, které umožňují růst nádoru a šíření metastáz. Mezi tyto zásadní vlastnosti rakovinných buněk patří: soběstačnost v produkci růstových signálů, necitlivost k signálům zastavujícím buněčný cyklus, poškození apoptosy, neomezený replikační potenciál, schopnost angiogeneze a tvorba metastáz. Nicméně, v roce 2011 Hanahan a Weinberg uvádějí další čtyři znaky maligního nádoru: deregulace energetického metabolismu, únik před imunitním systémem, genomová nestabilita a mutace a nádorem vyvolaný zánět (Hanahan a Weinberg, 2000; Evan a Vousden, 2001; Alberts *et al.*, 2008a; Hanahan a Weinberg, 2011).

Již od svého počátku se díky studiu molekulární podstaty rakovinného onemocnění stala léčba účinnější. Téměř ve všech případech jsou cíle léčby zaměřeny na deregulaci buněčné proliferace, potlačení buněčné smrti a společně poskytují základní platformu pro progresi nádoru. Rakovina je klasifikována podle buněčné tkáně a typu buněk, ze kterého vznikla. Stejně tak jako progresi nádoru vedoucí k nekonečné kombinaci genetických a epigenetických změn, jež provázejí řadu různých onemocnění, tak i léčiva na rakovinné onemocnění musí být rozmanitá jako samotné onemocnění. Karcinomy vznikají z epiteliálních buněk a řadí se mezi nejčastější rakoviny u lidí. Sarkomy vznikají z pojivové tkáně nebo svalových buněk. Dále rozlišujeme leukémie a lymfomy, odvozené od bílých krvinek a jejich prekurzorů (hemopoetických buněk), i glioblastom, odvozený od buněk nervové soustavy. Většina nádorů je charakterizována podle jejich původu. Například karcinom bazálních buněk vzniká z keratinocytů v kůži a pokračuje syntézou cytokeratinových intermediárních filament. Zatímco buňky melanomu jsou odvozené od pigmentových buněk v kůži a často (ale ne vždy) pokračují tvorbou pigmentových granulí. Karcinom bazálních buněk kůže je lokálně invazivní a pouze vzácně metastazuje, ale melanomy se stávají častěji maligní a tvoří metastáze. A proto je karcinom bazálních buněk léčen okamžitě chirurgicky nebo lokálním ozářením, avšak maligní melanom metastazuje a je obvykle smrtelný (Evan a Vousden, 2001; Alberts *et al.*, 2008a).

Obecně platí, že rychlost vývoje populace buněk (i rakovinných) závisí na čtyřech parametrech: (1) mutační rychlosti, tzn. jakýkoliv člen populace prodělá genetickou změnu (pravděpodobnost na gen za jednotku času); (2) počtu reprodukcí se jedinců v populaci; (3) rychlosti reprodukce, tzn. průměrný počet generací potomstva vytvořený

za jednotku času; (4) selektivní výhodě využívané úspěšnými mutantními jedinci, tzn. poměr počtu přeživšího fertilního potomstva vytvořeného za jednotku času na poměr počtu přeživšího fertilního potomstva vytvořeného nemutantními jedinci (Alberts *et al.*, 2008a).

2.1.1 Maligní melanom

Melanom je šestým nejčastějším rakovinným onemocněním a tento zhoubný nádor má nejvyšší nárůst incidence (Rigel, 1997). Na základě článku Jemal *et al.* (2008) výskyt stále stoupá a v roce 2008 bylo odhadem ve Spojených státech amerických 62 480 nových případů (34 950 muži, 27 530 ženy) a 8 420 úmrtí (5 400 muži, 3 020 ženy). Podle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC) patří Austrálii, Nový Zéland mezi země s nejvyšším výskytem a Spojené státy americké se řadí až na sedmém místě (Jilaveanu *et al.*, 2009). Maligní melanom též moderně nazýván „černý mor“, poněvadž jeho výskyt až epidemicky narůstá a má vysokou úmrtnost (Chin *et al.*, 1998). Ačkoliv je většina jedinců s diagnózou melanomu léčena chirurgickým odstraněním primárního nádoru, metastatické onemocnění vykazuje rezistenci na dostupnou léčbu. Agresivita melanomu je dána okamžitou tvorbou metastáz se střední dobou přežití 6 měsíců. Melanom je relativně vzácný ve srovnání s jinými druhy rakoviny kůže (<5%), ale stále zodpovědný za 80 % všech úmrtí rakovin kůže (Miller a Mihm, 2006). Oproti dalším rakovinám toto nádorové onemocnění často postihuje mladé a lidi střední věku. Vrchol výskytu je mezi 35 až 55 lety věku (Tsao *et al.*, 2004).

Původ vzniku melanomu není přesně znám. Za rizikové faktory jsou považovány kožní fototyp, dysplastické névy, RTG záření, chronická iritace, imunosuprese, genetický podklad (u 2-5 %) a jiné. Jediným známým rizikovým faktorem týkajícího se životního prostředí je vystavení se ultrafialovému záření. A tedy změnám opalovacích návyků lze alespoň z části můžeme připsat dramatický nárůst výskytu za posledních 50 let. Ve skutečnosti se melanom vyskytuje více na straně kůže, která je vystavena slunečnímu záření. Nicméně, je vztah mezi melanomem a expozicí ultrafialovým zářením složitý. V kůži diferencované melanocyty reagují na ultrafialové záření tím, že produkují melanin, jenž je přenesen do okolních keratinocytů, což vede k odpovědi na opalování. Je známo, že výskyt melanomu je nižší u osob pracujících venku než u pracujících uvnitř. Pracující venku si totiž pokožku opalují pomalu a jsou méně náchylní k melanomu. Pracující uvnitř už tak často nevystavují pokožku slunečnímu záření a mají větší sklon k slunečním spáleninám (Houghton a Viola, 1981; Tucker

a Goldstein, 2003; Čáp *et al.*, 2005). Rovněž jsou více ohroženi jedinci kavkazoidní (europoidní) rasy než negroidní, se zrzavými vlasy či světlou vlasy, s modrými nebo zelenými očima a jedinci produkující méně pigmentu kvůli genetickým změnám v receptoru pro melanokortin-1 (Holman *et al.*, 1986; Valverde *et al.*, 1995; Palmer *et al.*, 2000).

Maligní melanom vzniká z epidermálních melanocytů nebo melanocytárních prekurzorových buněk odvozených z neurální lišty, migrujících do kůže a vlasových folikulů během embryonálního vývoje (Bennett, 1993). Je přítomen na kůži trupu, končetin, na dlaních a ploskách nohou a pod nehtovými ploténkami. Může se vyskytovat i v jiných lokalizacích, jako např. na sliznici dutiny ústní, nosní, vedlejších nosních dutinách, oblasti rekta a genitálu. Kromě toho může vznikat primárně v oku a játrech (Čáp *et al.*, 2005).

Iniciace a progresse melanomu jsou dále doprovázeny řadou histologických změn popsaných v Clarkově modelu (Clark, 1991). Jiným dělením na stádia klinického onemocnění je histologické podle Breslowa, založené na hodnocení invaze melanomu v milimetrech (Breslow, 1970). Clarkův model zahrnuje celkem pět stádií: (1) névy a benigní léze; (2) dysplastické névy vyznačující se náhodnými a nesouvislými cytologickými atypii; (3) fáze radiálního růstu, kde buňky získávají schopnost proliferace intraepidermálně; (4) fáze vertikálního růstu, kde buňky penetrují skrz bazální membránu do spodní dermis a podkožní tkáně; (5) metastazující melanom vyznačující se šířením buněk do jiných částí kůže a dalších orgánů. Nejkritičtější bodem je pravděpodobně přechod mezi třetí a čtvrtou fází. Růst keratinocytů není kontrolován, což odpovídá tloušťce tumoru, a je jedním z nejsilnějších ukazatelů metastazujícího onemocnění a nepříznivých klinických výsledků (Tsao *et al.*, 2004).

Pro rozpoznání změn maligního melanomu se užívá akronym přejatý z anglického jazyka ABCDE (Asymetry - asymetrie, Border - okraj, Color - barva, Diameter - průměr, Enlargement – růst v čase). Právě z pigmentových névů vzniká 40 až 50 % melanomů. Kromě nepravidelných okrajů, rozmazaných, neostrých okrajů s nepravidelnými zářezy a výběžky, skvrnitě barvy (hnědé až černé), velikosti větší než 5-6 mm a neustálého zvětšování se mezi další objektivní známky malignizace névu řadí krvácení, mokvání a nodulární růst v pozdních formách a zánětlivá reakce v okolí névu (Čáp *et al.*, 2005).

Dahl a Guldborg (2007) uvádějí, že akumulace somatických mutací u klíčových regulačních genů (např. proto-onkogeny *NRAS*, *BRAF*, *CDK4* a tumor supresorové geny

INK4A, *TP53*) je hnací silou iniciace a progresu vývoje melanomu. U melanocytárních nádorů byly zjištěny tři molekulární dráhy, u kterých často dochází k dysregulaci. Jsou to: RAS-RAF-MEK-ERK dráha (prostřednictvím mutací *BRAF*, *NRAS* nebo *KIT*), p16^{INK4A}-CDK4-RB dráha (prostřednictvím mutací *INK4A* nebo *CDK4*) a ARF-p53 dráha (prostřednictvím mutací *ARF* nebo *TP53*). Dále jsou známy ještě dvě dráhy, u nichž dochází k dysregulaci, avšak ne tak často. Jsou to: PI3K-AKT dráha (prostřednictvím mutací *NRAS*, *PTEN* či *PIK3CA*) a tzv. kanonická Wnt signální dráha neboli β -cateninová dráha (prostřednictvím mutací *CTNNB1* či *APC*); (Dahl a Gulberg, 2007).

2.1.2 Eventuality léčby maligního melanomu

Tato kapitola se bude věnovat možnostem léčby pomocí tzv. „single-agent“ chemoterapie, polychemoterapie, biologické léčby cytokiny, biochemoterapie a cílené léčby.

2.1.2.1 „Single-agent“ chemoterapie

„Single-agent“ chemoterapie má omezenou účinnost. Některá chemoterapeutická činidla vykazují jistý účinek na maligní melanom, avšak míra odezvy je relativně nízká (<25 %). Dakarbazin, sloučeniny platiny, vinca alkaloidy, deriváty nitrosomočoviny a taxany spadají mezi aktivní chemoterapeutika (Jilaveanu *et al.*, 2009). Cytotoxickou chemoterapií je v nádorových buňkách indukována buněčná smrt aktivací apoptotické kaskády, jež je iniciována uvolněním cytochromu *c* z mitochondrie a aktivací caspasy-9 (Searle *et al.*, 1975; Soengas a Lowe, 2003).

Dakarbazin je alkylační činidlo (terapeutická odpověď 7-25 %), podává se v monoterapii intravenózně a je účinný pro podkoží, lymfatické uzliny a plicní metastázy (Balch *et al.*, 1997; Bedikian, 2006). Temozolomid, imidazotetrazinový derivát dakarbazinu, působí na mozkové nádory, pro které je dakarbazin neefektivní (Bleehen *et al.*, 1995). U pacientů léčených temozolomidem byl medián přežití 7,7 měsíců a u pacientů léčených dakarbazinem 6,4 měsíců (Middleton *et al.*, 2000).

Další dvě látky mající aktivitu proti malignímu melanomu jsou cisplatina a karboplatina. U cisplatiny byla zaznamenána terapeutická odpověď až 16,3 % (Glover, 2003) a u karboplatiny 19 % (Evans *et al.*, 1987).

Vindesin, derivát vinblastinu, je zástupcem vinca alkaloidů. V jedné studii zaznamenali míru odpovědi 20 %, o pár let později ve studii z roku 2003 opět využili

vindesin jako chemoterapeutikum u druhé linie monoterapie, ale bez odezvy (Quagliana *et al.*, 1984; Emmert *et al.*, 2003).

Mezi zástupce derivátů nitrosomočoviny řadíme karmustin, lomustin, semustin a fotemustin. Tyto deriváty vykazovaly míru odezvy až 20 %, jestliže byly použity jako monoterapie u pokročilého stádia pacientů s melanomem. Jsou lipofilní a mají schopnost procházet přes hematoencefalickou bariéru, proto byly zkoumány i u mozkových metastáz. Protinádorové účinky včetně odezvy u mozkových metastáz byly zaznamenány pouze u fotemustinu s mírou odpovědi 24,2 % (Costanza *et al.*, 1977; Jacquillat *et al.*, 1990; Jones *et al.*, 1992). Naopak v roce 2004 Avril *et al.* (2004) uvádějí ve své studii srovnání dakarbazinu s fotemustinem s terapeutickými odpověďmi 7,2 % a 15,5 %.

Paclitaxel a docetaxel zařazujeme do skupiny taxanů. Paclitaxel je rostlinný produkt izolovaný z kůry stromu *Taxus brevifolia*. Jeho medián doby reakce je přibližně 5 měsíců a míra odpovědi 15,6 %. Docetaxel je syntetizován ze sloučeniny (10-deacetyl–baccatin III) extrahované z jehličí *Taxus baccata*, jeho míra odezvy je 17 % a medián doby reakce 9 měsíců (Wiernik a Einzig, 1993; Aamdal *et al.*, 1994; Bedikian *et al.*, 2004).

I když všechna chemoterapeutická činidla měla protinádorovou aktivitu, stále se nejvíce využívá dakarbazin a zůstává standardem monoterapie tohoto rakovinného onemocnění. Vzhledem k nízké míře odpovědi se chemoterapeutika často kombinují s jinými chemoterapeutiky nebo biologickými agens (Jilaveanu *et al.*, 2009).

2.1.2.2 Polychemoterapie

V polychemoterapii se nejčastěji kombinovala různá chemoterapeutická činidla (sloučeniny platiny, vinca alkaloidy nebo deriváty nitrosomočoviny) s dakarbazinem s léčebnou odpovědí v rozmezí 14 až 37 %. Nicméně, neprokázaly převahu nad monoterapií dakarbazinem (Costanza *et al.*, 1977; Fletcher *et al.*, 1988; Avril *et al.*, 1990). Nejvíce používanou polychemoterapií je kombinace cisplatiny, vinblastinu a dakarbazinu nebo kombinace cisplatiny, dakarbazinu, karmustinu a tamoxifenu s léčebnou odpovědí 30 až 50 % (Legha *et al.*, 1989). Vzhledem k nedostatku důkazů, že polychemoterapie je lepší než monoterapie chemoterapeutikem, je léčba maligního melanomu u první linie diskutabilní, jelikož toxicita spojená s polychemoterapií je vyšší než s monoterapií (Jilaveanu *et al.*, 2009).

2.1.2.3 Léčba cytokiny

Následující možností je léčba cytokiny, mezi které spadá interferon- α (IFN- α), interleukin (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-12 a IL-18, jakož i faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofagů (GM-CSF). Míry odezvy jsou nízké, ale trvalé. Zdá se, že alespoň podskupina pacientů by mohla být léčena cytokiny. Ačkoliv je tato léčba nadějná, vykazuje vysokou míru toxicity, což omezilo její využití v pokročilé fázi onemocnění. Zvýšení účinnosti a snížení toxicity bylo dosaženo použitím menších dávek spolu v kombinaci s chemoterapií (biochemoterapií). Rovněž byly toxické účinky méně výrazné použitím pegylovaného IFN- α (PEG-IFN- α); (Cascinelli *et al.*, 2001; Dummer *et al.*, 2006). Pokud byl podáván pouze interferon α , bylo dosaženo míry odezvy 10 až 22 % a nebyla závislá na dávce (Robinson *et al.*, 1986; Creagan *et al.*, 1987; Miller *et al.*, 1989). Podávání vysoké dávky IFN- α je v současné době schváleno ve Spojených státech amerických jako adjuvantní léčba u pacientů s vysokým rizikem relapsu po chirurgické resekci (Jilaveanu *et al.*, 2009). U pacientů v pokročilém stádiu byl také podáván ve vysokých dávkách interleukin-2. Jeho celková terapeutická odpověď byla 16 % (6 % úplná, 10 % částečná) a medián přežití 11,4 měsíců (Atkins *et al.*, 1999; Atkins *et al.*, 2000).

2.1.2.4 Biochemoterapie

S cílem zvýšit míru odezvy a míru přežití byla kombinována chemoterapeutická agens s biologickými. Daný způsob léčby nazýváme biochemoterapie neboli chemoimunoterapie. Míra odpovědi u těchto léčiv byla vysoká, až 60 % (Legha *et al.*, 1996; Legha *et al.*, 1997). Léčba biochemoterapií je založena na postupném či současném podávání biologických léčiv (IFN- α , IL-2 nebo obojí) spolu s dalšími chemoterapeutiky. Ovšem u všech se nepodařilo prokázat statisticky významný přínos oproti polychemoterapii. Její nevýhodou je toxicita (Flaherty *et al.*, 2001; Ridolfi *et al.*, 2002). Až 52% míry odezvy bylo dosaženo kombinací IFN- α , IL-2 a dakarbazinu (Neri *et al.*, 2006). Naopak Hauschild *et al.* (2001) srovnávají ve své studii IFN- α , dakarbazin s nebo bez IL-2. Nebyl ale prokázán žádný významný rozdíl. Terapeutická odpověď pro dakarbazin, IFN- α byla 18,0 % a pro dakarbazin, IFN- α , IL-2 16,1 %. Nejrozšířenější biochemoterapií s mírou odpovědi až 60 % je kombinace cisplatinu, vinblastinu, dakarbazinu, IFN- α a IL-2. Buď jsou nejdříve podávány chemoterapeutická činidla a až poté následuje cytokinová léčba, nebo jsou podávány současně (Legha *et al.*, 1996; Legha *et al.*, 1997; Eton *et al.*, 2002; Bajetta *et al.*, 2006; Hess *et al.*, 2007).

I když se zdá, že biochemoterapie je nejúčinnější z hlediska míry odezvy, není jasná převaha nad samotnou chemoterapií s ohledem na celkové přežití a toxicitu. Tudíž je stále nutné hledat alternativní přístupy léčby (Jilaveanu *et al.*, 2009).

2.1.2.5 Cílená léčba

Léčba je cílena na inhibici nadexprimovaných a konstitutivně aktivovaných specifických proteinů. Rovněž je cílem vyšší míra odezvy a díky selektivitě cílových míst u maligních buněk snížení toxicity. V cílené léčbě se uplatňují hlavně inhibitory proteinkinas - Sorafenib (BAY 43-9006; Davies *et al.*, 2002; Flaherty *et al.*, 2004; Karasarides *et al.*, 2004; Wilhelm *et al.*, 2004; Eisen *et al.*, 2006; Flaherty, 2006, Fecher *et al.*, 2008), inhibitory cílového místa rapamycinu u savců – Temsirolimus (Margolin *et al.*, 2005), cílené protilátky na cytotoxický T-lymfocytární antigen – Ipilimumab (Hamid *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2007), agonisté „toll-like“ receptorů - CpG 7909 (Wagner *et al.*, 2004), léčiva cílena na Bcl-2 – Oblimersen (Jansen *et al.*, 1998; Bedikian *et al.*, 2006), antiangiogenní léčiva cílená proti signální dráze VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) - kombinace interferonu s bevacizumabem, PI-88 (antiangiogenní a antimetastatický inhibitor heparanasy), semaxanib, sunitinib, IMC-1121B s dakarbazinem, aflibercept (Peterson *et al.*, 2004; Thomson *et al.*, 2005; Varker *et al.*, 2007) a inhibitory „heat shock“ proteinu 90 (Grbovic *et al.*, 2006; Kefford *et al.*, 2007; Chapman *et al.*, 2011).

Bcl-2 je antiapoptotický protein exprimující se u pokročilých melanomů a také je spojován s rezistencí k chemoterapii. Tudíž je využíván oblimersen, což je „antisense“ oligonukleotid, který se váže na mRNA pro Bcl-2 a tím blokuje jeho translaci. Přidání oblimersenu k dakarbazinu zlepšilo výsledky celkového přežití (9 oproti 7,8 měsícům) a celkové míry odezvy (13 % oproti 7,5 %). Nicméně kvůli nedostatečnému zlepšení celkového přežití, celkové míry odezvy a zvýšené toxicitě na oblimersen nebyla tato kombinace léčiv schválena (Jansen *et al.*, 1998; Bedikian *et al.*, 2006).

2.1.3 Léčba rakoviny kůže lokální farmakoterapií

Lokální farmakologie se zaměřuje jednak na nemelanomové kožní nádory, tzv. „lentigo maligna“ (*in situ* melanoma, LM) a na metastazující melanom (MM). Mezi nemelanomové kožní nádory patří především aktinická keratóza (AK), bazocelulární karcinom (bazaliom, BCC) a spinocelulární karcinom (spinaliom, SCC). Lze k nim přiřadit také Bowenovu chorobu (BD), erythroplasia Queyrat (EQ) a extramamární Pagetovu chorobu (EPD). Jestliže jsou lokální léčiva používaná

u nemelanomových nádorů, je třeba vzít v úvahu mnoho faktorů, např. schválenou indikaci, účinnost, vedlejší účinky, preferenci lékaře, vyhovění pacientovi a samozřejmě cenu. Nejvýhodnějším, co se týče ceny, je 5-fluorouracil. Imiquimod je zase nejuniverzálnější. Na léčbu keratózy je nejvhodnější 3% diclofenakový gel v 2,5% kyselině hyaluronové. Díky své účinnosti a krátké době léčby (2-3 dny) je nadějným léčivem ingenol mebutát. I když jsou zapotřebí další studie na větších sériích pacientů. Využití lokální farmakoterapie pro EQ, EPD, LM a metastazující melanom je omezeno na úroveň důkazu („level of evidence“) IV (Chitwood *et al.*, 2013; Micali *et al.*, 2014).

2.2 Přírodní látky rostlinného původu

Využití rostlin v léčbě lidských chorob i rakovinného onemocnění má dlouhou historii (Hartwell, 1982). Jsou důležitým zdrojem účinných protinádorových látek. Více než 60 % protinádorových látek získaných z přírodních zdrojů, původem z rostlin, mořských živočichů a mikroorganismů, je v současné době užíváno. Zájem o přírodní látky rostlinného původu začal v roce 1950 objevem a vývojem vinca alkaloidů (vinblastin, vinkristin) a podofylotoxinů jako potencionálních chemoterapeutik. Postupem času vše vedlo k objevu dalších léčiv rostlinného původu včetně taxanů, derivátů kamptotecinu (topotecan, irinotecan), derivátů epipodofylotoxinu (etoposid) a jejich zavedení do klinické praxe. Mají však své nevýhody: omezenou rozpustnost ve vodných roztocích, úzký terapeutický index a jsou toxické nejen vůči rakovinným, ale i normálním buňkám. Z tohoto důvodu je cílem zkoumání nových léčiv se zaměřit na zvýšení terapeutického indexu látky, a aby cíleně působily jen v nádorových buňkách. Dnes jsou primárními terči vývoje nových léčiv molekuly signálních transdukčních drah, proteiny účastníci se nádorové angiogeneze a maligní kmenové buňky. Slibnými přírodními látkami nebo látkami od nich odvozených, které jsou v klinických a preklinických studiích, jsou například silvestrol, betulinová kyselina, combretastatin A-4, roscovitin či flavopiridol (Newman *et al.*, 2003; Cragg a Newman, 2005; Shoeb, 2006; Giaccia a Turcotte, 2010).

2.2.1 Saponiny

Saponiny jsou steroidní nebo triterpenoidní glykosidy vyskytující se v rostlinách, mořských organismech (Mahato *et al.*, 1982) a obsahující hydrofilní mono- nebo oligosacharidy připojené k hydrofobnímu sapogenu. Jsou významné pro své

biologické a farmaceutické vlastnosti, především protirakovinné (Chiang *et al.*, 1991; Hu *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1996), antivirální (Ikeda *et al.*, 2000), antifungicidní (Hufford *et al.*, 1988), protizánětlivé, anti-HIV, nebo např. účinky proti malárii (Yamashita *et al.* 2002; Mutai *et al.*, 2004). Rovněž mají významný vliv na růst rostlin (Ohara a Ohira, 2003).

Triterpeny se řadí mezi přírodní látky, terpeny. Terpeny spolu se steroly tvoří rozsáhlou skupinu isoprenoidů. Můžeme je rozdělit dle počtu stavebních molekul isoprenu (2-methylbut-1,3-dienu) na monoterpeny, seskvi-, di-, sester-, tri-, tetra- a polyterpeny (Džubák *et al.*, 2006). Vyskytují se nejen ve vyšších rostlinách, ale vzácně i v houbách anebo ojediněle v mikroorganismech, plísních a mořských organismech (Connolly a Hill, 2005a; Connolly a Hill, 2005b). Do této skupiny bylo zařazeno přibližně 30 000 identifikovaných sloučenin. Díky svým rozmanitým biologickým účinkům se v poslední době dostaly do popředí zájmu volné triterpenoidy, saponiny, fytosteroly, či jejich prekurzory (Džubák *et al.*, 2006). Na počátku 50. let 19. století Růžička a kol. zjistili, že veškeré známé $C_{30}H_{50}O$ triterpenové alkoholy (do té doby) byly biosyntetizovány podobně, a proto navrhli biogenetické isoprenové pravidlo (soubor zásad), jimž mohou vysvětlit biosyntézu každého základního skeletu triterpenů. Ze skvalenu pak vychází biosyntéza samotných triterpenů (Růžička *et al.*, 1953; Eschenmoser *et al.*, 1955; Arigoni, 1959; Růžička *et al.*, 1959; Růžička *et al.*, 1963; Xu *et al.*, 2004).

Pohodlným způsobem dodání léčiva do určité lidské buňky je pomocí modifikace saponinů mono- či trimannosylovými zbytky a jejich interakcí s mannosovými receptory. V glykoproteinech patogenních bakterií, kvasinek, virů a různých parazitů se vyskytují α -D-mannopyranosylové koncové jednotky, jež jsou rozpoznávány receptory makrofágů (Ezekowitz a Stahl, 1988) a dendritických buněk (Jiang *et al.*, 1995; Sallusto *et al.*, 1995). Rozvětvený trisacharidový 3,6-di-O-(α -D-mannopyranosyl)- α -D-mannopyranosylový ligand se s vysokou afinitou váže na tyto mannosové receptory (Tanaka *et al.* 2000) a poskytuje možný způsob, jak transportovat antigeny nebo léčiva do lidských dendritických buněk či makrofágů. Navíc připojení trimannosidových zbytků na saponin zvyšuje jejich rozpustnost (Cmoch *et al.*, 2008).

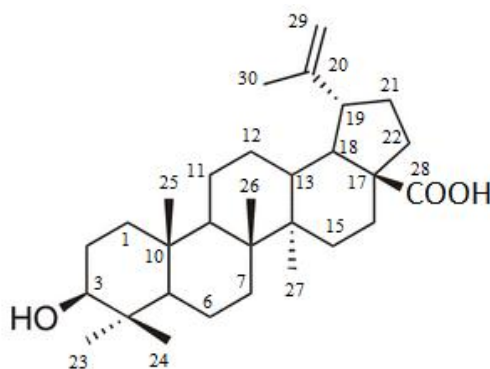
Pozoruhodně se Shashidině skupině podařilo izolovat malou skupinu cholestanových glykosidových saponinů z *Ornithogalum saundersiae* vykazující cytotoxickou aktivitu v nanomolárních koncentracích (Kubo *et al.*, 1992; Mimaki *et al.*, 1997). Tyto saponiny obsahují nové 3β , 16β , 17α -trihydroxycholest-5-en-22-onové aglykony s acetylovaným

disacharidem na uhlíku C-16. Nejvýznamnějším a nejaktivnějším saponinem je OSW-1. Je 10-100 krát více cytotoxický vůči některým nádorovým buněčným liniím než klinicky používané protirakovinné agens, jako je mitomycin C, adriamycin, cisplatina, camptothecin a paclitaxel. Díky jeho cytotoxicitě, jedinečnému mechanismu účinku a selektivitě k maligním nádorovým buňkám mají OSW-1 a jeho analoga velký potenciál jako protirakovinné agens. Nicméně, samotné OSW-1 je cytotoxické nejen k nádorovým buňkám, ale i k normálním lidským buňkám a má úzké terapeutické okno. Proto byly vyvinuty deriváty OSW-1. Deriváty jsou 40-150 krát citlivější k rakovinným než k normálním lidským buňkám a jsou 15-3000 krát méně cytotoxické k normálním buňkám než OSW-1. Vše naznačuje tomu, že analoga OSW-1 mohou mít širší terapeutické okno než samotné OSW-1 (Zhou *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005; Maj *et al.*, 2011).

2.2.1.1 Betulinová kyselina, betulín a lupeol

Betulinová kyselina [3 β -hydroxylup-20(29)-en-28-ová kyselina], betulín [3 β -28-dihydroxylup-20(29)-en] a lupeol [3 β -hydroxylup-20(29)-en] jsou sloučeniny rostlinného původu s dlouhou historií. Patří mezi saponiny, konkrétně mezi přírodní lupanové triterpeny (Cmoch *et al.*, 2008).

Betulinová kyselina (Obr. 1) je bílá krystalická látka. Byla izolována z mnoha taxonomicky rozmanitých druhů (Hayek *et al.*, 1989; Maurya *et al.*, 1989; Baglin *et al.*, 2003; Cichewitz a Kouzi, 2004; Krasutsky, 2006). Značné množství nalezneme ve vnější kůře různých stromů, především v bříze, *Betula* spp. (*Betulaceae*), jež je také primárním zdrojem jejího C-28 alkoholového prekurzoru, betulínu, z něhož může být snadno syntetizována (Kim *et al.*, 1997). Zajímavostí je, že už v minulosti byla bílá březová kůra (*Betula alba*) používána v lidovém léčitelství Indiány (Fulda S., 2009).

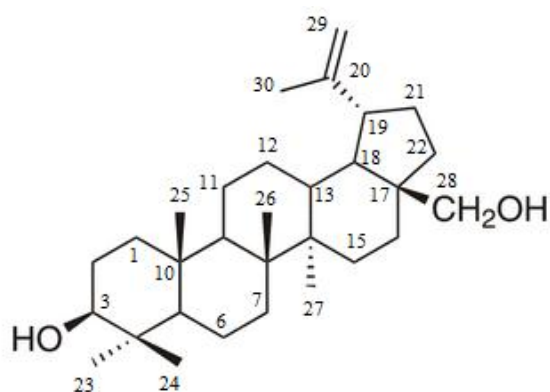


Obr. 1 Struktura kyseliny betulinové. Upraveno dle Cichewitz a Kouzi, 2004.

Betulinová kyselina má celou řadu biologických vlastností (Pisha *et al.*, 1995; Kvasnica *et al.*, 2005), včetně antibakteriálních, protizánětlivých, antimalarických, nejdůležitější jsou však spojeny s inhibicí replikace kmenů virů lidské imunodeficiency (HIV) a cytotoxicitou proti řadě nádorových buněčných linií (Cragg a Newman, 2005; Fulda, 2009). Až na přelomu 90. let bylo popsáno cytostatické působení kyseliny betulinové jako takové (Yasukawa *et al.*, 1991). Pisha *et al.* (1995) uvádějí právě cytotoxický účinek proti buněčným liniím lidského melanomu. Nicméně novější studie ukazují, že má širší spektrum účinku proti dalším typům nádorových buněk (Schmidt *et al.*, 1997; Fulda, 1999; Zuco *et al.*, 2002). Protinádorová aktivita je přímo spojena s produkcí reaktivních forem kyslíku a s její schopností vyvolat permeabilizaci mitochondriální membrány, což je hlavní děj v apoptotickém procesu, který spustí buněčnou smrt. Narušením transmembránového potenciálu je uvolněn cytochrom *c* a AIF (apoptosu indukující faktor), poté jsou aktivovány caspasy-3 a -8, štěpeny substráty s následnou nukleární fragmentací (Fulda *et al.*, 1998; Raghuvar Gopal *et al.*, 2005).

Rovněž inhibuje *in vitro* aktivitu aminopeptidasy N (Melzig a Bormann, 1998) a má slabé inhibiční účinky proti topoisomerase I a IIa (Syrovets *et al.*, 2000). Její vlastností je, že je účinná v prostředí s nižším pH (pH < 6,8), jež je vlastní většině nádorů (Noda *et al.*, 1997; Stubbs *et al.*, 2000). Dále vykazuje selektivní protinádorovou aktivitu proti neuroektodermálním nádorům (Kim *et al.*, 1998), zahrnující lidský melanom, neuroblastom a Ewingův sarkom. Obzvláště slibnou kombinací v protirakovinné léčbě může být využití kyseliny betulinové spolu s konvenčními chemoterapeutiky či radioterapií. Její deriváty vykazují nižší toxicitu vůči nenádorovým buňkám, a proto jsou zkoumány. Má celkem tři místa přístupná pro derivatizaci a to pozice: C-3 hydroxylovou skupinu, C-20 alken a C-28 karboxylovou skupinu (Pathak *et al.*, 2002; Šarek *et al.*, 2010). Mohou být připraveny chemickou syntézou a biotransformací prostřednictvím bakterií (Chatterjee *et al.*, 2000).

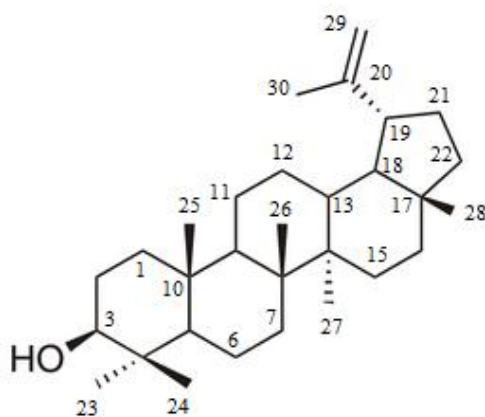
Betulin (Obr. 2) najdeme zejména v kůře bříz (*Betula* spp.), z nichž je odvozen také jeho název. Díky přítomnosti betulinu je březová kůra bílá a má specifické vlastnosti, jako např. protiplísňové a antibakteriální. Ale jeho deriváty disponují dalšími biologickými vlastnostmi (hepatoprotektivními, anti-HIV, protizánětlivými, protivirovými, aj.), (Simonsen a Ross, 1957; Džubák *et al.*, 2006; www.betulinines.cz).



Obr. 2 Struktura betulinu. Upraveno dle Cichewitz a Kouzi, 2004.

V poloze C-3 má sekundární β -hydroxylovou skupinu a v poloze C-28 primární hydroxylovou skupinu, které mohou být snadno modifikovány a substituovány pro syntézu derivátů (Šarek *et al.*, 2003; Šarek *et al.*, 2005; Cmoch *et al.*, 2008; Šarek *et al.*, 2010; Kommera *et al.*, 2011).

Lupeol (Obr. 3) najdeme v léčivých bylinách (Minocha a Tiwari, 1981; Oliveira *et al.*, 2002) a v ovoci, např. mangu, jablku (Anjaneyulu *et al.*, 1982). Vyznačuje se chemopreventivními účinky: potlačuje benzoylperoxid (BPO), který indukuje kožní toxicitu prostřednictvím aktivace enzymových antioxidantů inaktivovaných BPO. Do skupiny enzymových antioxidantů spadá glutathiontransferasa, glutathionreduktasa, glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, glutathionperoxidasa a katalasa (Saleem *et al.*, 2001). Bylo prokázáno, že vykazuje protizánětlivé (Della loggia *et al.*, 1994; Akihisa *et al.*, 1996), antiartritické (Kweifio-Okio *et al.*, 1995; Geetha *et al.*, 1998) a antimutagení účinky (Guevara *et al.*, 1996). Také má antioxidantní a antiangiogenní účinky (You *et al.*, 2003; Saleem *et al.*, 2001). Na základě těchto zjištění může být využit u nemocí vyvolaných volnými radikály (Saleem *et al.*, 2001). Jeho deriváty vykazují i jiné biologické vlastnosti, například cytotoxické (Šarek *et al.*, 2003; Mutai *et al.*, 2004; Džubák *et al.*, 2006; Pakulski *et al.*, 2009; Šarek *et al.*, 2010).



Obr. 3 Struktura lupeolu. Upraveno dle Cichewitz a Kouzi, 2004.

2.2.1.2 Cytotoxická aktivita vybraných lupanových triterpenů a jejich syntetických derivátů

Byl testován vliv lupanových triterpenů a jejich syntetických derivátů na životaschopnost normálních a nádorových buněčných linií různého histopatologického původu. Konkrétně byla stanovena protinádorová aktivita lupeolu a jeho derivátu substituovaného v polohách C-3 a C-28 (látka s kódovým označením **3**), betulinu a jeho derivátů substituovaných v poloze C-3 (látky s kódovým označením **1**, **2**) a kyseliny betulinové. Byly porovnány *in vitro* cytotoxické aktivity vybraných lupanových triterpenů a jejich syntetických analog proti lidským kožním fibroblastům, BJ, a nádorovým buněčným liniím, zahrnující nádorové buněčné linie odvozené od T-lymfoblastické leukémie, CEM, adenokarcinomu prsu, MCF7, cervikálního karcinomu, HeLa, a maligního melanomu, G-361. Před stanovením viability buněk byly buňky vystaveny šesti koncentracím v triplicátech po dobu 72 hodin. Hodnoty IC_{50} (koncentrace látky inhibující životaschopnost 50 % buněk) získané z Calcein AM testu cytotoxicity jsou uvedeny v Tabulce 1. Hodnoty IC_{50} prekurzorů betulinu a lupeolu a kyseliny betulinové jako pozitivní kontroly byly testovány již v roce 2008 Laboratoří růstových regulátorů, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci publikované v Cmoch *et al.* (2008) a hodnoty IC_{50} syntetických derivátů byly testovány v roce 2013 ve stejné laboratoři.

Tab. 1 Hodnoty IC₅₀ (μM) získané Calcein AM testem cytotoxicity v závislosti na testovaných nádorových a normálních buněčných liniích. Průměry ± SD byly získány ze tří nezávislých měření provedených v triplicátech

Sloučeniny	Buněčné linie (IC ₅₀ , μM)				
	CEM	MCF7	HeLa	G-361	BJ
Betulinová kyselina	40 ± 2,8	>50	47,6 ± 1,9	>50	>50
Betulin	21,2 ± 3,4	>50	>50	13,4 ± 0,8	48,6 ± 0,1
Lupeol	27,6 ± 1,4	>50	>50	>50	>50
1	5,5 ± 0,1	2,6 ± 0,4	1,5 ± 0,4	1,1 ± 0,1	6,9 ± 0,7
2	6,7 ± 1,1	6,6 ± 1,5	5,4 ± 0,8	5,5 ± 0,8	5,4 ± 0,8
3	13,7 ± 4,9	7,8 ± 1,7	4,7 ± 0,3	4,8 ± 0,7	18,0 ± 0,8

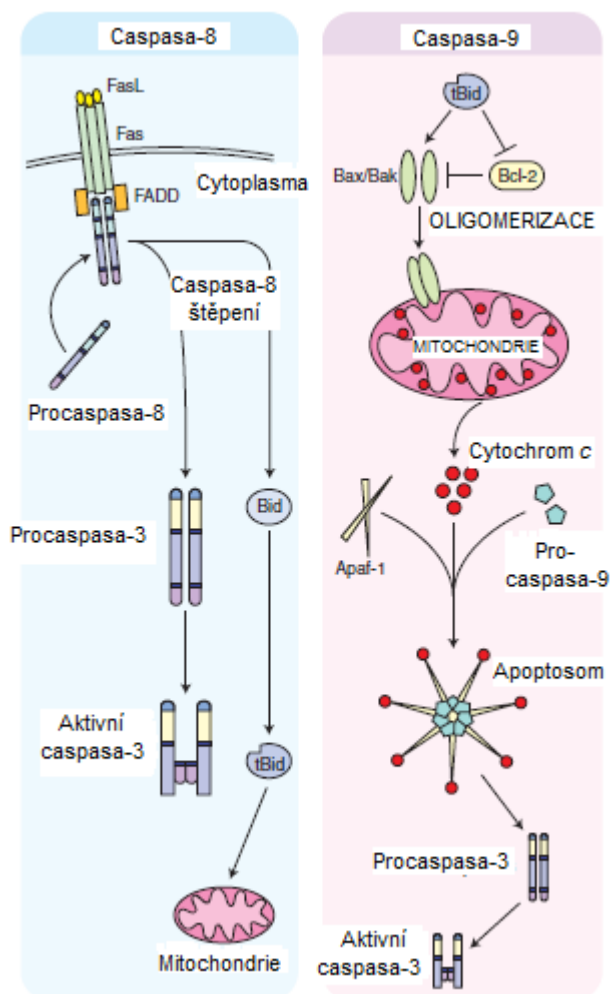
*Betulinová kyselina byla použita jako pozitivní kontrola. Hodnoty IC₅₀ kyseliny betulinové, betulinu a lupeolu byly převzaty z Cmoch *et al.*, 2008 a hodnoty IC₅₀ látek **1**, **2** a **3** byly měřeny v Laboratoři růstových regulátorů, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci.

Všechny tři deriváty měly oproti svým prekurzorům výrazný cytotoxický účinek na použité nádorové buněčné linie v nízkých mikromolárních koncentracích (IC₅₀ 1,1 ± 0,1 až 13,7 ± 4,9 μM). Nicméně, vykazovaly značnou toxicitu i proti normálním buňkám (BJ fibroblastům, IC₅₀ 5,4 ± 0,8 až 18,0 ± 0,8 μM). Terapeutický index látky **2** není příliš vysoký vzhledem k její vysoké cytotoxicitě na normální lidské fibroblasty, ale látky **1** a **3** vykazovaly 3 - 6 násobný rozdíl cytotoxicity na G-361 buňky proti BJ buňkám. Prekurzory, betulin a lupeol, měly podobné hodnoty IC₅₀ jako pozitivní kontrola kyselina betulinová, která byla neaktivní nebo vykazovala minimální cytotoxickou aktivitu (IC₅₀ 40 ± 2,8 μM) vůči CEM buněčné linii. Avšak betulin byl navíc aktivní proti nádorovým buněčným liniím odvozeným od maligního melanomu, G-361 (IC₅₀ 13,4 ± 0,8 μM) a od T-lymfoblastické leukémie, CEM (IC₅₀ 21,2 ± 3,4 μM), kdežto lupeol byl aktivní v menší míře pouze proti CEM buněčné linii (IC₅₀ 27,6 ± 1,4 μM). Nejúčinnější sloučeninou byla látka **1**, jež vykazovala cytotoxickou aktivitu proti všem nádorovým buněčným liniím, ale proti G-361 buněčné linii vykazovala vysokou selektivitu (IC₅₀ 1,1 ± 0,1 μM). Výsledky získané Calcein AM testem znázorňují tři jedinečné synteticky připravené deriváty lupanových triterpenů s protinádorovou aktivitou na několik nádorových buněčných linií, zejména na buněčné linie G-361 a HeLa, v nízkých mikromolárních koncentracích.

2.3 Proteiny související s apoptosou

Apoptosa neboli programovaná buněčná smrt je důsledkem řady přesně regulovaných událostí, které se často mění v nádorových buňkách. To nám poskytuje příležitost pro selektivní klinickou intervenci k indukci programované smrti nádorových buněk, v ideálním případě bez ovlivnění normálních buněk (Kerr *et al.*, 1994; Kasibhatla a Tseng, 2003). Mnohobuněčný organismus eliminuje nadbytečné, poškozené nebo infikované buňky právě pomocí apoptosy. Mechanismy zapojené v procesu apoptosy v savčích buňkách popsal Horwitz (1999) na hlístici. Apoptosa je fyziologický proces vyznačující se určitými znaky (kondenzací chromatinu, kondenzací cytoplasmy, intaktní mitochondrií, intaktními lysozomy, tvorbou membránových vesikulů, postihuje jednotlivé buňky, hydrolýzou chromatinu, není spojena se zánětem atd.), (Kerr *et al.* 1972; Wyllie *et al.*, 1980; Kerr, 2002). Nicméně, teprve až v 90. letech byla programovaná buněčná smrt spojena s aktivací cysteinových proteas – caspas, které štěpí klíčové intracelulární substráty (Cerretti *et al.*, 1992; Nicholson *et al.*, 1995; Alnemri *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996; Thornberry a Lazebník, 1998). Existují dvě hlavní signální dráhy zprostředkovávající apoptotickou buněčnou smrt: vnější receptorová a vnitřní mitochondriální (Trauth *et al.*, 1989; Itoh a Nagata, 1993; Ashkenazi a Dixit, 1998; Green a Reed, 1998; Danial a Korsmeyer, 2004).

Vnější dráha je iniciována vazbou extracelulárního ligandu (např. FasL) na transmembránový „receptor smrti“ (např. Fas receptor), což indukuje oligomerizaci a aktivaci receptoru (Trauth *et al.*, 1989; Itoh a Nagata, 1993; Danial a Korsmeyer, 2004). Po aktivaci se na intracelulární doménu receptoru (např. FADD - Fas associated death domain-containing protein) váží adaptorové proteiny a poté se celý komplex naváže na prodoménu iniciačních caspas (např. caspasa-8 nebo -10), díky čemuž dochází k jejich dimerizaci a aktivaci. Tyto komplexy jsou označovány jako DISC neboli signální komplexy indikující buněčnou smrt (Kischkel *et al.*, 1995). Aktivovaná caspasa-8/10 pak může přímo štěpit a aktivovat efektorové caspasy, jako caspasu-3. V některých buněčných typech je vnější dráha dostačující k iniciaci buněčné smrti (buněčný typ I), ale v jiných buňkách (buněčný typ II) musí caspasa-8 navíc zapojit i mitochondrie, což je popsáno níže (Obr. 4) jako vnitřní dráha (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998; Scaffidi *et al.*, 1998). Dalšími receptory smrti (DR), jež se stejně jako FasL-Fas receptor mohou účastnit vnějších apoptotických dráh jsou komplex TNF ligand-TNF-R1 a komplexy DR4/5-Apo2 L/TRAIL ligand.



Obr. 4 Aktivace iniciačních caspas. Caspasa-8: vnější dráha je iniciována v plazmatické membráně, kde ligand (FasL) interaguje s transmembránovým receptorem (Fas), což indukuje oligomerizaci receptoru. Fas receptor má intracelulární DD (death domain), která umožňuje navázání adaptorového proteinu FADD z cytoplasmy přes jeho DD. K tomuto komplexu se váže caspasa-8 prostřednictvím interakce mezi DED (death effector domain) na FADD a podobnou sekvencí DED caspasy-8. Aktivní caspasa-8 může pak přímo aktivovat caspasu-3, nebo může štěpit protein Bid, jež napomáhá uvolnění cytochromu *c* z mitochondrie. Caspasa-9: caspasou-9 je aktivována vnitřní mitochondriální dráhou. V mitochondrii anti-apoptotičtí členové rodiny Bcl-2 (např. Mcl-1, Bcl-2, Bcl-X_L) inhibují uvolňování cytochromu *c* z mitochondriálního mezimembránového prostoru. Naopak pro-apoptotičtí členové rodiny Bcl-2 (např. Bax, Bak) usnadňují uvolňování cytochromu *c*. Pouze proteiny s motivem BH3 pomáhají regulovat rovnováhu mezi pro- a anti-apoptotickými členy rodiny Bcl-2. Také je aktivita proteinů rodiny Bcl-2 regulována na různých úrovních: na úrovni exprese genů (ovlivněné např. proteinem p53), fosforylace/defosforylace proteinů aj. Kontrolním bodem vnitřní dráhy apoptosy je poměr Bax/Bcl-2, po jehož zvýšení je již apoptosa ireverzibilní, a je regulován anti-apoptotickými (Rb, Mcl-1, Bcl-2 atd.) a pro-apoptotickými proteiny (Bax, p53 atd.). Po translokaci cytochromu *c* do cytoplasmy se cytochrom *c* váže na Apaf-1, díky čemuž dochází ke konformačním změnám v Apaf-1 a oligomerizaci do heptamerické struktury známé jako apoptosom. Na apoptosom se váže iniciační caspasa-9. Takto aktivovaná caspasa-9 pak přímo štěpí efektorové caspasy, jako caspasu-3. Následně aktivovaná caspasa-3 štěpí protein PARP. Převzato a upraveno z Parrish *et al.*, 2013.

Ve vnitřní dráze hrají centrální roli mitochondrie. Nejprve caspasa-8 štěpí protein Bid, který aktivuje pro-apoptotické členy rodiny Bcl-2 a antagonizuje anti-apoptotické proteiny. Následně dochází k permeabilizaci vnější mitochondriální membrány a uvolnění jedné z komponent dýchacího řetězce - cytochromu *c* z mezimembránového prostoru mitochondrie do cytoplasmy. Cytochrom *c* interaguje s adaptorovým proteinem Apaf-1 (faktor aktivující apoptotické proteasy-1). Poté se na tento komplex váže pro-caspasa-9, díky čemuž dochází k její aktivaci, a vzniká heptamerický komplex apoptosomu (Liu *et al.*, 1996; Zou *et al.*, 1997; Acehan *et al.*, 2002; Boatright *et al.*, 2003). Aktivovaná caspasa-9 štěpí a aktivuje „downstream“ efektorové caspasy (Obr. 4), například caspasu-3 (Slee *et al.*, 1999). Mitochondriální dráha je regulována pozitivními a negativními regulátory. Mezi tzv. spouštěče se mohou řadit – onkogeny, nedostatek kyslíku (hypoxie), deprivace růstových faktorů, volné radikály, virové infekce, hypertermie, radiace, toxiny a další stresové signály. Kromě cytochromu *c* mohou být do cytoplasmy uvolněny i proteiny Smac/DIABLO a AIF (Du *et al.*, 2000; Saelens *et al.*, 2004).

2.3.1 Caspasa-3

Caspasy jsou cysteinové proteasy (cysteinylní aspartát-specifické proteasy) a jsou syntetizovány v buňce jako neaktivní zymogeny (pro-caspasy) aktivující se proteolytickým štěpením (Thornberry *et al.*, 1992; Earnshaw *et al.*, 1999). Deset hlavních caspas bylo identifikováno a rozděleno na iniciační (caspasy-2, -8, -9, -10), výkonné (caspasy-3, -6, -7) a zánětlivé (caspasy-1, -4, -5); (Cohen, 1997; Rai *et al.*, 2005). Dále byly identifikovány caspasy-11, -12, -13 a -14 (Hu *et al.*, 1998; Nakagawa *et al.*, 2000, Koenig *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2002).

Caspasa-3 (CPP32, apopain) je nejlépe charakterizovaná efektorová caspasa (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1994; Nicholson *et al.*, 1995; Tewari *et al.*, 1995). Má jednak odlišné, ale i překrývající se funkce s caspasou-7 a caspasou-6 (Slee *et al.*, 1999; Lakhani *et al.*, 2006; Luthi a Martin, 2007; Inoue *et al.*, 2009). Caspasa-3 je aktivovaná iniciačními caspasami, jako caspasou-9 a také bylo prokázáno, že caspasa-3 zprostředkovává zpětnou vazbu na caspasu-9 (Srinivasula *et al.*, 1998; Slee *et al.*, 1999b). Je stále regulována prostřednictvím různých posttranslačních modifikací. Je fosforylována PKC δ (proteinkinasa C, pro-apoptotická kinasa) a p38 (fosforyluje Ser150, inhibuje caspasu-3). Proteinfosfatasa 2A naopak zase Ser150 defosforyluje a obnovuje aktivitu caspasy (Voss *et al.*, 2005; Alvarado-Kristensson *et al.*, 2004;

Alvarado-Kristensson a Andersson, 2005). Také je modifikována ubikvitinylací (Huang *et al.*, 2000).

2.3.2 PARP-1 [poly(ADP-ribosa) polymerasa-1]

Poly(ADP-ribosa) polymerasa-1 využívá jako substrát β -NAD⁺, syntetizuje a přenáší polymery ADP-ribosy na glutamátové, aspartátové a lysinové zbytky akceptorových proteinů, čímž mění jejich funkční vlastnosti (Chambon *et al.*, 1963; D'Amours *et al.*, 1999; Shall a Murcia, 2000; Schreiber *et al.*, 2006; Yelamos *et al.*, 2008). Tato posttranslační modifikace je dynamický proces a je podrobena degradaci pomocí enzymů poly(ADP-ribosa) glykohydrolasy (PARG) a poly(ADP-ribosa) hydrolasy 3 (ARH3), (Mayer-Ficca *et al.*, 2004). Poly(ADP-ribosyl)ace zprostředkované PARP-1 a PARP-2 způsobují dekonduzaci chromatinu kolem míst poškození, aktivují DNA opravný aparát a urychlují opravu DNA. Proteiny PARP-1 a -2 mají v podstatě dvojí roli v reakci na poškození DNA, jako sensory DNA poškození a signální transducery pro „down-stream” efekty (Ménissier-de Murcia *et al.*, 1997; Trucco *et al.*, 1998; d'Adda di Fagagna *et al.*, 1999; Vodenicharov *et al.*, 2000; Schreiber *et al.*, 2006; Yelamos *et al.*, 2008). V apoptických buňkách dochází ke štěpení celkového jaderného proteinu PARP-1 (113 kDa) caspasou-3 na 24 kDa a 89 kDa fragmenty. PARP je tedy inaktivován štěpením, nedochází k opravám DNA a je podporována fragmentace DNA. K inaktivaci dochází v buňkách, u nichž je poškození DNA rozsáhlé (Kaufmann *et al.*, 1993; Casiano *et al.*, 1996; Gobeil *et al.*, 2001; Doetsch *et al.*, 2012).

2.3.3 Protein p53

Protein p53 byl objeven před více než pětadvaceti lety (Lane a Crawford, 1979; Linzer a Levine, 1979; DeLeo *et al.*, 1979). Též je přezdíván jako „strážce genomu“ (Lane, 1992). Nádorový supresor *TP53* je u rakovinného onemocnění nejčastěji mutovaným genem, kdy je gen *p53* přibližně u 50 % případů nádorových onemocnění mutován. Přes 80 % mutací *p53* se vyskytuje v DNA-vazebné doméně (DBD). Díky mutacím je jeho transkripční funkce inaktivována (Donehower *et al.*, 1992; Jacks *et al.*, 1994; Hainaut a Hollstein, 2000; Feki a Irminger-Finger, 2004; Petijean *et al.*, 2007). Je to klíčový protein, jenž odstraňuje geneticky nestabilní buňky indukci zástavy buněčného cyklu nebo apoptosy prostřednictvím transkripční regulace nebo přímé interakce s apoptotickými proteiny (Vogelstein *et al.*, 2000; Jia a Levine, 2004; Steele a Lane, 2005). Může být aktivován v reakci na poškození DNA, aktivaci onkogenů, hypoxii,

zkracování telomer a inaktivován posttranslační modifikací, mutací či uvolněním vazebných proteinů. Jako transkripční faktor je schopen aktivovat nebo potlačit expresi mnoha cílových genů. Stovky cílových genů proteinu p53 byly identifikovány, charakterizovány a jsou zapojeny do různých biologických procesů, včetně zastavení buněčného cyklu, apoptosy, opravy DNA, diferenciaci, angiogeneze, autofagie, senescence a metabolismu (Giaccia a Kastan, 1993; Lohrum a Vousden, 1999; Yee a Vousden, 2005; Riley *et al.*, 2008; Green a Kroemer, 2009). Podílí se na transkripční aktivaci těchto genů: *Ras*, *p21*, *Bax*, BH3- geny *Noxa* a *Puma*, *PIG3* (p53 inducible gene 3), *Killer/DR5* (death receptor-5), *CD95* (cluster of differentiation 95, *Fas*), *p53AIP1* (p53-regulated apoptosis-inducing protein 1) a *Perp* (p53 apoptosis effector related to PMP-22). Mnozí z nich jsou členové pro-apoptických genů. Naopak transkripční funkci anti-apoptických genů potlačuje. (Zhang a Reed, 2001; Nikolaev *et al.*, 2003; Zhao a Liao, 2003; Yee a Vousden, 2005; Liu *et al.*, 2007; Riley *et al.*, 2008; Green a Kroemer, 2009; Zilfou a Lowe, 2009; Olivier *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2011). Mezi jeho nejvíce studované cílové geny patří *p21^{waf1}*, *Puma* a *Noxa*, které jsou zapojeny do zástavy buněčného cyklu, procesu apoptosy a také udržují tumor supresivní funkci proteinu p53 (Valente *et al.*, 2013). Na rozdíl od vysokého výskytu mutací p53 (50-70 %) zaznamenaného u rakoviny plic a tlustého střeva je p53 mutován pouze u 10-20 % lidských melanomů (Mar *et al.*, 2013).

2.3.4 Mdm-2 (murine double minute-2)

Mdm-2 byl původně identifikován jako gen amplifikující se na zdvojených drobných (double minute) chromosomech u transformovaných myších fibroblastů (Fakharzadeh *et al.*, 1991). Následně bylo prokázáno, že interaguje s tumor supresorovým proteinem p53 a negativně reguluje jeho funkci. K tomu dochází pomocí dvou základních mechanismů. Za prvé, prostřednictvím přímé vazby *Mdm-2* na N-terminální konec p53 inhibuje jeho transkripčně aktivační funkci (Momand *et al.*, 1992; Oliner *et al.*, 1993). Za druhé, *Mdm-2* má ubikvitin ligasovou aktivitu, která modifikuje p53 a poté jej označí k degradaci 26S proteasomem (Haupt *et al.*, 1997; Honda *et al.*, 1997; Kubbutat *et al.*, 1997). Lidský *Mdm-2* je složen z 491 aminokyselin. Byly u něj charakterizovány celkem čtyři domény (Marine *et al.*, 2007; Wade *et al.*, 2010). Na N-konci je hlavní vazebné místo pro p53. V centrální části je kyselá doména a doména zinkového prstu, zatímco na C-konci se nachází „RING finger“ doména. Řada proteinů (nádorový supresor p14^{ARF}, ribozomální a nukleolární) interaguje s *Mdm-2* v centrální části.

„RING finger“ je zodpovědná za ubikvitin ligasovou aktivitu a také slouží jako vazebné místo pro Mdm-X (Tanimura *et al.*, 1999). Mdm-2 je rovněž regulován proteinem p53. Transkripce genu *Mdm-2* je aktivována volným proteinem p53. Tato negativní zpětná vazba, jež je mezi Mdm-2 a p53, byla Lahavem (2008) na úrovni jednotlivých buněk potvrzena. Právě různé stresové signály (poškození buněčné DNA, posttranslační modifikace aj.) mají za následek narušení interakce Mdm-2 a p53 (Barak *et al.*, 1993; Juven *et al.*, 1993; Perry *et al.*, 1993).

2.3.5 Rb (retinoblastomový) protein

Gen *Rb* byl naklonován před více než pětadvaceti lety (Friend *et al.*, 1986). Protein jím kódovaný byl identifikován jako univerzální regulátor buněčného cyklu. Lidský Rb se skládá z 928 aminokyselin a byly u něj popsány 3 domény (Weinberg, 1995; Dyson, 1998). Je to nádorový supresor a řídí přechod z G₁ do S fáze buněčného cyklu (Pardee, 1989). Jestliže je Rb vyřazen z funkce, dochází k neregulované progresi buněčného cyklu a podpoře růstu nádoru. U většiny nádorů je inaktivován a to buď mutací *Rb* genu, nebo častěji změnou exprese regulátorů Rb zahrnující cyklin D, CDK4, CDK6 a jejich důležitý inhibitor p16 (Knudson, 1971; Friend *et al.*, 1986). Jeho aktivita je řízena fosforylací/defosforylací. V hypofosforylovaném stavu interaguje s transkripčním faktorem E2F (*E2* promoter binding factor) a brání expresi genů pro vstup do S fáze. Postupnou fosforylací CDK je vazba rušena, dochází k uvolnění transkripčního faktoru E2F a následně je aktivována transkripce genů specifických pro přechod G₁/S (Ewen *et al.*, 1993; Kato *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1996; Dyson, 1998; Lundberg a Weinberg, 1998). Komplexy E2F jsou definovány na základě jejich schopnosti vázat se na sekvenční element, který byl identifikován původně v adenovirovém *E2* promoteru (Kovesdi *et al.*, 1987; La Thangue a Rigby, 1987; Yee *et al.*, 1987). p16 inhibuje aktivitu CDK a inhibicí Rb fosforylace reguluje transkripční program buněčné proliferace. Rb je přítomen v buňkách neustále, akorát v průběhu buněčného cyklu se střídá jeho fosforylace a defosforylace (Smith *et al.*, 1996; Dyson, 1998; Lundberg a Weinberg, 1998; Classon a Harlow, 2002).

2.3.6 Bcl-2 (B-cell CLL/lymphoma 2, B-buňky CLL/lymfom 2)

Proteiny rodiny Bcl-2 zahrnují klíčové regulátory buněčného přežívání, které mohou potlačit (např. Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1) nebo podpořit (např. Bad, Bax, Bak) apoptosu (Reed, 1995a; Reed *et al.*, 1996; Weller, 1997; Gross *et al.*, 1999). Nejméně 15 členů

rodiny Bcl-2 bylo identifikováno u savců a několik dalších u virů (Vaux *et al.*, 1988; Strasser *et al.*, 1991; Garcia *et al.*, 1992; Cory *et al.*, 1994; Cory, 1995; Yang *et al.*, 1995; Yang a Korsmeyer, 1996; Strasser *et al.*, 1997; Zou *et al.*, 1997; Chao a Korsmeyer, 1998). Každý člen má alespoň jeden ze čtyř motivů známých jako Bcl-2 homologní domény (BH1-BH4), (Adams a Cory, 1998; Kelekar a Thompson, 1998; Reed, 1998). Pouze členové s motivem BH3 buď přímo aktivují pro-apoptotické členy rodiny Bax a Bak, nebo antagonizují anti-apoptotické členy (Chen *et al.*, 2005; Chipuk *et al.*, 2010). Konkrétně je pro-apoptotickými proteiny lokalizovanými na vnější mitochondriální membráně indukována vnitřní apoptotická dráha. Vnitřní mitochondriální dráha je spuštěna v závislosti na několika buněčných stresorech. Předpokládá se, že Bax a Bak homooligomerizují a tvoří póry ve vnější mitochondriální membráně, čímž zvyšují její permeabilizaci. Permeabilizace vnější mitochondriální membrány způsobuje „efflux“ pro-apoptotických proteinů, včetně cytochromu *c* z mezimembránového prostoru (Chittenden *et al.*, 1995; Xiang *et al.*, 1996; McCarthy *et al.*, 1997; Eskes *et al.*, 1998; Gross *et al.*, 1998; Pastorino *et al.*, 1998; Finucane *et al.*, 1999; Llambi *et al.*, 2011). V důsledku toho mohou sekundární mitochondriální aktivátory caspas (Smac nebo DIABLO) přejít z mezimembránového prostoru do cytoplasmy. Cytochrom *c* interaguje s adaptorovým proteinem Apaf-1 (faktor aktivující apoptotické proteasy-1), což je rozhodující krok vnitřní dráhy. Tato interakce vyvolá konformační změny v Apaf-1 poháněné hydrolýzou dATP. Na výsledný komplex, konkrétně na doménu Apaf-1 se váže pro-caspasa-9. Aktivovaná caspasa-9 dále aktivuje caspasy-3 a -7 (Zou *et al.*, 1997; Beere *et al.*, 2000; Ott *et al.*, 2002; Riedl *et al.*, 2005).

Jak již bylo řečeno, Bcl-2 je anti-apoptotický protein a byl nejprve objeven v B-buňkách maligního lymfomu (Tsujimoto *et al.*, 1985; Oltvai *et al.*, 1993; Reed, 1995a; Reed *et al.*, 1996; Weller, 1997). Skládá se z osmi α -helixů a hydrofobní „kapsičky“, díky níž může navázat BH3 doménu pro-apoptotických proteinů a inaktivovat je (Tsujimoto a Croce, 1986; Petros *et al.*, 2001). Nachází se v jaderné membráně a akumuluje se v endoplazmatickém retikulu, kde ovlivňuje uskladňování vápenatých iontů. Jeho nadměrná exprese je častá u velkého množství rakovinných onemocnění (Yang *et al.*, 1995; Evtodienko *et al.*, 1999).

2.3.7 Mcl-1 (myeloid cell leukemia 1, myeloidní buněčná leukémie 1)

Mcl-1 je anti-apoptotický protein a původně byl identifikován v roce 1993 v procesu diferenciaci myeloidních buněk. Lidský gen *Mcl-1* je lokalizován na chromosomu 1q21. Prototypický protein Mcl-1 (někdy označován jako Mcl-1L) se skládá z 350 aminokyselinových zbytků. Obsahuje domény BH1-3, jež jsou důležité pro regulaci apoptosy, a C-terminální transmembránovou doménu, která slouží k lokalizaci Mcl-1 na různých intracelulárních membránách, zejména na vnější mitochondriální membráně (Kozopas *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1995; Gross *et al.*, 1999). N-terminální části zahrnují dvě sekvence PEST (residua prolinu, kyseliny glutamové, serinu a threoninu). Tyto sekvence se vyskytují u proteinů s krátkým poločasem rozpadu a jsou zodpovědné za rychlou degradaci proteinu v buňkách. Poločas rozpadu Mcl-1 je jedna až několik hodin (Craig, 2002; Cuconati *et al.*, 2003; Nijhawan *et al.*, 2003).

Mcl-1 se řadí mezi anti-apoptotické členy rodiny Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-X_L atd.), jimiž je stejně jako pro-apoptotickými regulována apoptosa (Reed, 1995b). Vysoké hladiny Mcl-1 jsou detekovány u diferencovanějších apikálních vrstev epitelu (např. u epitelu prostaty, prsu, tlustého střeva a plic), kdežto zvýšená exprese Bcl-2 je v bazální buněčné vrstvě (Krajewski *et al.*, 1995). Exprese Mcl-1 je vyvolaná signály pro přežití a diferenciacními signály, cytokiny a růstovými faktory. U většiny buněčných systémů je jeho exprese během apoptosy snižena na rozdíl od anti-apoptotických proteinů Bcl-2 a Bcl-X_L. K této snížené expresi by mohly přispět caspasy (především efektorové, caspasa-3), poněvadž mohou štěpit protein Mcl-1 na místech Asp¹²⁷ a Asp¹⁵⁷ (Craig, 2002; Snowden *et al.*, 2003; Michels *et al.*, 2004). Navíc „down-regulace“ Mcl-1 může být zprostředkována inaktivací transkripčních faktorů stimulujících jeho transkripci, i když promotor je přímo potlačen navázáním transkripčního faktoru E2F-1 (Croxtton *et al.*, 2002).

Kromě toho je u živočichů Mcl-1 nezbytný pro embryogenezi (Reinkerberger *et al.*, 2000) a pro vývoj a zachování B a T lymfocytů (Opferman *et al.*, 2003). Hraje i klíčovou roli v přežívání maligních buněk (Derenne *et al.*, 2002; Michels *et al.*, 2004).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 MATERIÁL

3.1.1 Použité chemikálie

Ac-DEVD-AMC (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylkumarin)	Sigma-Aldrich [*]
Ac-DEVD-CHO (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyd)	Sigma-Aldrich [*]
Akrylamid	Sigma-Aldrich [*]
Aprotinin	Sigma-Aldrich [*]
Bromfenolová modř	Sigma-Aldrich [*]
Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA)	Sigma-Aldrich [*]
Ethylenglykoltetraoctová kyselina (EGTA)	Sigma-Aldrich [*]
Fetální sérum	Life Technologies [*]
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich [*]
Dihydrogenfosforečnan draselný (KH ₂ PO ₄)	Chemapol [*]
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich [*]
Dodecylsírán sodný (SDS)	Lach-Ner [*]
Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného	Penta [*]
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma [*]
Ethanol	Penta [*]
Fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich [*]
Fluorid sodný	Sigma-Aldrich [*]
Glutamin	Sigma-Aldrich [*]
Glycerol	Lach-Ner [*]
Glycin	M.G.P. [*]
Hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma-Aldrich [*]
Hydroxid draselný	Sigma-Aldrich [*]
HEPES [4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina]	Sigma-Aldrich [*]
CHAPS [3-((3-cholamidopropyl)-dimethylammonio)-1-propansulfonát]	Sigma-Aldrich [*]
Chemiluminiscenční substráty luminol a peroxid	Thermo Scientific [*]
Chlorid draselný	Penta [*]
Chlorid hořečnatý hexahydrát	Penta [*]
Chlorid sodný	Lach-Ner [*]
Leupeptin	Sigma-Aldrich [*]
Kyselina chlorovodíková (HCl)	Lach-Ner [*]
Kyselina <i>o</i> -fosforečná	Penta [*]
2-merkptoethanol	Serva [*]
Methanol	Penta [*]
N,N'-metylenbisakrylamid	Sigma-Aldrich [*]
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich [*]
Penicilin-Streptomycin solution	Sigma-Aldrich [*]
Peroxodisírán amonný (APS)	Sigma-Aldrich [*]
PIPES [Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonová kyselina)]	Sigma-Aldrich [*]
Ponceau S	Serva [*]
Propidium jodid (PI)	Sigma-Aldrich [*]
Ribonukleasa A	Sigma-Aldrich [*]
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich [*]
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	MP Biomedicals [*]
Triton X-100	Sigma-Aldrich [*]

Trypsin
Tween 20

Sigma-Aldrich*
MP Biomedicals*

*Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Life Technologies (Carlsbad, CA, USA), Chemapol (Praha, ČR), Lach-Ner (Neratovice, ČR), Penta (Chrudim, ČR), M.G.P. (Zlín, ČR), Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA), Serva (Heidelberg, Německo), MP Biomedicals (Aurora, OH, USA), Sigma (MO, USA)

3.1.2 Použité roztoky

0,5% EGTA (w/v) pH 7,2: 2,5 g EGTA/500 ml PBS

Trypsin/EGTA: 0,1% trypsin; 0,25% EGTA

10% DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium; 100 U penicilin; 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ streptomycin; 2 mM L-glutamin; 10% (v/v) fetální sérum

PBS (Phosphate buffered saline): 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 2 mM KH_2PO_4 (pH = 7,4)

TBS (Tris-buffered saline): 137 mM NaCl; 20 mM TRIS (pH = 6,8)

RIPA pufr: 20 mM TRIS-HCl pH 7,4; 100 mM NaCl; 5 mM EDTA; 2 mM NaF; 2 mM EGTA; 0,2% Nonidet P-40 (pH = 7,4); těsně před použitím přidat: 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ leupeptin; 2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ aprotinin

Činidlo Bradfordové: 0,01% Coomassie brilliant blue; 95% ethanol; 85% kyselina *o*-fosforečná

Roztok akrylamidu: 30% akrylamid; 0,8% bisakrylamid

1M TRIS/HCl pH 8,8: 48,46 g TRIS/400 ml pH 8,8

1M TRIS/HCl pH 6,8: 24,23 g TRIS/200 ml pH 6,8

10% SDS: 5 g SDS/50 ml H_2O

10% APS: 0,1 g APS/1 ml H_2O

5x SDS vzorkovací pufr: 0,3 M TRIS (pH = 6,8); 10% SDS; 50% glycerol; 0,05% Bromfenolová modř; 5% 2-merkaptoethanol

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

Blotovací pufr: 25 mM TRIS; 192 mM glycin

Blokovací roztok: 3% (w/v) BSA v TBS s 0,1% Tween 20

Ponceau S: 0,2% v 1% kyselině octové

Lyzační pufr pro stanovení aktivity caspasy 3/7: 10 mM KCl; 5 mM HEPES; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 0,2% CHAPS pH 7,4; těsně před použitím přidat: 2 mM DTT, inhibitory proteas 2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ aprotinin a 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ leupeptin, 1 mM PMSF

Roztok substrátu pro stanovení aktivity caspasy 3/7: 10 mM Ac-DEVD-AMC v DMSO

Roztok inhibitoru pro stanovení aktivity caspasy 3/7: 1 mM Ac-DEVD-CHO v DMSO
 Reakční pufr pro stanovení aktivity caspasy 3/7: 25 mM PIPES/KOH; 2 mM EGTA;
 2 mM MgCl₂; pH 7,3; těsně před použitím přidat: 5 mM DTT; 100 μM Ac-DEVD-
 AMC

3.1.3 Použité protilátky

V experimentální části bylo při Western blotu použito celkem osm primárních protilátek a dvě sekundární protilátky (viz Tab. 2).

Tab. 2 Seznam protilátek používaných pro analýzu Western blotem

Označení	Výrobce	Zdroj	Velikost detekovaného proteinu (kDa)	Použité ředění
Primární protilátky				
anti-PARP (46D11)	Cell Signaling Technology [†]	R	116 a 89	1:500
anti-p53 (DO-1)	Dr. B. Vojtěšek z MOÚ	M	53	1:10
anti-Mcl-1 (S-19)	Santa Cruz Biotechnology [†]	R	40	1:500
anti-Bcl-2 (PC68)	Calbiochem [†]	R	26	1:50
anti-Bcl-2 (50E3)	Cell Signaling Technology [†]	R	26	1:1000
anti-Bcl-2 (10C4)	Sigma-Aldrich [†]	M	26	1:1000
anti-Rb (4H1)	Cell Signaling Technology [†]	M	100	1:1000
anti-Mdm-2	Dr. B. Vojtěšek z MOÚ	M	56	1:500
anti-Mdm-2 (SMP14)	Santa Cruz Biotechnology [†]	M	56	1:1000
anti-β-actin (C4)	Santa Cruz Biotechnology [†]	M	42	1:2000
anti-caspasa-3	Cell Signaling Technology [†]	M	35 a 17	1:1000
Sekundární protilátky				
RAM/Px	Sigma-Aldrich [†]	anti-M	-	1:1000
SWAR/Px	Sigma-Aldrich [†]	anti-R	-	1:1000

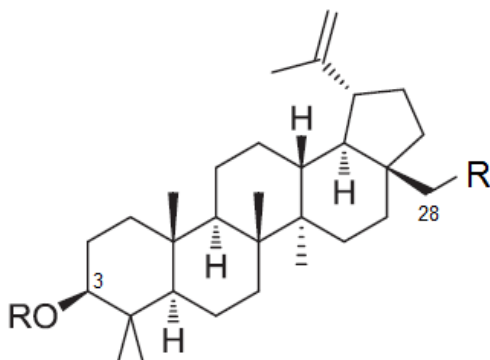
*RAM/Px (rabbit anti-mouse IgG značený křenovou peroxidasou), SWAR/Px (swine anti-rabbit IgG značený křenovou peroxidasou), R (rabbit), M (mouse), MOÚ – Masarykův onkologický ústav v Brně, Česká republika.

[†]Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), Calbiochem (La Jolla, CA, USA), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

3.1.4 Studované deriváty betulinu a lupeolu

V praktické části předložené práce byly testovány biologické účinky dvou derivátů betulinu (látky s kódovým označením **1**, **2**) a jednoho derivátu lupeolu (látky s kódovým označením **3**) připravené v Laboratoři růstových regulátorů, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci. Pro srovnání určitých vlastností látek **1**, **2** a **3** byly testovány i jejich prekurzory - betulin (Obr. 2, str. 15), lupeol (Obr. 3, str. 16) a kyselina betulinová (Obr. 1, str. 13), která sloužila jako pozitivní kontrola. Deriváty betulinu, tedy látky **1** a **2** byly substituovány v poloze C-3 a derivát lupeolu, tedy látka **3** byla

substituována v polohách C-3 a C-28. Následující deriváty, jejichž obecná chemická struktura je zobrazena na Obr. 5, byly připraveny jako 7,5 mM zásobní roztoky v DMSO a při experimentech byly dle potřeby ředěny do média ze zásobních roztoků na požadované koncentrace (1, 5 a 10 μM).



Obr. 5 Obecná chemická struktura testovaných látek.

3.1.5 Buněčná linie maligního melanomu a podmínky kultivace

K experimentům uvedených v této práci byla použita adherentní nádorová buněčná linie G-361 odvozená od lidského maligního melanomu. Tato buněčná linie byla získána z Evropské sbírky buněčných kultur (ECACC, Salisbury, Velká Británie).

Nádorová linie G-361 byla kultivována v médiu DMEM, které bylo doplněno 10% bovinním fetálním sérem, L-glutaminem (2 mM), penicilinem (100 U) a streptomycinem (100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Kultivace probíhala v inkubátoru (Sanyo, Japonsko) při teplotě 37 °C a v atmosféře o vysoké vlhkosti obsahující 5 % CO_2 .

3.2 METODY

3.2.1 Ovlivnění nádorových buněk a jejich sklizení

Buňky G-361 byly kultivovány v Petriho miskách (100 mm). Do každé kultivační misky bylo napipetováno 10 ml buněčné suspenze o koncentraci $7 \cdot 10^4$ buněk/ml. Buňky byly spočítány na požadovanou koncentraci v Bürkerově komůrce pomocí optického mikroskopu (Nikon TMS, Tokio, Japonsko; Olympus CK2, Tokio, Japonsko). Pro zajištění adheze buněk ke dnu kultivační nádoby, byly buňky ponechány 24 hodin v inkubátoru. Po 24 hodinách kultivace za standardních podmínek bylo médium odsáto a nahrazeno médiem obsahujícím testovanou látku o zvolené koncentraci (1, 5 a 10 μM). Inkubace opět probíhala 24 hodin. U buněk sloužících jako kontrola bylo buď přidáno pouze médium (ozn. 0, viz kap. 4), nebo médium s odpovídajícím množstvím DMSO (0,134% (v/v), ozn. 0 + DMSO, viz kap. 4).

Po 24 hodinách působení testovaných látek následovalo sklizení buněk pro další analýzu metodou Western blot, průtokové cytometrie či biochemického testu aktivity caspas-3 a -7. Buňky určené pro analýzu metodou Western blot byly sklizeny mechanickým seškrábáním ze dna misky, přepipetovány do zkumavky a centrifugovány po dobu 9 minut při 1000xg a teplotě 4 °C v centrifuze BR4i (Jouan, Saint-Herblain, Francie). Poté byl supernatant odsán, buněčný pelet promyt roztokem PBS a centrifugován za stejných podmínek. Po centrifugaci byl promývací roztok odsán, buněčný pelet resuspendován v PBS, přenesen do mikrozkuvek a opět centrifugován za stejných podmínek. Nakonec byl roztok PBS odstraněn. Buněčné pelety byly uskladněny při -80 °C. Během celého sklizení je nutné buňky neustále uchovávat na ledu.

Buňky kultivované za účelem cytometrické analýzy a pro analýzu metodou fluorimetrického stanovení aktivity caspas-3 a -7 byly sklizeny trypsinizací. Nejprve bylo kultivační médium odebráno do zkumavky a buňky byly opláchnuty roztokem PBS (filtrovaný), který byl také přenesen do zkumavky. Až poté byl do misky přidán roztok trypsin/EGTA, jenž se nechal působit 3 minuty, dokud se buňky neuvolnily ze dna nádoby. Trypsin byl deaktivován přidávkem média DMEM a celý obsah misky byl přidán do zkumavky. Vše bylo centrifugováno při 1000xg, 4 °C po dobu 9 minut. Poté byl supernatant odsán, buněčný pelet promyt roztokem PBS (filtrovaný) a centrifugován za stejných podmínek. Po centrifugaci byl promývací roztok odsán, buněčný pelet resuspendován v 1 ml PBS (filtrovaný) a rozdělen na dvě části. První část (700 μl) byla

určena pro test aktivity caspas a byla přenesena do mikrozkušavek. Druhá část (300 μ l) byla určena pro cytometrickou analýzu. Následně byly zkumavky i mikrozkušavky centrifugovány za stejných podmínek. U první části byl po centrifugaci roztok PBS odstraněn a buněčné pelety byly uskladněny při -80 °C. U druhé části byl rovněž roztok PBS odsán. Buněčné pelety byly resuspendovány ve 300 μ l PBS (filtrovaný), zafixovány 700 μ l vychlazeného 70% ethanolu přidávaného po kapkách za mírného míchání a uskladněny při -20 °C. Během celého sklizení je nutné buňky neustále uchovávat na ledu.

3.2.2 Příprava buněčných lyzátů

U metod Western blot a biochemické detekce aktivity caspas-3 a -7 se příprava buněčných lyzátů liší složením lyzačních pufrů. Buněčné pelety pro Western blot byly resuspendovány ve vychlazeném RIPA pufru (Radioimmunoprecipitation buffer) dle velikosti peletu (cca 10^6 buněk ve 20-50 μ l) a buněčné pelety pro stanovení aktivity caspas byly resuspendovány v lyzačním pufru, který obsahoval KCl; 0,2% CHAPS a HEPES místo NaCl; 0,2% Nonidetu P-40 a Trisu. Vzorky byly inkubovány v těchto pufrách po dobu 20 minut na ledu za občasného resuspendování. Poté byly sonikovány použitím ultrazvukového homogenizátoru (3 cykly, 10 sekund, 30 % max.) Sonopuls HD2200 (Bandelin, Německo). Následně byly buněčné homogenáty centrifugovány po dobu 30 minut při 4 °C a 14 000 rpm. Supernatanty byly přeneseny do mikrozkušavek a byla změřena koncentrace proteinů v lyzátech spektrofotometrickou metodou Bradfordové (Bradford, 1976) při 595 nm na UV-VIS spektrofotometru UV-1800 (Shimadzu, Japonsko). Lyzáty byly naředěny na stejnou koncentraci proteinů příslušným množstvím lyzačního pufru (na nejnižší koncentraci proteinů daného vzorku v $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ pro Western blot a na $3\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ pro stanovení aktivity caspas-3 a -7). K lyzátům určeným pro Western blot byl navíc přidán 5x SDS vzorkovací pufr a byly denaturovány 2 minuty při teplotě 98 °C.

3.2.3 Polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE), Western blot a imunodetekce proteinů na membráně

Proteiny byly separovány elektroforézou v SDS-polyakrylamidových gelech. Pro separaci byl použit 5% zaostřovací gel a 10% nebo 12,5% dělicí gel (složení gelů viz Tab. 3). Do jednotlivých jamek bylo vždy naneseno 30 μg proteinu a do boční jamky 3,5 μl standardu molekulových hmotností proteinů (SpectraTM Multicolor Broad

Range Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA nebo Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards, BioRad, Hercules, CA, USA). Elektroforetická separace probíhala v aparatuře pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad, Hercules, CA, USA) 30 minut při 80 V. Jakmile proteiny vstoupily do dělicího gelu, bylo napětí zvýšeno na 120 V.

Následně byly proteiny z gelu přeneseny na nitroceluloseovou membránu (BioRad, Hercules, CA, USA) metodou Western blot v blotovací aparatuře Mini Trans-Blot Cell (BioRad, Hercules, CA, USA). Přenos probíhal při 270 mA, za stálého chlazení ledem po dobu 2 hodin a ve vychlazeném 1x koncentrovaném blotovacím pufru. Membrána s přenesenými proteiny byla obarvena v roztoku Ponceau S, promyta destilovanou vodou, nechala se volně uschnout na filtračním papíře a byla nařezána na proužky se sledovanými proteiny dle molekulových hmotností naneseného markeru. Poté byly membrány odbarveny v roztoku TBS a blokovány v 3% (w/v) BSA v TBS s 0,1% Tweenem 20 po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě.

Imunologická detekce proteinů byla provedena pomocí primárních protilátek a sekundárních protilátek značených křenuvou peroxidasou (viz Tab. 2). Nejprve byly membrány inkubovány přes noc při 4 °C s primárními protilátkami v blokovacím pufru. Následující den byly membrány krátce promyty v TBS a TBS s 0,1% Tweenem 20 (5 min v TBS, 5 min TBS s 0,1% Tweenem 20, 5 min v TBS, 10 min v TBS) a inkubovány 1 hodinu při pokojové teplotě se sekundárními protilátkami v blokovacím pufru. Membrány byly opět promyty v TBS a TBS s 0,1% Tweenem 20 (10 min v TBS, 5 min TBS s 0,1% Tweenem 20, 5 min v TBS, 10 min v TBS). Nakonec byla provedena vizualizace s využitím chemiluminiscenčního činidla (roztok luminolu a peroxidu v poměru 1:1; Pierce™ Fast Western Blot Kit, ECL Substrate, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) a detekce signálu byla provedena pořízením snímku pomocí CCD kamery LAS4000 (FujiFilm, Japonsko) pro snímkování chemiluminiscence v programu Image Reader. Expres proteinů ovlivněných buněk byla porovnána s neovlivněnými kontrolami.

Tab. 3 Složení dělicího a zaostřovacího gelu

Chemikálie	10% 2 dělicí gely	12,5% 2 dělicí gely	5% 2 zaostřovací gely
Roztok AA+Bis	2,5 ml	3,13 ml	0,84 ml
H ₂ O	2,15 ml	1,55 ml	3,51 ml
TRIS	2,8 ml (pH 8,8)	2,8 ml (pH 8,8)	0,63 ml (pH 6,8)
10% SDS	75 µl	75 µl	50 µl
TEMED*	5 µl	5 µl	5 µl
10% APS*	30µl	30 µl	30 µl

*Přidat těsně před použitím. AA+Bis – roztok akrylamidu a bisakrylamidu.

3.2.4 Průtoková cytometrie

K vyhodnocení počtu buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu (G_0/G_1 , S a G_2/M), včetně detekce apoptotických buněk ($subG_1$) byla použita analýza průtokovou cytometrií. Principem metody je měření obsahu buněčné DNA označené fluorescenční sondou propidium jodidem (PI), jež se inkorporuje do dvouřetězcové DNA. Po inkorporaci a excitaci zářením o vlnové délce 488 nm dochází k emisi širokého spektra o maximální intenzitě okolo 610 nm a jeho detekce probíhala na kanále FL3 (fluorescent light, záření okolo 670 nm). Celý proces byl zaznamenán softwarem Quanta Collection (Beckman Coulter, CA, USA) a vyhodnocen programem Quanta Analysis (Beckman Coulter, CA, USA).

Buňky zafixované 70% (v/v) ethanolem byly centrifugovány při 1 200xg, 4 °C po dobu 10 minut. Po centrifugaci byl supernatant odstraněn a buněčný pelet promyt resuspendováním v 500 µl PBS (filtrovaný) a centrifugován za stejných podmínek. Opět byl supernatant odsán a buněčný pelet resuspendován v 500 µl roztoku PBS (filtrovaný), do kterého bylo navíc přidáno 10 µl roztoku RNasy ($0,2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), 5 µl propidium jodidu ($10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 0,5 µl Tritonu X-100. Buňky byly inkubovány ve tmě po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl obsah ze zkumavek přepipetován do vialek pro průtokový cytometr a analyzován na průtokovém cytometru Cell Lab QuantaTM SC-MPL (Beckman Coulter, CA, USA).

3.2.5 Biochemická detekce aktivity caspas-3/7

Caspasy-3 a -7 se řadí mezi efektorové caspasy účastníci se specifické proteolytické degradace intracelulárních proteinů během buněčné smrti, především při apoptose. Principem fluorimetrického měření aktivity caspas-3 a -7 je hydrolýza peptidového substrátu značeného 7-amido-4-methylkumarinem (Ac-DEVD-AMC). Produktem

hydrolýzy je fluoreskující AMC, který po excitaci zářením o vlnové délce 346 nm emituje záření o vlnové délce 442 nm, jež je zaznamenáno detektorem.

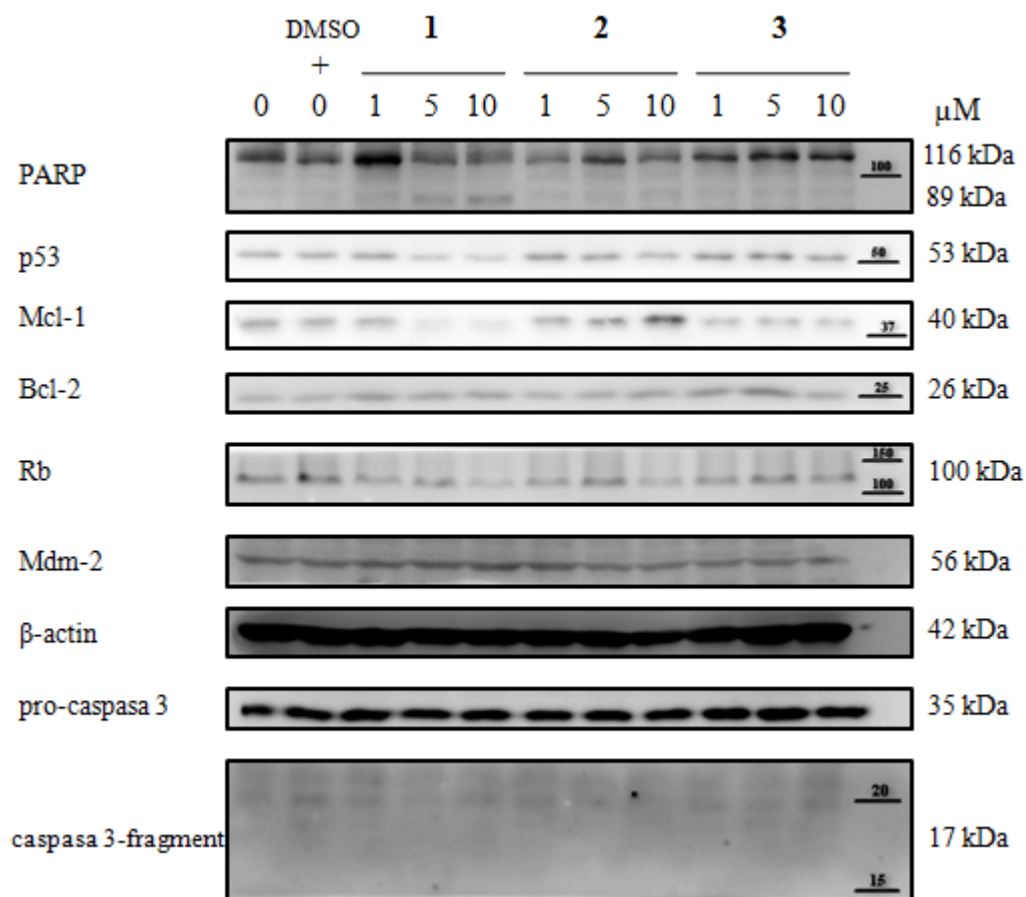
Nejprve byly do mikrotitrační destičky po 5 μl napipetovány buněčné lyzáty v triplikátech ($3 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ koncentrace proteinů). Dále bylo přidáno 100 μl reakčního pufru s roztokem substrátu (Ac-DEVD-AMC v DMSO) nebo 100 μl reakčního pufru obohaceného roztokem inhibitoru caspas-3/7 (Ac-DEVD-CHO v DMSO). Mikrotitrační destička byla inkubována ve tmě při laboratorní teplotě a po hodinových intervalech byla měřena fluorescence při 346/442 nm (excitace/emise) na přístroji Fluoroskan Ascent (Labsystems, Helsinky, Finsko) a pomocí programu Ascent. Pro relativní stanovení nárůstu aktivity caspas bylo nejprve odečteno fluorescenční pozadí (lyzační pufr), které sloužilo pro stanovení autolýzy substrátu v lyzačním pufru, a dle negativní kontroly (lyzáty z neovlivněných buněk) byly veškeré signály znormalizovány.

4 VÝSLEDKY

4.1 Western blot analýza pro- a anti-apoptotických proteinů

Pro detekci změn v expresi apoptotickým markerů byla pro nádorové buněčné linie odvozené od maligního melanomu (G-361) použita analýza Western blot. Nádorová buněčná linie G-361 byla po dobu 24 hodin ovlivněna deriváty betulinu a lupeolu (1, 5 a 10 μM). Změny v expresi pro- a anti-apoptotických proteinů po ovlivnění danými syntetickými deriváty jsou znázorněny na Obrázku 6. Tento experiment byl zopakován čtyřikrát s podobnými výsledky. Byly porovnány hladiny exprese vybraných proteinů v buňkách maligního melanomu po ovlivnění prekurzory a jejich připravenými analogy na 24 h 10 μM deriváty s kódovým označením **1** (derivát betulinu), **2** (derivát betulinu), **3** (derivát lupeolu), jejich prekurzory a kyselinou betulinovou jako pozitivní kontrolou. Následující porovnání změn v expresi vybraných proteinů po aplikaci látek **1**, **2**, **3** a jejich prekurzorů je znázorněno na Obrázku 7. Tento experiment byl zopakován dvakrát s podobnými výsledky. Neovlivněné buňky, ke kterým bylo přidáno pouze médium (ozn. 0, viz Obr. 6 a 7) nebo médium s 0,134% (v/v) DMSO (ozn. 0 + DMSO, viz Obr. 6 a 7), byly použity jako negativní kontrola.

Dnes je již známo, že mechanismus iniciace apoptosy je zprostředkován aktivací kaskády caspas (Budihardjo *et al.*, 1999). Caspasa-3 je efektorová proteasa, která štěpí celkový protein PARP (116 kDa) na 24 kDa a 89 kDa fragmenty a také je zapojena do degradace DNA a apoptotické smrti buněk (Allen *et al.*, 1998; Gobeil *et al.*, 2001; Cain *et al.*, 2002). Caspasy jsou v buňce syntetizovány jako neaktivní zymogeny (pro-caspasy), jež jsou pak v apoptotických buňkách aktivovány proteolytickým štěpením, díky čemuž dochází ke vzniku jejich fragmentů (Earnshaw *et al.*, 1999). PARP se účastní aktivace DNA opravného aparátu a urychlení opravy DNA (Schreiber *et al.*, 2006; Yelamos *et al.*, 2008). Důležitým markerem apoptosy je právě 89 kDa fragment proteinu PARP, jehož zvýšená hladina v závislosti na koncentraci látky byla detekována po aplikaci látky **1**. Působením látek **2** a **3** v testovaných koncentracích nedocházelo ke štěpení caspasy-3 ani k výraznému štěpení PARP.

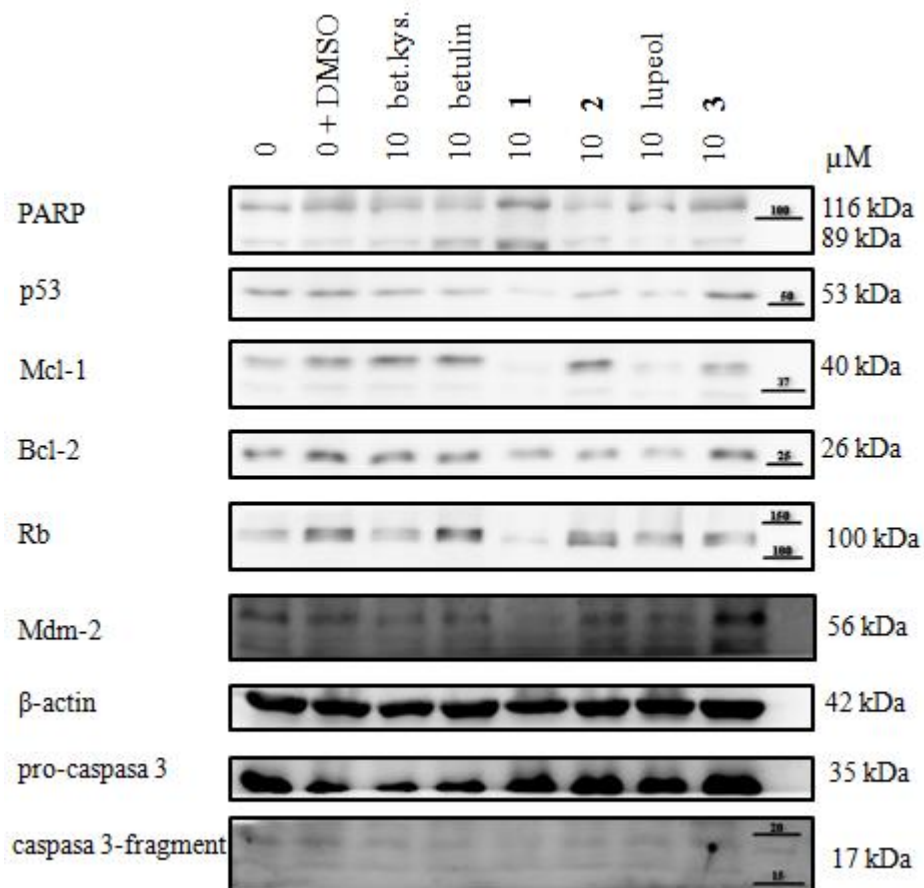


Obr. 6 Western blot analýza pro-apoptotických (PARP, p53, caspasa-3) a anti-apoptotických proteinů (Mcl-1, Bcl-2, Rb, Mdm-2) v G-361 buňkách ovlivněných deriváty betulinu (**1**, **2**) a derivátem lupeolu (**3**). Změny v expresi daných proteinů v buňkách vystavených působení 1, 5 a 10 μM derivátů **1**, **2** a **3** po 24 h byly porovnány s neovlivněnými kontrolními buňkami (ozn. 0 a 0 + DMSO). Celková hladina proteinů ve všech vzorcích byla detekována pomocí exprese β-actinu. Vpravo jsou uvedeny molekulové hmotnosti (kDa) detekovaných proteinů. Molekulové hmotnosti jednotlivých proteinů v použitém markeru jsou 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 a 250 kDa.

Naproti tomu exprese nádorových supresorů p53 a Rb byla po aplikaci látky **1** v koncentraci 5 i 10 μM snižena (Obr. 6 a 7). Snižování hladiny proteinu p53 by mohlo být způsobeno vysokou, zřejmě už cytotoxickou koncentrací testovaných látek, kdy došlo k destrukci buněk očividně jiným mechanismem než apoptosou (viz kap. 5). Přítomnost látky **2** v koncentraci 10 μM v kultivačním médiu vedla v G-361 buňkách k mírnému snížení hladin proteinů p53 a Rb, ale po aplikaci 1 μM látky **2** byla hladina exprese p53 mírně zvýšená. Nicméně po aplikaci látky **3** v koncentraci 1 a 5 μM byla hladina exprese p53 mírně zvýšená. Protein p53 je aktivován fosforylací, čímž je zvýšená jeho hladina, a dochází k navození zástavy buněčného cyklu či apoptosy nebo je inhibována transkripce. Bylo prokázáno, že Mdm-2 interaguje s tumor supresorovým

proteinem p53 a negativně reguluje jeho funkci. K tomu dochází pomocí dvou základních mechanismů (Momand *et al.*, 1992; Oliner *et al.*, 1993; Haupt *et al.*, 1997; Honda *et al.*, 1997; Kubbutat *et al.*, 1997). Avšak zvýšení hladiny Mdm-2 po aplikaci látky **1** a snížení po aplikaci 1 μM látky **2** se nepodařilo potvrdit (Obr. 6 a 7). Při apoptose může být Rb protein štěpen (An a Dou, 1996), tudíž byla detekována jeho snížená hladina (viz kap. 5).

Jak už bylo řečeno, apoptosa je pevně regulována anti-apoptotickými a pro-apoptotickými efektorovými molekulami, včetně proteinů z rodiny Bcl-2. Do této rodiny spadají i anti-apoptotické proteiny Bcl-2 a Mcl-1, jejichž hladina exprese byla v nádorové buněčné linii G-361 po ovlivnění látkami **1**, **2** a **3** detekována. Exprese proteinu Mcl-1 byla v závislosti na koncentraci snížena po aplikaci látky **1** a tedy po ovlivnění buněk G-361 látkou **1** v koncentraci 10 μM byla hladina nejnižší (Obr. 6 a 7). Ve většině buněčných systémů je exprese Mcl-1 během apoptosy snížena na rozdíl od anti-apoptotických proteinů Bcl-2 a Bcl-X_L. K této snížené expresi by mohly přispět caspasy (především efektorové, caspasa-3), poněvadž mohou štěpit protein Mcl-1 (Craig, 2002; Snowden *et al.*, 2003; Michels *et al.*, 2004). Ale po aplikaci látky **2** byl detekován opačný efekt, kdy v závislosti na koncentraci se hladina exprese Mcl-1 zvyšovala. Zvýšená exprese anti-apoptotických proteinů často přispívá k rezistenci nádorů (Fisher, 1994; Tron *et al.*, 1995; Chan *et al.*, 2003). Po aplikaci látky **3** byla hladina exprese Mcl-1 v G-361 buňkách mírně snížena a hladina Bcl-2 mírně zvýšená v koncentracích 1 a 5 μM . Hladina proteinu Bcl-2 se po aplikaci látek **1** a **2** nějak výrazně nelišila od kontrolních buněk. Po aplikaci látky **1** se exprese proteinu Mcl-1 v buňkách odvozených od maligního melanomu postupně snižovala, což by mohlo souviset s aktivitou caspasy-3 (Obr. 8 a 9), která jej může štěpit. Po aplikaci látky **2** se exprese Mcl-1 postupně zvyšovala, což znamená, že by mohlo docházet k rezistenci nádorových buněk.



Obr. 7 Western blot analýza pro-apoptotických (PARP, p53, caspasa-3) a anti-apoptotických proteinů (Mcl-1, Bcl-2, Rb, Mdm-2) v G-361 buňkách ovlivněných deriváty betulinu (**1**, **2**), derivátem lupeolu (**3**), jejich prekurzory a kyselinou betulinovou. Změny v expresi daných proteinů v buňkách vystavených působení 10 μM derivátů **1**, **2**, **3**, jejich prekurzorů a kyseliny betulinové po 24 h byly porovnány s neovlivněnými kontrolními buňkami (ozn. 0 a 0 + DMSO). Celková hladina proteinů ve všech vzorcích byla detekována pomocí exprese β-actinu. Vpravo jsou uvedeny molekulové hmotnosti (kDa) detekovaných proteinů. Molekulové hmotnosti jednotlivých proteinů v použitém markeru jsou 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 a 250 kDa. Bet. kys. – kyselina betulinová.

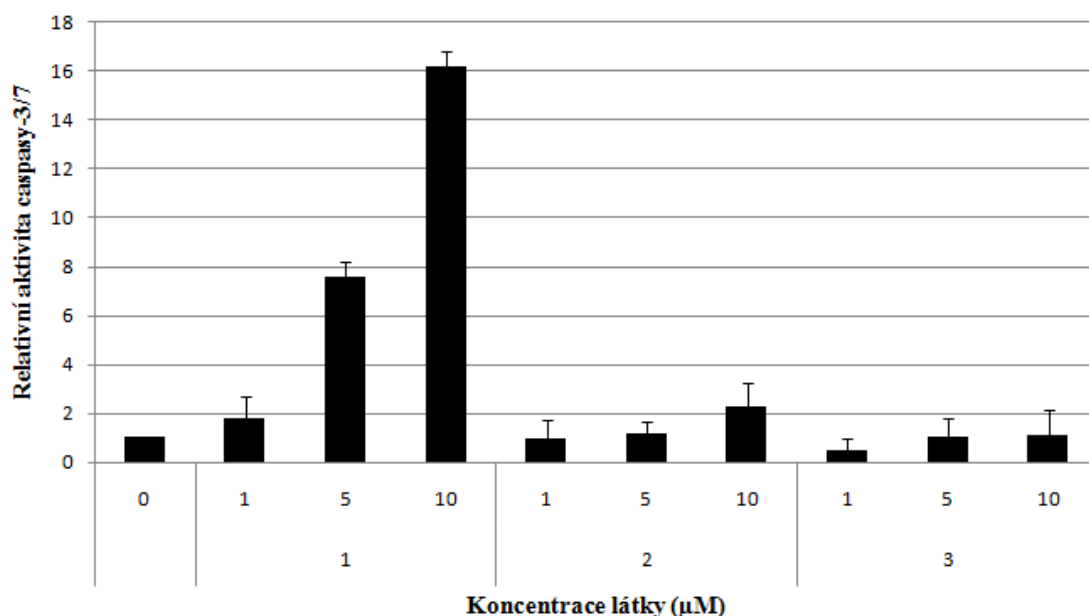
Vzhledem k předešlým výsledkům v kap. 2.2.1.2 Tab. 1, kdy betulin také vykazoval cytotoxickou aktivitu na nádorovou buněčnou linii G-361, byly u něj analýzou Western blot detekovány podobné výsledky jako po aplikaci jeho derivátu s kódovým označením **1** v koncentraci 1 μM. Byla tedy po aplikaci betulinu mírně zvýšená hladina exprese 89 kDa fragmentu proteinu PARP a mírně snížená hladina proteinu p53. Po aplikaci lupeolu na rozdíl od jeho derivátu (ozn. **3**) byly hladiny proteinů p53, Mcl-1, Bcl-2, Mdm-2 mírně snížené, což by znamenalo, že mechanismus působení lupeolu v buňkách odvozených od maligního meanomu je jiný než jeho připraveného derivátu, jež vykazoval cytotoxickou aktivitu na G-361 buňky viz Tab. 1. Hladiny exprese

proteinů po aplikaci kyseliny betulinové byly podobné jako v neovlivněných kontrolních buňkách.

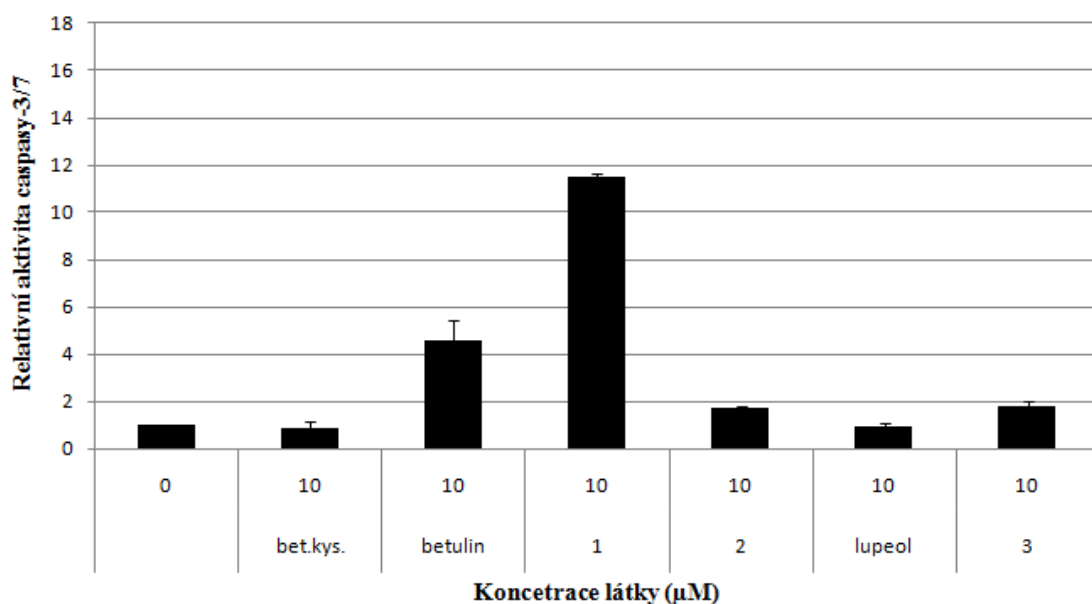
4.2 Aktivita efektorových caspas-3/7 po ovlivnění buněk G-361 deriváty lupanových triterpenů

Pomocí fluorogenního substrátu caspas-3/7, Ac-DEVD-AMC, a/nebo inhibitoru caspas-3/7 Ac-DEVD-CHO byla stanovena aktivita těchto efektorových caspas v G-361 buňkách vystavených působení látek **1**, **2** či **3** v koncentracích 1, 5 a 10 μM po dobu 24 hodin. Pro porovnání hladin fluorescence u prekurzorů a jejich derivátů byly buňky G-361 ovlivněny látkami **1**, **2**, **3**, jejich prekurzory (betulin, lupeol) a kyselinou betulinovou v koncentracích 10 μM po 24 hodin a byl opět v nich změřen signál pomocí fluorimetrického stanovení aktivity caspas-3/7. Dle negativní kontroly (neovlivněné buňky, ozn. 0) byly absolutní hodnoty fluorescence znormalizovány a převedy na relativní aktivitu.

Z naměřených dat je patrné, že látka **1** zvyšuje aktivitu caspas-3/7 v závislosti na koncentraci. Po aplikaci látky **1** v koncentraci 5 μM byla aktivita zvýšena přibližně sedmkrát a při její nejvyšší koncentraci (10 μM) byla zvýšena až šestnáctkrát (Obr. 8). Zatímco látky **2** a **3** i při jejich nejvyšších koncentracích zvyšovaly aktivitu caspas-3/7 pouze dvakrát a měly na ně slabý vliv (Obr. 8 a 9). Kyselina betulinová ani lupeol, prekurzor látky **3**, nezvyšovali aktivitu caspas-3/7 a nevykazovali proapoptické účinky, což koreluje s výsledky z Western blotu (kap. 4.1), kdy nedocházelo ke štěpení proteinu PARP ani ke štěpení caspasy-3. Po aplikaci betulinu v 10 μM koncentraci byla ve srovnání s neovlivněnou kontrolou zvýšena aktivita caspas-3/7 přibližně čtyřikrát. Specifický inhibitor caspas-3/7 (Ac-DEVD-CHO) přidaný k buněčným lyzátům zcela inhiboval aktivitu caspas (data nejsou uvedena), čímž bylo dokázáno, že za nárůst měřeného fluorescenčního signálu v buněčných lyzátech vystavených působení vybraných lupanových triterpenů a jejich derivátů je vskutku odpovědná caspasa-3/7.



Obr. 8 Relativní aktivita caspasy-3/7 v buňkách maligního melanomu G-361, které byly po dobu 24 hodin ovlivněny deriváty lupanových triterpenů (**1**, **2** a **3**) v koncentracích 1, 5 a 10 μM a porovnány s neovlivněnými kontrolními buňkami (ozn. 0). Fluorescenční signál byl měřen po sedmi hodinách inkubace. Experiment byl zopakován čtyřikrát.



Obr. 9 Relativní aktivita caspasy-3/7 v buňkách maligního melanomu G-361, které byly po dobu 24 hodin ovlivněny látkami **1**, **2**, **3**, jejich prekurzory (betulin, lupeol) a kyselinou betulinovou v koncentracích 10 μM a porovnány s neovlivněnými kontrolními buňkami (ozn. 0). Fluorescenční signál byl měřen po sedmi hodinách inkubace. Experiment byl zopakován dvakrát. Bet. kys. – kyselina betulinová.

4.3 Analýza buněčného cyklu a apoptosy pomocí průtokové cytometrie po ovlivnění buněk G-361 deriváty lupanových triterpenů

Pro kvantifikaci distribuce buněk G-361 v jednotlivých fázích buněčného cyklu (G_0/G_1 , S a G_2/M) a zastoupení apoptotických buněk byla použita analýza průtokovou cytometrií. Frakce $subG_1$ odpovídá procentuálnímu zastoupení počtu apoptotických buněk a jejich fragmentů. Nádorová buněčná linie G-361 byla po dobu 24 hodin vystavena působení derivátů betulinu a lupeolu v koncentracích 1, 5 a 10 μM . Pro porovnání změn u prekurzorů a jejich substituovaných derivátů v distribuci buněk ve fázích buněčného cyklu byly buňky G-361 ovlivněny betulinem a jeho deriváty **1**, **2**; lupeolem a jeho derivátem **3** a kyselinou betulinovou v koncentraci 10 μM po dobu 24 hodin.

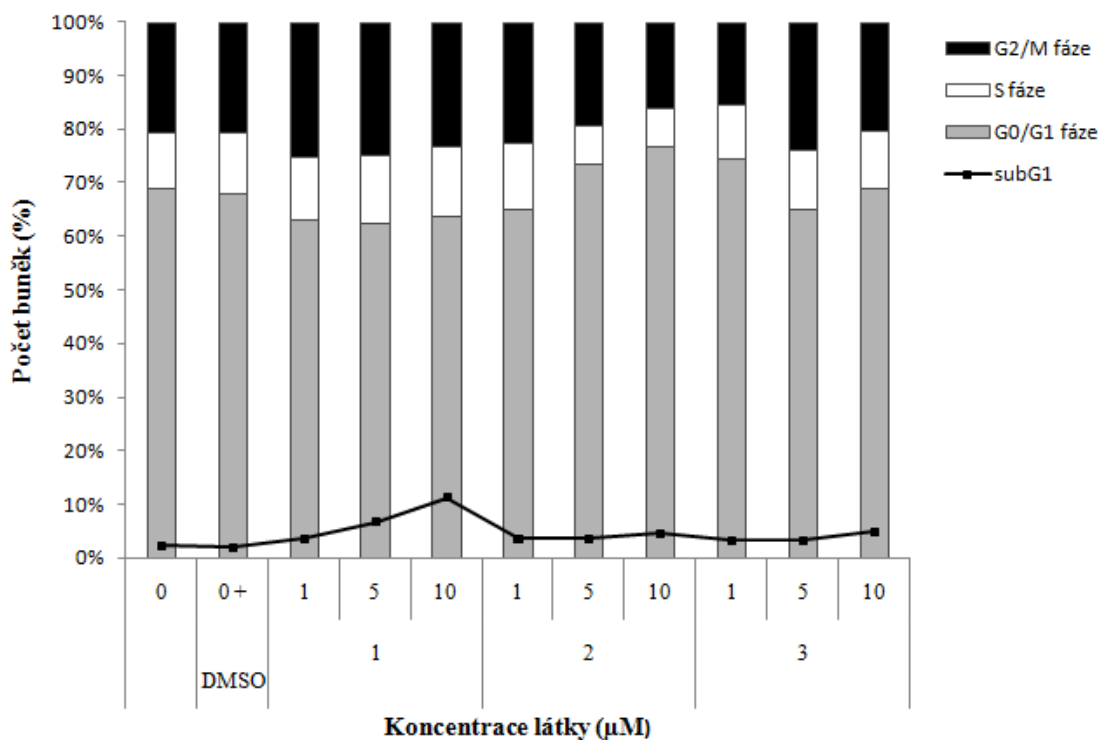
Z výsledků je patrné, že v buňkách ovlivněných látkou **1** docházelo v závislosti na koncentraci k nárůstu počtu apoptotických buněk, tedy buněk v $subG_1$ frakci. Kromě toho byl po aplikaci látky **1** v porovnání s neovlivněnými kontrolními buňkami (ozn. 0 a 0 + DMSO) zvýšený podíl buněk v G_2/M a S fázi a snížený podíl buněk v G_0/G_1 fázi (Obr. 10). Po aplikaci látky **2** byl naopak zaznamenán nárůst počtu buněk v G_0/G_1 fázi, kdy po aplikaci 10 μM koncentrace byl největší, dále pokles počtu buněk v G_2/M fázi a po aplikaci v koncentraci 5 a 10 μM byl snížený podíl buněk v S fázi buněčného cyklu. Oproti kontrolním buňkám docházelo v buňkách ovlivněných látkou **3** v koncentraci 1 μM k nárůstu počtu buněk v G_0/G_1 fázi a poklesu počtu buněk v G_2/M fázi, avšak po aplikaci v koncentraci 5 μM byl zvýšený podíl buněk v G_2/M fázi (Obr. 10). Kumulace buněk v G_0/G_1 fázi znamená, že nádorové buňky nemohou vstoupit do S fáze, dochází k inhibici progresu buněčného cyklu, a také to pro ně může být buď příležitost projít opravnými mechanismy, nebo je spuštěna apoptotická dráha. Pokud je počet buněk snížený v G_0/G_1 fázi a buňky se kumulují v S fázi, tak buňky nemohou projít kontrolním bodem do další fáze buněčného cyklu G_2/M , ale DNA je zmnožena. Jestliže neprojdou opravnými mechanismy, je pravděpodobné, že došlo k iniciaci apoptosy.

Z histogramu, na němž jsou porovnány prekurzory a jejich substituované deriváty, vyplývá, že se po aplikaci kyseliny betulinové nezměnila distribuce buněk ve fázích buněčného cyklu v porovnání s neovlivněnými kontrolními buňkami. Oproti betulinu byl po aplikaci látky **1** podíl buněk v S fázi zvýšen, v G_0/G_1 fázi snížen a po aplikaci

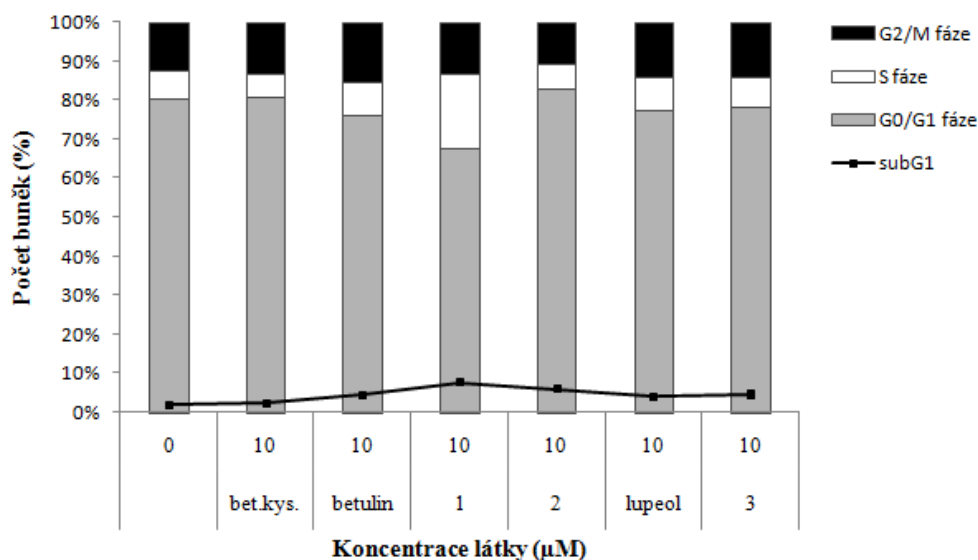
látky **2** byl zaznamenán nárůst počtu buněk v G₀/G₁ fázi a pokles počtu buněk v G₂/M fázi (Obr. 11). Nebyly pozorovány významné rozdíly mezi lupeolem a látkou **3** v procentuálním zastoupení jednotlivých fází buněčného cyklu.

Procentuální zastoupení buněk G-361 v jednotlivých fázích buněčného cyklu zobrazených na Obr. 10 bylo v neovlivněných kontrolních buňkách: 2,32 ± 0,71 % subG₁; 68,90 ± 4,52 % G₀/G₁; 10,44 ± 1,70 % S; 20,65 ± 3,00 % G₂/M (ozn. 0) a 1,91 ± 0,47 % subG₁; 68,08 ± 3,46 % G₀/G₁; 11,41 ± 1,53 % S; 20,52 ± 3,19 % G₂/M (ozn. 0 + DMSO); v buňkách ovlivněných 1 μM **1**: 3,48 ± 0,63 % subG₁; 63,19 ± 1,08 % G₀/G₁; 11,48 ± 0,82 % S; 25,33 ± 0,26 % G₂/M; 5 μM **1**: 6,59 ± 2,30 % subG₁; 62,54 ± 2,79 % G₀/G₁; 12,72 ± 2,80 % S; 24,74 ± 3,04 % G₂/M; 10 μM **1**: 11,19 ± 1,20 % subG₁; 63,86 ± 3,12 % G₀/G₁; 12,83 ± 1,33 % S; 23,31 ± 1,79 % G₂/M; 1 μM **2**: 3,41 ± 0,61 % subG₁; 65,09 ± 2,96 % G₀/G₁; 12,14 ± 0,86 % S; 22,77 ± 2,12 % G₂/M; 5 μM **2**: 3,44 ± 1,05 % subG₁; 73,37 ± 4,69 % G₀/G₁; 7,29 ± 2,21 % S; 19,34 ± 2,62 % G₂/M; 10 μM **2**: 4,47 ± 1,01 % subG₁; 76,59 ± 2,50 % G₀/G₁; 7,38 ± 1,48 % S; 16,03 ± 1,55 % G₂/M; 1 μM **3**: 3,16 ± 1,59 % subG₁; 74,57 ± 1,52 % G₀/G₁; 9,84 ± 2,25 % S; 15,59 ± 1,84 % G₂/M; 5 μM **3**: 3,23 ± 0,64 % subG₁; 65,18 ± 3,20 % G₀/G₁; 10,94 ± 1,61 % S; 23,88 ± 1,76 % G₂/M; 10 μM **3**: 4,84 ± 2,32 % subG₁; 68,89 ± 4,04 % G₀/G₁; 10,63 ± 2,63 % S; 20,48 ± 4,27 % G₂/M fáze buněčného cyklu. Průměry ± SD byly získány ze čtyř nezávislých měření.

Procentuální zastoupení buněk G-361 v jednotlivých fázích buněčného cyklu zobrazených na Obr. 11 bylo v neovlivněných kontrolních buňkách: 1,88 ± 0,09 % subG₁; 80,41 ± 6,02 % G₀/G₁; 7,01 ± 1,56 % S; 12,39 ± 4,49 % G₂/M; v buňkách ovlivněných 10 μM kyselinou betulinovou: 2,21 ± 0,33 % subG₁; 80,57 ± 4,51 % G₀/G₁; 6,01 ± 1,43 % S; 13,42 ± 3,08 % G₂/M; 10 μM betulinem: 4,50 ± 0,14 % subG₁; 76,11 ± 3,24 % G₀/G₁; 8,36 ± 0,88 % S; 15,52 ± 2,35 % G₂/M; 10 μM **1**: 7,60 ± 0,05 % subG₁; 67,44 ± 4,42 % G₀/G₁; 19,02 ± 1,72 % S; 13,54 ± 2,70 % G₂/M; 10 μM **2**: 5,98 ± 0,05 % subG₁; 82,64 ± 0,85 % G₀/G₁; 6,36 ± 1,64 % S; 11,00 ± 0,79 % G₂/M; 10 μM lupeolem: 4,01 ± 0,35 % subG₁; 77,43 ± 0,64 % G₀/G₁; 8,30 ± 1,10 % S; 14,26 ± 0,46 % G₂/M; 10 μM **3**: 4,54 ± 0,23 % subG₁; 78,20 ± 5,41 % G₀/G₁; 7,73 ± 1,44 % S; 14,07 ± 3,97 % G₂/M fáze buněčného cyklu. Průměry ± SD byly získány ze dvou nezávislých měření.



Obr. 10 Histogramy znázorňující distribuce buněk G-361 v G_0/G_1 , S a G_2/M fázích buněčného cyklu a zastoupení počtu buněk v sub G_1 frakci (apoptotických buněk a jejich fragmentů) po 24-hodinovém ovlivnění látkami **1**, **2** a **3** v koncentracích 1, 5 a 10 μM . Ovlivněné buňky byly porovnány s neovlivněnými kontrolními buňkami (ozn. 0) pomocí průtokové cytometrie. Data indikují procentuální (%) zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu.



Obr. 11 Histogramy znázorňující distribuce buněk G-361 v G_0/G_1 , S a G_2/M fázích buněčného cyklu a zastoupení počtu buněk v sub G_1 frakci (apoptotických buněk a jejich fragmentů) po 24-hodinovém ovlivnění betulinovou kyselinou, betulinem, látkou **1**, **2**, lupeolem a látkou **3** v koncentracích 10 μM . Ovlivněné buňky byly porovnány s neovlivněnými kontrolními buňkami (ozn. 0) pomocí průtokové cytometrie. Data indikují procentuální (%) zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Bet. kys. – kyselina betulinová.

5 DISKUSE

Cílem experimentální části diplomové práce bylo charakterizovat antiproliferační účinky vybraných derivátů betulinu a lupeolu na lidskou nádorovou buněčnou linii G-361 (buňky odvozené od lidského maligního melanomu) *in vitro*. Deriváty byly vybrány na základě jejich významné toxicity a selektivity na G-361 nádorovou buněčnou linii. Betulin i lupeol se řadí mezi saponiny, konkrétně mezi lupanové triterpeny. Triterpeny spadají do skupiny přírodních látek, isoprenoidů. Mají široké spektrum farmakologických účinků (Džubák *et al.*, 2006), z nichž jsou nejvýznamnější: antivirální, protizánětlivé, antimikrobiální, antiulcerogenní, antikariogenní a protirakovinné účinky. Právě deriváty lupanu vykazují cytotoxickou aktivitu proti melanomovým buňkám (Salvador, 2010; Šarek *et al.*, 2011).

Díky substituci v poloze C-3 u látek **1** a **2** a substitucím v polohách C-3 a C-28 u látky **3** byla jejich cytotoxická aktivita vůči vybraným buněčným liniím výrazně zvýšena v porovnání s jejich prekurzory, betulinem a lupeolem (Tab. 1). I když betulin byl aktivní proti nádorovým buněčným liniím odvozeným od maligního melanomu G-361 (IC_{50} $13,4 \pm 0,8 \mu M$), jeho deriváty vykazovaly 2 – 13 x vyšší cytotoxickou aktivitu (IC_{50} **1**: $1,1 \pm 0,1 \mu M$; **2**: $5,5 \pm 0,8 \mu M$). Naproti tomu lupeol byl neúčinný proti buněčné linii G-361 ($IC_{50} > 50 \mu M$) a jeho derivát **3** vykazoval silnou cytotoxickou aktivitu IC_{50} $4,8 \pm 0,7 \mu M$. Nicméně tyto deriváty vykazovaly nižší toxicitu proti normálním lidským buňkám (BJ fibroblastům, IC_{50} $5,4 \pm 0,8$ až $18,0 \pm 0,8 \mu M$) než proti G-361 buňkám, což také vykazovaly deriváty zkoumané Cmochem *et al.* (2014a) a Urbanem *et al.* (2012). V současné době je známo jen několik přírodních sloučenin, které by měly potenciální schopnost selektivně či přednostně odstranit rakovinné buňky bez ovlivnění růstu normálních buněk (Tang a Porter, 1997; Matsuya *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2005; Cmoch *et al.*, 2008; Sidoryk *et al.*, 2015). Rozdíly mezi stanovenými koncentracemi (IC_{50}) látek mohou souviset s různou citlivostí daných buněčných linií používaných při pokusech nebo se strukturou derivátů, jejich stabilitou, intracelulární penetrací, rozpustností či metabolickou aktivací (Šarek *et al.*, 2003).

Jednou z možností kontroly růstu nádorových buněk je kontrola progresu buněčného cyklu nádorových buněk (Graña a Reddy, 1995). Kromě toho, pomocí molekulárních analýz bylo zjištěno, že regulátory buněčného cyklu jsou u nejčastěji se vyskytujících zhoubných nádorů mutovány (Molinari, 2000). Proto také byly metodou Western blot detekovány regulátory buněčného cyklu (protein p53 a Rb). Obr. 10 a 11 znázorňují

distribuce buněk G-361 v jednotlivých fázích buněčného cyklu (G_0/G_1 , S a G_2/M) a zastoupení počtu apoptotických buněk a jejich fragmentů ($subG_1$), kdy v buňkách ovlivněných látkou **1** docházelo v závislosti na koncentraci k nárůstu počtu apoptotických buněk, zvýšení podílu buněk v G_2/M fázi a v porovnání s betulinem k nárůstu buněk v S fázi buněčného cyklu. Z toho plyne, že jestliže je počet buněk snížený v G_0/G_1 a zvýšený v S, nádorové buňky nemohou vstoupit do G_2/M fáze a buď je iniciována apoptosa, nebo prochází kontrolními mechanismy. Podobný efekt byl pozorován i u jiných derivátů publikovaných Cmochem *et al.* (2014b), Šarkem *et al.* (2003) a u genisteinu (Hunáková *et al.*, 1994; Spinozzi *et al.*, 1994; Regenbrecht *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2012), u kterého docházelo k zástavě buněčného cyklu v G_2/M fázi. Progrese buněčného cyklu je kontrolována CDK, kdy na konci G_2/M fáze jsou pomocí CDK fosforylovány a aktivovány proteiny podporující mitosu a cytokinezi (Roberts *et al.*, 1994). Každý přechod je kontrolován komplexem cyklin-CDK, tudíž by bylo vhodné stanovit exprese jednotlivých cyklinů a CDK, jestli jsou aktivovány či deaktivovány.

Po aplikaci látky **2** naopak došlo k poklesu počtu buněk v G_0/G_1 fázi, což by mohlo znamenat, že jedním z mechanismů, kterým látka **2** může způsobit inhibici proliferace nádorových buněk, je inhibice progrese buněčného cyklu. Tedy nádorové buňky nemohou vstoupit do dalších fází buněčného cyklu přes kontrolní body a je možné, že v nich bude indukována programovaná buněčná smrt. V souladu s tímto a pro bližší určení mechanismu účinku by bylo vhodné stanovit hladinu exprese G_1 -S cyklinů a CDK, popřípadě jejich inhibitorů p27^{Kip1}, p21^{Waf1/Cip1} (Macaluso *et al.*, 2005). Zastavení progrese buněčného cyklu v G_1 fázi je pro buňky buď příležitost projít opravnými mechanismy, nebo je spuštěna apoptotická dráha (Alberts *et al.*, 2008b). Oproti kontrolním buňkám docházelo v buňkách G-361 ovlivněných látkou **3** v koncentraci 1 μ M k nárůstu počtu buněk v G_0/G_1 fázi a poklesu počtu buněk v G_2/M fázi, avšak v koncentraci 5 μ M byl zvýšený podíl buněk v G_2/M fázi a v koncentraci 10 μ M byla distribuce buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu podobná distribuci v neovlivněných buňkách. Mezi lupeolem a látkou **3** v koncentraci 10 μ M nebyl zaznamenán významný rozdíl v distribuci buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu (Obr. 11).

Dále byla sledována exprese apoptotických markerů pomocí Western blotu (Obr. 6 a 7). Apoptotická buněčná smrt je důsledkem řady přesně regulovaných událostí, jež jsou regulovány proteiny, jejichž exprese může být v nádorových buňkách jiná

než v normálních buňkách, a díky čemuž by mohla být apoptosa cíleně indukována v nádorových buňkách, ideálně bez ovlivnění normálních buněk (Kasibhatla a Tseng, 2003). Apoptosa je fyziologický proces eliminující buňky s poškozenou DNA a představující odlišný typ buněčné smrti na rozdíl od nekrosy (dochází k bobtnání mitochondriální matrix, jádra, cytoplasmy, rozpadu organel, cytoplasmatické membrány, dilataci endoplazmatického retikula, postihu skupin buněk a je provázána zánětem; Kerr *et al.*, 1972; Wyllie *et al.*, 1980; Proskuryakov *et al.*, 2003) či autofagie (tzv. makroautofagie - udržuje homeostázi buněk, vyskytuje se i při hladovění, jedná se o lysozomální degradaci, slouží k degradaci extracelulárních proteinů, k degradaci poškozených organel, hraje protektivní úlohu, dochází k tvorbě vakuol v cytoplasmě, ale ne ke kondenzaci chromatinu; Schweichel a Merker, 1973; Clarke, 1990). Apoptosa je pevně regulována anti-apoptotickými a pro-apoptotickými efektorovými molekulami a může být zprostředkována několika různými drahami. Právě poměr proteinů Bax/Bcl-2 je rozhodující pro indukci apoptosy (Reed, 1995). Zvýšení poměru Bax/Bcl-2 stimuluje uvolnění cytochromu *c* z mitochondrie do cytosolu, kde se váže na Apaf-1, což vede k aktivaci caspasy-3 a štěpení PARP. V apoptických buňkách dochází ke štěpení celkového jaderného proteinu PARP-1 caspasou-3 na 24 kDa a 89 kDa fragmenty (Kaufmann *et al.*, 1993; Casiano *et al.*, 1996; Gobeil *et al.*, 2001). V buňkách odvozených od maligního melanomu (G-361) vystavených působení látky **1** v koncentraci 10 μ M byla detekována zvýšená exprese 89 kDa fragmentu proteinu PARP (Obr. 6 a 7). Apoptosa může být odpovědí na poškození DNA. Aktivace DNA opravného aparátu a urychlení opravy DNA se přímo účastní protein PARP (Schreiber *et al.*, 2006; Yelamos *et al.*, 2008). V souladu s tímto byla v buňkách G-361 ovlivněných látkami **1**, **2** a **3** měřena aktivita caspas-3/7 pomocí fluorimetrického stanovení. A právě po aplikaci látky **1** v koncentraci 10 μ M byla zvýšena až šestnáctkrát (Obr. 8). Zatímco působením látek **2** a **3** v testovaných koncentracích nebyla aktivita caspas-3/7 zvýšená, což je v souladu s výsledky Western blotu, kde nebyla zvýšena hladina exprese caspasy-3 ani fragmentu PARP (Obr. 6 a 8). Po aplikaci prekurzoru lupeolu nebyl pozorován žádný významný efekt, ale po aplikaci betulinu byla mírně zvýšená hladina exprese proteinu PARP (Obr. 7) a aktivita caspas-3/7 byla zvýšená čtyřikrát (Obr. 9), což koreluje s výsledky cytotoxické aktivity (Tab. 1).

Nicméně, exprese nádorových supresorů p53 a Rb byla po aplikaci látky **1** v koncentraci 10 μ M snižena, po aplikaci 10 μ M látky **2** byla mírně snižena, ale po ovlivnění látkou **3** byla hladina exprese p53 mírně zvýšená (Obr. 6 a 7).

Za normálních okolností (při apoptose) je hladina proteinu p53 v odpovědi na poškození DNA, stresy či aktivaci onkogenů zvýšená a následně je indukována apoptosa nebo je zabráněno buňkám vstoupit do S fáze buněčného cyklu (Sherr a Roberts, 1995). Snížení hladiny proteinu p53 by mohlo být způsobeno vysokou, zřejmě už cytotoxickou koncentrací testovaných látek, kdy došlo k destrukci buněk očividně jiným mechanismem než apoptosou a to autofágií, jež by mohla přispívat k buněčné smrti vyvolané caspasami, nebo nekrosou (Eisenberg-Lerner *et al.*, 2009; Green a Kroemer, 2009; Tasdemir *et al.*, 2009; Rikiishi, 2012). Nemělo by se však zapomínat, že autofagie hraje dvojí roli, buď za daných podmínek napomáhá buňkám přežít (Rashmi *et al.*, 2008), nebo je nástrojem buněčné smrti (Codogno a Meijer, 2005). Často se vyskytuje právě v buňkách, u nichž je inhibována apoptosa (Maiuri *et al.*, 2007).

Jelikož protein p53 nemá jen funkci transkripčního faktoru, může být apoptosa indukována i pomocí jeho translokace do mitochondrií nezávisle na jeho transkripční aktivitě (Marchenko *et al.*, 2000). Také je nutné zjistit, zda dochází ke snížení exprese p53 po ovlivnění látkou **1** na úrovni transkripce nebo na úrovni proteinu. Pokud dochází ke snížení hladiny exprese p53, jedním z možných vysvětlení by mohlo také být zvýšení hladiny jeho negativního regulátoru Mdm-2. K negativní regulaci dochází pomocí dvou základních mechanismů. Za prvé, prostřednictvím přímé vazby Mdm-2 na N-terminální konec p53 inhibuje jeho transkripčně aktivační funkci (Momand *et al.*, 1992; Oliner *et al.*, 1993). Za druhé, Mdm-2 má ubikvitin ligasovou aktivitu, která modifikuje p53 a poté jej označí k degradaci 26S proteasomem (Haupt *et al.*, 1997; Honda *et al.*, 1997; Kubbutat *et al.*, 1997). Ale zvýšení hladiny Mdm-2 se nepodařilo potvrdit.

Jak již bylo řečeno, působením látky **1** v koncentraci 10 μ M bylo pozorováno snížení hladiny Rb a působením látky **2** v koncentraci 10 μ M mírné snížení. Protein Rb je klíčovým regulátorem buněčného cyklu a brání vstupu do S fáze buněčného cyklu. Jeho aktivita je řízena fosforylací/defosforylací (Dyson, 1998). Předpokládá se, že je během pozdní G₁ fáze inaktivován CDK- a cyklinem-zprostředkovanou fosforylací (Van den Heuvel a Dyson, 2008). Prominentně nejvíce jsou do procesu fosforylace zapojeny cykliny třídy D (D1, D2, D3). Tyto cykliny jsou regulátory kinas CDK4 a CDK6, které spolu s nimi fosforylují Rb (Kato *et al.*, 1993; Ewen *et al.*, 1993). V defosforylovaném stavu se Rb váže na transkripční faktor E2F a ten brání expresi genů potřebných pro vstup do S fáze buněčného cyklu. Naopak fosforylací dochází k uvolnění E2F a transkripci genů (Chellappan *et al.*, 1991) a Rb je inaktivní. V defosforylovaném stavu je Rb protein aktivní a inhibuje transkripční aktivitu nádorového transkripčního faktoru

E2F. Po ovlivnění látkou **2** byla detekována snížená exprese v G-361 buňkách, což koreluje s výsledky průtokové cytometrie a tedy s nárůstem počtu buněk v G₀/G₁ fázi. Jiným důvodem snížení hladiny Rb může jeho štěpení během apoptosy (An a Dou, 1996). V nádorových buňkách vystavených působení látky **2** dochází k inhibici proliferace na základě inibice progresu buněčného cyklu, buňky jsou kumulovány v G₀/G₁ fázi a nemohou projít kontrolními body do dalších fází buněčného cyklu. Buď prochází opravnými mechanismy, nebo je spuštěna apoptotická dráha.

Dále byla sledována hladina exprese anti-apoptotických proteinů Bcl-2 a Mcl-1. Zvláště významný efekt byl pozorován u proteinu Mcl-1, kdy po ovlivnění látkou **1** byla jeho hladina v závislosti na koncentraci snížena. Kdežto po ovlivnění látkou **2** v koncentraci 10 μM byla hladina Mcl-1 zvýšena (Obr. 6). Za snížení exprese by mohly být odpovědné efektorové caspasy, poněvadž mohou štěpit protein Mcl-1 (Craig, 2002; Snowden *et al.*, 2003; Michels *et al.*, 2004). Navíc Mcl-1 obsahuje sekvenci PEST vyskytující u proteinů s krátkým poločasem rozpadu a jsou zodpovědná za rychlou degradaci proteinu v buňkách (Craig, 2002; Cuconati *et al.*, 2003; Nijhawan *et al.*, 2003). Naopak zvýšená exprese anti-apoptotických proteinů často přispívá k rezistenci nádorů (Tron *et al.*, 1995; Chan *et al.*, 2003) a právě rezistence k indukci apoptosy může být jedním z možných vysvětlení, díky nimž nádorové buňky během anti-neoplastické léčby přežívají (Fisher, 1994). S rezistencí chemoterapeutik a jejich neschopností indukovat apoptosu v nádorových buňkách souvisí nedostatečná aktivace caspas, zvýšená exprese anti-apoptotických proteinů a snížená exprese pro-apoptotických proteinů (Hanahan a Weinberg, 2011). Tudíž jsou v dnešní době intenzivně zkoumány i jiné typy buněčné smrti neapoptotického původu, jako nekroptosa (Holler *et al.*, 2000; Degterev *et al.*, 2005).

Výsledky experimentální části diplomové práce poukazují na potencionální antiproliferační účinky vybraných derivátů lupanových triterpenů vůči G-361 buňkám, načež testovaná látka **1**, derivát betulinu substituovaný v poloze C-3, vykazovala nejsilnější účinek ze všech tří testovaných derivátů.

6 ZÁVĚR

V této diplomové práci byly zkoumány antiproliferační účinky tří derivátů lupanových triterpenů, látek s kódovým označením **1**, **2** a **3**. Látky **1** a **2** jsou deriváty betulinu substituované v poloze C-3 a látka **3** je derivát lupeolu substituovaná v polohách C-3 a C-28. Díky substitucím vykazují tyto deriváty silnější cytotoxický účinek v nízkých mikromolárních koncentracích na buňky odvozené od lidského maligního melanomu (G-361) než vykazují jejich prekurzory. I když jsou cytotoxické proti normálním buňkám, ale v nižších koncentracích než proti G-361 buňkám, mohou být dalším krokem v pochopení mechanismu účinků derivátů lupanových triterpenů a mohou nám pomoci k odhalení dalších terapeutických cílů v léčbě maligního melanomu.

Jejich antiproliferační účinky byly stanoveny třemi nezávislými metodami. Předložené výsledky poukazují především na významné protirakovinné účinky látky **1** v koncentraci 10 μM . Bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací dochází v buňkách G-361 ovlivněných látkou **1** ke zvýšení aktivity caspas-3/7 až šestnáctkrát a zvýšení exprese 89 kDa fragmentu proteinu PARP, jež je důležitým apoptotickým markerem. Dále bylo pozorováno snížení exprese anti-apoptického proteinu Mcl-1 v závislosti na koncentraci, což by mohlo souviset se zvýšením aktivity efektorových caspas, které mohou protein Mcl-1 štěpit. Pozoruhodné však bylo zjištění, že exprese nádorových supresorů p53 a Rb se s rostoucí koncentrací snižovala. Snížení hladiny proteinu p53 by mohlo souviset s aktivací jiného typu buněčné smrti, autofagie či nekrosy. A tak je možné, že po aplikaci látky **1** je kooperativně indukována vnitřní apoptotická dráha spolu s jiným typem buněčné smrti zřejmě díky překročení cytotoxické dávky. Jednou z možností kontroly růstu nádorových buněk je kontrola progresu buněčného cyklu nádorových buněk. Po aplikaci látky **1** byl pozorován zvýšený počet apoptotických buněk, zvýšený podíl buněk v G_2/M fázi a v porovnání s betulinem nárůst počtu buněk v S fázi buněčného cyklu.

Nicméně po aplikaci látek **2** a **3** v testovaných koncentracích nebyla významně zvýšená aktivita caspas-3/7 ani nebyla zvýšená exprese fragmentu proteinu PARP. V buňkách G-361 ovlivněných látkou **2** docházelo ke kumulaci buněk v G_0/G_1 fázi, což je pro buňky buď příležitost projít opravnými mechanismy, nebo je spuštěna apoptotická dráha. Navíc byla po působení látky **2** v koncentraci 10 μM pozorována zvýšená exprese proteinu Mcl-1. Zvýšená exprese anti-apoptických proteinů mnohdy, ale ne vždy, souvisí s rezistencí nádorů.

V budoucnu by se další studie derivátů betulinu a lupeolu mohly zaměřit na přesné vysvětlení mechanismů a typů buněčné smrti a na odezvu nádorových a normálních buněk tak, aby tyto deriváty nevykazovaly cytotoxickou aktivitu i proti lidským fibroblastům (BJ). Rovněž by bylo vhodné se zaměřit na mechanismus účinku derivátů betulinu v souvislosti s proteinem p53. V experimentech by mohly být použity například inhibitory caspas či p53 deficientní nádorové buněčné linie. U látky **2** by v souvislosti se zablokováním buněčného cyklu v G₀/G₁ fázi mohla být navíc detekována exprese G₁-S cyklinů, CDK a jejich inhibitorů p27^{Kip1}, p21^{Waf1/Cip1}.

7 LITERATURA

- Aamdal S., Wolff I., Kaplan S., Paridaens R., Kerger J., Schachter J., Wanders J., Franklin H. R., Verweij J. (1994): Docetaxel (Taxotere) in advanced malignant melanoma: a phase II study of the EORTC Early Clinical Trials Group. *Eur. J. Cancer* **30A**, 1061-1064.
- Acehan D., Jiang X., Morgan D. G., Heuser J. E., Wang X., Akey C. W. (2002): Three-dimensional structure of the apoptosome: Implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol. Cell* **9**, 423-432.
- Adams J. M., Cory S. (1998): The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322-1326.
- Akihisa T., Yasukawa K., Oinuma H., Kasahara Y., Yamanouchi S., Takido M., Kumaki K., Tamura T. (1996): Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry* **43**, 1255-1260.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008a): Cancer. In: *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed., (Anderson M., Granum S., eds.), Abingdon, UK, 1205-1265.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008b): The Cell Cycle. In: *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed., (Anderson M., Granum S., eds.), Abingdon, UK, 1053-1112.
- Allen R. T., Cluck M. W., Agrawal D. K. (1998): Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *Cell. Mol. Life Sci.*, **54**, 427-445.
- Alnemri E. S., Livingston D. J., Nicholson D. W., Salvesen G., Thornberry N. A., Wong W. W., Yuan J. (1996): Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**, 171.
- Alvarado-Kristensson M., Andersson T. (2005): Protein phosphatase 2A regulates apoptosis in neutrophils by dephosphorylating both p38 MAPK and its substrate caspase 3. *J. Biol. Chem.* **280**, 6238-6244.
- Alvarado-Kristensson M., Melander F., Leandersson K., Ronnstrand L., Wernstedt C., Andersson T. (2004): p38-MAPK signals survival by phosphorylation of caspase-8 and caspase-3 in human neutrophils. *J. Exp. Med.* **199**, 449-458.
- An B., Dou Q. (1996): Cleavage of retinoblastoma protein during apoptosis: an interleukin 1 β -converting enzyme-like protease as candidate. *Cancer Res.* **56**, 438-442.
- Anjaneyulu V., Prasad K. H., Rao G. S. (1982): Triterpenoids of the leaves of *Mangifera indica*. *Indian J. Pharm. Sci.* **44**, 58-59.
- Arigoni D. (1959): Biogenesis of terpenes in molds and higher plants. In: *Ciba Foundation Symposium Biosynthesis of Terpenes and Sterols*, Vol. 1958, (Wolstenholme G. E. V., O'Connor M. eds.), Little, Brown and Company, Boston, 231-243.
- Ashkenazi A., Dixit V. M. (1998): Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-1308.
- Atkins M. B., Kunkel L., Sznol M., Rosenberg S. A. (2000): High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update. *Cancer J. Sci. Am.* **6**, 11-14.
- Atkins M. B., Lotze M. T., Dutcher J. P., Fisher R. I., Weiss G., Margolin K., Abrams J., Sznol M., Parkinson D., Hawkins M., Paradise C., Kunkel L., Rosenberg S. A. (1999): High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J. Clin. Oncol.* **17**, 2105-16.
- Avril M. F., Aamdal S., Grob J. J., Hauschild A., Mohr P., Bonerandi J. J., Weichenthal M., Neuber K., Bieber T., Gilde K., Guillem Porta V., Fra J., Bonnetterre J., Saïag P., Kamanabrou D., Pehamberger H., Sufliarsky J., Gonzalez Larriba J. L., Scherrer A., Menu Y. (2004): Fotemustine compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: a phase III study. *J. Clin. Oncol.* **22**, 1118-1125.
- Avril M. F., Bonnetterre J., Delaunay M., Grosshans E., Fumoleua P., Israel L., Bugat R., Namer M., Cupissol D., Kerbrat P., Montcuquet P., Arcaute V., Bizzari J. P. (1990): Combination chemotherapy of dacarbazine and fotemustine in disseminated malignant melanoma. Experience of the French Study Group. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **27**, 81-84.

- Baglin I., Mitaine-Offer A.-C., Nour M., Tan K., Cavé C., Lacaille-Dubois M.-A. (2003): A review of natural and modified betulinic, ursolic and echinocystic acid derivatives as potential antitumor and anti-HIV agents. *Mini Rev. Med. Chem.* **3**, 525-539.
- Bajetta E., Del Vecchio M., Nova P., Fusi A., Daponte A., Sertoli M. R., Queirolo P., Taveggia P., Bernengo M. G., Legha S. S., Formisano B., Cascinelli N. (2006): Multicenter phase III randomized trial of polychemotherapy (CVD regimen) versus the same chemotherapy (CT) plus subcutaneous interleukin-2 and interferon-alpha2b in metastatic melanoma. *Ann. Oncol.* **17**, 571-577.
- Balch C., Reintgen D. S., Kirkwood J. M., et al. (1997): Cutaneous melanoma. In: *Cancer: principles and practice of oncology*. 5th edition. (DeVita V., Hellman S., Rosenber S. A., eds.), Philadelphia, Lippincott-Raven, 1947-1994.
- Barak Y., Juven T., Haffner R., Oren M. (1993): mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J.* **12**, 461-468.
- Bedikian A. Y., Millward M., Pehamberger H., Conry R., Gore M., Trefzer U., Pavlick A. C., DeConti R., Hersh E. M., Hersey P., Kirkwood J. M., Haluska F. G. (2006): Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. *J. Clin. Oncol.* **24**, 4738-4745.
- Bedikian A. Y., Plager C., Papadopoulos N., Eton O., Ellerhorst J., Smith T. (2004): Phase II evaluation of paclitaxel by short intravenous infusion in metastatic melanoma. *Melanoma Res.* **14**, 63-66.
- Beere H. M., Wolf B. B., Cain K., Mosser D. D., Mahboubi A., Kuwana, T., Tailor P., Morimoto R. I., Cohen G. M., Green D. R. (2000): Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat. Cell Biol.* **2**, 469-475.
- Bennett D. C. (1993): Genetics, development, and malignancy of melanocytes. *Int. Rev. Cytol.* **146**, 191-260.
- Bleehen N. M., Newlands E. S., Lee S. M., Thatcher N., Selby P., Calvert A. H., Rustin G. J., Brampton M., Stevens M. F. (1995): Cancer Research Campaign phase II trial of temozolomide in metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* **13**, 910-913.
- Boatright K. M., Renatus M., Scott F. L., Sperandio S., Shin H., Pedersen I. M., Ricci J. E., Edris W. A., Sutherlin D. P., Green D. R., et al. (2003): A unified model for apical caspase activation. *Mol. Cell* **11**, 529-541.
- Bradford M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of mikrogram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Breslow A. (1970): Thickness, Cross-Sectional Areas and Depth of Invasion in Prognosis of Cutaneous Melanoma. *Ann. Surg.* **172**, 902-908.
- Budihardjo I., Oliver H., Lutter M., Luo X., Wang X. (1999): Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 269-290.
- Cain K., Bratton S. B., Cohen G. M. (2002): The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* **84**, 203-214.
- Cascinelli N., Belli F., MacKie R. M., Santinami M., Bufalino R., Morabito A. (2001): Effect of long-term adjuvant therapy with interferon alpha-2a in patients with regional node metastases from cutaneous melanoma: a randomised trial. *Lancet* **358**, 866-869.
- Casiano C. A., Martin S. J., Green D. R., Tan, E. M. (1996): Selective cleavage of nuclear autoantigens during CD95 (Fas/APO-1)-mediated T cell apoptosis. *J. Exp. Med.* **184**, 765-770.
- Cichewitz R. H., Kouzi S. A. (2004): Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. *Med. Res. Rev.* **24**, 90-114.
- Clark W. H. (1991): Human cutaneous malignant melanoma as a model for cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **10**, 83-88.
- Clarke P. G. H. (1990): Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol. (Berl)*. **181**, 195-213.

- Classon M., Harlow E. (2002): The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nature Rev. Cancer* **2**, 910-917.
- Cerretti D. P., Kozlosky C. J., Mosley B., Nelson N., Van Ness K., Greenstreet T. A., March C. J., Kronheim S. R., Druck T., Cannizzaro L. A., et al. (1992): Molecular cloning of the interleukin-1 β converting enzyme. *Science* **256**, 97-100.
- Cmoch P., Korda A., Rárová L., Oklešťková J., Strnad M., Gwardiak K., Karczewski R., Pakulski Z. (2014a): Synthesis of lupane-type saponins containing an usual α -D-idopyranoside fragment as potent cytotoxin agents. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 4089-4098.
- Cmoch P., Korda A., Rárová L., Oklešťková J., Strnad M., Luboradzki R., Pakulski Z. (2014b): Synthesis and structure-activity relationship study of cytotoxin lupane-type 3 β -O-monodesmosidic saponins with an extended C-28 side chain. *Tetrahedron* **70**, 2717-2730.
- Cmoch P., Pakulski Z., Swaczynová J., Strnad M. (2008): Synthesis of lupane-type saponins bearing mannosyl and 3,6-branched trimannosyl residues and their evaluation as anticancer agents. *Carbohydr. Res.* **343**, 995-1003.
- Codogno P., Meijer A. J. (2005): Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ.* **12**, 1509-1518.
- Cohen G. M. (1997): Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* **326**, 1-16.
- Connolly J. D., Hill R. A. (2005a): Triterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* **22**, 230-248.
- Connolly J. D., Hill R. A. (2005b): Triterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* **22**, 487-503.
- Cory S. (1995): Regulation of lymphocyte survival by the *bcl-2* gene family. *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 513-543.
- Cory S., Strasser A., Jacks T., Corcoran L. M., Metz T., Harris A. W., Adams J. M. (1994): Enhanced cell survival and tumorigenesis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **59**, 365-375.
- Costanza M. E., Nathanson L., Schoenfeld D., Wolter J., Colsky J., Regelson W., Cunningham T., Sedransk N. (1977): Results with methyl-CCNU and DTIC in metastatic melanoma. *Cancer* **40**, 1010-1015.
- Cragg G. M., Newman D. J. (2005): Plants as a source of anti-cancer agents. *J. Ethnopharmacol.* **100**, 72-79.
- Craig R. W. (2002): MCL-1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia* **16**, 444-454.
- Creagan E. T., Ahmann D. L., Frytak S., Long H. J., Chang M. N., Itri L. M. (1987): Three consecutive phase II studies of recombinant interferon alfa-2a in advanced malignant melanoma. Updated analyses. *Cancer* **59**, 638-646.
- Croxtan R., Ma Y., Song L., Haura E. B., Cress W. D. (2002): Direct repression of the Mcl-1 promoter by E2F1. *Oncogene* **21**, 1359-1369.
- Cuconati A., Mukherjee C., Perez D., White E. (2003): DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. *Genes Dev.* **17**, 2922-2932.
- Čap R., Dobeš D., Hošek F., Hyža P. (2005): Maligní melanom. *Military Medical Science Letters* **74**, 4-8.
- d'Adda di Fagagna F., Hande M. P., Tong W. M., Lansdorp P. M., Wang Z. Q., Jackson, S. P. (1999): Functions of poly(ADP-ribose) polymerase in controlling telomere length and chromosomal stability. *Nat. Genet.* **1**, 76-80.
- D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I., Poirier G. G. (1999): Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem. J.* **342**, 249-268.
- Dahl C., Guldberg P. (2007): The genome and epigenome of malignant melanoma. *APMIS* **115**, 1161-1176.
- Davies H., Bignell G. R., Cox C., Stephens P., Edkins S., Clegg S., Teague J., Woffendin H., Garnett M. J., Bottomley W., Davis N., Dicks E., Ewing R., Floyd Y., Gray K., Hall S., Hawes R., Hughes J., Kosmidou V., Menzies A., Mould C., Parker A., Stevens C., Watt S., Hooper S., Wilson R., Jayatilake H., Gusterson B. A., Cooper C., Shipley J., Hargrave D., Pritchard-Jones K., Maitland N., Chenevix-Trench G., Riggins G. J., Bigner D. D., Palmieri G., Cossu A., Flanagan A., Nicholson A., Ho J. W., Leung S. Y., Yuen S. T., Weber B. L., Seigler H. F., Darrow T. L., Paterson H., Marais R., Marshall C. J., Wooster

- R., Stratton M. R., Futreal P. A. (2002): Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. *Nature* **417**, 949-954.
- Davies M. A., Samuels Y. (2010): Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene* **29**, 5545-5555.
- Degterev A., Huang Z., Boyce M., Li Y., Jagtap P., Mizushima N., Cuny G. D., Mitchison T. J., Moskowitz M. A., Yuan J. (2005): Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat. Chem.Biol.* **1**, 112-119.
- DeLeo A. B., Jay G., Appella E., Dubois G. C., Law L. W., Old L. J. (1979): Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 2420-2424.
- Della loggia R., Tabura A., Sosa S., Becker H., Saar S., Isaac O. (1994): The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Med.* **60**, 516-520.
- Derenne S., Monia B., Dean N. M., Taylor J. K., Rapp M. J., Harousseau J. L., Bataille R., Amiot M. (2002): Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood* **100**, 194-199.
- Donehower L. A., Harvey M., Slagle B. L., McArthur M. J., Montgomery C. A. J., Butel J. S., Bradley A. (1992): Mice deficient for p53 are developmentally normal but are susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**, 215-221.
- Doetsch M., Gluch A., Poznanović G., Bode J., Vidaković M. (2012): YY1-binding sites provide central switch functions in the *PARP-1* gene expression network. *PLOS ONE* **7**, e44125.
- Du C., Fang M., Li Y., Li L., Wang X. (2000): Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome *c*-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33-42.
- Dummer R., Garbe C., Thompson J. A., Eggermont A. M., Yoo K., Maier T., Bergstrom B. (2006): Randomized dose-escalation study evaluating peginterferon alfa-2a in patients with metastatic malignant melanoma. *J. Clin. Oncol.* **24**, 1188-1194.
- Dyson N. (1998): The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* **12**, 2245-2262.
- Džubák P., Hajdúch M., Vydra D., Hustová A., Kvasnica M., Biedermann D., Marková L., Urban M., Šarek J. (2006): Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic Implications. *Nat. Prod. Rep.* **23**, 394-411.
- Earnshaw W. C., Martins L. M., Kaufmann S. H. (1999): Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 383-424.
- Eisen T., Ahmad T., Flaherty K. T., Gore M., Kaye S., Marais R., Gibbens I., Hackett S., James M., Schuchter L. M., Nathanson K. L., Xia C., Simantov R., Schwartz B., Poulin-Costello M., O'Dwyer P. J., Ratain M. J. (2006): Sorafenib in advanced melanoma: a Phase II randomised discontinuation trial analysis. *Br. J. Cancer* **95**, 581-586.
- Eisenberg-Lerner A., Bialik S., Simon H. U., Kimchi A. (2009): Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ.* **16**, 966-975.
- Eiznhamer D., Xu, Z. (2004): Betulinic acid: A promising anticancer candidate. *Idrugs* **7**, 359-373.
- Emmert S., Zutt M., Haenssle H., Neumann C., Kretschmer L. (2003): Inefficacy of vindesine monotherapy in advanced stage IV malignant melanoma patients previously treated with other chemotherapeutic agents. *Melanoma Res.* **13**, 299-302.
- Eschenmoser A., Ružička L., Jeger O., Arigoni D. (1955): Zur Kenntnis der Triterpene. *Helv. Chim. Acta* **38**, 1890-1904.
- Eskes R., Antonsson B., Osen-Sand A., Montessuit S., Richter C., Sadoul R., Mazzei G., Nichols A., Martinou J. C. (1998): Bax-induced cytochrome *C* release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions. *J. Cell Biol.* **143**, 217-224.
- Eton O., Legha S. S., Bedikian A. Y., Lee J. J., Buzaid A. C., Hodges C., Ring S. E., Papadopoulos N. E., Plager C., East M. J., Zhan F., Benjamin R. S. (2002): Sequential biochemotherapy versus chemotherapy for metastatic melanoma: results from a phase III randomized trial. *J. Clin. Oncol.* **20**, 2045-2052.

- Evan G. I., Vousden K. H. (2001): Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* **411**, 342-348.
- Evans L. M., Casper E. S., Rosenbluth R. (1987): Phase II trial of carboplatin in advanced malignant melanoma. *Cancer Treat. Rep.* **71**, 171-172.
- Evtodienko Y. V., Teplova V. V., Azarashvily T. S., Kudin A., Prusakova O., Virtanen I., Saris N. E. (1999): The Ca²⁺ threshold for the mitochondrial permeability transition and the content of proteins related to Bcl-2 in rat liver and Zajdela hepatoma mitochondria. *Mol. Cell Biochem.* **194**, 251-256.
- Ewen M. E., Sluss H. K., Sherr C. J., Matsushime H., Kato J. Y., Livingston, D. M. (1993): Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* **73**, 487-497.
- Ezekowitz R. A. B., Stahl, P. D. (1998): The structure and function of vertebrate mannose lectin-like protein. *J. Cell. Sci.* **9**, 121-133.
- Fakharzadeh S. S., Trusko S. P., George D. L. (1991): Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO J.* **10**, 1565-1569.
- Fecher L. A., Amaravadi R. K., Flaherty K. T. (2008): The MAPK pathway in melanoma. *Curr. Opin. Oncol.* **20**, 183-189.
- Feki A., Irminger-Finger I. (2004): Mutational spectrum of p53 mutations in primary breast and ovarian tumors. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **52**, 103-116.
- Fernandes-Alnemri T. G., Litwack G., Alnemri E. S. (1994): CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein CED-3 and mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *J. Biol. Chem.* **269**, 30761-30764.
- Finucane D. M., Bossy-Wetzel E., Waterhouse N. J., Cotter T. G., Green D. R. (1999): Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome *c* release from mitochondria is inhibitable by Bcl-XL. *J. Biol. Chem.* **274**, 2225-2233.
- Fisher D. E. (1994): Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* **78**, 539-542.
- Flaherty K. T. (2006): Chemotherapy and targeted therapy combinations in advanced melanoma. *Clin. Cancer Res.* **12**, 2366-2370.
- Flaherty K. T., Brose M., Schuchter L., et al. (2004): Phase I/II trial of BAY 43-9006, carboplatin (C) and paclitaxel (P) demonstrates preliminary antitumor activity in the expansion cohort of patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* **22** (14S), 7507.
- Flaherty L. E., Atkins M., Sosman J., Weiss G., Clark J. I., Margolin K., Dutcher J., Gordon M. S., Lotze M., Mier J., Sorokin P., Fisher R. I., Appel C., Du W. (2001): Outpatient biochemotherapy with interleukin-2 and interferon alfa-2b in patients with metastatic malignant melanoma: results of two phase II cytokine working group trials. *J. Clin. Oncol.* **19**, 3194-3202.
- Fletcher W. S., Green S., Fletcher J. R., Dana B., Jewell W., Townsend R. A. (1988): Evaluation of cis-platinum and DTIC combination chemotherapy in disseminated melanoma. A Southwest Oncology Group Study. *Am. J. Clin. Oncol.* **11**, 589-593.
- Friend S. H., Bernards R., Rogelj S., Weinberg R. A., Rapaport J. M., Albert D. M., Dryja T. P. (1986): A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* **323**, 643-646.
- Fulda S. (2009): Betulic acid: A natural product with anticancer activity. *Mol. Nutr. Food Res.* **53**, 140-146.
- Fulda S., Jeremias I., Steiner H. H., Pietsch T., Debatin K. M. (1999): Betulinic acid: A new cytotoxic agent against malignant brain-tumor cells. *Int. J. Cancer* **82**, 435-441.
- Fulda S., Scaffidi C., Susin S. A., Krammer P. H., Kroemer G., Peter M. E., Debatin K. M. (1998): Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid. *J. Biol. Chem.* **273**, 33942-33948.
- Garcia I., Martinou I., Tsujimoto Y., Martinou J.-C. (1992): Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 proto-oncogene. *Science* **258**, 302-304.
- Geetha T., Varalakshmi P., Marylatha R. (1998): Effect of triterpene from *Crataeva nurvala* stem bark on lipid peroxidation in adjuvant induced arthritis in rats. *Pharmacol. Res.* **37**, 191-195.

- Giaccia A. J., Turcotte S. (2010): Targeting cancer cells through autophagy for anticancer therapy. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 246-251.
- Giaccia A. J., Kastan, M. B. (1998): The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev.* **12**, 2973-2983.
- Glover D., Ibrahim J., Kirkwood J., Glick J., Karp D., Stewart J., Ewell M., Borden E. (2003): Phase II randomized trial of cisplatin and WR-2721 versus cisplatin alone for metastatic melanoma: an Eastern Cooperative Oncology Group Study (E1686). *Melanoma Res.* **13**, 619-626.
- Gobeil S., Boucher C. C., Nadeau D., Poirier G. G. (2001): Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases. *Cell Death Differ.* **8**, 588-594.
- Graña X., Reddy E. P. (1995): Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclindependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* **11**, 211-219.
- Grbovic O. M., Basso A. D., Sawai A., Ye Q., Friedlander P., Solit D., Rosen N. (2006): V600E B-Raf requires the Hsp90 chaperone for stability and is degraded in response to Hsp90 inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 57-62.
- Green D. R., Kroemer G. (2009): Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* **458**, 1127-1130.
- Green D. R., Reed J. C. (1998): Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-1312.
- Gross A., Jockel J., Wei M. C., Korsmeyer S. J. (1998): Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J.* **17**, 3878-3885.
- Gross A., McDonnell J. M., Korsmeyer S. J. (1999): BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, **13**, 1899-1911.
- Guevara A. P., Amor E., Russel G. (1996): Antimutagenic from *Plumeria acuminata*. *Mutat. Res.* **361**, 67-72.
- Hainaut P., Hollstein M. (2000): p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res.* **77**, 81-137.
- Hamid O., Urba W. J., Yellin M., Nichol G. M., Weber J., Hersh E. M., Tchekmedyian S., Hodi F. S., Weber R., O'Day S. (2007): Kinetics of response to ipilimumab (MDX-010) in patients with stage III/IV melanoma. *J. Clin. Oncol.* **25** (18S), 8525.
- Hanahan D., Weinberg R. A. (2000): The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Hanahan D., Weinberg R. A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674.
- Hartwell J. L. (1982): In: *Plants Used Against Cancer: A survey*. Quarterman Pub., Quarterman, Lawrence, MA, 1-710.
- Haupt Y., Maya R., Kazaz A., Oren M. (1997): Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**, 296-299.
- Hauschild A., Garbe C., Stolz W., Ellwanger U., Seiter S., Dummer R., Ugurel S., Sebastian G., Nashan D., Linse R., Achteik W., Mohr P., Kaufmann R., Fey M., Ulrich J., Tilgen W. (2001): Dacarbazine and interferon alpha with or without interleukin 2 in metastatic melanoma: a randomized phase III multicentre trial of the Dermatologic Cooperative Oncology Group (DeCOG). *Br. J. Cancer.* **84**, 1036-1042.
- Hayek E. W. H., Jordis U., Moche W., Sauter F. (1989): A bicentennial of betulin. *Phytochemistry* **28**, 2229-2242.
- Hess V., Herrmann R., Veelken H., Schwabe M. (2007): Interleukin-2-based biochemotherapy for patients with stage IV melanoma: long-term survivors outside a clinical trial setting. *Oncology* **73**, 33-40.
- Holler N., Zaru R., Micheau O., Thome M., Attinger A., Valitutti S., Bodmer J. L., Schneider P., Seed B., Tschopp J. (2000): Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat. Immunol.* **1**, 489-495.
- Holman C. D., Armstrong B. K., Heenan P. J. (1986) Relationship of cutaneous malignant melanoma to individual sunlight-exposure habits. *J. Natl. Cancer Inst.* **76**, 403-414.
- Honda R., Tanaka H., Yasuda H. (1997): Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* **420**, 25-27.

- Horvitz H. R. (1999): Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res.* **59**:1701-1706.
- Houghton A. N., Viola M. V. (1981): Solar radiation and malignant melanoma of the skin. *J. Am. Acad. Dermatol.* **5**, 477-483.
- Hu K., Dong A. J., Yao X. S., Kobayashi H., Iwasaki S. (1996): ANTINEOPLASTIC AGENTS .1. 3 SPIROSTANOL GLYCOSIDES FROM RHIZOMES OF *DIOSCOREA COLLETTII* VAR. *HYPOGLAUCA*. *Planta Med.* **62**, 573-575.
- Hu S., Snipas S. J., Vincenz C., Salvesen G., Dixit V. M. (1998): Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease. *J. Biol. Chem.* **273**, 29648-29653.
- Huang H., Joazeiro C. A., Bonfoco E., Kamada S., Levenson J. D., Hunter T. (2000): The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes *in vitro* monoubiquitination of caspases 3 and 7. *J. Biol. Chem.* **275**, 26661-26664.
- Hufford C. D., Liu S., Clark A. M. J. (1988): Antifungal activity of *Trillium grandiflorum* constituents. *J. Nat. Prod.* **51**, 94-98.
- Hunáková L., Sedlák J., Klobusická M., Duraj J., Chorváth B. (1994): Tyrosine kinase inhibitor-induced differentiation of K-562 cells: alterations of cell cycle and cell surface phenotype. *Cancer Lett.* **81**, 81-87.
- Chambon P., Weill J. D., Mandel P. (1963): Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **11**, 39-43.
- Chan S. L., Lee M. C., Tan K. O., Yang L. K., Lee A. S., Flotow H., Fu N. Y., Butler M. S., Soejarto D. D., Buss A. D., Yu V. C. (2003): Identification of chelerythrine as an inhibitor of BclXL function. *J. Biol. Chem.* **278**, 20453-20456.
- Chao D. T., Korsmeyer S. J. (1998): BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 395-419.
- Chapman P. B., Hauschild A., Robert C., Haanen J. B., Ascierto P., Larkin J., Dummer R., Garbe C., Testori A., Maio M., Hogg D., Lorigan P., Lebbe C., Jouary T., Schadendorf D., Ribas A., O'Day S. J., Sosman J. A., Kirkwood J. M., Eggermont A. M. M., Dreno B., Nolop K., Li J., Nelson B., Hou J., Lee R. J., Flaherty K. T., McArthur G. A., Grp B. S. (2011): Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2507-2516.
- Chatterjee P., Kouzi S. A., Pezzuto J. M., Hamann M. T. (2000): Biotransformation of the antimelanoma agent betulinic acid by *Bacillus megaterium* ATCC 13368. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3850-3855.
- Chellappan S. P., Hiebert S., Mudryj M., Horowitz J. M., Nevins J. R. (1991): The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* **65**, 1053-1061.
- Chen L., Willis S. N., Wei A., Smith B. J., Fletcher J. I., Hinds M. G., Colman P. M., Day C. L., Adams J. M., Huang D. C. (2005): Differential targeting of pro-survival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol. Cell* **17**, 393-403.
- Chiang H. C., Tseng T. H., Wang C. J., Chen C. F., Kan W. S. (1991) Experimental antitumor agents from *Solanum indicum*. *L. Anticancer Res.*, **11**, 1911-1917.
- Chin L., Merlino G., DePinho R. A. (1998): Malignant melanoma: modern black plague and genetic black box. *Genes Dev.* **12**, 3467-3481.
- Chipuk J. E., Moldoveanu T., Llambi F., Parsons M. J., Green D. R. (2010): The BCL-2 family reunion. *Mol. Cell* **37**, 299-310.
- Chittenden T., Flemington C., Houghton A. B., Ebb R. G., Gallo G. J., Elangovan B., Chinnadurai G., Lutz R. J. (1995): A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J.* **14**, 5589-5596.
- Chitwood K., Etkorn J., Cohen G. (2013): Topical and intralesional treatment of nonmelanoma skin cancer: efficacy and cost comparisons. *Dermatol. Surg.* **39**, 1306-1316.
- Ikeda T., Ando J., Miyazono A., Zhu X. H., Tsumagari H., Nohara T., Yokomizo K., Uyeda M. (2000): Anti-herpes virus activity of *Solanum* steroidal glycosides. *Biol. Pharm. Bull.* **23**, 363-364.
- Inoue S., Browne G., Melino G., Cohen G. M. (2009): Ordering of caspases in cells undergoing apoptosis by the intrinsic pathway. *Cell Death Differ.* **16**, 1053-1061.

- Itoh N., Nagata S. (1993): A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J. Biol. Chem.* **268**, 10932-10937.
- Jacquillat C., Khayat D., Banzet P., Weil, M., Fumoleau P., F., Avril M. F., Namer M., Bonnetterre J., Kerbrat P., Bonerandi J. J., Bugat R., Montcuquet P., Cupissol D., Lauvin R., Vilmer C., Prache C., Bizzari J. P. (1990): Final report of the French multicenter phase II study of the nitrosourea fotemustine in 153 evaluable patients with disseminated malignant melanoma including patients with cerebral metastases. *Cancer* **66**, 1873-1878.
- Jacks T., Remington L., Williams B. O., Schmitt E. M., Halachmi S., Bronson R. T., Weinberg R. A. (1994): Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr. Biol.* **4**, 1-7.
- Jansen B., Schlagbauer-Wadl H., Brown B. D., Bryan R. N., van Elsas A., Müller M., Wolff K., Eichler H. G., Pehamberger H. (1998): Bcl-2 antisense therapy chemosensitizes human melanoma in SCID mice. *Nat. Med.* **4**, 232-234.
- Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y., Xu J., Murray T., Thun M. J. (2008): Cancer statistics, 2008. *CA-Cancer J. Clin.* **58**, 71-96.
- Jiang W., Swiggard W. J., Heufler C., Peng M., Mirza A., Steinman R. M., Nussenzweig M. C. (1995): The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* **375**, 151-155.
- Jilaveanu L. B., Aziz S. A., Kluger H. M. (2009): Chemotherapy and biologic therapies for melanoma: do They work? *Clin. Dermatol.* **27**, 614-625.
- Jin S., Levine A. J. (2001). The p53 functional circuit. *J. Cell Sci.* **114**, 4139-4120.
- Jones A. L., O'Brien M. E., Lorentzos A., Viner C., Hanrahan A., Moore J., Millar J. L., Gore M. E. (1992): A randomised phase II study of carmustine alone or in combination with tumour necrosis factor in patients with advanced melanoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **30**, 73-76.
- Juven T., Barak Y., Zauberman A., George D. L., Oren M. (1993): Wild type p53 can mediate sequence-specific transactivation of an internal promoter within the *mdm2* gene. *Oncogene* **8**, 3411-3416.
- Kang S. J., Wang S., Kuida K., Yuan J. (2002): Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock response. *Cell Death Differ.* **9**, 1115-1125.
- Karasarides M., Chiloehes A., Hayward R., Niculescu-Duvaz D., Scanlon I., Friedlos F., Ogilvie L., Hedley D., Martin J., Marshall C. J., Springer C. J., Marais R. (2004) B-RAF is a therapeutic target in melanoma. *Oncogene* **23**, 6292-6298.
- Kasibhatla S., Tseng B. (2003): Why target apoptosis in cancer treatment. *Mol. Cancer Ther.* **2**, 573-580.
- Kato J., Matsushime H., Hiebert S. W., Ewen M. E., Sherr C. J. (1993): Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase, CDK4. *Genes Dev.* **7**, 331-342.
- Kaufmann S. H., Desnoyers S., Ottaviano Y., Davidson N. E., Poirier G. G. (1993): Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* **53**, 3976-3985.
- Kefford R., Millward M., Hersey P., Brady B., Graham M., Johnson R. G., Hannah A. L. (2007): Phase II trial of tanspimycin (KOS-953), a heat shock protein-90 (Hsp90) inhibitor in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* **25** (18S), 8558.
- Kelekar A., Thompson C. B. (1998): Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol.* **8**, 324-330.
- Kerr J. F., Winterford C. M., Harmon B. V. (1994): Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* **73**, 2013-2026.
- Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R. (1972): Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-257.
- Kerr J. F. (2002): History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* **181-182**, 471-474.
- Kim D. S. H. L., Chen Z., van Tuyen Nguyen, Pezzuto J. M., Qiu S., Lu Z.-Z. (1997): A concise semi-synthetic approach to betulinic acid from betulin. *Synth. Commun.* **27**, 1607-1612.

- Kim D. S., Pezzuto J. M., Pisha E. (1998): Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 1707-1712.
- Kischkel F. C., Hellbardt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Krammer P. H., Peter M. E. (1995): Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* **14**, 5579-5588.
- Knudson A. G. (1971): Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **68**, 820-823.
- Koenig U., Eckhart L., Tschachler E. (2001): Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**, 1150-1154.
- Kommera H., Kaluderović G. N., Kalbitz J., Paschke R. (2011): Lupane triterpenoids-betulin and betulinic acid derivatives induce apoptosis in tumor cells. *Invest. New. Drugs.* **29**, 266-272.
- Kozopas K. M., Yang T., Buchan H. L., Zhou P., Craig R. W. (1993): *MCL1*, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3516-3520.
- Kovesdi I., Reichel R., Nevins J. R. (1987): Role of an adenovirus E2 promoter binding factor in E1A-mediated coordinate gene control. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 2180-2184.
- Krajewski S., Bodrug S., Krajewska M., Shabaik A., Gascoyne R., Beran K., Reed J. C. (1995): Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. Differential regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death in vivo. *Am. J. Pathol.* **146**, 1309-1319.
- Krasutsky P. A. (2006): Birch bark research and development. *Nat. Prod. Rep.* **23**, 919-942.
- Kubbutat M. H., Jones S. N., Vousden K. H. (1997): Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**, 299-303.
- Kubo S., Mimaki Y., Terao M., Sashida Y., Nikaido T., Ohmoto T. (1992): Acylated cholestane glycosides from the bulbs of *Ornithogalum saundersiae*. *Phytochemistry* **31**, 3969-3973.
- Kvasnica M., Šarek J., Klinotová E., Džubák P., Hajdúch M. (2005): Synthesis of phthalates of betulinic acid and betulin with cytotoxic activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 3447-3454.
- Kweifio-Okio G., Field B., Ruble B. A., Macrides T. A., Demunk F. (1995): Esterification improves antiarthritic effectiveness of lupeol. *Drug Dev. Res.* **35**, 137-141.
- Lahav G. (2008): Oscillations by the p53-Mdm2 feedback loop. *Adv. Exp. Med. Biol.* **641**, 28-38.
- Lakhani S. A., Masud A., Kuida K., Porter G. A., Booth C. J., Mehal W. Z., Inayat I., Flavell R. A. (2006): Caspases 3 and 7: Key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* **311**, 847-851.
- Lane D. P., Crawford L. V. (1979): T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**, 261-263.
- Lane D. P. (1992): Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15-16.
- La Thangue N. B., Rigby P. W. J. (1987): An adenovirus E1Alike transcription factor is regulated during the differentiation of murine embryonal carcinoma stem cells. *Cell* **49**, 507-513.
- Legha S. S., Ring S., Bedikian A., Plager C., Eton O., Buzaid A. C., Papadopoulos N. (1996): Treatment of metastatic melanoma with combined chemotherapy containing cisplatin, vinblastine and dacarbazine (CVD) and biotherapy using interleukin-2 and interferon-alpha. *Ann. Oncol.* **7**, 827-835.
- Legha S. S., Ring S., Eton O., Bedikian A., Plager C., Papadopoulos N. (1997): Development and results of biochemotherapy in metastatic melanoma: the University of Texas M. D. Anderson Cancer Center experience. *Cancer J. Sci. Am.* **3**, 9-15.
- Legha S. S., Ring S., Papadopoulos N., Plager C., Chawla S., Benjamin R. (1989): A prospective evaluation of a triple-drug regimen containing cisplatin, vinblastine, and dacarbazine (CVD) for metastatic melanoma. *Cancer* **64**, 2024-2029.

- Li H., Zhu H., Xu C. J., Yuan J. (1998): Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501.
- Linzer D. I., Levine A. J. (1979): Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* **17**, 43-52.
- Liu X., Kim C. N., Yang J., Jemmerson R., Wang X. (1996): Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome *c*. *Cell* **86**, 147-157.
- Liu S., Li J., Tao Y., Xiao X. (2007): Small heat shock protein alphaB-crystallin binds to p53 to sequester its translocation to mitochondria during hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **354**, 109-114.
- Llambi F., Moldoveanu T., Tait S. W., Bouchier-Hayes L., Temirov J., McCormick L. L., Dillon C. P., Green D. R. (2011): A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Mol. Cell* **44**, 517-531.
- Lohrum M. A., Vousden, K. H. (1999): Regulation and activation of p53 and its family members. *Cell Death Differ.* **6**, 1162-1168.
- Lu W. J., Lee N. P., Kaul S. C., Lan F., Poon R. T., Wadhwa R., Luk J. M. (2011): Mortalin-p53 interaction in cancer cells is stress dependent and constitutes a selective target for cancer therapy. *Cell Death Differ.* **18**, 1046-1056.
- Lundberg A. S., Weinberg R. A. (1998): Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-Cdk complexes. *Mol. Cell Biol.* **18**, 753-761.
- Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., Wang X. (1998): Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome *c* release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**, 481-490.
- Luthi A. U., Martin S. J. (2007): The CASBAH: A searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ.* **14**, 641-650.
- Macaluso M., Montanari M., Giordano A. (2005): The regulation of ER-alpha transcription by pRb2/p130 in breast cancer. *Ann. Oncol.* **16**, 20-22.
- Mahato S. B., Ganguly A. N., Sahu N. P. (1982) Steroid saponins. *Phytochemistry* **21**, 959-978.
- Maiuri M. C., Zalckvar E., Kimchi A., Kroemer G. (2007): Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 741-752.
- Maj J., Morzycki J. W., Rárová L., Oklest'ková J., Strnad M., Wojtkielewicz A. (2011): Synthesis and biological activity of 22-deoxy-23-oxa analogues of saponin OSW-1. *J. Med. Chem.* **54**, 3298-3305.
- Mar V. J., Wong S. Q., Li J., Scolyer R. A., McLean C., Papenfuss A. T., Tothill R. W., Kakavand H., Mann G. J., Thompson J. F., Behren A., Cebon J. S., Wolfe R., Kelly J. W., Dobrovic A., McArthur G. A. (2013): BRAF/NRAS wild-type melanomas have a high mutation load correlating with histologic and molecular signatures of UV damage. *Clin. Cancer Res.* **19**, 4589-4598.
- Margolin K., Longmate J., Baratta T., Synold T., Christensen S., Weber J., Gajewski T., Quirt I., Doroshow J. H. (2005): CCI-779 in metastatic melanoma: a phase II trial of the California Cancer Consortium. *Cancer* **104**, 1045-1048.
- Marchenko N. D., Zaika A., Moll U. M. (2000): Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria - A potential role in apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.* **275**, 16202-16212.
- Marine J. C., Dyer M. A., Jochemsen A. G. (2007): MDMX: From bench to bedside. *J. Cell Sci.* **120**, 371-378.
- Mathers C. D., Boshi-Pinto C., Lopez A. D., Murray, C. J. L. (2001): Cancer incidence, mortality, and survival by site for 14 regions of the world. In: *Global Programme on evidence for Health Policy Discussion Paper No. 13 (World Health Organization)*, 16.04. 2011, Available from: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/data_sources_methods/en/
- Matsuya Y., Masuda S., Ohsawa N., Adam S., Tschamber T., Eustache J., Kamoshita K., Sukenaga Y., Nemoto H. (2005): Synthesis and Antitumor Activity of the Estrane Analogue of OSW-1. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 803-808.

- Maurya S. K., Devi S., Pandey V. B., Khosa R. L. (1989): Content of betulin and betulinic acid, antitumor agents of *Zizyphus* species. *Fitoterapia* **60**, 468-469.
- McCarthy N. J., Whyte M. K., Gilbert C. S., Evan G. I. (1997): Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *J. Cell Biol.* **136**, 215-227.
- Melzig M. F., Bormann H. (1998): Betulinic acid inhibits aminopeptidase N activity. *Planta Med.* **64**, 655-657.
- Ménissier-de Murcia J., Niedergang C., Trucco C., Ricoul M., Dutrillaux B., Mark M., Oliver F. J., Masson M., Dierich A., LeMeur M. et al. (1997): Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 7303-7307.
- Meyer-Ficca M. L., Meyer R. G., Coyle D. L., Jacobson E. L., Jacobson M. K. (2004): Human poly(ADP-ribose) glycohydrolase is expressed in alternative splice variants yielding isoforms that localize to different cell compartments. *Exp. Cell Res.* **297**, 521-532.
- Micali G., Lacarrubba F., Nasca M. R., Ferraro S., Schwartz R. A. (2014): Topical pharmacotherapy for skin cancer: part II. Clinical applications. *J. Am. Acad. Dermatol.* **70**, 979-990.
- Middleton M. R., Grob J. J., Aaronson N., Fierlbeck G., Tilgen W., Seiter S., Gore M., Aamdal S., Cebon J., Coates A., Dreno B., Henz M., Schadendorf D., Kapp A., Weiss J., Fraass U., Statkevich P., Muller M., Thatcher N. (2000): Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J. Clin. Oncol.* **18**, 158-166.
- Michels J., O'Neill J. W., Dallman C. L., Mouzakiti A., Habens F., Brimmell M., Zhang K. Y., Craig R. W., Marcusson E. G., Johnson P. W., Packham G. (2004): Mcl-1 is required for Akata6 B-lymphoma cell survival and is converted to a cell death molecule by efficient caspase-mediated cleavage. *Oncogene* **23**, 4818-4827.
- Miller A. J., Mihm M. C. (2006): Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **355**, 51-65.
- Miller R. L., Steis R. G., Clark J. W., Smith J. W. 2nd, Crum E., McKnight J. E., Hawkins M. J., Jones M. J., Longo D. L., Urba W. J. (1989): Randomized trial of recombinant alpha 2b-interferon with or without indomethacin in patients with metastatic malignant melanoma. *Cancer Res.* **49**, 1871-1876.
- Mimaki, Y., Kuroda M., Kameyama A., Sashida Y., Hirano T., Oka K., Maekawa R., Wada T., Suita K., Beutler J. A. (1997): Cholestane glycosides with potent cytostatic activities on various tumor cells from *Ornithogalum saundersiae* bulbs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7**, 633-636.
- Minocha, P. K., Tiwari, K. P. (1981): A triterpenoidal saponin from roots of *Acanthus ilicifolius*. *Phytochemistry* **20**, 135-137.
- Molinari M. (2000): Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Prolif.* **33**, 261-274.
- Momand J., Zambetti G. P., Olson D. C., George D., Levine A. J. (1992): The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell.* **69**, 1237-1245.
- Mutai C., Abatis D., Vagias C., Moreau D., Roussakis C., Roussis V. (2004): Cytotoxic lupane-type triterpenoids from *Acacia mellifera*. *Phytochemistry* **65**, 1159-1164.
- Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., Xu J., Yankner B. A., Yuan J. (2000): Caspase-12 mediates endoplasmicreticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* **403**, 98-103.
- Nakamura T., Komori C., Lee Y. Y., Hashimoto F., Yahara S., Nohara T., Ejima A. (1996): Cytotoxic activities of *Solanum* steroidal glycosides. *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 564-566.
- Neri B., Vannozzi L., Fulignati C., Pantaleo P., Pantalone D., Paoletti C., Perfetto F., Turrini M., Mazzanti R. (2006): Long-term survival in metastatic melanoma patients treated with sequential biochemotherapy: report of a Phase II study. *Cancer Invest.* **24**, 474-478.
- Newman D. J., Cragg G. M., Snader K. M. (2003): Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* **66**, 1022-1037.

- Nicholson D. W., Ali A., Thornberry N. A., Vaillancourt J. P., Ding C. K., Gallant M., Gareau Y., Griffin P. R., Labelle M., Lazebnik Y. A., et al. (1995): Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **376**, 37-43.
- Nijhawan D., Fang M., Traer E., Zhong Q., Gao W., Du F., Wang X. (2003): Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev.* **17**, 1475-1486.
- Nikolaev A. Y., Li M., Puskas N., Qin J., Gu W. (2003): Parc: A cytoplasmic anchor for p53. *Cell.* **112**, 29-40.
- Noda Y., Kaiya T., Kohda K., Kawazoe Y. (1997): Enhanced cytotoxicity of some triterpenes toward leukemia L1210 cells cultured in low pH media: possibility of a new mode of cell killing. *Chem. Pharm. Bull.* **45**, 1665-1670.
- Ohara S., Ohira T. J. (2003): Plant growth regulation effects of triterpenoid saponins. *J. Wood Sci.* **49**, 59-64.
- Oliner J. D., Pietenpol J. A., Thiagalingam S., Gyuris J., Kinzler K. W., Vogelstein B. (1993): Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* **362**, 857-860.
- Oliveira M., Carvalho M., Silva C., Werle A. A. (2002): New Biflavonoid and Other Constituents from *Luxemburgia nobilis* (EICHL). *J. Braz. Chem. Soc.*, **13**, 119-123.
- Olivier M., Hollstein M., Hainaut, P. (2010): TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a001008.
- Oltvai Z. N., Milliman C. L., Korsmeyer S. J. (1993): Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609-619.
- Opferman J. T., Letai A., Beard C., Sorcinelli M. D., Ong C. C., Korsmeyer S. J. (2003): Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* **426**, 671-676.
- Ott M., Robertson J. D., Gogvadze V., Zhivotovsky B., Orrenius S. (2002): Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 1259-1263.
- Pakulski Z. A. (2005): Regioselective glycosylation of unprotected mannosides: A convenient access to high-mannose type saponins. *Pol. J. Chem.* **79**, 361-367.
- Pakulski Z. A., Cmoch P., Oklešťková J., Strnad, M. (2009): Saccharide lupane derivatives, their use and pharmaceuticals compositions containing these derivatives. PCT/CZ2009/000007, filing date 2009-01-28.
- Palmer J. S., Duffy D. L., Box N. F., Aitken J. F., O’Gorman L. E., Green A. C., Hayward N. K., Martin N. G., Sturm R. A. (2000): Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? *Am. J. Hum. Genet.* **66**, 176-186.
- Pardee A. B. (1989): G1 events and regulation of cell proliferation. *Science.* **246**, 603-608.
- Park S. R., Kwak H. H., Park B. S., Kim G. Ch. (2012): Preferential Cytotoxic Effect of Genistein on G361 Melanoma Cells Via Inhibition of the Expression of Focal Adhesion Kinase. *Int. J. Oral Biology* **37**, 189-195.
- Parrish A. B., Freel C. D., Kornbluth S. (2013): Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **5**, pii: a008672.
- Pastorino J. G., Chen S. T., Tafani M., Snyder J. W., Farber J. L. (1998): The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* **273**, 7770-7775.
- Pathak A., Singh S. K., Biabani M. A. F., Kulshreshtha D. K., Puri S. K., Srivastava S., Kundu B. (2002): Synthesis of combinatorial libraries based on terpenoid scaffolds. *Combin. Chem. High Throughput Screen.* **5**, 241-248.
- Perry M. E., Piette J., Zawadzki J. A., Harvey D., Levine A. J. (1993): The *mdm-2* gene is induced in response to UV light in a p53-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 11623-11627.
- Peterson A. C., Swiger S., Stadler W. M., Medved M., Karczmar G., Gajewski T. F. (2004): Phase II study of the Flk-1 tyrosine kinase inhibitor SU5416 in advanced melanoma. *Clin. Cancer Res.* **10**, 4048-4054.

- Petitjean A., Mathe E., Kato S., Ishioka C., Tavtigian S. V., Hainaut P., Olivier M. (2007): Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: Lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum. Mutat.* **28**: 622-629.
- Petros A. M., Medek A., Nettesheim D. G., Kim D. H., Yoon H. S., Swift K., Matayoshi E. D., Oltersdorf T., Fesik S. W. (2001): Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 3012-3017.
- Pirard P., de Vries E. (2007): Incidence of melanoma in people aged under 55 years. In: *European Environment and Health Information System*, 16. 04. 2011, Available from: <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/data-and-evidence/environment-and-health-information-system-enhis/publications/pre-2009/enhis-fact-sheets-2007/incidence-of-melanoma-in-people-aged-under-55-years-enhis-2007-fact-sheet-4.2>
- Pisha E., Chai H., Lee I. S., Chagwedera T. E., Farnsworth N. R., Cordell G. A., Beecher C. W., Fong H. H., A., Kinghorn A. D., Brown D. M. (1995): Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat. Med.* **1**, 1046-1051.
- Proskuryakov S. Y., Konoplyannikov A. G., Gabai V. L. (2003): Necrosis: a specific form of programmed cell death?. *Exp. Cell Res.* **283**, 1-16.
- Quagliana J. M., Stephens R. L., Baker L. H., Costanzi J. J. (1984): Vindesine in patients with metastatic malignant melanoma: a Southwest Oncology Group study. *J. Clin. Oncol.* **2**, 316-319.
- Raghuvar Gopal D. V., Narkar A. A., Badrinath Y., Mishra K. P., Joshi D. S. (2005): Betulinic acid induces apoptosis in human chronic myelogenous leukemia (CML) cell line K-562 without altering the levels of Bcr-Abl. *Toxicol. Lett.* **155**, 343-351.
- Rai N. K., Tripathi K., Sharma D., Shukla V. K. (2005): Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int. J. Low Extrem. Wounds* **4**, 138-144.
- Rashmi R., Pillai S. G., Vijayalingam S., Ryerse J., Chinnadurai G. (2008): BH3-only protein BIK induces caspase-independent cell death with autophagic features in Bcl-2 null cells. *Oncogene* **27**, 1366-1375.
- Reed J. C. (1995b): Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Curr. Opin. Oncol.* **7**, 541-546.
- Reed J. C. (1995a): BCL-2: prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* **9**, 451-470.
- Reed J. C., Miyashita T., Takayama S., Wang H. G., Sato T., Krajewski S., Aimé-Sempé C., Bodrug S., Kitada S., Hanada M. (1996): BCL-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *J. Cell. Biochem.* **60**, 23-32.
- Reed J. C. (1998): Bcl-2 family proteins. *Oncogene* **17**, 3225-3236.
- Regenbrecht C. R., Jung M., Lehrach H., Adjaye J. (2008): The molecular basis of genistein-induced mitotic arrest and exit of self-renewal in embryonal carcinoma and primary cancer cell lines. *BMC Med Genomics* **10**, 1-49.
- Ridolfi R., Chiarion-Sileni V., Guida M., Romanini A., Labianca R., Freschi A., Lo Re G., Nortilli R., Brugnara S., Vitali P., Nanni O. (2002): Cisplatin, dacarbazine with or without subcutaneous interleukin-2, and interferon alpha-2b in advanced melanoma outpatients: results from an Italian multicenter phase III randomized clinical trial. *J. Clin. Oncol.* **20**, 1600-1607.
- Riedl S. J., Li W., Chao Y., Schwarzenbacher R., Shi Y. (2005): Structure of the apoptotic protease-activating factor 1 bound to ADP. *Nature* **434**, 926-933.
- Rigel D. S. (1997): Malignant melanoma: incidence issues and their effect on diagnosis and treatment in the 1990s. *Mayo Clin. Proc.* **72**, 367-371.
- Rikiishi H. (2012): Novel insights into the interplay between apoptosis and autophagy. *Int. J. Cell Biol.* **2012**, 317645.
- Riley T., Sontag E., Chen P., Levine A. (2008): Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 402-412.
- Rinkenberger J. L., Horning S., Klocke B., Roth K., Korsmeyer S. J. (2000): Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes Dev.* **14**, 23-27.

- Roberts J. M., Koff A., Polyak K., Firpo E., Collins S., Ohtsubo M., Massague J. (1994): Cyclins, Cdks, and cyclin kinase inhibitors. *Cold Spring Aarbor Symp. Quant. Biol.* **59**, 31-38.
- Robinson W. A., Mughal T. I., Thomas M. R., Johnson M., Spiegel R. J. (1986): Treatment of metastatic malignant melanoma with recombinant interferon alpha 2. *Immunobiology* **172**, 275-282.
- Růžička L. (1959): History of the isoprene rule: Faraday lecture. *Proc. Chem. Soc.* **1959**, 341-360.
- Růžička L. (1963): Perspectives of the biogenesis and chemistry of terpenes. *Pure Appl. Chem.* **6**, 493-522.
- Růžička L., Eschenmoser A., Heusser H. (1953): The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia* **9**, 357-367.
- Saelens X., Festjens N., Vande Walle L., van Gurp M., van Loo G., Vandenabeele P. (2004): Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* **23**, 2861-2874.
- Sakahira H., Enari M., Nagata S. (1998): Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**, 96-99.
- Saleem M., Alam A., Arifin S., Shah M. S., Ahmed B., Sultana S. (2001): Lupeol, a triterpene, inhibits early responses of tumor promotion induced by benzoyl peroxide in murine skin. *Pharmacol. Res.* **43**, 127-134.
- Sallusto F., Cella M., Danieli C., Lanzavecchia A. (1995): Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* **182**, 389-400.
- Salvador J. A. R. (2010): Pentacyclic Triterpenes as Promising Agents in Cancer, Nova Science Publishers, Inc., ISBN 978-1-61122-835-9, Hauppauge NY.
- Searle J., Lawson T. A., Abbott P. J., Harmon B., Kerr J. F. R. (1975): An electron-microscope study of the mode of cell death induced by cancer-chemotherapeutic agents in populations of proliferating normal and neoplastic cells. *J. Pathol.* **116**, 129-138.
- Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A., Friesen C., Li F., Tomaselli K. J., Debatin K. M., Kramer P. H., Peter M. E. (1998): Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* **17**, 1675-1687.
- Shall S., de Murcia G. (2000): Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat. Res.* **460**, 1-15.
- Sherr C. J., Roberts J. M. (1995): Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* **9**, 1149-1163.
- Shi B., Tang P., Hu X., Yu B. (2005): OSW saponins: facile synthesis toward a new type of structures with potent antitumor activities. *J. Org. Chem.* **70**, 10354-10367.
- Shoeb M. (2006): Anticancer agents from medicinal plants. *Bangl. J. Pharmacol.* **1**, 35-41.
- Schmidt M. L., Kuzmanoff K. L., Ling-Indeck L., Pezzuto J. M. (1997): Betulinic acid induces apoptosis in human neuroblastoma cell lines. *Eur. J. Cancer* **33**, 2007-2010.
- Schreiber V., Dantzer F., Ame J. C., de Murcia G. (2006): Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 517-528.
- Schweichel J. U., Merker H. J. (1973): The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology.* **7**, 253-266.
- Sidoryk K., Korda A., Rárová L., Oklešťková J., Strnad M., Cmoch P., Pakulski Z., Gwardiaka K., Karczewskia R., Luboradzki R. (2015): Synthesis and biological activity of new homolupanes and homolupane saponins. *Tetrahedron* **71**(13), 2004-2012.
- Simonsen J., Ross W. C. J. (1957): In: *The Terpenes: Vol. IV - the Triterpenes and Their Derivatives Hydrocarbons, Alcohols, Hydroxy - Aldehydes, Ketones and Hydroxy - Carbones*. Cambridge Univ. Press, London, 1-524.
- Slee E. A., Adrain C., Martin S. J. (1999a): Serial killers: Ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ.* **6**, 1067-1074.
- Slee E. A., Harte M. T., Kluck R. M., Wolf B. B., Casiano C. A., Newmeyer D. D., Wang H. G., Reed J. C., Nicholson D. W., Alnemri E. S., Green D. R., Martin S. J. (1999b): Ordering

- the cytochrome *c*-initiated caspase cascade: Hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell Biol.* **144**, 281-292.
- Smith E. J., Leone G., DeGregori J., Jakoi L., Nevins J. R. (1996): The accumulation of an E2F-p130 transcriptional repressor distinguishes a G0 cell state from a G1 cell state. *Mol. Cell Biol.* **16**, 6965-6976.
- Snowden R. T., Sun X. M., Dyer M. J., Cohen G. M. (2003): Bisindolylmaleimide IX is a potent inducer of apoptosis in chronic lymphocytic leukaemic cells and activates cleavage of Mcl-1. *Leukemia* **17**, 1981-1989.
- Soengas M. S., Lowe S. W. (2003): Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* **22**, 3138-3152.
- Spinozzi F., Pagliacci M. C., Migliorati G., Moraca R., Grignani F., Riccardi C., Nicoletti I. (1994): The natural tyrosine kinase inhibitor genistein produces cell cycle arrest and apoptosis in Jurkat T-leukemia cells. *Leuk Res.* **18**, 431-439.
- Srinivasula S. M., Ahmad M., Fernandes-Alnemri T., Alnemri E. S. (1998): Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol. Cell* **1**, 949-957.
- Steele R. J. C., Lane D. P. (2005): p53 in cancer: a paradigm for modern management of cancer. *The Surgeon* **3**, 197-205.
- Strasser A., Harris A. W., Cory S. (1991): *bcl-2* transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell* **67**, 889-899.
- Strasser A., Huang D. C., Vaux D. L. (1997): The role of the *bcl-2/ced-9* gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumourigenesis and resistance to chemotherapy. *Biochim. Biophys. Acta* **1333**, 151-178.
- Stubbs M., McSheehy P. M., Griffiths J. R., Bashford C. L. (2000): Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Mol. Med. Today* **6**, 15-19.
- Syrovets T., Buchele B., Gedig E., Slupsky J. R., Simmet T. (2000): Acetyl-boswellic acids are novel catalytic inhibitors of human topoisomerase I and IIa. *Mol. Pharm.* **58**, 71-81.
- Šarek J., Kvasnica M., Urban M., Klinot J., Hajdúch M. (2005): Correlation of Cytotoxic Activity of Betulinines and their Hydroxy Analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 4196-4200.
- Šarek J., Kvasnica M., Vlk M., Biedermann D. (2010): Semisynthetic Lupane Triterpenes with Cytotoxic Activity. In: *Pentacyclic Triterpenes as Promising Agents in Cancer*. Nova Publishers, New York, U.S.A., 159-189.
- Šarek J., Kvasnica M., Vlk M., Urban M., Džubák P., Hajdúch M. (2011): The Potential of Triterpenoids in the Treatment of Melanoma. In: *Research on Melanoma: A Glimpse into Current Directions and Future Trends*. 1.vyd. (Murph M.), INTECH Open Access Publisher, Rijeka, Chorvatsko, 125-158.
- Šarek J., Spačilová P., Hajdúch M. (2009): Triterpenoid 2-deoxy glycosides, method of preparation thereof and use thereof as medicaments. PCT/CZ2009/000132, 2009-11-06.
- Šarek J., Klinot J., Džubák P., Klinotová E., Nosková V., Krecek V., Korínková G., Thomson J. O., Janost'áková A., Wang S., Parsons S., Fischer P. M., Zhelev N. Z., Hajdúch M. (2003): New lupane derived compounds with pro-apoptotic activity in cancer cells: synthesis and structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* **46**, 5402-5415.
- Tanaka H., Nishida Y., Kobayashi K. (2000): A facile synthesis of a glycoconjugate cationic polymer carrying the 3,6-branched- α -D-mannosyl trisaccharide cluster. *J. Carbohydr. Chem.* **19**, 413-418.
- Tang D. G., Porter, A. T. (1997): Target to apoptosis: a hopeful weapon for prostate cancer. *Prostate* **32**, 284-293.
- Tanimura S., Ohtsuka S., Mitsui K., Shirouzu K., Yoshimura A., Ohtsubo M. (1999): MDM2 interacts with MDMX through their RING finger domains. *FEBS Lett.* **447**, 5-9.
- Tasdemir E., Maiuri M. Ch., Galluzzi L., Vitale I., Djavaheri-Mergny M., D'Amelio M., Criollo A., Morselli E., Zhu Ch., Harper F., Nannmark U., Samara Ch., Pinton P., Vincencio J. M., Carnuccio R., Moll U. M., Madeo F., Paterlini-Brechot P., Rizzuto R., Szadabkai G., Pierron G., Blomgren K., Tavernarakis N., Codogno P., Cecconi F., Kroemer G. (2008): Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat. Cell Biol.* **10**, 676-687.

- Tewari M., Quan L., O'Rourke K., Desnoyers S., Zeng Z., Beidler D.R., Poirier G.G., Salvesen G.S., Dixit V.M. (1995): Yama/ CPP32b, a mammalian homolog of ced-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* **81**, 801-809.
- Thomson D., Gonzalez R., Millward M., Price T., Haydon A., Robinson W., Powel A., Roberts K., Creese B. (2005): A phase II trial of PI-88, a novel antiangiogenic and antimetastatic heparanase inhibitor, in patients with melanoma. *J. Clin. Oncol.* **23** (16S), 7559.
- Thornberry N. A., Lazebnik Y. (1998): Caspases: Enemies within. *Science* **281**, 1312-1316.
- Thornberry N. A., Bull H. G., Calaycay J. R., Chapman K. T., Howard A. D., Kostura M. J., Miller D. K., Molineaux S. M., Weidner J. R., Aunins J., et al. (1992): A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature* **356**, 768-774.
- Trauth B. C., Klas C., Peters A. M., Matzku S., Moller P., Falk W., Debatin K. M., Krammer P. H. (1989): Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* **245**, 301-305.
- Tron V. A., Krajewski S., Klein-Parker H., Li G., Ho V. C., Reed J. C. (1995): Immunohistochemical analysis of Bcl-2 protein regulation in cutaneous melanoma. *Am. J. Pathol.* **146**, 643-650.
- Trucco C., Oliver F. J., de Murcia G., Menissier-de Murcia, J. (1998): DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines. *Nucleic Acids Res.* **26**, 2644-2649.
- Tsao H., Atkins M. B., Sober A. J. (2004): Management of cutaneous melanoma. *N. Engl. J. Med.* **351**, 998-1012.
- Tsujimoto Y., Gorham J., Cossman J., Jaffe E., Croce C. M. (1985): The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* **229**, 1390-1393.
- Tsujimoto Y., Croce C. M. (1986): Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 5214-5218.
- Tucker M. A., Goldstein A. M. (2003): Melanoma etiology: where are we? *Oncogene* **22**, 3042-3052.
- Urban M., Vlk M., Džubák P., Hajdúch M., Šárek J. (2012): Cytotoxic heterocyclic triterpenoids derived from betulin and betulinic acid. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 3666-3674.
- Valente L. J., Gray D. H., Michalak E. M., Pinon-Hofbauer J., Egle A., Scott C. L., Janic A., Strasser A. (2013): p53 efficiently suppresses tumor development in the complete absence of its cell-cycle inhibitory and proapoptotic effectors p21, Puma, and Noxa. *Cell Rep.* **3**, 1339-1345.
- Valverde P., Healy E., Jackson I., Rees J. L., Thody A. J. (1995): Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat. Genet.* **11**, 328-330.
- Van den Heuvel S., Dyson N. J. (2008): Conserved functions of the pRb and E2F families. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 713-724.
- Varker K. A., Biber J. E., Kefauver C., Jensen R., Lehman A., Young D., Wu H., Lesinski G. B., Kendra K., Chen H. X., Walker M. J., Carson W. E. 3rd. (2007): A randomized phase 2 trial of bevacizumab with or without daily low-dose interferon alfa-2b in metastatic malignant melanoma. *Ann. Surg. Oncol.* **14**, 2367-2376.
- Vaux D. L., Cory S., Adams J. M. (1988): Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**, 440-442.
- Vodenicharov M. D., Sallmann F. R., Satoh M. S., Poirier G. G. (2000): Base excision repair is efficient in cells lacking poly(ADP-ribose) polymerase 1. *Nucleic Acids Res.* **28**, 3887-3896.
- Vogelstein, B., Lane, D., Levine, A.J. (2000): Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307-310.
- Voss O. H., Kim S., Wewers M. D., Doseff A. I. (2005): Regulation of monocyte apoptosis by the protein kinase C δ -dependent phosphorylation of caspase-3. *J. Biol. Chem.* **280**, 17371-17379.

- Wade M., Wang Y. V., Wahl G. M. (2010): The p53 orchestra: Mdm2 and Mdmx set the tone. *Trends Cell Biol.* **20**, 299-309.
- Wagner S., Pasenkov M., Goess G., Wagner C., Schneeberger A., Krieg A. M., Stingl G. (2004): TLR9-targeted CPG immunostimulatory treatment of metastatic melanoma: a phase II trial with CPG 7909 (ProMune). *J. Clin. Oncol.* **22** (14S), 7513.
- Weber J., Hersh E. M., Yellin M., Nichol G. M., Urba W., Powderly J. D., O'Day S. J. (2007): The efficacy and safety of ipilimumab (MDX-010) in patients with unresectable stage III or stage IV malignant melanoma. *J. Clin. Oncol.* **25** (18S), 8523.
- Weinberg R. A. (1995): The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-330.
- Weller M. (1997): Genetic regulation and therapeutic modulation of apoptosis in human malignant glioma. *Cell. Physiol. Biochem.* **6**, 376-380.
- Wiernik P. H., Einzig A. I. (1993): Taxol in malignant melanoma. *J. Natl. Cancer. Inst. Monogr.* **15**, 185-187.
- Wilhelm S. M., Carter C., Tang L., Wilkie D., McNabola A., Rong H., Chen C., Zhang X., Vincent P., McHugh M., Cao Y., Shujath J., Gawlak S., Eveleigh D., Rowley B., Liu L., Adnane L., Lynch M., Auclair D., Taylor I., Gedrich R., Voznesensky A., Riedl B., Post L. E., Bollag G., Trail P. A. (2004): BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.* **64**, 7099-7109.
- Wyllie A. H., Kerr J. F., Currie A. R. (1980): Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**: 251-306.
- Xiang J., Chao D. T., Korsmeyer S. J. (1996): BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 14559-14563.
- Xu R., Fazio G. C., Matsuda S. P. (2004): On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry* **65**, 261-291.
- Yamashita K., Lu H., Lu J., Chen G., Yokoyama T., Sagara Y., Manabe M., Kodama H. (2002): Effect of three triterpenoids, lupeol, betulin, and betulinic acid on the stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation of proteins in human neutrophils. *Clin. Chim. Acta* **325**, 91-96.
- Yang E., Zha J., Jockel J., Boise L. H., Thompson C. B., Korsmeyer S. J. (1995): Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell.* **80**, 285-91.
- Yang E., Korsmeyer S. J. (1996): Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* **88**, 386-401.
- Yang T., Kozopas K. M, Craig R. W. (1995): The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *J. Cell Biol.* **128**, 1173-1184.
- Yasukawa K., Takido M., Matsumoto T., Takeuchi M., Nakagawa S. (1991): Sterol and triterpene derivatives from plants inhibit the effects of a tumor promoter, and sitosterol and betulinic acid inhibit tumor formation in mouse skin two-stage carcinogenesis. *Oncology* **48**, 72-76.
- Yee A. S., Reichel R., Kovesdi I., Nevins J. R. (1987): Promoter interaction of the E1A-inducible factor E2F and its potential role in the formation of a multi-component complex. *EMBO J.* **6**, 2061-2068.
- Yee K. S., Vousden K. H. (2005): Complicating the complexity of p53. *Carcinogenesis* **26**, 1317-1322.
- Yelamos J., Schreiber V., Dantzer F. (2008): Toward specific functions of poly(ADP-ribose) polymerase-2. *Trends Mol. Med.* **14**, 169-178.
- You Y., Nam N., Kim Y., Bae K. H., Ahn B. Z. (2003): Antiangiogenic activity of Lupeol from *Bombax ceiba*. *Phytother. Res.* **17**, 341-344.
- Zhang H., Reed J. C. (2001): Studies of apoptosis proteins in yeast. *Methods Cell Biol.* **66**, 453-468.
- Zhao L. Y., Liao D. (2003): Sequestration of p53 in the cytoplasm by adenovirus type 12 E1B 55-kilodalton oncoprotein is required for inhibition of p53-mediated apoptosis. *J. Virol.* **77**, 13171-13181.

- Zhou Y., Gracia-Prieto C., Carney D. A., Xu R., Pelicano H., Kang Y., Yu W., Lou C., Kondo S., Liu J., Harris D. M., Estrov Z., Keating M. J., Jin Z., Huang P. (2005): OSW-1: a natural compound with potent anticancer activity and a novel mechanism of action. *J. Natl. Cancer Inst.* **97**, 1781-1785.
- Zhu J., Xiong L., Wu J. (2005): Apoptosis induced by a new member of saponin family is mediated through caspase-8-dependent cleavage of Bcl-2. *Mol. Pharmacol.* **68**, 1831-1838.
- Zilfou J. T., Lowe S. W. (2009): Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, a001883.
- Zou H., Henzel W. J., Liu X., Lutschg A., Wang X. (1997): Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* **90**, 405-413.
- Zuco V., Supino R., Righetti S. C., Cleris K., Marchesi E., Gambacorti-Passerini C., Formelli F. (2002): Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not normal cells. *Cancer Lett.* **175**, 17-25.
- Internetový zdroj: Betulinines (RNDr. Jan Šarek, Ph.D.): <http://www.betulinines.cz/index.php?page=triterpeny> (15.4. 2015).
- Internetový zdroj: Gen BRAF: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/673> (23.4. 2015)
- Internetový zdroj: Gen RAF: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5894> (23.4. 2015)

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ac-DEVD-AMC	Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylkumarin
Ac-DEVD-CHO	Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyd
AIF	Apoptosu indukující faktor
AK	Aktinická keratosa, z angl. Actinic keratosis
AKT	Proteinkinasa B
Apaf-1	Faktor aktivující apoptotické proteasy-1
ARF	ADP ribosylační faktor, z angl. ADP ribosylation factor
ARH3	Poly(ADP-ribosa)hydrolysa-3
Bak	z angl. Bcl-2 antagonist/killer
Bax	X protein asociovaný s Bcl-2, z angl. Bcl-2-associated X protein
BCC	Bazocelulární karcinom, z angl. Basal cell carcinoma
Bcl-2	B-buňky CLL/lymfom 2, z angl. B-cell CLL/lymphoma 2
Bcl-X _L	z angl. B-cell lymphoma-extra large
BD	Bowenova choroba, z angl. Bowen disease
Bid	z angl. BH3-interacting domain death agonist
BPO	Benzoylperoxid
BSA	Hovězí sérový albumin, z angl. Bovine serum albumin
CD95	Klastr diferenciacie 95, z angl. Cluster of differentiation 95
CDK	Cyklin-dependentní kinasy, z angl. Cyclin-dependent kinase
Cip/Kip	z angl. CDK interacting protein/kinase inhibitory protein
DD	Doména smrti, z angl. Death domain
DED	Efaktorová doména smrti, z angl. Death effector domain
DIABLO	z angl. Direct inhibitor of apoptosis protein
DISC	Signální komplex indikující buněčnou smrt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DR	Receptor smrti, z angl. Death receptor
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
EGTA	Kyselina ethylenglykoltetraoctová
EPD	Extramamární Pagetova choroba (disease)
EQ	tzv. Erythroplasia of Queyrat
ERK	Extracelulárně regulovaná kinasa
FADD	Fas asociovaná doména smrti (death)
FAK	Fokální adhezivní kinasa, z angl. Focal adhesion kinase

FasL	Fas ligand
GM-CSF	Faktor stimulujiící kolonie granulocytů a makrofágů
Gp 100	Glykoprotein 100
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
Hsp90	Heat shock protein 90
CHAPS	[3-((3-cholamidopropyl)-dimethylammonio)-1-propansulfonát]
IC ₅₀	50% inhibiční koncentrace, z angl. 50% inhibitory concentration
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LM	tzv. Lentigo maligna
MAPK	Mitogenem aktivované proteinkinasy
Mcl-1	Myeloidní bněčná leukémie 1, z angl. Myeloid-cell leukemia 1
Mdm-2	z angl. Murine double minute 2
MEK	z angl. Mitogen-activated protein kinase kinase
MM	Metastazující melanom
p53AIP1	z angl. p53-regulated apoptosis-inducing protein 1
PARG	Poly(ADP-ribose)glykohydrolasa
PARP	Poly(ADP-ribose)polymerasa
PBS	Phosphate buffered saline
PERP	z angl. p53 apoptosis effector related to PMP-22
PI3K	Fosfatidylinositol-3-kinasa, z angl. Phosphatidylinositide-3-kinase
PIG3	z angl. p53 inducible gene 3
PIPES	Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)
PKCδ	Proteinkinasa Cδ
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PTEN	z angl. Phosphatase and tensin homolog
Rb	Retinoblastoma protein
RIPA	Radioimmunoprecipitation buffer
SC	tzv. Solar cheilosis
SCC	Spinocelulární karcinom, z angl. Squamous cell carcinoma
Smac	z angl. Second mitochondria-derived activator of caspases
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiammin
TNF	Tumor nekrotizující faktor
TP53	Tumor protein p53
TRAIL	z angl. TNF-related apoptosis inducing ligand
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan