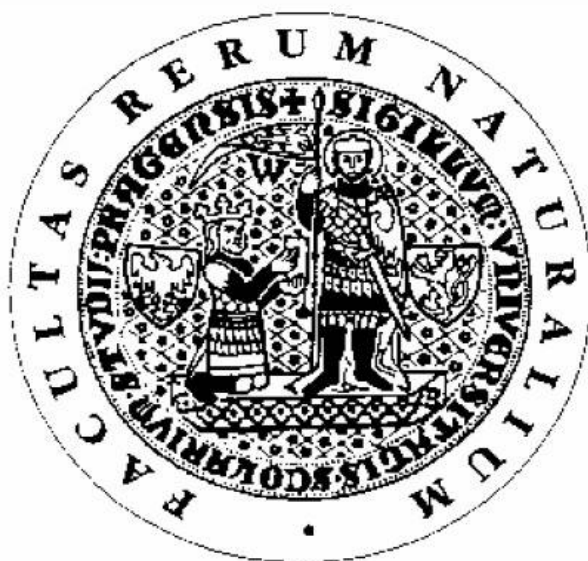


KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra Biochemie



**Vliv acyklických nukleosidfosfonátů PMEG a PMEDAP
na p38-kinasovou signalizaci
v lidských leukemických buňkách**

Diplomová práce

Biochemie

Michaela Nejedlá

Školitel: PharmDr. Helena Mertlíková-Kaiserová, PhD.

Praha 2010

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Heleny Mertlíkové-Kaiserové a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne

Podpis:

ABSTRACT

PMEG [9-(2-phosphonomethoxyethyl)guanine] and PMEDAP [9-phosphonomethoxyethyl)-2,6-diaminopurine] are acyclic nucleoside phosphonates possessing cytotoxic properties. Antiproliferative effect of PMEG was demonstrated in various tumor cell lines *in vitro*. PMEG also represents an active component of some experimental prodrugs with enhanced selectivity and efficacy (such as GS-9219). PMEDAP seems to have weaker effect *in vitro* compared to PMEG, however it exhibited pronounced antitumor effect in SD-rats with spontaneous lymphoma. Therefore it was included in the present study as well. The aim of this study was to describe the interactions of PMEG and PMEDAP with p38 MAP kinase signaling and its relationship to the apoptosis. We investigated the influence of these compounds on the expression of four genes encoding p38 MAPK isoforms and whether this change is translated into the protein. It was found that PMEG up-regulates p38 β and γ mRNA in CCRF-CEM cells and p38 β and δ in HL-60 cells. The effect of PMEDAP was less pronounced than that of PMEG. However, total p38 protein level remained unaffected by PMEG and PMEDAP. Activation of p38 MAPK cascade was also measured in the cells exposed to these agents using phospho-specific antibodies. We found that neither PMEG nor PMEDAP activated p38 kinase signaling pathway and the effect was independent of the cell line used. Next we evaluated apoptotic effects of PMEG and PMEDAP by monitoring PARP and caspase 3 cleavage. Apoptosis induction by the compounds was found to be concentration-dependent. The apoptotic effect was stronger in the case of PMEG, which is consistent with its higher antiproliferative potency. Finally, cells were pretreated with specific inhibitor of p38 MAPK SB203580 prior to PMEG or PMEDAP treatments and the effect of the inhibitor on apoptosis was followed. It turned out that inhibition of p38 MAPK pathway cannot completely reverse PMEG/PMEDAP-induced apoptosis but it is able to reduce its extent. These findings suggest that p38 kinase might play a role in the apoptotic effects of PMEG and PMEDAP. (In Czech)

Keywords: acyclic nucleoside phosphonates, MAP kinases, p38 kinase, apoptosis, anticancer therapy

ABSTRAKT

PMEG [9-(2-fosfonometoxyetyl)guanin] a PMEDAP [9-(fosfonometoxyetyl)-2,6-diaminopurin] jsou acyklické nukleosidfosfonáty se zvýrazněným cytotoxickým účinkem. Antiproliferační aktivita látky PMEG byla demonstrována *in vitro* na řadě nádorových buněčných linií. PMEG je také účinnou látkou několika experimentálních proléčiv vynikající se selektivitou a výborným protinádorovým účinkem (např. GS-9219). PMEDAP v *in vitro* experimentech sice nedosahuje účinnosti PMEG, prokázal však silný protinádorový účinek na modelu SD-potkanů se spontánními lymfomy, proto byl rovněž zařazen do této studie. Cílem práce bylo na modelu buněčných linií CCRF-CEM a HL-60 popsat interakce PMEG a PMEDAP s p38-MAP-kinasovou signalizací a její vztah k apoptose. Byl zkoumán vliv těchto látek na expresi genů kódujících čtyři isoformy p38-MAPK a dále zda se tato změna projeví na úrovni proteinu. Bylo zjištěno, že PMEG zvyšuje expresi mRNA pro p38 β , γ v buněčné linii CCRF-CEM a isoformem β , δ v buněčné linii HL-60, efekt PMEDAP je v porovnání s PMEG slabší. Celkové množství proteinu pro p38 však nebylo účinkem PMEG a PMEDAP ovlivněno. Dále byl sledován vliv PMEG a PMEDAP na aktivaci p38-kinasové dráhy pomocí protilátky proti fosforylované formě p38. Bylo zjištěno, že ani jedna z látek kinasovou dráhu neaktivuje. Výsledky se nelišily ani v závislosti na použité buněčné linii. Následně byly hodnoceny apoptotické účinky PMEG a PMEDAP sledováním aktivace PARP a exekutivní kaspasy 3. Indukce apoptosy byla koncentračně závislá a apoptotický účinek PMEG byl silnější než efekt PMEDAP. Poslední částí práce byla koinkubace buněk se specifickým inhibítorem p38-kinasy SB203580 a PMEG nebo PMEDAP a byl sledován vliv inhibítora na rozsah apoptosy. Bylo zjištěno, že apoptosu nelze inhibítorem p38-MAPK zcela zablokovat, ale lze snížit její rozsah. To naznačuje, že apoptosa indukovaná PMEG a PMEDAP by mohla být zčásti spojená s aktivací p38-kinasové dráhy.

Klíčová slova: acyklické nukleosidfosfonáty, MAP-kinasy; p38-kinasa; apoptosa, protinádorová terapie

PODĚKOVÁNÍ

Úvodem bych ráda poděkovala své školitelce PharmDr. Heleně Mertlíkové-Kaiserové, PhD. za odborné vedení, cenné připomínky, trpělivost a pochopení a svému garantovi Prof. RNDr. Gustavu Entlicherovi, CSc. za vstřícné jednání a podporu při realizaci diplomové práce.

Poděkování patří též paní Karolíně Müllerové za pomoc při práci v laboratoři a RNDr. Ivanu Votrubovi, DrSc. za revizi této práce, přínosné připomínky a rady.

V neposlední řadě také děkuji svým rodičům za všestrannou podporu při studiu.

OSNOVA

1.	ÚVOD	7
2.	PŘEHLED O SOUČASNÉM STAVU PROBLEMATIKY	9
2.1.	Acyklické nukleosidfosfonáty (ANP)	9
2.1.1.	Struktura	9
2.1.2.	Metabolismus a biologická aktivita	10
2.1.2.1.	Analogy s protivirovou aktivitou	10
2.1.2.2.	Analogy s protinádorovou aktivitou	11
2.2.	p38-MAP-kinasová signalizace	15
2.2.1.	Isoformy a tkáňová distribuce p38-MAP-kinas	15
2.2.2.	Aktivace a deaktivace p38-MAP-kinasové dráhy	16
2.2.2.1.	Horní sled fosforylačních reakcí	16
2.2.2.2.	Dolní sled fosforylačních reakcí	17
2.2.3.	p38-MAP-kinasy a apoptosa	18
3.	CÍLE PRÁCE	21
4.	MATERIÁL A METODY	22
4.1.	Použité přístroje a pomůcky	22
4.1.1.	Přístroje	22
4.1.2.	Pomůcky	22
4.2.	Metody a chemikálie	23
4.2.1.	Kultivace a pasážování buněčných linií CCRF-CEM a HL-60	23
4.2.2.	Inkubace buněk s látkami (PMEG a PMEDAP)	23
4.2.3.	Stanovení antiproliferační aktivity látek a další zpracování buněk	24
4.2.4.	Izolace RNA	24
4.2.5.	Kontrola kvality RNA	25
4.2.5.1.	Hodnocení integrity RNA	25
4.2.5.2.	Spektrální hodnocení čistoty a koncentrace RNA	26
4.2.6.	Syntéza jednovláknové cDNA	26
4.2.7.	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (real time PCR)	27
4.2.8.	SDS-PAGE proteinů a immunoblotting	28
4.2.8.1.	Příprava vzorku (lýza buněk)	29
4.2.8.2.	Stanovení proteinu metodou BCA	29

4.2.8.3.	SDS-PAGE	30
4.2.8.4.	Diskontinuální semi-dry blotting	32
4.2.8.5.	Blokování membrány a inkubace s protilátkami	33
4.2.8.6.	Chemiluminiscenční (ECL) detekce	34
4.2.8.7.	Odstranění protilátek z membrány	35
4.2.9.	Statistické zpracování výsledků	35
5.	VÝSLEDKY	36
5.1.	Stanovení antiproliferačních účinků PMEG a PMEDAP v buněčných liniích CCRF-CEM a HL-60	36
5.2.	Vliv PMEG a PMEDAP na genovou expresi isoform p38-kinasy v buněčných liniích CCRF-CEM a HL-60	37
5.3.	Vliv PMEG a PMEDAP na expresi celkové a fosforylované p38-kinasy v buněčných liniích CCRF-CEM a HL-60 na úrovni proteinu	40
5.4.	Apoptotické účinky PMEG a PMEDAP v buněčných liniích CCRF-CEM a HL-60	46
5.4.1.	Vliv inhibice p38-MAP-kinasové dráhy na apoptosu navozenou PMEG a PMEDAP v buněčné linii CCRF-CEM	48
6.	DISKUSE	49
7.	ZÁVĚR	52
8.	SEZNAM ZKRATEK	53
9.	REFERENCE	57

1. ÚVOD

Analogy složek nukleových kyselin (nukleosidů / nukleotidů) představují skupinu klinicky významných chemoterapeutik virových infekcí a nádorových onemocnění. Zavedení látek nukleosidové povahy do terapie znamenalo ve své době zásadní posun například v léčbě herpetických infekcí – acyklovir (1982) [1], o něco později byl schválen azidothymidin (AZT, 1985) pro léčbu pacientů infikovaných virem HIV. Nukleosidové analogy byly též mezi prvními látkami, které byly již na počátku 60. let použity k léčbě zhoubných nádorů. Postupem času se tato skupina látek rozrostla a dnes zahrnuje celou řadu purinových a pyrimidinových derivátů, aktivních jak v léčbě solidních nádorů, tak hematologických malignit.

Spolupráce Prof. Antonína Holého (Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd ÚOCHB, Praha) a Erika De Clercq (Rega Institute for Medical Research, K. U. Leuven, Belgie) vedla před třiceti lety k objevení malé série acyklických nukleosidových analogů typu DHPA [(*S*)-9(2,3-dihydroxypropyl)adenin] a pozdějšímu rozvoji velkého počtu dalších nukleotidových analogů, acyklických nukleosidfosfonátů (ANP) typu HPMPA [(*S*)-9-(3-hydroxy-2-fosfonometoxypyl)adenin]. Tyto látky se staly významnými protivirovými léčivy – DHPA se například stala složkou Duviragelu®, populárního léku proti oparům [2]. V neposlední řadě tyto dílčí úspěchy posloužily jako ukazatel směru pro vývoj dalších generací antivirotik strukturního typu acyklických nukleosidfosfonátů. Tento výzkum byl neobyčejně plodný a vedl k patentování a komercializaci několika dalších preparátů, jejichž hlavní využití je v léčbě hepatitidy typu B a v supresivní léčbě HIV-pozitivních pacientů jako součást kombinovaných preparátů.

Nukleosidové/nukleotidové analogy mají charakter antimetabolitů a jejich hlavním zásahovým místem v buňce je proces replikace nukleových kyselin. Protivirově účinné látky se vyznačují větší afinitou k virovým polymerasám (např. reverzní transkriptase), zatímco buněčně replikativní polymerasy neovlivňují vůbec nebo jen minimálně. Analogy, které výrazněji interferují s buněčnými polymerasami, jsou ve svém důsledku cytotoxické a pro protivirovou terapii se nehodí. Jsou však dobře využitelné jako protinádorová léčiva. Ze skupiny ANP se cytotoxickým účinkem vyznačují zejména guaninový derivát PMEG [9-(2-fosfonometoxetyl)guanin] a strukturně podobný diaminopurinový derivát PMEDAP [9-(fosfonometoxetyl)-2,6-diaminopurin], jež jsou také předmětem předkládané diplomové

práce. Naší snahou bylo přispět k objasnění mechanismu účinku cytostaticky účinných acyklických nukleotidů. Jelikož interakce těchto látek s buněčnými polymerasami jsou již dobře známy, práce byla zaměřena na proapoptotickou buněčnou signalizaci zprostředkovanou MAP-kinasou p38. Teoretický přehled zahrnuje jak část věnovanou struktuře, metabolismu a biologické aktivitě ANP, tak část zabývající se MAP-kinasovou signalizací a jejím vztahem k apoptose a protinádorové terapii.

2. PŘEHLED O SOUČASNÉM STAVU PROBLEMATIKY

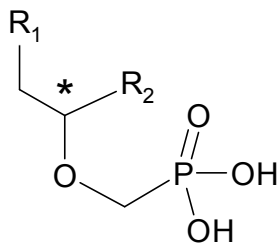
2.1. Acyklické nukleosidfosfonáty (ANP)

2.1.1. Struktura

V 80. letech byly aktivity řady vědců cíleny na design a syntézu katabolicky stabilních, isopolárních, popřípadě isosterických nukleotidových analogů. Jelikož polární povaha nukleotidů zamezuje jejich vniknutí do buňky, isopolární analogy byly vyvíjeny tak, aby atom kyslíku byl přemístěn k nejbližšímu sousednímu atomu α -uhlíku. Fosfoesterová skupina =P-O-C- byla přetransformována na isomerní fosfonometyler =P-C-O-. V této době byl též identifikován prototyp acyklických nukleosidových fosfonátů (*S*)-HPMPA. (*S*)-HPMPA, s širokým spektrem protivirové aktivity, je představován jako hybrid mezi (*S*)-DHPA (látka se slabou aktivitou proti DNA a RNA virům) a fosfonoacetylovou kyselinou (PAA, předchůdce protivirových látek fosfonoacetylových kyselin). Vzniká tedy spojením PAA s DHPA a přemístěním karboxylové skupiny [3].

Fosfonometoxyskupina, která je jedním charakteristických strukturních znaků ANP, je připojena esterovou vazbou přes alifatický řetězec k heterocyklické bázi (typicky adenin, guanin, cytosin nebo diaminopurin). P-C vazba fosfonometoxyskupiny není štěpena buněčnými hydrolasami, odolává esterázám a dalším katabolickým enzymům.

Vzhledem k přítomnosti chirálního centra na uhlíku acyklického řetězce (na obr. 1 označeno hvězdičkou), je umožněna existence dvou konfigurací, R a S. Biologická aktivita ANP je typicky striktně enantiospecifická tj. je vázána pouze na jeden z těchto dvou stereoizomerů.



Obr. 1. Obecný strukturní vzorec acyklických nukleosidfosfonátů. R_1 – heterocyklická báze (adenin, guanin, cytosin, diaminopurin), R_2 -CH₃ (PMP-řada), -CH₂OH (HPMP-řada), -H (PME-řada).

2.1.2. Metabolismus a biologická aktivita

Intracelulární fosforylace je jednou z velmi důležitých metabolických cest ANP, protože jen fosforylované formy jsou terapeuticky aktivní. Acyklické nukleosidfosfonáty na rozdíl od klasických nukleosidových analogů již obsahují fosfát napodobující skupinu, proto obcházejí typickou iniciační fosforylaci. Fosforylace tak probíhá jen ve dvou po sobě jdoucích krocích, které zajišťují nukleosidmonofosfátkinasy (GMP-kinasa nebo AMP-kinasa) a nukleosid-difosfátkinasy, enzymy převážně cytosolické, ale i mitochondriální lokalizace. Výsledkem postupné fosforylace ANP je monofosfát (ANPp) a difosfát (ANPpp) představující analogy di- a tri-fosfátů [4].

ANPpp fungují jako kompetitivní inhibitory nebo alternativní substráty virových enzymů (např. DNA-polymerasa HSV-1, DNA-polymerasa CMV a reverzní transkriptasa HIV-1) a nebo buněčných DNA-polymeras (DNA-polymerasa α , β , γ , ϵ). Selektivitu vůči jednotlivým enzymům určuje charakter báze, přičemž největší inhibiční potenciál mají guaninové deriváty [4]. Afinita ANPpp k buněčným nebo virovým polymerasám podmiňuje jejich protinádorový resp. protivirový účinek. ANPpp jsou nejen inhibitory, ale také substráty DNA polymeras a reverzních transkriptas. To znamená, že mohou být inkorporovány do DNA během její replikace nebo opravy, což vede k terminaci syntézy DNA. V případě absence 3'-OH skupiny v molekule látky jako je tomu například u látek PMEPA nebo (*R*)-PMPA postačí k ukončení syntézy DNA inkorporace jediné molekuly ANPpp (tzv. obligátní terminátory). U látek typu HPMPC mimikujících 3'-OH je k ukončení replikace zapotřebí inkorporace alespoň dvou bloků ANPpp v řadě za sebou, kdy pokračování syntézy DNA zabrání prostorové důvody.

2.1.2.1. Analogy s protivirovou aktivitou

Od acyklického nukleosidu (*S*)-HPMPA byly odvozeny tři sloučeniny, které byly schváleny pro celosvětové klinické využití:

- HPMPC [(*S*)-1-(3-hydroxy-2-fosfonomoxypropyl)cytosin] - cidofovir (Vistide[®]), sloužící pro léčbu zánětu sítnice vyvolanou cytomegalovirem (CMV) u pacientů s AIDS, pro léčbu polyoma-, papilloma-, adeno-, herpes- a poxvirových infekcí
- PMEPA [9-(2-fosfonomoxyetyl)adenin] - adefovir (ve formě orálního proléčiva – adefovirdipivoxil (Hepsera[®])), užívaný pro léčbu chronické HBV infekce
- PMPA [(*R*)-9-(2-fosfonomoxypropyl)adenin] - tenofovir (ve formě orálního proléčiva - tenofovirdisoproxilfumarát (Viread[®])), léčivo proti HIV infekcím

(AIDS) [3]. V nedávně době byl tento preparát schválen též pro léčbu hepatitidy B. Je také součástí kombinovaných přípravků Truvada® a Atripla®.

Podle spektra protivirové aktivity je možné ANP rozdělit do dvou skupin: HPMP deriváty, reprezentovány (*S*)-HPMPC, jsou aktivní proti různým typům DNA virů (polyoma-, papilloma-, adeno-, herpes- a poxviry). Druhou skupinou jsou deriváty PME- a PMP- řady, reprezentovány látkami PME A a (*R*)-PMPA, primárně aktivní proti hepadnavirům a retrovirům.

2.1.2.2. Analogy s protinádorovou aktivitou

Na rozdíl od protivirové terapie, ve které ANP slaví již mnoho let četné komerční úspěchy, na uvedení protinádorově účinných léčiv z této skupiny do praxe se stále čeká. Informací o mechanismech protinádorové aktivity ANP je mnohem méně než v případě protivirových účinků těchto látek, v posledních letech však byly i v této oblasti dosaženy značné pokroky a stále zde probíhá intenzivní výzkum.

Zajímavé je, že přestože cidofovir a adefovir jsou primárně aktivní jako protivirová léčiva, byl u nich prokázán i určitý protinádorový potenciál. Ukazuje se tak, že úplná disociace protivirových a protinádorových účinků je spíše vzácná a záleží na tom, který efekt převládne. Bylo prokázáno, že adefovir (PMEA) je silným induktorem diferenciaci v několika nádorových buněčných liniích *in vitro*, např. v buňkách erytrocytární leukemie K562 a lidské myeloidní leukemie HL-60 [5]. PME A vyvolává též diferenciaci v choriokarcinomech z krysích buněk RCHO *in vivo* [6] a působí proti růstu nosohltanového karcinomu (NPC) ve štěpu z tkáně laboratorní nahé myši [7]. Nejsilnějším inhibítozem růstu NPC, navozujícím apoptosu je však cidofovir. Jelikož je cidofovir širokospektrální látka proti DNA-virům, zdá se být zvláště vhodným chemoterapeutikem u nádorů příčinně souvisejících s papilomavirovou infekcí. Velice nadějně výsledky byly zatím dosaženy na řadě živočišných modelů. Mezi tyto modely patří např. nahé myši, jimž jsou implantovány štěpy (xenografty) z lidského cervikálního karcinomu vyvolaného HPV [8], dále potkaní model, u něhož polyomavirus vyvolává hemangiomy [9] a model nahé myši, u kterého fibroblastový růstový faktor FGF-2 vyvolává hemangiosarkomy [10]. Inhibiční efekt cidofoviru na růst těchto nádorů může být následkem vyvolané apoptosy (stejně tak i u NPC štěpů).

Mezi cytotoxické analogy s výrazně větším protinádorovým potenciálem patří PMEG [9-(2-fosfonometoxyetyl)guanin] a PMEDAP [9-(fosfonometoxyetyl)-2,6 diaminopurin]. I u nich však nacházíme poměrně výrazné protivirové účinky. Látka PMEDAP se jak strukturně,

tak svou biologickou aktivitou nejvíce podobá látce PMEAs. Obě dvě jsou inhibitory retroviróvé replikace *in vitro* [virus lidského imunodeficitu (HIV-1 a HIV-2), virus opičího imunodeficitu (SIV), Moloneyho virus myšího sarkomu (MSV), virus kočičího imunodeficitu (FIV)] [11]. Kromě retrovirů jsou také *in vitro* a *in vivo* inhibitory širokého spektra herpesvirů. Látka PMEDAP podaná orálně měla např. vysokou účinnost u myší infikovaných Moloneyho virem myší leukemie (MLV), Friendovým leukemickým virem (FLV) i myším cytomegalovirem (MCMV) [12]. Zvýšený protivirový efekt si lze udržet nepravidelným dávkováním. Ačkoliv má PMEDAP vynikající protivirové parametry, díky své cytotoxicitě nebyl v této aplikaci dále sledován v preklinické fázi farmaceutického výzkumu. Pro PMEG bylo zjištěno, že potlačuje papilomavirovou infekci u králíka a též u myší infikovaných lidským papilomavirem HPV-11 (xenografty z kondylomat) [13]. Dále bylo testováno velké množství 2'-substituovaných analogů PMEG proti herpes simplex viru (HSV) a viru HIV. Jejich účinnost závisí na charakteru substituentu, eventuálně na absolutní konfiguraci ve 2' poloze PMEG. Ukázalo se, že tyto sloučeniny mají obecně větší účinnost proti HIV než HSV [14]. Podobně jako PMEDAP, i látka PMEG byla díky své buněčné toxicitě vyloučena z výzkumu jako protivirové léčivo. V porovnání s látkou PMEDAP vykazuje menší protivirovou aktivitu, má však výraznější cytostatickou účinnost. Díky tomu se PMEG stal předlohou několika typů proléčiv s cílem vyvinout účinné chemoterapeutikum specificky zasahující nádorové buňky při minimální toxicitě pro zdravou tkáň (viz. kapitola 2.1.2.2.1).

Antiproliferační aktivita látky PMEG byla demonstrována *in vitro* na lidských leukemických buňkách, i buněčných liniích odvozených od solidních tumorů. Stejně tak *in vivo* ve dvou typech myším transplantovaných tumorů - P388 lymfocytické leukemie a B16 melanomu [15]. Cytostatický efekt byl prokázán u buněčných linií lidské erytrocytární leukemie K562 a myší leukemie L1210 [16]. U linie K562 a choriokarcinomu z RCHO buněk byla pozorována také indukce diference [16]. Efekt PMEG a PMEDAP na buněčný cyklus a jejich schopnost vyvolat apoptosu byl sledován ve velkém počtu nádorových buněčných linií, jako je např. MOLT-4, HL-60, ML-1 nebo CEM [17]. Experimenty na těchto liniích ukázaly, že změny buněčného růstu jsou při použití nízkých koncentrací analogů reversibilní. Použitím vyšších koncentrací dochází k indukci apoptosy v důsledku zástavy buněčného cyklu v S-fázi. V souhrnu výsledky těchto studií ukázaly, že látka PMEG má největší cytostatický efekt z fosfonometoxyalkylpurinů.

Rovněž látka PMEDAP inhibuje DNA syntézu a růst L1210 myších leukemických buněk *in vitro* [18]. Přestože její antiproliferační efekt v *in vitro* experimentech nedosahuje účinnosti PMEG, zdá se být účinnější v podmínkách *in vivo*. Výrazná protinádorová aktivita byla

prokázána u lymfoblastické leukemie Sprague-Dawley (SD) potkanů [19] a byla též detailně studována na modelu spontánních T-buněčných lymfomů SD potkanů. Pokles váhy lymfomu během podávání PMEDAP byl doprovázen potlačením mitotické aktivity neoplastických buněk a vzrůstem chromatinové kondenzace, stejně tak vzrostla i jaderná fragmentace. Tyto výsledky jasně ukazují, že aplikace PMEDAP vyvolává apoptosu buněk rostoucího lymfomu *in vivo* [20].

Výsledky *in vitro* studií ukázaly, že PMEGpp jako analog dGTP (dATP) efektivně kompetuje s přirozeným substrátem při inkorporaci do DNA řetězce. Bylo též zjištěno, že PMEGpp inhibuje krysí polymerasy α a ϵ a lidské DNA-polymerasy α a δ , s následnou inhibicí syntézy DNA v buňce [21]. Další studie prokázaly, že základem cytostatické aktivity analogu PMEDApp je silná inhibice polymerasy δ [22]. Oba tyto acyklické nukleosidfosfonáty mohou mít také funkci řetězcových terminátorů. Díky chybějící 3'-OH skupině se růst DNA řetězce ukončí.

2.1.2.2.1. Proléčiva PMEG

Uvažuje se, že relativně nižší účinnost PMEG (proti PMEDAP) v *in vivo* podmínkách může být způsobena nižší biologickou dostupností PMEG. Tuto zdánlivou nevýhodu je ovšem možné elegantně vyřešit přípravou vhodných proléčiv - neaktivní prekurzorů, ze kterých vzniká účinná látka teprve metabolickými pochody v organismu. V pravém slova smyslu je už samotná látka PMEG proléčivem, neboť její aktivní složkou je teprve fosforylovaná forma PMEGpp. Vzhledem k polaritě PMEG je však značně limitován průchod látky buněčnými membránami. Problémem je i značná toxicita (zvláště pro buňky ledvin, kterými je látka vylučována). Zvýšení prostupnosti do buněk a selektivity účinku je jedním z hlavních důvodů přípravy proléčiv látky PMEG.

Cpr-PMEDAP:

9-(2-fosfonometoxyetyl)- N^6 -cyklopropyl-2,6-diaminopurin(cpr-PMEDAP) je acyklický nukleotidový analog PME série obsahující cyklopropylový substituent na N^6 pozici 2,6-diaminopurinové (DAP) báze [23]. Experimenty *in vitro* na buněčných liniích a jejich buněčných extraktech prokázaly, že cpr-PMEDAP je deaminován pomocí N^6 -metyl-AMP aminohydrolasy na látku PMEG [24], která je dále fosforylována na aktivní metabolity PMEGp a PMEGpp – narozdíl od látky PMEDAP, která není deaminována, ale přímo fosforylována na PMEDApp a PMEDAppp. Díky pomalejší transformaci zaručuje cpr-

PMEDAP optimální antiproliferační účinek. V porovnání se samotnou látkou PMEDAP je pochopitelně mnohem účinnější, neboť je ekvivalentní látce PMEG. Mezi buněčné nádorové linie, kde byla látka cpr-PMEDAP srovnatelným induktorem diferenciací jako PMEG, patří např. lidská erytroleukemie K562, myší leukemie L1210 a potkaní choriokarcinom RCHO [25].

GS-9191:

GS-9191 (L-fenylalanin, N,N-[[[2-[2-amino-6-(cyklopropylamino)-9H-purin-9-yl]etoxy]metyl]fosfynylidyl]bis-, bis(2-metylpropyl)ester) je dvojité prolečivo nukleotidového analogu PMEG, zacílené na terapii lidských genitálních papilomavirů – původcům genitálních bradavic a změn na sliznici děložního hrdla [26]. GS-9191 je aplikován lokálně přímo do zasažené tkáně, což zvětšuje její účinnost, zatímco se snižuje toxicita. GS-9191 je metabolizován intracelulárně na cpr-PMEDAP a následně deaminován na PMEG. Na svůj difosfátový analog je přeměňován v epitelální vrstvě. Antiproliferační účinky tohoto prolečiva byly testovány v sériích HPV-transformovaných buněčných linií, metabolismus a mechanismus působení byly potvrzeny *in vitro*. Výsledky výzkumu ukázaly, že GS-9191 je mnohem silnější inhibitor DNA polymeras α , δ a ϵ v HPV sériích pozitivních buněčných linií než PMEG a cpr-MEDAP [26]. Předpokládá se tedy, že tato látka působí jako prolečivo PMEG použitelné při HPV infekci.

GS-9219:

GS-9219 (dietyl-N,N'-[({2-[2-amino-6-(cyklopropylamino)-9H-purin-9-yl]etoxy} metyl) fosfonyl]di-L-alaninát) je dvojité prolečivo PMEG vytvořené jako cytotoxická látka přednostně působící v lymfocytech [27]. N⁶-cyklopropyl modifikace PMEG způsobuje lepší rozpustnost ve vodě. Bisfosforamidátová modifikace neutralizuje negativní fosfátové náboje PMEG, proto GS-9219 prochází membránou rychleji než látka PMEG. V lymfocytech jsou pak fosforamidátové skupiny hydrolyzovány katepsinem A na první metabolit cpr-PMEDAP, dále následuje deaminace na PMEG a fosforylace na PMEGpp, který působí cytotoxicky v dělicích se buňkách díky inhibici buněčných DNA-polymeras [28]. Aktivní forma léčiva selektivně přetrvává v periferních krevních mononukleárních buňkách. Hlavní indikací GS-9219 je Non-Hodgkinův lymfom (NHL). Protinádorová účinnost GS-9219 byla prokázána na modelu pěti psů, kteří měli NHL v pokročilém stádiu - látka GS-9219 byla dobře tolerována a vykazovala značnou aktivitu. Tato studie poskytla podklad pro právě probíhající klinické studie s lidskými pacienty s NHL [29]. Kategorie NHL zahrnuje též chronickou lymfocytovou

leukemii (CLL) vznikající z B-buněk. U této formy leukemie byla prokázána inhibice opravných mechanismů DNA CLL buněk látkou GS-9219 a schopnost stimulace signální cesty pro indukci apoptosy.

2.2. p38-MAP-kinasová signalizace

Nadrodina mitogeny-aktivovaných proteinkinas (MAP-kinas, MAPK) zahrnuje tři serin/threonin kinasové kaskády regulující buněčnou proliferaci, buněčný cyklus, dělení a buněčné přežití. ERK (extracellular signal-regulated-kinase) kinasová dráha zprostředkovává buněčnou odpověď na růstové faktory a jiné mitogenní podněty (cytokiny, virové infekce a karcinogeny) ve smyslu podpory buněčné proliferace a omezení buněčné smrti. Další dvě dráhy, JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase) a p38-MAPK jsou typicky aktivovány stresovými podněty (osmotický nebo tepelný šok, hyperosmolarita, prudká radiace) a podílejí se na vzniku zánětu a programované buněčné smrti [30].

MAP-kinasy představují atraktivní cíl a předmět intenzivního výzkumu farmaceutických firem, zaměřeného na hledání molekul inhibujících MAP-kinasy. Inhibitory p38 jsou například vyvíjeny a testovány jako léčiva zánětlivých onemocnění. V poslední době ale také narůstá množství studií ukazujících, že aktivace p38-MAP-kinasy je nezbytná pro usmrcení nádorových buněk působením nejrůznějších protinádorových látek. Signální dráha MAP-kinasy p38 se proto stává novým cílovým místem terapeutického zásahu proti nádorovému bujení.

2.2.1. Isoformy a tkáňová distribuce p38-MAP-kinas

p38-kinasová dráha (SAPK, p40, RK, CSBP, HOG1) byla poprvé popsána v roce 1994 [31] a nachází se v jádře a cytoplazmě aktivovaných buněk. MAP-kinasová rodina p38 se zahrnuje čtyři isoformy, p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ , které sdílejí charakteristické strukturní prvky. Nejlépe popsanou isoformou je p38 α (MAPK14, SAPK2a), která je fyziologicky nejvýznamnější v odpovědích na záněty. Reguluje diferenciaci a proliferaci v různých buněčných typech, např. v myocytech, kardiomyocytech, neuronech a adipocytech. Ukázalo se, že hraje svou roli též v embryonálním vývoji - v placentální organogenezi [32]. p38 α je podobně jako p38 β (MAPK11, SAPK2b) exprimována ve většině tkání a ty kinasy jsou ze 73% homologní [33]. P38 γ (MAPK12, SAPK3, ERK6) a p38 δ (MAPK13, SAPK4) jsou vzájemně a s isoformami p38 α a p38 β identické na 60%. S ostatními členy

MAP-kinasové rodiny pak p38-kinasy sdílejí 40-45% identitu [34]. p38 γ je exprimována v kosterních svalech, kardiomyocytech a v maligních buněčných liniích. Expresi p38 δ nacházíme ve varlatech, pankreatu, tenkém střevě, ve slinách, podvěsku mozkovém a štítné žláze. Společným znakem p38 α a p38 β je citlivost vůči pyrimidylovým inhibitorům, zatímco p38 γ a p38 δ jimi nejsou inhibovány.

2.2.2. Aktivace a deaktivace p38-MAP-kinasové dráhy

p38-kinasa obsahuje dvě domény oddělené hlubokou katalytickou mezerou, kam se váží substráty. Amino-terminální doména tak tvoří aktivační fosforylační místo – Thr-X-Tyr motiv, kde X je pro p38 kinasy Gly (Glu pro ERKasy, Pro pro JNK kinasy) [35]. Mechanismus aktivace p38 spočívá v duální fosforylaci Thr-180 a Tyr-182 pomocí MAP-kinaskinas (MAPKK). V odpovědi na extracelulární stimuly se odstartuje sled fosforylačních reakcí. Na počátku stojí aktivace MAPKKK, která následně aktivuje MAPKK pokračující aktivací MAPK (horní sled fosforylačních reakcí). Tyto MAP-kinasy pak aktivují různé substráty, jako jsou např. transkripční faktory, další kinasy a cytosolické proteiny (dolní sled fosforylačních reakcí).

Za specifické aktivátory p38-kinas se považují dvě MAPKK – MAPKK3 (označovaná jako MAP2K3) a MAPKK6 (označovaná jako MAP2K6). Zatímco MAP2K6 je společným aktivátorem všech isoform p38, MAP2K3 není schopna aktivovat p38 β , i když je mezi těmito MAPKK 80% homologie [36]. MAPKK4 (horní sled reakcí JNK rodiny) slouží jako aktivátor p38 α a p38 δ ve specifických buňkách. Tyto údaje ukazují, že aktivace isoform p38 může být specificky kontrolována rozdílnými regulátory a společně aktivovaná různými kombinacemi regulátorů horního sledu fosforylačních reakcí.

2.2.2.1. Horní sled fosforylačních reakcí

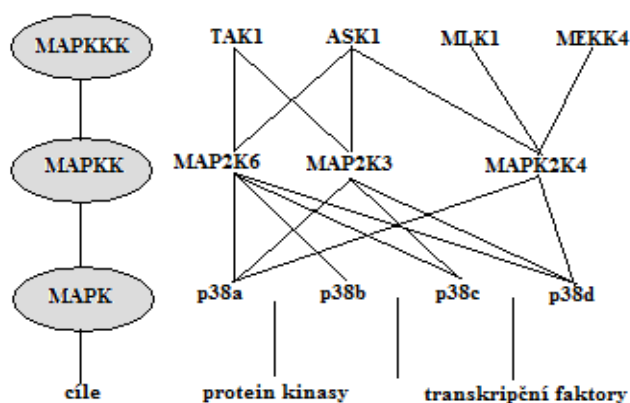
Existuje mnoho cest, jak aktivovat p38-MAP-kinasy. Jednou z nich je nezávislý aktivační mechanismus zprostředkovaný MAPKK – TAB1 [transforming growth factor- β (TGF- β)-activated protein kinase 1 (TAK)-binding protein]. Aktivace p38 je dosažena autofosforylací p38 α po interakci s TAB1 [34].

Další aktivační mechanismus je zprostředkovaný pomocí TRAF (tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor). TRAF je rodina šesti cytoplasmatických adaptorových proteinů tvořících cytokinovou signalizaci. Jeden z členů této rodiny TRAF2 interaguje

s ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase-1), která fosforylací aktivuje MAP2K3, MAP2K6, ale i MAP2K4. Další možnou aktivací ASK1 je přes Fas ligand (transmembránový protein patřící do rodiny TNF) aktivující DAXX (a death-domain-associated protein), který je stresovým podnětem přemístěn z jádra do cytoplasmy, kde reaguje s ASK1 [36].

Dalším z aktivátorů je též skupina proteinů nazývaná GADD (growth arrest and DNA damage-inducible). GADD jsou genové produkty vyvolané stresem, jako je např. UV záření, chemické karcinogeny, osmotický stres nebo hladovění. Hrají významnou roli v procesech adaptace na stres zahrnujících kontrolu růstu, genomovou stabilitu, opravu DNA a apoptosu. Do této skupiny patří GADD45, který váže MEKK4 (také označovanou jako MTK1) [37]. Tato vazba vede ke zvětšení aktivity MAPKK4 a následně k aktivaci p38.

Receptory spřažené s G-proteiny mohou též aktivovat p38-MAP-kinasovou cestu přes CDC42 a RAC1 guanin-nukleotidové proteiny vážící GTP. Tyto proteiny existují ve dvou formách – inaktivní GDP a GTP aktivní forma. Aktivní forma evokuje interakci MLK1, která odstartuje fosforylací MAP2K4. CDC42 a RAC1 se podílí na regulaci MAP-kinas vazbou PAK (P21-activated kinases) [38]. Sled fosforylačních reakcí je pro přehlednost popsán na obr. 2.



Obr. 2. Schéma p38-MAP-kinasové signální dráhy.

2.2.2.2. Dolní sled fosforylačních reakcí

Aktivované p38-kinasy regulují aktivaci řady substrátů – další proteinkinasy a transkripční faktory. Prvním identifikovaným p38 α substrátem byla Ser/Thr-proteinkinasa MAPKAP K2 (MAP kinase-activated protein kinase 2). Spolu s příbuzným substrátem

MAPKAP K3 fosforylují malý heat shock protein HSP27, tyrosinhydroxylasu a LSP1 (lymfocytární specifický protein). 20-30% identitu sdílí se substrátem PRAK (p38-regulated/activated protein kinase), jehož kinasová aktivita je regulována p38 α a p38 β fosforylací na Thr182 [39]. Po fosforylaci též aktivuje protein HSP27. Dalším kinasovým substrátem p38 isoforem je MNK1 (MAP kinase-interacting kinase), který fosforyluje eukaryotní iniciační faktor-Ee (eIF-4E) [40]. Ser/Thr kinasy MSK1 a 2 (mitogen and stress-activated kinase) jsou aktivovány růstovým faktorem nebo stresem přes ERK a p38 MAP-kinasovou cestu a způsobí tak aktivaci CREB (cAMP responsive element binding protein) [41].

Aktivační transkripční faktor ATF2 je jeden z prvních identifikovaných transkripčních faktorů, který je vhodným *in vitro* substrátem pro JNK a p38-MAP-kinasy [42]. Transkripční faktor ATF6 je zapojený v genové expresi ANF (atrial natriuretic factor) v srdečních myocytech. Aktivita transkripčního faktoru MEF2C (myocyte enhancer factor) vzrůstá díky LPS, fosforylací p38 kinasy v myocytech, stejně tak jako aktivita faktoru MEF2A [43]. Transkripční faktor CHOP (C/EBP homologous protein nebo GADD153), aktivovaný převážně p38 α spolu s GADD45, způsobuje stresový efekt na buněčný růst a diferenciaci [44]. Další faktory, které jsou aktivovány p38-kinasovou cestou, jsou např. p53, ELK1, SAP1 a další.

Tato komplikovaná síť proteinových interakcí je zodpovědná za změny buněčné aktivity, jako jsou apoptosa, zastavení buněčného cyklu, produkce cytokinů, buněčná diferenciacie, buněčné stárnutí a tumorová suprese [45].

Aktivace p38 je ve fyziologických podmínkách často přechodná a je zpětně regulována defosforylací některými členy MAP-kinasové cesty. Proteiny zodpovědné za defosforylací jsou specifické fosfatasy patřící do MAP-kinasové fosfatasové rodiny MKP. Někteří zástupci této skupiny mohou efektivně defosforylovat p38 α a p38 β , kdežto p38 γ a p38 δ jsou odolné proti všem známým členům MKP rodiny. Mechanismy, jimiž jsou jednotlivé isoformy p38 regulovány, záleží na fosfatasových hladinách a jejich specifitě.

2.2.3. p38-MAP-kinasy a apoptosa

Apoptosa je aktivní forma buněčné smrti, která hraje významnou roli v odstranění zničených nebo poškozených buněk a je přirozenou součástí vývoje mnohobuněčných organismů a součástí regulace imunitního systému. Apoptosa je vysoce regulovaná programovaná buněčná smrt, čímž se liší od nekrosy, nekontrolované smrti buněk, vedoucí

k buněčným lézím, zánětům a dalším problémům. Morfologické změny typické pro apoptosu zahrnují smrštění buňky, jadernou kondenzaci, tvorbu membránových puchýřků, fragmentaci jádra a odstranění apoptotických buněk fagocytosou [46].

Apoptosa může být vyvolána různými stimuly jako jsou virová infekce, buněčný stres nebo poškození DNA. Citlivost buněk na tyto stimuly závisí na mnoha faktorech, např. expresi pro- a antiapoptotických proteinů, síle působících stimulů a fázi buněčného cyklu. V prvních fázích apoptosy je aktivována skupina cystein-aspartátových proteas – kaspas. Kaspasy pak způsobují štěpení buněčných komponentů jako jsou strukturální proteiny cytoskeletu nebo enzymy opravující DNA [47]. Kaspasy mohou též aktivovat další degradační enzymy, DNasy, začínající štěpení DNA v jádře. Rozdělují se na kaspasy iniciační (např. kaspasa 8 a 9), které se autoaktivují proteolyticky a kaspasy efektorové (např. kaspasa 3), aktivované iniciačními kaspasami, které pak způsobují buněčnou smrt. Kaspasa 3 je zodpovědná za štěpení jednoho z prvních identifikovaných substrátů kaspas poly(ADP-ribosa)polymerasy (PARP). PARP je důležitým enzymem účastnícím se oprav DNA [48]. Na aktivaci apoptosy se podílí mnoho dalších signálů působících přes specifické receptory („death receptors“) typu TNF, FAS, TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) a svou roli zde hrají i mitochondrie a proteiny rodiny BCL2 (B-cell lymphoma 2).

Apoptosa je přísně regulovaný proces a jeho nedostatečná nebo nadměrná aktivace je zdrojem řady onemocnění. Zvýšená apoptosa s postupnou ztrátou neuronů je například spojena s některými neurodegenerativními chorobami jako jsou Parkinsonova nebo Alzheimerova nemoc. Naopak nádorové bujení je charakterizované příliš slabou apoptosou. Díky mutacím v nádorových buňkách jsou ignorovány normální buněčné signály regulující růst a nádorové buňky mnohem více proliferují a následně tvoří tumory. Terapie je značně obtížná, neboť mutacemi v apoptotické cestě často vznikají buňky resistantní vůči radiační i chemické léčbě. Apoptosa a její mechanismus se proto stal jedním ze zájmů vývoje nových protinádorových léčiv.

Uvádí se, že role p38-MAP-kinasy v apoptose může být jak ve smyslu její stimulace, tak inhibice, v závislosti na buněčném typu a druhu stimulu. Většina dosud publikovaných studií ale charakterizuje p38-MAP-kinasy jako proapoptotické. Bylo prokázáno, že aktivace p38-MAP-kinas je nezbytná pro indukci buněčné smrti v nádorových buňkách vlivem řady protinádorových látek jako jsou deriváty retinoidů, vinkristin, vinblastin, taxol, cisplatina nebo doxorubicin [49]. Významný je i fakt, že aktivace p38-MAPK vyvolává apoptotickou odpověď specificky v tumorových, nikoli v normálních buňkách [45]. Z látek nukleosidového typu je popsána klíčová role p38-MAPK v apoptose pankreatických nádorových buněk

indukované gemcitabinem [50]. Naproti tomu, adenosinový analog kladribin sice v Jurkat leukemických buňkách p38-MAP-kinasu aktivoval, ale inhibice této dráhy apoptosu ještě zvýraznila, což naznačuje spíše antiapoptotickou úlohu p38-MAPK za těchto podmínek [51]. Ve studii s karbocyklickým cytidinovým analogem cyklopentenylcytosinem (CPEC) byl kromě klasické inhibice p38-MAPK specifickými inhibitory proveden také knock-down p38-MAPK pomocí siRNA (short interfering RNA). Obojí vedlo ke snížení diferenciaci K562 buněk a prevenci zástavy buněčného cyklu vlivem CPEC [52].

3. CÍLE PRÁCE

- Kvantifikovat a porovnat antiproliferační účinky acyklických nukleosidfosfonátů PMEG a PMEDAP v buněčných liniích CCRF-CEM a HL-60 (stanovení IC₅₀)

V obou buněčných liniích dále stanovit a porovnat:

- Vliv PMEG a PMEDAP na genovou expresi čtyř isoform p38-kinasy (α , β , γ , δ)
- Vliv PMEG a PMEDAP na expresi p38-kinasy na úrovni proteinu
- Funkční stav (aktivaci) p38-kinasové kaskády kvantifikací fosforylované formy p38-kinasy
- Apoptotické účinky PMEG a PMEDAP sledováním aktivace kaspasy 3 a PARP
- Vliv inhibice p38-kinasové signální dráhy na rozsah apoptosy navozené PMEG a PMEDAP

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Použité přístroje a pomůcky

4.1.1. Přístroje

- CO₂ inkubátor Hera Cell
- mikroskop Carl Zeiss
- termoblok, vývojové dílny ÚOCHB, AV ČR
- centrifuga Eppendorf 5417R
- elektronické váhy ADAM, AGT-200
- pH metr PHM 240, MeterLab
- vortex, IKA
- Agilent 2100 Bioanalyzer
- spektrofotometr NanoDrop[®] ND-1000
- termocykler DNA Engine Opticon II[®], Bio-Rad
- spektrofotometr Tecan Genios
- elektrobloter TE 70 PWR, Amersham Biosciences
- roller Stuart
- CCD kamera Fuji LAS 3000
- elektroforetická aparatura Hoeffer

4.1.2. Pomůcky

Automatické pipety, skleněné pipety, odměrné válce, kádinky, mikrozkuřavky, filtrační papír, pinzeta, 6-jamkové destičky, jehly 20G, 96-jamkové mikrotitrační destičky, PVDF (polyvinylidendifluoridová) membrána, blotovací papíry (Whatman), folie

4.2. Metody a chemikálie

4.2.1. Kultivace a pasážování buněčných linií CCRF-CEM a HL-60

Buněčné linie lidské T-lymfoblastické leukemie CCRF-CEM (ATCC CLL-119) a lidské myeloidní leukemie HL-60 (ATCC CLL-240) byly získány z Americké kolekce kultur ATCC (Rockville, MD). Buňky byly kultivovány při 37°C pod atmosférou obsahující 5% CO₂. Pro růst buněk bylo použito komerční médium RPMI-1640 doplněné o přídavek 10% FCS, 2 mM glutaminu a směsi penicilinu a streptomycinu v koncentraci 0,01%. Pasážování bylo prováděno při dosažení buněčné hustoty 1-2 x 10⁶ buněk/ml vyředěním na koncentraci 0,5 - 1 x 10⁵ buněk/ml do čerstvého média.

4.2.2. Inkubace buněk s látkami (PMEG a PMEDAP)

Látky PMEG a PMEDAP byly syntetizovány Prof. Holým dle publikovaného postupu [53]. Byly připraveny zásobní 15 mM, 3,5 mM a 0,35 mM vodné roztoky. Buňky (CCRF-CEM nebo HL-60) byly nasazeny na 6-jamkové destičky v koncentraci 10⁵/ml a ponechány přes noc v inkubátoru. Následující den byly k buňkám přidány látky PMEG a PMEDAP (koncentrační řady – viz. níže) a inkubovány 72 h při 37°C a pod atmosférou obsahující 5% CO₂.

V pokusech, kde byl použit inhibitor p38 kinasy SB203580 (4-(4-fluorofenyl)-2-(4-metylsulfinylfenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazol), byl nejprve k buněčné kultuře přidán inhibitor a po 1 h preinkubace (37°C) byly přidány látky PMEG (3 μM) a PMEDAP (10 μM) Další postup zpracování buněk byl stejný jako u buněk bez inhibitoru.

Koncentrační řady:

PMEG 0 – 0,1 – 0,3 – 1 – 3 – 10 μM

PMEDAP 0 – 0,3 – 1 – 3 – 10 – 30 μM

4.2.3. Stanovení antiproliferační aktivity látek a další zpracování buněk

Chemikálie

- Trypanová modř
- PBS (phosphate buffered saline)

Po skončení inkubační doby byly buňky spočítány pod mikroskopem v počítači Bürkerově komůrce po obarvení Trypanovou modří (1:9). Počty živých tj. neobarvených buněk byly zaznamenány a použity k sestavení proliferačních křivek a stanovení IC₅₀.

Pro další zpracování materiálu (izolace RNA, immunoblotting) bylo potřebné množství nebarvených buněk odstředěno na centrifuze 5 min, 250 x g, 25°C. Peleta byla promyta 1 ml PBS a opět stočena za stejných podmínek. Supernatant byl odstraněn a pelety byly v mikrozkuvkách skladovány při -80°C.

4.2.4. Izolace RNA

Pro izolaci RNA z peletizovaných buněk byl použit komerční kit RNeasy Mini (Qiagen). Jeho výhodou je poměrně rychlá purifikace RNA vysoké kvality za použití malého množství startovního materiálu (1-2 x 10⁶ buněk)

Chemikálie:

- kit RNeasy mini
 - RLT pufr
 - RW1 pufr,
 - RPE pufr
 - RNase-free DNase
- 70% etanol v RNase-free vodě
- 80% etanol v RNase-free vodě
- lyofilizovaná DNasa + RDD pufr pro naředění (Qiagen)

DNasa byla naředěna RDD pufr (1 vzorek: 10 µl DNasa + 70 µl RDD), zamíchána a ponechána na ledu pro pozdější použití. K peletě buněk bylo přidáno 350 µl lyzačního RLT pufru, vortexováno a 5x protáhnuto jehlou 20-gauge. Dále bylo přidáno 350 µl 70% etanolu a promícháno pipetou. 700 µl vzorku bylo nanášeno na kolonku umístěnou v 2 ml sběrné zkumavce, centrifugováno 15 s (12 000 x g). Eluát, byl odstraněn a zkumavka byla znova

použita. Na kolonku bylo nanášeno 500 μ l promývacího RW1 pufru a centrifugováno 15 s (12 000 x g). Eluát byl opět odstráňen a zkumavka byla znova použita. Za účelem separace zbytkové DNA bylo přímo na kolonku nanášeno 80 μ l roztoku DNasy a inkubováno 15 min při laboratorní teplotě (20-30 °C). Pak byla kolonka promyta 500 μ l pufru RW1 a centrifugována opět 15 s (12 000 x g). Zkumavka byla znova recyklována a poté stejným postupem promyta 500 μ l RPE a následně dvakrát 500 μ l 80% etanolu. Kolonka pak byla opatrně přenesena do nové 2 ml zkumavky a byla odstředěna 2 min maximální rychlostí. Kolonka byla vložena do nové 1,5 ml zkumavky a otevřená ponechána 15 min na vzduchu za účelem vysušení. Posledním krokem bylo vymytí purifikované RNA z kolonky přidáním 40 μ l RNase-free vody a centrifugací 1 min (12 000 x g). Eluát byl rozpipetován do dvou alikvotů - 10 a 30 μ l a uschován při -80 °C pro další použití.

4.2.5. Kontrola kvality RNA

4.2.5.1. Hodnocení integrity RNA

Integrita RNA byla provedena s využitím Lab-On-A-Chip technologie na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer. Za tímto účelem byl použit příslušný RNA 6000 Nano Kit obsahující čip a reagentie pro analýzu RNA fragmentů. Každý RNA čip se skládá ze sady vzájemně propojených mikrokanálků, přes něž se vzorky pohybují elektroforézou. Fragmenty nukleových kyselin se dělí v závislosti na jejich velikosti.

Chemikálie:

- Agilent RNA 6000 Nano gel Matrix
- RNA Nano Dye Concentrate
- RNA 6000 Nano Marker
- Agilent RNA 6000 Ladder

550 μ l RNA 6000 Nano gelu bylo zfiltrováno přes spin kolonku 10 min, 1500 x g a rozděleno po 65 μ l do mikrozkuavek. K 65 μ l gelu byl přidán 1 μ l fluorescenční sondy (RNA Nano Dye Concentrate). Gel byl důkladně promíchán na vortexu (10 s) a centrifugován 10 min, 13000 x g. Připravený gel byl pomocí čipové stanice dodávané k přístroji nanášeno na čip a natlakován pístem do kanálků. Dále bylo do všech jamek nanášeno 5 μ l markeru (RNA 6000 Nano Marker) sloužícího jako standard. Následně byl do

jednotlivých jamek pipetován 1 μ l vzorku nebo roztoku fragmentů RNA o definované velikosti (RNA 6000 Ladder). Čip byl horizontálně vložen do speciálně upraveného IKA vortexu a třepán 1 min při 2400 rpm. Pak byl vložen do bioanalyzáru Agilent 2100 a po ukončení separace byla v jednotlivých vzorcích vyhodnocena integrita RNA pomocí parametru RIN (RNA Integrity Number).

4.2.5.2. Spektrální hodnocení čistoty a koncentrace RNA

Nukleové kyseliny absorbují v UV oblasti (s maximem při 260 nm), proto je možné na základě jejich spektrálních charakteristik hodnotit jak čistotu, tak koncentraci RNA. Vzorky byly analyzovány pomocí spektrofotometru NanoDrop[®] ND-1000, který měří absorbanci 1 μ l vzorku s vysokou přesností a reprodukovatelností. Čistota RNA byla stanovena z poměru mezi hodnotami absorbancí při 260 nm a 280 nm (A260/A280) s ohledem na kontaminanty absorbující při této vlnové délce, např. proteiny a fenoly. Dalším hodnoceným parametrem byl poměr A260/A230, který ukazuje na znečištění vzorku etanolem nebo různými solemi. Pokud jsou hodnoty poměrů A260/A280 a A260/A230 větší než 1,8 je vzorek použitelný pro následné analýzy (syntéza cDNA, PCR). Hodnota A260 pak umožňuje kvantifikovat koncentraci RNA ve vzorku. Výsledné hodnoty jsou udány v jednotkách ng/ μ l.

4.2.6. Syntéza jednovláknové cDNA

Reverzní transkripce je proces, při němž se podle templátu RNA syntetizuje jednovláknová cDNA (komplementární DNA). Pro syntézu jednovláknové cDNA byla použita reverzní transkriptasa SuperScript II[®] (Invitrogen) a jako primer byl použit oligo(dT)₁₂₋₁₈, který je vysoce specifický pro mRNA. Jako templát bylo použito 0,5 μ g izolované celkové RNA.

Chemikálie:

- oligo(dT)₁₂₋₁₈ (500 μ l/ml)
- dNTP mix (10 mM dATP, 10 mM dTTP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP)
- RNase-free voda
- 5x First Strand Buffer
- 0,1 M DTT
- Protector RNase inhibitor (40U/ μ l, Roche)

- reverzní transkriptasa SuperScript II (200U/μl)

Byl připraven premix oligo(dT)₁₂₋₁₈ a dNTP v závislosti na počtu vzorků. Na každý vzorek bylo počítáno 1 μl primeru + 1 μl dNTP mixu. Na základě koncentrace RNA naměřené na NanoDropu byl napočítán objem RNA vstupující do reakce a dopočítán objem RNase-free vody do 10 μl. Dále byl připraven RT mix - 4 μl reakčního pufru (5x First Strand Buffer), 2 μl 0,1 M DTT a 1 μl inhibitoru RNas (Protector RNase Inhibitor) (40U/μl). Do mikrozkuhavek bylo pipetováno 0,5 μg RNA, 2 μl premixu oligo(dT)₁₂₋₁₈ a RNase-free voda. Směs byla promíchána, stočena na centrifuze a inkubována při 65 °C po dobu 5 min (annealing primeru). Po uplynutí doby inkubace byly vzorky s roztoky rychle schlazeny na ledu a krátce odstředěny. Ke každému vzorku bylo přidáno 7 μl RT mixu, směs byla jemně promíchána a opětovně odstředěna. Následovala inkubace při 42 °C, 2 min. Ke každému vzorku byl přidán 1 μl (200 U) reverzní transkriptasy SuperScript II. Inkubační směs byla jemně promíchána, krátce stočena na centrifuze a inkubována při 42 °C po dobu 5 min. Nakonec byly vzorky zahřáty na 70 °C, 15 min (denaturace transkriptasy a rozložení RNA templátu), zchlazeny na ledu, krátce stočeny a skladovány při -20 °C.

4.2.7. Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (real time PCR)

Metoda real time PCR na rozdíl od klasické PCR umožňuje kontinuálně monitorovat přírůstky DNA během každého cyklu. Využívá se fluorescenční sondy (SYBR Green), která se nespecificky váže na syntetizovanou dvojvláknovou DNA a úroveň detekované fluorescence pak odráží množství nasyntetizované nukleové kyseliny. Výsledkem je charakteristická amplifikační křivka. Číslo cyklu, kdy hodnota fluorescence poprvé přesáhne hodnotu pozadí (baseline) se označuje jako C_t a je nepřímě úměrné množství amplifikované DNA ve vzorku. Metoda vyžaduje použití speciálního termocykleru vybaveného fluorescenčním detektorem. K vlastnímu provedení PCR reakce jsme využili komerčně dodávaného premixu RT² qPCR Master mix (SABiosciences) založeného na Hot-Start polymerase. Dále jsme použili validované primery od stejné firmy.

Chemikálie:

- RT² qPCR Master mix
- ddH₂O
- RT² qPCR Primer (MAPK 11, MAPK12, MAPK13, MAPK14, ACTB)

cDNA byla 5x naředěna pomocí RNase-free vodou. Dále byla připravena směs pro PCR – 12,5 µl premixu (RT² qPCR Master mix), 10,5 µl vody, 1 µl jednotlivých primerů (RT² qPCR Primer). Směs byla v chlazeném stojánku napipetována do PCR stripů a byl k ní přidáno 1 µl naředěné cDNA (templát). Stripy byly uzavřeny víčkem, vortexovány, stočeny a vloženy do termocykleru DNA Engine Opticon II[®] (Bio-Rad). Přístroj byl naprogramován následovně:

95°C - 10 min

95°C - 10 s

55°C - 35 s

72°C - 30 s

(40x)

72°C - 2 min

55°C – 95°C (po 0,5°C) - křivka tání

Kvantifikace exprese jednotlivých genů byla provedena relativně ve vztahu k neovlivněné kontrole pomocí $\Delta\Delta Ct$ metody s normalizací na jeden referenční gen β -aktin (ACTB).

Výpočet:

$$\Delta \text{ genové exprese} = 2^{(-\Delta\Delta Ct)} = 2^{-\{[Ct(2)P - Ct(1)P] - [Ct(2)K - Ct(1)K]\}}$$

Ct(1) - hodnota Ct referenčního genu (ACTB)

Ct(2) - hodnota Ct genu pro MAP kinasy

Ct(1)K a Ct(2)K - hodnota kontrolního vzorku Ct(1) a Ct(2)

Ct(1)P a Ct(2)P - hodnota ovlivněného vzorku Ct(1) a Ct(2)

4.2.8. SDS-PAGE proteinů a immunoblotting

Metoda immunoblottingu kombinuje separační účinnost gelové elektroforesy se specifitou detekce na bázi vazby antigen-protilátka. Probíhá v několika krocích: separace proteinů elektroforézou v polyakryamidovém gelu za denaturujících podmínek (SDS-PAGE), přenosem rozdělených proteinů z gelu na PVDF (polyvinylidendifluoridovou) membránu (western blotting), blokováním nespecifických vazebných míst membrány, inkubací membrány se specifickou protilátkou (primární protilátkou), dále inkubací s druhou značenou

protilátkou (sekundární) proti imunoglobulinům zvířecího druhu primární protilátky a detekci specifických antigenů pomocí značení.

4.2.8.1. Příprava vzorku (lýza buněk)

Chemikálie:

- RIPA pufr
 - 50 mM TRIS-HCl
 - 1% Nonidet-40
 - 150 mM NaCl
 - 0,5% deoxycholát sodný
 - 0,1% SDS
- Protease inhibitor cocktail (Sigma)
- Halt[®] phosphatase inhibitor cocktail (Pierce)

V den zpracování byl čerstvě připraven lyzační RIPA pufr s inhibitory fosfatů a proteas (na každých 100 μ l RIPA pufru bylo počítáno 2,5 μ l protease inhibitor cocktail a 1 μ l Halt[®] phosphatase inhibitor cocktail). K buněčným peletám byl přidán lyzační pufr s inhibitory v množství 150 μ l na 10^7 buněk, vzorky byly důkladně vortexovány, propipetovány a ponechány na ledu po dobu 30 min s občasným vortexováním. Dále byly vzorky stočeny v předchlazené centrifuzě 25 min, 16 000 x g, 4 °C. Supernatant byl rozdělen po 40 μ l a zmrazen na -80 °C. 10 μ l bylo ponecháno na stanovení proteinů.

4.2.8.2. Stanovení proteinu metodou BCA

Metoda využívá kyseliny bicinchoninové (BCA) ke spektrofotometrickému stanovení celkových proteinů. Proteiny reagují s Cu^{2+} v alkalickém prostředí. Měď přechází na Cu^+ , která redukuje BCA za vzniku modrého zbarvení (562 nm). Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství bílkoviny.

Chemikálie:

- Roztok A
 - NaHCO_3
 - Na_2CO_3
 - BCA v 0,1 M NaOH
- Roztok B
 - 4% $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

- hovězí sérový albumin (BSA)
- destilovaná voda

Vzorky byly naředěny tak, aby byla koncentrace bílkovin v rozsahu 0,2-1 mg/ml (5x naředěný vzorek). Dále byl připraven pracovní roztok smícháním roztoku A a B v poměru 50:1. Do každé jamky na 96-jamkové mikrotitrační destičce bylo pipetováno 25 μ l naředěného vzorku nebo standardu BSA (0-1000 μ g/ml) (příprava viz tab. 1) a 200 μ l pracovního roztoku. Slepý vzorek obsahoval pouze činidlo a vodu. Všechny vzorky byly připraveny v triplicátech.

Tab. 1. Příprava standardů BSA ze zásobního roztoku o koncentraci 1 mg/ml.

c BSA (μ g/ml)	V BSA (μ l)	V H ₂ O (μ l)
0	0	25
200	5	20
400	10	15
600	15	10
800	20	5
1000	25	0

Destička byla protřepána na vortexu a inkubována 30 min při 37°C v suchém bloku. Absorbance byla změřena na spektrofotometru Tecan Genios. Od všech hodnot byla odečtena hodnota slepého vzorku. Na základě absorbancí standardů byla sestrojena kalibrační přímka a metodou lineární regrese byla vypočítána koncentrace bílkovin.

4.2.8.3. SDS-PAGE

Elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS) je elektromigrační metoda využívající pohybu nabitých částic v elektrickém poli. SDS se na proteiny váže v konstantním poměru, čímž jim udává jednotný záporný náboj. Po nanesení vzorku (proteinu) na gel a umístění gelu do elektrického pole, dochází k migraci proteinů ke kladné elektrodě (anodě) výlučně dle jejich molekulové hmotnosti (menší molekuly se pohybují rychleji).

Chemikálie:

- 5x vzorkový pufr
 - 0,3 M TRIS-HCl pH 6,8
 - 5% SDS

- 50% glycerol
- 2,5% β -merkaptoetanol
- 0,05% bromfenolová modř
- akrylamid (AA) - na 100 ml
 - 30 g akrylamidu
 - 0,8 g bis-akrylamidu
- 10% APS – 10 mg persíranu amonného na 100 μ l HPLC vody
- TEMED (tetrametyletylendiamin)
- 1 M TRIS-HCl pufr pH 8,8 – 100ml
 - 50 ml 2 M TRIS
 - 25 ml H₂O
 - 4M HCl – úprava pH na 8,8
- 1M TRIS-HCl pufr 6,8 – 100 ml
 - 50 ml 2 M TRIS
 - 25 ml H₂O
 - 4M HCl – úprava pH na 6,8
- 12% separační gel
 - 6 ml 30% AA
 - 5,51 ml 1M TRIS-HCl pH 8,8
 - 3,35 ml H₂O
 - 82 μ l 20% SDS
 - 50 μ l 10% APS
 - 10 μ l TEMED
- 5% zaostřovací gel
 - 1 ml 30% AA
 - 750 μ l 1M TRIS-HCl pH 6,8
 - 4,2 ml H₂O
 - 28,1 μ l 20% SDS
 - 30 μ l 10% APS
 - 6 μ l TEMED
- isobutanol
- marker molekulové hmotnosti (Sigma)
- 10x ELFO pufr

- 0,25 M TRIS
- 1,92 M glycin
- 1% SDS

Byla sestavena aparatura pro nalévání gelů, za použití spacerů o tloušťce 0,75 cm a hřebínků pro 10 jamek. Čerstvě připravený separační gel byl opatrně napipetován do výšky přibližně 4,5 cm, převrstven isobutanolem a ponechán polymerizovat 45 min. Po ztuhnutí separačního gelu byl isobutanol odsát filtračním papírem a nad separační gel byl nalit zaostřovací gel, zasunut hřebínek a polymerace proběhla dalších 30 min. Na sklech byla fixem vyznačena poloha jamek. Gely byly upevněny v elektroforetické aparatuře, do níž byl následně nalit 1x ELFO pufr a byly vytáhnuty hřebínky. Gely byly ekvilibrovány 30 min při 110 V. Do pufrů vypláchnutých jamek bylo napipetováno 15 μ l vzorků, které byly naředěny vzorkovým pufrům na koncentraci proteinu 3 μ g/ μ l a povařeny 5 min při 99°C. Jedna jamka obsahovala namísto vzorku 5 μ l denaturovaného markeru. Elektroforéza byla spuštěna na 100 V 20 min pak bylo napětí zvýšeno na 150 V. Elektroforéza byla ukončena v době, kdy barva vzorkového pufru dorazila na čelo gelu.

4.2.8.4. Diskontinuální semi-dry blotting

Tato metoda je založena na přenosu (z angl. „blotting“) proteinů z polyakrylamidového gelu na PVDF membránu. Přenos je umožněn díky blotovacímu zařízení, kdy dojde k přenosu proteinů z gelu na membránu působením elektrického pole. Semi-dry („polosuchý“) blotting je charakterizován minimální spotřebou pufrů, rychlostí a možností použití několika rozdílných pufrů v rámci jednoho transferu – diskontinuální blotting. Limitací je maximální molekulová hmotnost transferovaných proteinů okolo 150 kDa, větší proteiny se touto technikou transferují špatně.

Chemikálie:

- katodový pufr - 25 mM TRIS (pH 9,4)
- 40 mM ϵ -aminokapronová kyselina
- anodový pufr II - 0,3 M TRIS (pH 10,4)
- anodový pufr I - 25 mM TRIS (pH 10,4)
- metanol

Po ukončení elektroforézy byly gely přesunuty do katodového pufru, kde byly ekvilibrovány po dobu 15 min. Hydrofobní PVDF membrána (4,5 x 8 cm) byla ponořena na 1 min do 100% metanolu, propláchnuta destilovanou vodou a ekvilibrována v anodovém pufru II po dobu 10 min. Blotovací papíry (Whatman) nastříhané na 4,5 x 8 cm byly na 30 s ponořeny do katodového pufru (3x/blot), anodového pufru I (2x/blot) a anodového pufru I (1x/blot). Blotovací sendvič byl skládán zdola nahoru v následujícím pořadí: 2 x papír v anodovém pufru I, 1 x papír v anodovém pufru II, membrána, gel, a 3 x papír v katodovém pufru. Blotovací přístroj (TE 70 PWR, Amersham Biosciences) byl nastaven na 180 mA (pro dva sendviče blotované najednou) a doba transferu na 45 min. Po uplynutí této doby byly membrány řádně označeny, vysušeny na vzduchu (30 min) a skladovány v lednici po dobu max. 1 měsíce.

4.2.8.5. Blokování membrány a inkubace s protilátkami

Tato metoda je založena na detekci proteinů na základě interakce se specifickými protilátkami. Inkubace membrány byla prováděna specifickou primární protilátkou a s HRP-konjugovanou sekundární protilátkou (vše Cell Signaling Technology, USA).

Použité primární protilátky (vše králičího původu)

- anti-phospho-p38
- anti-p38
- anti-PARP
- anti-cleaved caspase 3
- anti- β -actin

HRP-konjugovaná sekundární protilátka (koží)

- anti-králičí IgG

Chemikálie

- 10x TBS
 - 25 mM TRIS
 - 150 mM NaCl
 - 2 mM KCl
 - pH 7,4

- 1x TBS-T - 50 ml 10x TBS
-2,5 ml 10% Tween-20
- doplnit HPLC vodou do 500 ml

100 ml blokovacího pufru bylo přefiltrováno přes filtrační papír a přidáno 500 μ l Tweenu-20. PVDF membrány s proteiny byly aktivovány metanolem a umístěny do 50 ml zkumavky tak, aby byly proteiny přístupné protilátkám. Za pokojové teploty byly blokovány s 15 ml blokovacího pufru po dobu 45 min na rolleru (rychlost 50). Po uplynutí této doby byly membrány 3 x promyty 20 ml TBS-T po dobu 5 min, při laboratorní teplotě. Dále byly 1 h inkubovány s roztokem příslušné primární protilátky 1:1000 v blokovacím pufru. Poté byly bloty 3 x promyty 5 min TBS-T a inkubovány 1 h, při laboratorní teplotě s příslušnou HRP-konjugovanou sekundární protilátkou 1:1000 (případně 1:2000) v blokovacím pufru. Poté byly membrány 3 x promyty ve 20 ml TBS-T po dobu 5 min a na závěr 1 x ve 20 ml TBS.

4.2.8.6. Chemiluminiscenční (ECL) detekce

Chemiluminiscenční ECL detekce je technika využívající reakci křenové peroxidasy (HRP) navázané na určitý antigen s luminolem obsaženým v ECL činidlech v přítomnosti zesilovače (enhanceru). Výsledkem je emise světelného kvanta, které je možné zachytit na filmu nebo CCD kamerou. Proti kolorimetrickým technikám detekce je ECL mnohem citlivější a navíc nezneškodňuje membránu, kterou je možné po odstranění protilátek použít k detekci jiného antigenu.

Chemikálie:

- SuperSignal[®] West Femto Maximum Sensitivity substrate (Pierce)

Chemiluminiscenční substrát byl čerstvě připraven smícháním roztoků A a B v poměru 1:1. Membrány byly inkubovány se substrátem po dobu 1 min, následně vloženy do folie a vyfoceny CCD kamerou (Fuji LAS 3000). Membrány byly typicky exponovány 30 s (s úpravami dle aktuální intenzity signálu). Obrázky byly uloženy v digitálním formátu a intenzita proužků následně vyhodnocena programem QuantiScan (Biosoft).

4.2.8.7. Odstranění protilátek z membrány

Chemikálie:

- TBS
- metanol
- HPLC voda
- Restore[®] Western Blot Stripping Buffer (Pierce)

Membrány po ECL detekci byly znovu aktivovány metanolem, promyty TBS a 10-20 min inkubovány s 10 ml stripovacího pufru na rolleru. Poté byly membrány promyty HPLC vodou a buďto ihned použity k detekci dalšího antigenu nebo vysušeny na vzduchu a uloženy v lednici pro další použití.

4.2.9. Statistické zpracování výsledků

Výsledky byly statisticky zpracovány pomocí programu SigmaStat (SPSS). Rozdíly mezi experimentálními skupinami byly hodnoceny testem ANOVA (Analysis of Variance), a to na hladině významnosti 0,05.

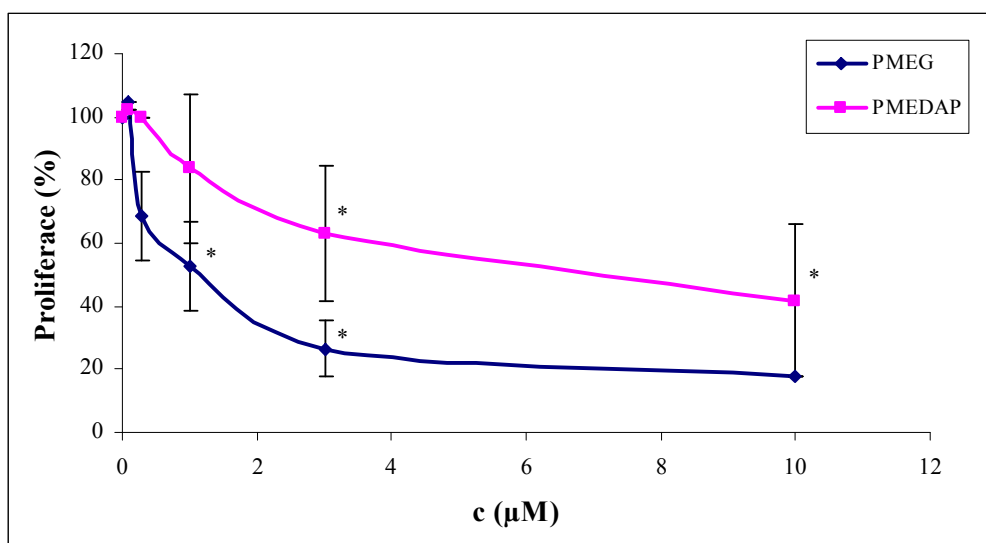
5. VÝSLEDKY

5.1. Stanovení antiproliferačních účinků PMEG a PMEDAP v buněčných liniích CCRF-CEM a HL-60

Látky PMEG a PMEDAP patří mezi cytostaticky účinné acyklické nukleosidfosfonáty. Inhibice buněčné proliferace se však může svým rozsahem i výrazně lišit v závislosti na buněčném typu a experimentálních podmínkách (zejména inkubačním čase). Proto bylo nejprve přikročeno v rámci optimalizačních experimentů ke stanovení antiproliferační aktivity PMEG a PMEDAP na buněčných liniích CCRF-CEM a HL-60, které byly zvoleny jako *in vitro* model pro tuto diplomovou práci.

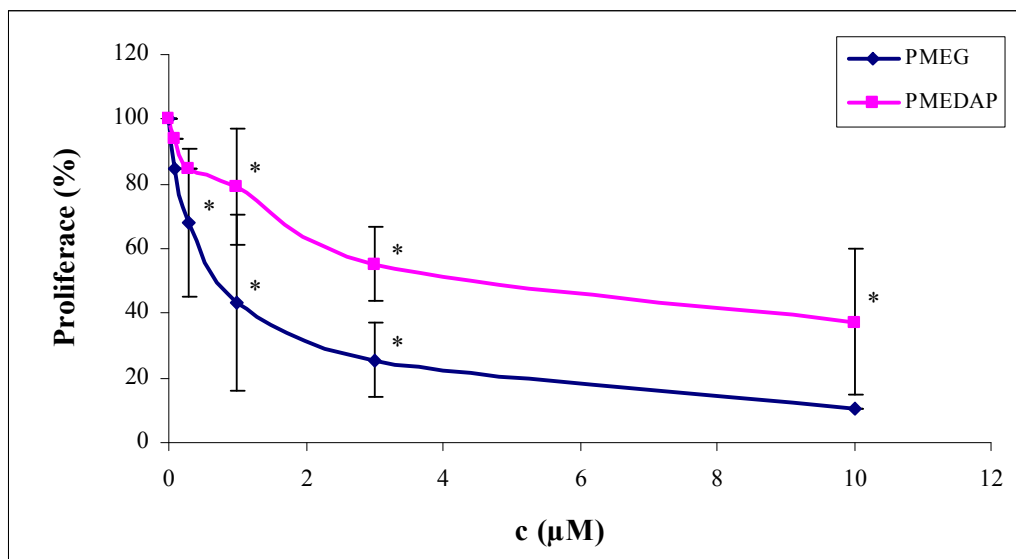
Bylo zjištěno, že po 72 h inkubace buněk s PMEG a PMEDAP je dosaženo výrazné inhibice proliferace, která vykazuje charakteristickou koncentrační závislost v rozmezí koncentrací 0,1- 10 μM . (obr. 3 a 4). Hodnoty IC_{50} pro PMEG byly stanoveny na 1 μM (CCRF-CEM) a 1 μM (HL-60) a hodnoty IC_{50} pro PMEDAP byly 6 μM (CCRF-CEM) a 5 μM (HL-60). Je tedy zjevné, že PMEG je cytostaticky účinnější než PMEDAP a účinek těchto látek se výrazně neliší v závislosti na použité linii.

Na základě zjištěných hodnot IC_{50} byly nastaveny optimální koncentrace látek pro následné experimenty, a to tak, že buňky CCRF-CEM a HL-60 byly vystaveny působení látky PMEG o koncentraci 0,3; 1 a 3 μM a látky PMEDAP o koncentraci 1; 3 a 10 μM .



Obr. 3. Inhibice proliferace buněk CCRF-CEM působením látek PMEG a PMEDAP.

Absolutní hodnoty napočítaných buněk byly vztaženy ke kontrolnímu (neovlivněnému) vzorku, kterému byla přiřazena hodnota 100 %. Vynesené hodnoty jsou průměrem z pěti opakování \pm směrodatná odchylka. * $P < 0,05$ statisticky signifikantní rozdíl proti kontrole (ANOVA).



Obr. 4. Inhibice proliferace buněk HL-60 působením látek PMEG a PMEDAP.

Absolutní hodnoty napočítaných buněk byly vztaženy ke kontrolnímu (neovlivněnému) vzorku, kterému byla přiřazena hodnota 100 %. Vynesené hodnoty jsou průměrem z pěti opakování \pm směrodatná odchylka. * $P < 0,05$ statisticky signifikantní rozdíl proti kontrole (ANOVA)

5.2. Vliv PMEG a PMEDAP na genovou expresi isoform p38-kinasy v buněčných liniích CCRF-CEM a HL-60

Jedním ze způsobů regulace buněčných dějů je regulace na úrovni transkripce, tj. zvýšením nebo naopak snížením přepisu daného genu do mRNA. Aby bylo zjištěno, zda je p38-kinasa regulována látkami PMEG a PMEDAP na této úrovni, bylo metodou real-time PCR sledováno množství transkriptu (mRNA) pro čtyři v současnosti identifikované geny kódující p38 MAP-kinasu – MAPK11 (p38 β), MAPK12 (p38 γ), MAPK13 (p38 δ) a MAPK14 (p38 α). Změny exprese genů pro jednotlivé isoformy p38 jsou uvedeny v tab. 2, 3, 4 a 5. Uvedené hodnoty jsou průměrem nejméně ze tří nezávislých experimentů \pm směrodatná odchylka. * $P < 0,05$, statisticky signifikantní rozdíl proti kontrole (ANOVA).

Látka PMEG měla nejvyšší vliv na isoformu p38 β a p38 γ v buněčné linii CCRF-CEM, kde exprese u nejvyšší koncentrace vzrostla až 2-3x (tab. 2 a 3). Statisticky významný vzestup exprese vlivem PMEG byl zaznamenán též pro isoformu p38 δ v buněčné linii HL-60 - s rostoucí koncentrací změna exprese stoupá (tab. 4). V linii HL-60 bylo dále pozorováno zvýšení exprese vlivem PMEG na isoformu p38 β v nejvyšší koncentraci (tab. 2). Signifikantní rozdíl byl také zjištěn u 1 μ M PMEDAP, který způsobil změnu exprese u isoformy p38 β v buněčné linii CCRF-CEM (tab. 2). Exprese u isoformy p38 α v obou buněčných liniích působením látek PMEG a PMEDAP téměř ve všech koncentracích klesla (tab. 5). Celkově měl PMEDAP menší účinek na expresi MAPK než PMEG. Efekt obou látek na CCRF-CEM a HL-60 buňky se mnohdy i zásadně liší a liší se i vliv na jednotlivé isoformy MAPK.

Tab. 2. Vliv PMEG a PMEDAP na expresi genu pro isoformu p38 β – MAPK11 v buněčných liniích CCRF-CEM a HL-60.

MAPK11	c (μ M)	Δ exprese _{prům} (%)
kontrola	0	100 \pm 0
CEM, PMEG	0.3	148 \pm 23
	1	203 \pm 32
	3	293 \pm 48*
CEM, PMEDAP	1	154 \pm 31*
	3	114 \pm 20
	10	96 \pm 15
HL-60, PMEG	0.3	77 \pm 4
	1	111 \pm 16
	3	171 \pm 58
HL-60, PMEDAP	1	73 \pm 8
	3	90 \pm 14
	10	120 \pm 57

Tab. 3. Vliv PMEG a PMEDAP na expresi genu pro isoformu p38 γ – MAPK12 v buněčných liniích CCRF-CEM a HL-60.

MAPK 12	c (μ M)	Δ exprese _{prům} (%)
kontrola	0	100 \pm 0
CEM, PMEG	0.3	113 \pm 21
	1	132 \pm 28
	3	212 \pm 12*
CEM, PMEDAP	1	104 \pm 13
	3	109 \pm 27
	10	74 \pm 4
HL-60, PMEG	0.3	79 \pm 12
	1	70 \pm 8
	3	65 \pm 11*
HL-60, PMEDAP	1	79 \pm 13
	3	58 \pm 20
	10	56 \pm 19

Tab. 4. Vliv PMEG a PMEDAP na expresi genu pro isoformu p38 δ – MAPK13 v buněčných liniích CCRF-CEM a HL-60.

MAPK 13	c (μ M)	Δ exprese _{prům} (%)
kontrola	0	100 \pm 0
CEM, PMEG	0.3	112 \pm 8
	1	111 \pm 11
	3	83 \pm 11
CEM, PMEDAP	1	95 \pm 17
	3	92 \pm 11
	10	67 \pm 7
HL-60, PMEG	0.3	108 \pm 12
	1	142 \pm 6
	3	156 \pm 21*
HL-60, PMEDAP	1	95 \pm 11
	3	121 \pm 20
	10	118 \pm 48

Tab. 5. Vliv PMEG a PMEDAP na expresi genu pro isoformu p38 α – MAPK14 v buněčných liniích CCRF-CEM a HL-60.

MAPK 14	c (μ M)	Δ exprese _{prům} (%)
kontrola	0	100 \pm 0
CEM, PMEG	0.3	95 \pm 15
	1	69 \pm 3*
	3	38 \pm 15*
CEM, PMEDAP	1	95 \pm 14
	3	81 \pm 4
	10	45 \pm 10*
HL-60, PMEG	0.3	78 \pm 9
	1	102 \pm 17
	3	78 \pm 36
HL-60, PMEDAP	1	84 \pm 22
	3	73 \pm 19
	10	44 \pm 24*

5.3. Vliv PMEG a PMEDAP na expresi celkové a fosforylované p38-kinasy v buněčných liniích CCRF-CEM a HL-60 na úrovni proteinu

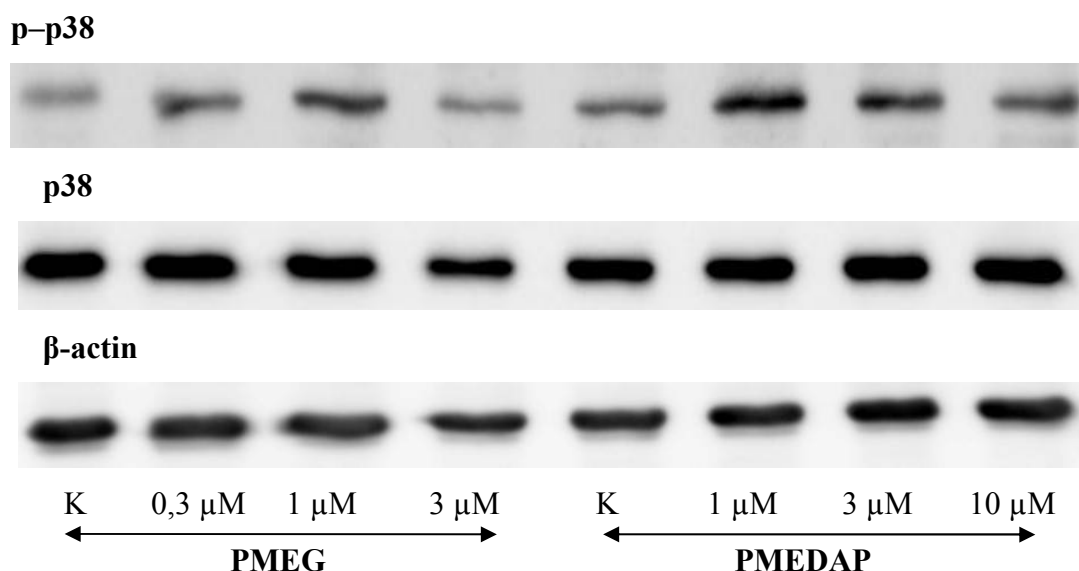
Rozdíly v expresi genu na úrovni mRNA automaticky nezaručují, že se ve stejném rozsahu promítnou do exprese výsledného proteinu (vliv posttranskripčních úprav, translace). Proto byla provedena série pokusů, kdy byla sledována změna exprese celkové p38-MAPK na proteinové úrovni metodou přenosu za účelem potvrzení dat získaných v předchozím experimentu (real-time PCR). Koncentrace PMEG a PMEDAP a inkubační podmínky byly stejné jako v předešlých pokusech. Dále byla pomocí specifické protilátky proti fosforylované formě p38-MAPK sledována aktivace p38-MAP-kinasové dráhy. Regulace aktivity p38-MAP-kinasy fosforylací/defosforylací představuje další způsob jejího ovlivnění zcela nezávisle na množství celkového proteinu.

Obě protilátky proti celkové a fosforylované p38-MAPK reagovaly s příslušným antigenem o molekulové hmotnosti 43 kDa (obr. 5 a 10). Množství proteinu pak bylo stanoveno densitometrickou analýzou příslušných blotů pomocí programu QuantiScan. Kontrole (K) byla přiřazena hodnota 100 % a k ní byly vztaženy hodnoty ostatních vzorků.

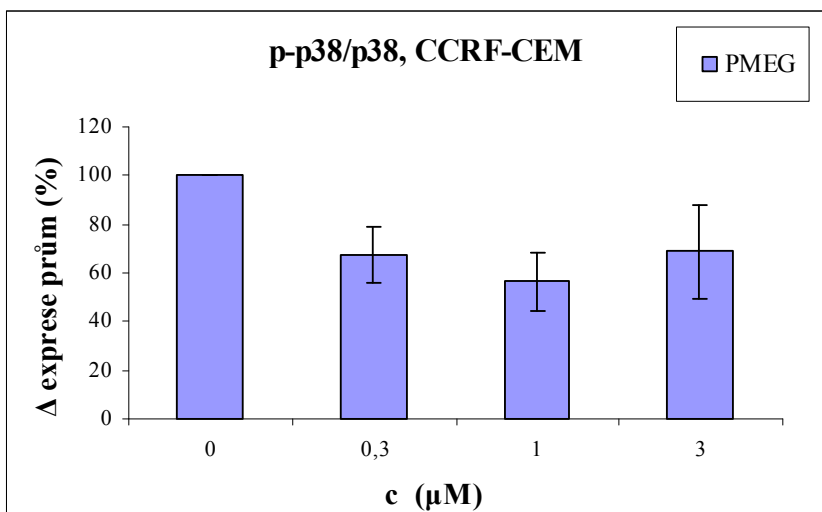
Množství proteinu bylo normalizováno na β -actin (47 kDa). Aktivace p38-MAP-kinasové dráhy je vyjádřena jako poměr fosforylované a celkové p38 MAPK (p-p38/p38).

Výsledky změn exprese celkové p38 jsou shrnuty na obr. 8, 9, 13 a 14. Ani v jednom případě nebyl zjištěn signifikantní rozdíl mezi kontrolním vzorkem a vzorky ovlivněnými PMEG a PMEDAP, nezávisle na použité buněčné linii. Nepotvrdil se tedy předpoklad, že PMEG a PMEDAP zvyšují množství celkového proteinu pro p38-kinasu, jak naznačovaly výsledky získané na úrovni mRNA. Statisticky významné nebyly ani změny ve fosforylaci p38 (obr. 6,7,11,12). Zdá se tedy, že PMEG ani PMEDAP p38-MAP-kinasovou dráhu neaktivují.

CCRF-CEM

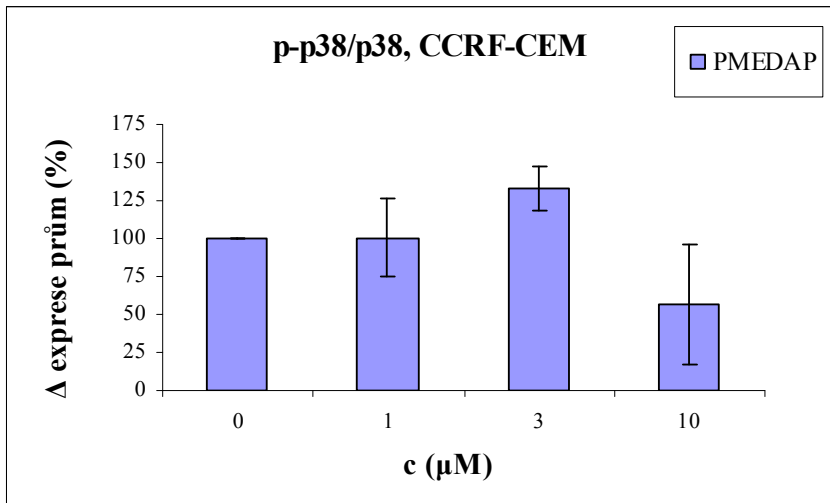


Obr. 5. Imunodetekce fosforylované a celkové p38-kinasy v buňkách CCRF-CEM (reprezentativní blot ze 3 provedených). p-p38 - fosforylovaná p38-kinasa, p38 - celková p38-kinasa a K - kontrola.

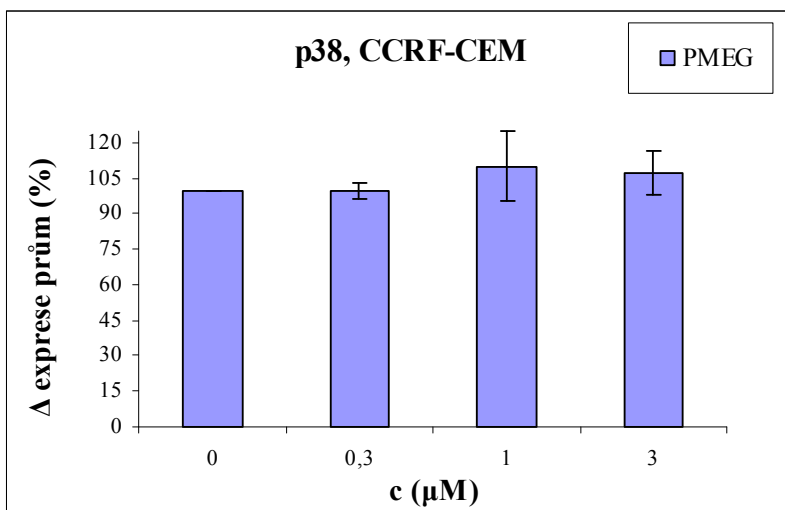


Obr. 6. Aktivace p38-kinasy působením látky PMEG v buňkách CCRF-CEM.

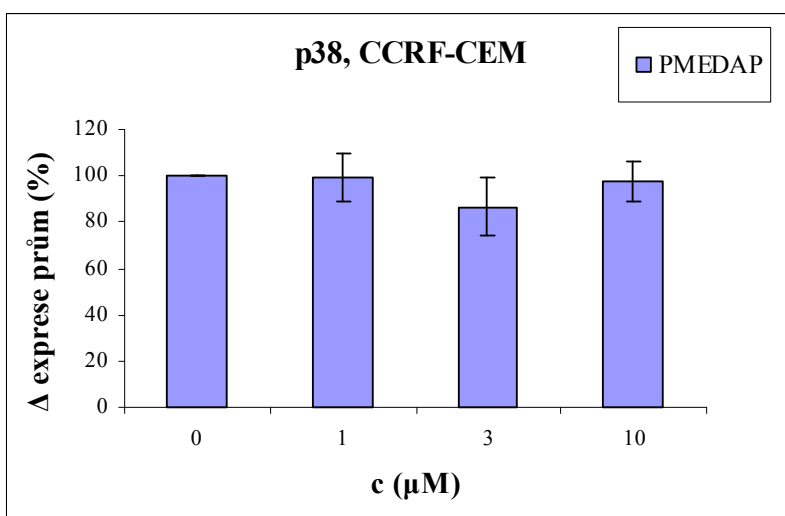
Poměr p-p38/p38 je průměrem ze tří pokusů ± směrodatná odchylka. * $P < 0,5$ statisticky signifikantní rozdíl proti kontrole (ANOVA). p-p38 - fosforylovaná p38-kinasa, p38 - celková p38-kinasa.



Obr. 7. Aktivace p38-kinasy působením látky PMEDAP v buňkách CCRF-CEM. Hodnoty jsou průměrem ze tří pokusů ± směrodatná odchylka. p-p38 je fosforylovaná p38-kinasa a p38 je celková p38-kinasa.



Obr. 8. Vliv PMEG na expresi p38-kinasy na úrovni proteinu v buněčné linii CCRF-CEM. Hodnoty jsou průměrem ze tří pokusů ± směrodatná odchylka a jsou normalizovány na β -actin.



Obr. 9. Vliv PMEDAP na expresi p38-kinasy na úrovni proteinu v buněčné linii CCRF-CEM. Hodnoty jsou průměrem ze tří pokusů ± směrodatná odchylka a jsou normalizovány na β -aktin.

HL-60

p-p38



p38

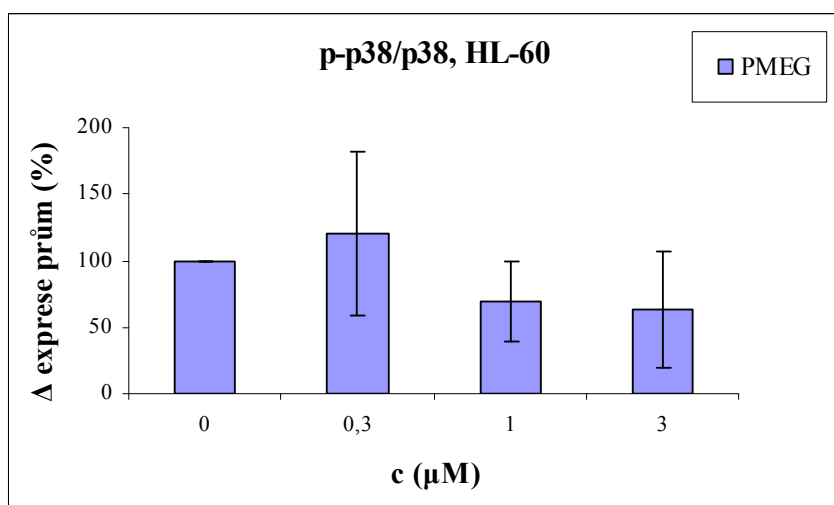


β-actin



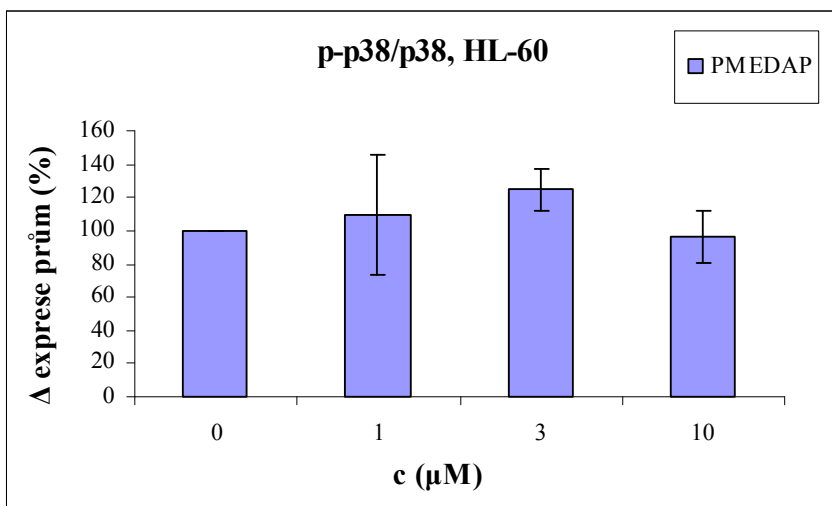
K 0,3 μM 1 μM 3 μM K 1 μM 3 μM 10 μM
← PMEG PMEDAP →

Obr. 10. Imunodetekce fosforylované a celkové p38-kinasy v buňkách HL-60 (reprezentativní blot ze 3 provedených). p-p38 - fosforylovaná p38-kinasa, p38 - celková p38-kinasa, K - kontrola.

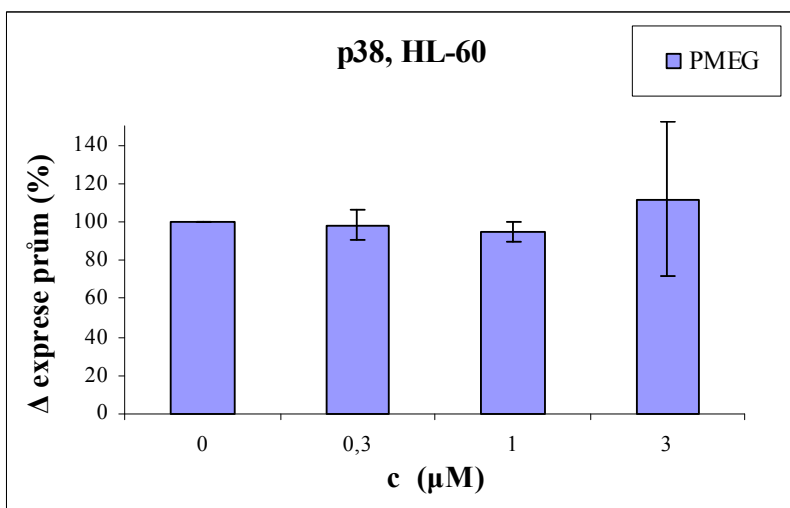


Obr. 11. Aktivace p38-kinasy působením látky PMEG v buňkách HL-60.

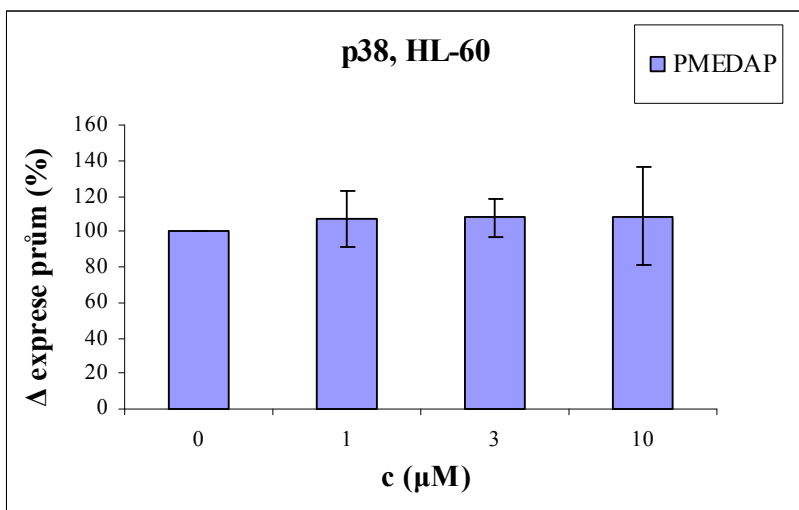
Hodnoty jsou průměrem ze tří pokusů ± směrodatná odchylka. p-p38 - fosforylovaná p38-kinasa, p38 - celková p38-kinasa.



Obr. 12. Aktivace p38-kinasy působením látky PMEDAP v buňkách HL-60. Hodnoty jsou průměrem ze tří pokusů ± směrodatná odchylka. -p38 - fosforylovaná p38-kinasa, p38 – celková p38 kinasa.



Obr. 13. Vliv PMEG a na expresi p38-kinasy na úrovni proteinu v buněčné linii HL-60. Hodnoty jsou průměrem ze tří pokusů ± směrodatná odchylka a jsou normalizovány na β-aktin. p38 je celková p38-kinasa.



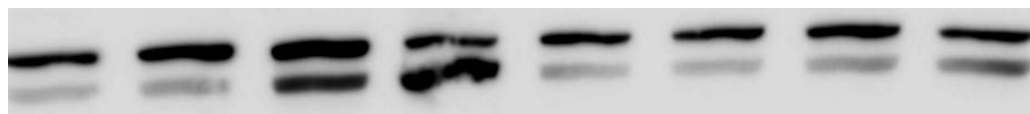
Obr. 14. Vliv PMEDAP a na expresi p38-kinasy na úrovni proteinu v buněčné linii HL-60. Hodnoty jsou průměrem ze tří pokusů ± směrodatná odchylka a jsou normalizovány na β -aktin. .

5.4. Apoptotické účinky PMEG a PMEDAP v buněčných liniích CCRF-CEM a HL-60

Kaspasa 3 a PARP jsou běžně používané markery apoptosy. Za podmínek apoptosy dochází ke štěpení jejich proenzymů a následné aktivaci. Použitím protilátek proti aktivovaným formám kaspasy 3 a PARP je možné usuzovat na průběh apoptosy ve vzorcích. Protilátka proti PARP reagovala s antigenem o molekulové hmotnosti 116 kDa (neštěpená forma) a 89 kDa (aktivovaná forma) (obr 15). Aktivace enzymu kaspasy 3 byla sledována pomocí protilátky reagující s antigenem o molekulové hmotnosti 17 kDa, který odpovídá štěpené (aktivované) kaspase 3 (obr. 15 a 16). Referenční kontrolou byl v obou případech β -actin (47 kDa). Z obrázku 15 a 16 lze však vyčíst, že látka PMEG navodila apoptosu výrazněji než látka PMEDAP, a to v obou buněčných liniích. 1 μ M a 3 μ M koncentrace látky aktivovala enzymy PARP i kaspasu 3 v buněčné linii CCRF-CEM (obr. 15) a 3 μ M koncentrace aktivovala kaspasu 3 v buněčné linii HL-60 (obr. 16). U nejvyšší koncentrace látky PMEDAP byla také pozorována zvýšená aktivita obou enzymů v buněčné linii CCRF-CEM (obr. 15). Tyto experimenty nebyly předmětem statistického hodnocení, neboť byly prozatím provedeny pouze jednou.

CCRF-CEM

Cl-PARP, PARP



Cl-Caspase 3



β -actin



K 0,3 μ M 1 μ M 3 μ M K 1 μ M 3 μ M 10 μ M
←----- PMEG -----> ←----- PMEDAP ----->

Obr. 15. Imunodetekce štěpené kaspasy 3 a PARP v buňkách CCRF-CEM. Cl-PARP - štěpený PARP, Cl-Caspase 3 - štěpená kaspasa 3, K - kontrola.

HL-60

Cl-Caspase 3



β -actin



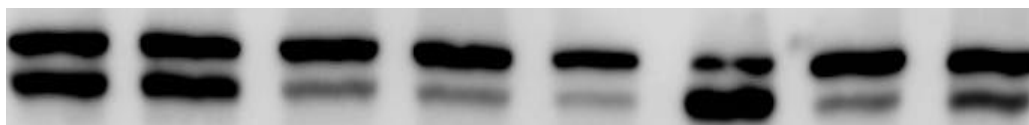
K 0,3 μ M 1 μ M 3 μ M K 1 μ M 3 μ M 10 μ M
←----- PMEG -----> ←----- PMEDAP ----->

Obr. 16. Imunodetekce štěpené kaspasy 3 v buňkách HL-60. Cl-Caspase 3 - štěpená kaspasa 3, K - kontrola.

5.4.1. Vliv inhibice p38-MAP-kinasové dráhy na apoptosu navozenou PMEG a PMEDAP v buněčné linii CCRF-CEM

V závěrečném pokusu jsme se pokusili definovat roli p38-MAP-kinasové dráhy v apoptose navozené PMEG a PMEDAP. Za tímto účelem byl použit specifický inhibitor p38 SB203580 enzymu, který byl přidán v buněčné kultuře k látkám PMEG (3 μ M) a PMEDAP (10 μ M). Byly použity dvě různé koncentrace inhibitoru - 5 μ M a 10 μ M. V těchto koncentracích nebyl inhibitor pro buňky sám o sobě toxický. Po 72 h inkubace byla stanovena apoptosa detekcí aktivované kaspasy 3 a PARP. Jako vnitřní standard posloužil opět β -aktin (obr. 17). Tento pokus byl rovněž proveden pouze jednou a pouze na jednom typu buněk, proto je předčasné dělat závěry, nicméně výsledky naznačují, že inhibicí p38 MAPK je možné alespoň částečně zvrátit apoptosu navozenou PMEG a PMEDAP a že se tedy p38-MAP-kinasové dráha účastní v mechanismu účinku těchto látek. Potvrzení tohoto nálezu bude úkolem pro další fáze projektu.

PARP



Cl-Caspase3



β -actin



3 μ M+5I 3 μ M+10I 10 μ M+5I 10 μ M+10I K 3 μ M K 10 μ M
←-----→ ←-----→ ←-----→ ←-----→ ←-----→ ←-----→
PMEG PMEDAP PMEG PMEDAP

Obr. 17 Imunodetekce štěpené kaspasy 3 a PARP s inhibitory v buňkách CCRF-CEM. Cl-PARP - štěpený PARP, Cl-Caspase3 - štěpená kaspasa 3, K - kontrola, 5I- 5 μ M SB203580, 10I - 10 μ M SB203580.

6. DISKUSE

Acyklické nukleosidfosfonáty představují klinicky významnou skupinu nukleotidových analogů vyvinutých Prof. Holým na Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky (ÚOCHB AV ČR). Doposud byla pozornost odborné veřejnosti věnována převážně jejím protivirovým účinkům a do humánní terapie byly zatím nukleosidfosfonátové analogy uvedeny výlučně v indikaci léčby virových infekcí [54, 4, 55]. Výzkum a vývoj nových cytostatik na této strukturní bázi byl poněkud upozaděn. Momentálně je ve fázi klinického testování protinádorových účinků jediný preparát – GS-9219, jež je dvojitým proléčivem guaninového analogu PMEG a je cílen na terapii Non-Hodgkinova lymfomu a chronické lymfocytární leukemie [27, 28, 29].

Je známo, že cytotoxické účinky acyklických nukleosidfosfonátů jsou podmíněny transportem do buňky, metabolickou aktivací (fosforylací), inkorporací do DNA s následným zastavením její replikace. K tomu dochází terminací syntézy nově vznikajícího řetězce v důsledku absence 3'-OH skupiny a/nebo interakcí s buněčnými DNA-polymerasami [23]. Dochází k zástavě buněčného cyklus v S-fázi [6] a při dostatečné koncentraci látky též k apoptose [56]. Buněčná signalizace, která zprostředkovává buněčnou smrt vyvolanou ANP je však prozkoumána jen velmi málo.

V poslední době se ukazuje, že jedním z důležitých mediátorů apoptosy vyvolané stresovými stimuly je MAP-kinasová rodina proteinkinas p38 a JNK a p38 jsou důležité mediátory apoptosy vyvolané stresovými stimuly [57]. Jejich aktivátory mohou být také chemoterapeutická léčiva, jako jsou např. vinkristin, vinblastin, taxol, cisplatina nebo doxorubicin [49], ale také látky nukleosidového typu např. fludarabin [58]. Acyklické nukleosidfosfonáty nebyly dosud v souvislosti s MAP kinasovou signalizací studovány. Cílem této práce proto bylo na vybraných zástupcích ANP s cytotoxickým účinkem popsat jejich interakci s MAP-kinasou p38 v leukemických buňkách a zjistit roli této signální cesty v jejich schopnosti indukovat apoptosu. Jako modelové látky byly zvoleny PMEG a PMEDAP. Jak již bylo řečeno výše, PMEG je účinnou látkou potenciálního cytostatika GS-9219 a je jedním z nejúčinnějších ANP v *in vitro* testech cytotoxicity. Strukturně podobný PMEDAP, lišící se pouze jednou aminoskupinou v poloze 2 purinového kruhu, naproti tomu vykazoval výjimečné protinádorové účinky *in vivo* na potkaním modelu [59, 60]. Obě tyto látky lze proto považovat za nadějná budoucí léčiva. Jako model pro tuto práci byly zvoleny buněčné linie – T-lymfoblastická CCRF-CEM a myeloidní HL-60.

Prvotním stimulem k analýze vlivu PMEG a PMEDAP na p38 signalizaci byly výsledky získané profilací genové exprese MAP-kinas technologií PCR arrayů (RT² Profiler PCR arrays – MAP kinase signaling pathway, SABiosciences, USA). V tomto pilotním experimentu, který není součástí této diplomové práce a který byl proveden s fixní koncentrací PMEG (1 μ M) v čase 72 h bylo zjištěno, že PMEG ovlivňuje expresi mRNA některých isoform p38 kinasy, zatímco exprese ERK a JNK-kinasy ovlivněna není (nepublikovaná pozorování). Jedním z prvních cílů této práce bylo tyto výsledky zopakovat a rozšířit – stanovit závislost na koncentraci, použité buněčné linii, typu látky. Byly použity koncentrační řady PMEG a PMEDAP, které se odvíjely od příslušných hodnot IC₅₀ v testu buněčné proliferace. Vzestup exprese mRNA byl pozorován u dvou isoform p38 (MAPK11 = p38 β , MAPK12 = p38 γ) v buňkách CCRF-CEM působením látky PMEG, čímž se potvrdily předchozí nálezy. S rostoucí koncentrací látky PMEG změna exprese obecně spíše stoupá. PMEG způsobil mírný vzrůst exprese u isoform p38 β a p38 δ i v buňkách HL-60. U isoformy p38 γ však v této linii došlo naopak ke snížení exprese. U isoformy p38 α byla exprese u ovlivněných buněk vždy snížena. V porovnání s PMEG byly změny exprese p38-MAPK navozené PMEDAP poněkud mírnější, a to v obou sledovaných buněčných liniích.

Dalším krokem bylo zjistit, zda se změny v množství mRNA pro p38-MAPK projeví na proteinové úrovni a jakým způsobem. Byla použita protilátka, která reaguje se všemi isoformami p38 kromě p38 α . Překvapivě nebyly nalezeny rozdíly v množství celkového proteinu p38-MAPK, což si můžeme vysvětlit dalšími úpravami primárního transkriptu v buňce a/nebo korekcí na úrovni translace. Dále je možné, že up-regulace některých isoform MAPK na jedné straně a down-regulace jiných isoform MAPK na straně druhé se ve výsledku vyruší. Celkově se zdá, že i přes zvýšení exprese mRNA pro p38-MAPK vlivem PMEG a PMEDAP, nemá transkripční regulace těchto genů pro mechanismus účinku těchto látek zásadní význam.

Vzhledem k tomu, že proteinkinasy jsou již ze své podstaty regulovány převážně fosforylací a defosforylací nadřazenými kinasami, nabízí se dále možnost ovlivnění katalytické aktivity p38 vlivem PMEG a PMEDAP nezávisle na množství celkového proteinu. p38-kinasa je fosforylována MAP-kinasou (MAPKK) na Thr-180 a Tyr-182. Jako marker katalytické aktivity p38 byla proto použita protilátka, která detekuje p38-kinasu pouze pokud je fosforylována na těchto aminokyselinách. Výsledky však neukázaly signifikantní aktivaci ani potlačení aktivace p38-kinasové dráhy účinkem PMEG nebo PMEDAP. Jelikož všechny experimenty byly prováděny ve fixním čase 72 h a aktivace/deaktivace MAP-kinas může být poměrně rychlý a reverzibilní děj, bylo by jistě

zajímavé sledovat i aktivaci p38-kinasy v závislosti na čase. Tento úkol bude předmětem dalšího zkoumání.

Posledním cílem, který byl pro tuto práci stanoven bylo alespoň předběžně zjistit, zda existuje přímá souvislost mezi p38-kinasou a apoptosou indukovanou PMEG a PMEDAP. Nejprve byly stanoveny apoptotické účinky látek samotných pomocí aktivace PARP a exekutivní kaspasy 3. Bylo potvrzeno, že k indukci apoptosy dochází v závislosti na koncentraci látek a apoptotický účinek PMEG je silnější než efekt PMEDAP. Dále byly buňky koinkubovány se specifickým inhibítor p38-kinasy SB 203580 a PMEG nebo PMEDAP a byl sledován vliv inhibitoru na rozsah apoptosy. Bylo zjištěno, že apoptosu nelze inhibítor p38-MAPK zcela zablokovat, ale lze snížit její rozsah. To naznačuje, že apoptosa indukovaná PMEG a PMEDAP by mohla být zčásti spojená s aktivací p38-kinasové dráhy, což je v souladu s již popsanou rolí p38-MAPK v apoptose indukované nukleosidovým analogem gemcitabinem v pankreatických nádorových buňkách [50, 61]. Tato poslední pozorování je nutné chápat jako předběžná, protože zatím nebyl proveden dostatečný počet opakování, který by umožnil statistické vyhodnocení. To bude cílem navazujících experimentů. Kromě p38-MAP-kinasy bude sledována rovněž aktivace ostatních MAP-kinas (ERK, JNK) a proteinkinasy B (PKB/Akt) a kromě závislosti na koncentraci PMEG a PMEDAP bude hodnocen i časový průběh těchto dějů.

7. ZÁVĚR

Pochopení mechanismu účinku nově vyvíjených léčiv na molekulární úrovni je nezbytným předpokladem jejich úspěšného dovedení do klinické praxe. Tato práce si kladla za cíl přispět k objasnění interakcí potenciálních cytostatik ze skupiny acyklických nukleosidfosfonátů PMEG a PMEDAP s p38-MAP-kinasovou signální dráhou na modelu nádorových buněčných linií. Provedená studie, předkládaná v této diplomové práci ukázala, že:

1. PMEG a PMEDAP inhibují proliferaci buněčných linií CCRF-CEM a HL-60. Hodnota IC_{50} pro PMEG byla stanovena na 1 μM u obou buněčných linií a hodnota IC_{50} pro PMEDAP byla stanovena na 6 μM pro CCRF-CEM a na 5 μM pro HL-60. PMEG je tedy cytostaticky účinnější než PMEDAP a účinek těchto látek se výrazně neliší v závislosti na použité linii.
2. PMEG má největší vliv na isoformy p38-kinasy - β , γ v buněčné linii CCRF-CEM (změna exprese stoupá) a na isoformy β , δ v buněčné linii HL-60. V porovnání s PMEG byly změny exprese p38-MAPK navozené PMEDAP mírnější a to v obou sledovaných buněčných liniích.
3. PMEG a PMEDAP nezvyšují celkové množství proteinu pro p38-kinasu v obou buněčných liniích.
4. PMEG a PMEDAP neaktivují ani nepotlačují aktivaci kinasové dráhy v obou buněčných liniích.
5. PMEG a PMEDAP aktivují PARP a kaspasu 3 v závislosti na jejich koncentraci. PMEG má silnější apoptotické účinky než PMEDAP.
6. Apoptosu navozenou PMEG a PMEDAP nelze inhibítorem p38-MAPK zcela zablokovat, ale lze snížit její rozsah. To naznačuje, že p38-MAP-kinasové dráha se účastní v mechanismu účinku těchto látek .

8. SEZNAM ZKRATEK

- AZT – azidothymidin
- ANP – acyklické nukleosidfosfonáty
- DHPA – (*S*)-9(2,3-dihydroxypropyl)adenin
- HPMPA – (*S*)-9-(3-hydroxy-2-fosfonometoxypropyl)adenin
- PMEG – 9-(2-fosfonylmetoxyetyl)guanin
- PMEDAP – 9-(fosfonometoxyetyl)-2,6-diaminopurin
- MAP-kinasa – mitogeny aktivovaná protein-kinasa
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- DNasa - deoxyribonukleasa
- RNA – ribonukleová kyselina
- PAA – fosfonoacetylová kyselina
- GMP-kinasa – guanosinmonofosfátkinasa, guanylátkinasa
- AMP-kinasa – adenosinmonofosfátkinasa, adenylátkinasa
- ANPp – monofosfát acyklického nukleosidfosfonátu
- ANPpp – difosfát acyklického nukleosidfosfonátu
- HSV – herpes simplex virus
- CMV – cytomegalovirus
- HIV – virus lidského imunodeficitu
- PME A – 9-(2-fosfonometoxyetyl)adenin
- PMPA - [9-(2-fosfonometoxyetyl)adenin
- HPMP C – (*S*)-1-(3-hydroxy-2-fosfonometoxypropyl)cytosin
- SIV – virus opičího imunodeficitu
- FIV – virus kočičího imunodeficitu
- MLV – Moloneyho leukemický virus
- FLV – Friendův leukemický virus
- MCMV – myší cytomegalovirus
- HPV – lidský papilomavirus
- P388 – myší lymfoblastická leukemie
- K562 – lidská erytroleukemie

- NPC – leukemie nosohltanu
- L1210 – myši leukemie
- RCHO – choriokarcinom
- MOLT-4 – lidská T-lymfoblastická leukemie
- HL-60 – lidská myeloidní leukemie
- ML-1 – leukemická folikulární thyreoidní buněčná linie
- CCRF-CEM – lidská T-lymfoblastická leukemie
- SD-potkan – Sprague-Dawley potkan
- dATP – deoxyadenosin-5'-trifosfát
- dGTP – deoxyguanosin-5'-trifosfát
- PMEGp – PMEG-fosfát
- PMEGpp – PMEG-difosfát
- PMEDAPp – PMEDAP-fosfát
- PMEDAPpp – PMEDAP-difosfát
- Cpr-PMEDAP – 9-(2-fosfonometoxyetyl)- N^6 -cyklopropyl-2,6-diaminopurin
- DAP – diaminopurin
- GS-9191 – L-fenylalanin, N,N-[[[2-[2-amino-6-(cyklopropylamino)-9H-purin-9-yl]etoxy]metyl]fosfínylidén]bis-, bis(2-metylpropyl)ester
- GS-9219 – diethyl N,N'-[({2-[2-amino-6-(cyklopropylamino)-9H-purin-9-yl]etoxy}metyl)fosfínylidén]di-L-alaninát
- NHL – Non-Hodgkinův lymfom
- ERK – extracellular signal-regulated-kinase
- JNK – c-Jun NH2-terminal kinase
- SAPK - stress-activated protein kinase
- TAB1 – transforming growth factor- β -activated protein kinase 1 (TAK)-binding protein
- TGF- β – transforming growth factor- β
- TRAF – tumor necrosis factor receptor-associated factor
- TNFR – tumor necrosis factor receptor
- ASK1 – apoptosis signal-regulating kinase-1
- DAXX – a death-domain-associated protein
- GADD – growth arrest and DNA damage-inducible

- PAK – P21-activated kinases
- MLK – mixed-lineage kinase
- MAPKAP K2 – MAP-kinase-activated protein kinase 2
- HSP – heat shock protein
- LSP – lymfocytární specifický protein
- PRAK – p38-regulated/activated protein kinase
- MNK1 – MAP kinase-interacting kinase
- eIF – eukaryotní iniciační faktor
- CREB – cAMP responsive element binding protein
- ATF – aktivační transkripční faktor
- ANF – atrial natriuretic factor
- MEF – myocyte enhancer factor
- CHOP – C/EBP homologní protein
- PARP – poly(ADP-ribose)polymerasa
- TRAIL – TNF-related apoptosis inducing ligand
- BCL – B-cell lymphoma protein
- CPEC – cyklopentenylcytosin
- siRNA – short interfering RNA
- PVDF – polyvinylidendifluorid
- SB203580 – (4-(4-fluorofenyl)-2-(4-metylsulfinylfenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazol)
- PBS – phosphate buffered saline
- PCR – polymerázová řetězová reakce
- ACTB – gen pro β -aktin
- SDS – dodecylsulfát sodný
- BCA – kyselina bicinchoninová
- TRIS – 2-amino-2hydroxymetylpropan
- TEMED – tetrametyletylendiamin
- AA – akrylamid
- APS – persíran amonný
- HPLC – high-performance liquid chromatography
- p-p38 – fosforylovaná p38 kinasa
- p38 – celková p38 kinasa

- K – kontrola
- Cl-PARP – štěpený PARP
- Cl-Caspase 3 – štěpená kaspasa 3

9. REFERENCE

1. King, D.H.: *J Am Acad. Dermatol.* 18, 176-179 (1988)
2. Marec, F., Gelbič, I.: *Mutat. Res.* 311, 305-317 (1994)
3. De Clercq, E.: *Antivir. Res.* 75, 1-13 (2007)
4. Erik De Clercq a A. Holý: *Nature* 4, 928-940, (2005)
5. Hatse, S., Schols, D., De Clercq, E., Balzarini, J.: *Cell Growth Differ.* 10, 435-446 (1999)
6. Hatse, S., Naesens, L., De Clercq, E., Balzarini, J.: *Biochem. Pharmacol.* 56, 851-859 (1998)
7. Muroso, S., Raab-Traub, N., Pagano, J.S.: *Can. Res.* 61, 7875-7877 (2001)
8. Andrei, G., Snoeck, R., Piette, J., Delvenne, P., De Clercq, E.: *Oncol. Res.* 10, 533-539 (1998)
9. Liekens, S., Andrei, G., Vandeputte, M., De Clercq, E., Neyts, J.: *Cancer Res.* 58, 2562-2567 (1998)
10. Liekens, S., Verbeken, E., De Clercq, E., Neyts, J.: *Int. J. Cancer* 92, 161-167 (2001)
11. De Clercq, E., Sakuma, T., Baba, M., Pauwels, R., Balzarini, J., Rosenberg, I., Holý, A.: *Antivir. Res.* 8, 261-272 (1987)
12. Naesens, L., Neyts, J., Balzarini, J., Holý, A., Rosenberg, I., De Clercq, E.: *J. Med. Vir.* 39, 167-172 (1993)
13. Krieder, J.W., Balogh, K., Olson, R.O., Martin, J.C.: *Antivir. Res.* 14, 51-58 (1990)
14. Yu, K.L., Bronson, J.J., Yang, H., Patick, A., Alam, M., Brankovan, V., Datema, R., Hitchcock, M.J., Martin, J.C.: *J. Med. Chem.* 35, 2958-69 (1992)
15. Rose, W.C., Crosswell, A.R., Bronson, J.J., Martin, J.C.: *J. Nat. Cancer Inst.* 82, 510-512 (1990)
16. Hatse, S., Naesens, L., De Clercq, E., Balzarini, J.: *Biochem. Pharmacol.* 58, 311-323 (1999)
17. Franek, F., Holy, A., Votruba, I., Eckschlager, T.: *Int. J. Oncol.* 14, 745-52 (1999)
18. Veselý, J., Merta, A., Votruba, I., Rosenberg, I., Holý, A.: *Neoplasma* 37, 105-110 (1990)
19. Bobková, K., Otová, B., Marinov, I., Mandys, V., Panczak, A., Votruba, I., Holý, A.: *Anticancer Res.* 20, 1041-1047 (2000)

20. Otová, B., Francová, K., Franěk, F., Koutník, P., Votruba, I., Holý, A., Sladká, M., Schramlová, J.: *Anticancer Res.* 19, 3173-3182 (1999)
21. Kramata, P., Downey, K.M., Paborsky, L.R.: *J. Biol. Chem.* 273, 21966-21971 (1998)
22. Kramata P., Votruba, I., Otová, B., Holý, A.: *Mol. Pharm.* 49, 1005-1011 (1996)
23. Compton, M.L., Toole J.J., Paborsky, L.R.: *Biochem. Pharmacol.* 58, 709–714 (1999)
24. Schinkmanová, M., Votruba, I., Shibata, R., Han, B., Liu, X., Cihlar, T., Holý, A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 73, 275-291 (2008)
25. Hatse, S., Naesens, L., De Clercq, E., Balzarini, J.: *Biochem. Pharmacol.* 58, 311–323 (1999)
26. Wolfgang, G.H.I., Shibata, R., Wang, J., Ray, A.S., Wu, S., Doerrfler, E., Reiser, H., Lee, W.A., Birkus, G., Christensen, N.D., Andrei, G., Snoeck, R.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 2777–2784 (2009)
27. Reiser, H., Wang, J., Chong, L., W., Watkins, J., Ray, A.S., Shibata, R., Birkus, G., Cihlar, T., Wu, S., Li, B., Liu, X., Henne, I. N., Wolfgang, G.H.I., Desai, M., Rhodes, G.R., Fridland, A., Lee, W.A., Plunkett, W., Vail, D., Thamm, D.H., Jeraj, R., Tumas D.B.: *Clin. Cancer Res.* 14, 2824-2832 (2008)
28. Tsai, C. Y., Ray A.S., Tumas, D.B., Keating, M.J., Reiser, H., Plunkett, W.: *Clin. Cancer Res.* 15, 3760-3769 (2009)
29. Vail, D.M., Thamm, D.H., Reiser, H., Ray, A.S., Wolfgang G.H.I., Watkins, W.J., Babusis, D., Henne, I.N., Hawkins, M.J., Kurzman, I.D., Jeraj, R., Vanderhoek, M., Plaza, S., Anderson, C., Wessel, M.A., Robat, C., Lawrence, J., Tumas D.B.: *Clin. Cancer Res.* 15, 3503-3510 (2009)
30. Plataniias, L.C.: *Blood* 101, 4667-79 (2003)
31. Lee, J.C., Kumar, S., Griswold, D.E., Underwood, D.C., Votta, B.J, Adams, J.L.: *J. Immunopharm.* 47, 185–201 (2000)
32. Hitti, E., Kotlyarov, A.: *Anti-Inflamm. Anti-Allergy Agents Med. Chem.* 6, 85-97 (2007)
33. Goedert, M., Cuenda, A., Craxton, M., Jakes, R., Cohen, P.: *EMBO J.* 16, 3563–3571 (1997)
34. Zarubin, T., Han, J.: *Cell Res.* 15, 11-18 (2005)
35. Kumar, S., Boehm, J., Lee, J.C.: *Nature Reviews* 2, 717 -726 (2003)
36. Song, J.J., Lee, Y.J.: *J. Biol. Chem.* 278, 47245-47252 (2003)
37. Miyake, Z., Takekawa, M., Ge, Q., Saito, H.: *Mol. Cell. Biol.* 27, 2765–2776 (2007)

38. Vidal, C., Geny, B., Melle, J., Jandrot-Perrus, M., Fontenay-Roupie, M.: *Blood* 100, 4462-4469 (2002)
39. New, L., Jiang, Y., Zhao, M., Liu, K., Zhu, W., Flood, L.J., Kato, Y., Parry, G.C.N., Han, J.: *EMBO J.* 17, 3372–3384 (1998)
40. Waskiewicz, A.J., Flynn, A., Proud, C.G., Cooper, J.A.: *EMBO J.* 16, 1909–1920 (1997)
41. Tan, Y, Rouse, J., Zhang, A., Cariatil, S., Cohen, P., Combl, M.J.: *EMBO J.* 15, 4629-4642 (1996)
42. Rangeaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R.J., Davis, R.J.: *J. Biol. Chem.* 270, 7420-7426 (1995)
43. Lee, J.C., Kumar, S., Griswold, D.E., Underwood, D.C., Votta, B.J., Adams, J.L.: *J. Immunopharm.* 47, 185–201 (2000)
44. Wang, X.Z., Ron, D.: *Science* 272, 1347–1349 (1996)
45. Olson, J.M., Hallahan, A.R.: *Trends Mol. Med.* 10, 125-129 (2004)
46. Wyllie, A.H., Kerr, J. F., Currie, A. R.: *Dialogues Cardiovascular Med.* 3, 100-109 (1998)
47. Wolf , B.B., Green, D.R.: *J. Biol. Chem.* 274, 20049–20052 (1999)
48. D’Amours, D., Germain, M., Orth, K., Dixit, V.M., Poirier, G.G.: *Rad. Res.* 150, 3-10 (1998)
49. Lenassi, M., Plemenitaš, A.: *Radiol. Oncol.* 40, 51-56 (2006)
50. Habiro, A., Tanno, S., Koizumi, K., Izawa, T., Nakano, Y., Osanai, M., Mizukami, Y., Okumura, T., Kohgo, Y.: *Biochem. Biophysic. Res. Commun.* 316, 71–77 (2004)
51. Conrad, D.M., Robichaud, M.R.J., Mader, J.S., Boudreau, R.T.M., Richardson, A.M., Giacomantonio, C.A, Hoskin, D.W: *Inter. J. Oncol.* 32, 1325-1333 (2008)
52. Huang, M., Wang, Y., Collins, M., Graves, L.M.: *Leukemia* 18, 1857–1863 (2004)
53. Holý, A., Rosenberg, I., Dvořáková, H.: *Collect. Czech Chem. Commun.* 54, 2190-2210 (1989)
54. Holý, A.: *Antivir. Res.* 71, 248–253 (2006)
55. Jenh, A.M., Thio, C.L., M.D., Pham, P.A.: *Pharmacotherapy* 29, 1212-1227 (2009)
56. Valeriánová, M., Otová, B., Bílá, V., Hanzalová, J., Votruba, I., Holý, A., Eckschlager, T., Krejčí, O., Trka, J.: *Anticancer Res.* 23, 4933-4939 (2003)
57. Zanke, B. W., Boudreau, K., Rubie, E., Winnett, E., Tibbles, L.A., Zon, L., Kyriakis, J., Liu, F.F, Woodgett, J.R.: *Curr. Biol.* 6, 606-613 (1996)
58. Deepa, S., Plunkett, W.: *Cancer Res.* 60, 6408–6415 (2000)

59. Valeriánová, M., Votruba, I., Holý, A., Mandys, V., Otová, B.: *Anticancer Res.* 21, 2057-2064 (2001)
60. Bobkov, K., Gut, I., Mandys, V., Holý, A., Votruba, I., Otová, B.: *Anticancer Res.* 21, 2725-2731 (2001)
61. Koizumi, K., Tanno, S., Nakano, Y., Habiro, A., Izawa, T., Mizukami, Y., Okumura, T., Kohgo, Y.: *Anticancer Res.* 25, 3347-3353 (2005)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka