

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD**



**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY SENZITIVITY LIDSKÝCH NÁDOROVÝCH  
BUNĚK K INHIBITORU PROTEIN KINÁZY SRC DASATINIBU**

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Konzultant: Ing. Ľubica Ondrušová, PhD.

Hradec Králové, 2016

Bc. Petra Žáková

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, Csc. a konzultance Ing. Lubici Ondrušové, Ph.D. za vedení diplomové práce a také za jejich podporu, trpělivost, čas a cenné rady. Ráda bych upřímně poděkovala svým kolegům z ÚLBLD.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Podpis

## **Použité zkratky**

Abl-Bcr - Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1 - Breakpoint Cluster Region

AGC – group protein kinases A,G,C

BSA – bovine serum albumine

Csk – c-src tyrosin kinasa

ECL – enhanced chemiluminescence

ERK – extracellular signal-regulated kinases

FBS – fetal bovine serum

GTP – guanosine diphosphate

GDP – guanosine triphosphate

GPCR- G protein coupled receptors

IC<sub>50</sub> – poloviční maximální koncentrace inhibitoru

JNK – c-jun N-terminal kinase

MAPK – mitogen activated protein kinases

MEK – MAPK/ERK kinase

mTOR – mammalian target of rapamycin

NAA – nonessential amino acids

NF-κB – nukleární faktor kappa B

PDGFR – růstový faktor krevních destiček

PI3K– fosfatidylinositol-3-kináza

PTEN - phosphatasa and tensin homolog

RTK – receptor tyrosin kinase

SAPK – stress-activated kinase

SDS-PAGE - sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

SFK- Src family kinases

SH2 - Src homology domains

wt - wild type

## Obsah

1 ABSTRAKT.....	5
2 ABSTRACT.....	6
3 ÚVOD .....	7
4 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA.....	8
5 CÍLE PRÁCE.....	22
6 MATERIÁL A METODY.....	23
7 VÝSLEDKY.....	30
8 DISKUZE.....	41
9 ZÁVĚR.....	43
10 LITERATURA.....	44

## 1 ABSTRAKT

Přenos signálu je účinným mechanismem, který dovoluje rychlou a specifickou odpověď eukaryotických buněk i na malé změny mimobuněčných a vnitrobuněčných informací. Mnohé kaskády protein kináz v signálních cestách jsou deregulovány při lidských nemocech a představují tak cenný cíl v terapii těchto onemocnění. Tato práce je věnována inhibici aktivity Src kinázy pomocí dasatinibu aplikovaného na melanomové buňky v buněčné kultuře. Dasatinib je multikinázový inhibitor protein tyrosin kináz a s velkou účinností inhibuje Src a další členy této rodiny kináz. Dasatinib je již používán jako protinádorový lék u některých nádorů, u dalších je v poslední fázi klinických zkoušek. Výsledky poukázaly hlavně na vliv inhibice Src na 2 hlavní signální cesty důležité pro přežívání a proliferaci melanomových buněk, a to MAPK a AKT. V literatuře není známo mnoho propojení MAPK a Src u melanomu, ale recentně bylo referováno, že Src inhibuje translokaci ERK1/2 do jádra a tím urychluje proliferaci melanomových buněk.

## **2 ABSTRACT**

Signal transmission is an efficient mechanism that allows fast and specific response of eukaryotic cells to small changes in the extracellular and intracellular information. Many cascade of protein kinases in signaling pathways are deregulated in human diseases and represent a valuable target for their therapy. This work has been devoted to inhibit Src kinase activity after application of dasatinib on melanoma cells in cell culture. Dasatinib is multikinase inhibitor of protein tyrosine kinases, and with high efficiency inhibits Src and other members of this family of kinases. Dasatinib is already in use as anticancer drug in some tumors, while another is in late stage clinical trials. Results showed mainly the effect of Src inhibition on two main signaling pathways important for survival and proliferation of melanoma cells, MAPK and AKT. In the literature it is not known many links MAPK and Src at melanomu, but recently has been reported that the Src inhibiting translocation of ERK1 / 2 in the core, thereby accelerating the proliferation of melanoma cells.

### 3 ÚVOD

Maligní melanom je vysoce zhoubné, především kožní onemocnění, které patří mezi stále častěji se vyskytující nádorové onemocnění. Melanom kůže vzniká neoplastickou transformací melanocytů, buněk neuroektodermálního původu způsobujících pigmentaci kůže (McCarthy 2015). Jen v České republice je hlášeno 300 nových pacientů každý rok. Incidence maligního melanomu má celosvětově vzestupný trend. Na rozdíl od epiteliálních kožních nádorů, jako jsou spinalom nebo bazaliom, se maligní melanom nevyznačuje destruktivním růstem, avšak nebezpečím časného hematogenního či lymfogenního metastázování. Ze všech kožních malignit představuje maligní melanom pouhá 4%, ale je zodpovědný až za 80% úmrtí na nádory kůže (Cancer facts and figures, 2003 – American Cancer Society). Takto vysoké procento je dáno tím, že pacienti trpící metastazovanou formou maligního melanomu neodpovídají na žádnou z možných terapií. Maligní melanom zůstává výzvou pro výzkumné pracovníky, kteří se snaží nalézt nové možnosti terapie u pacientů trpící pokročilými stádii tohoto onemocnění.

Dasatinib je multikinázový inhibitor protein-tyrosin kináz a s velkou účinností inhibuje Src a další členy této rodiny kináz. Inhibuje napří. i c-kit nebo PDGFR (Gnoni a spol., 2011). Dasatinib je používán jako protinádorový lék u některých nádorů, u dalších je v poslední fázi klinických zkoušek. Přesto přesný molekulární mechanismus jeho působení není u jednotlivých nádorových buněčných typů zcela jasný. Při léčbě je poměrně dobře tolerován a má relativně malé vedlejší účinky. V kombinaci s chemoterapií, může mít klinický přínos v léčbě maligního melanomu. Ukázalo se, že v kombinaci s temozolomidem byl účinek na melanomové buňky mírně synergický.  $IC_{50}$  pro temozolomid v kombinaci s dasatinibem je výrazně snížen ve srovnání se samotným podáním temozolomidu (Bantscheff a spol., 2007). Ve své práci jsem dasatinib použila jako silný inhibitor Src kinázy pro studium jeho vlivu na melanomové buňky v buněčné kultuře. Všimla jsem si hlavně vlivu inhibice Src na 2 hlavní signální cesty důležité pro přežívání a proliferaci melanomových buněk, a to MAPK a AKT.

## 4 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA

### 4.1 Maligní melanom

Melanocyty jsou pigmentové buňky v bazální vrstvě epidermis a normální melanocyty jsou i součástí pigmentových névů (névocyty). Za prekursorovou lézi melanomu je považován dysplastický névus. Pro melanocyty je charakteristickým rysem tvorba pigmentu – melaninu, exprese markerů spojených s touto biochemickou cestou a přítomnost specifických subcelulárních částic – melanosomů.

Nádorově transformované melanocyty si v naprosté většině zachovávají původní biochemický diferenciací fenotyp. Jsou rezistentní vůči většině používaných chemoterapeutik a jsou též silně radiorezistentní.

BRAF (V600E) je hlavní a nejfrekventnější mutací u sporadické formy melanomu, která byla identifikovaná již před cca 10 lety (Davies a spol., 2002). Přibližně 60-70% melanomů nese tuto mutaci, která je přítomna i u některých dalších nádorových typů. Část melanomů obsahuje mutaci genu N-ras (asi 10-15%) a v nádorových buňkách je přítomna buď jedna nebo druhá mutace.

BRAF i N-ras způsobují silnou aktivaci MAPK kinázové signální cesty, která je aktivovaná v podstatě ve všech melanomech (Davies a spol., 2002; Gray-Schopfer a spol., 2007). Zajímavé je, že BRAF je mutován již v benigních névech, kde pravděpodobně udržuje jejich senescenční charakter mechanismem zvaným “oncogene-induced senescence“ (OIS) a brání tak vlastně maligní transformaci (Michaloglou a spol., 2005). Tumor supresorový gen p16 je pravděpodobně, alepoň zčásti, zodpovědný za udržení senescentního stavu. Maligní vývoj začíná při dalších mutacích v névových buňkách (např. p16, p14ARF a dalších). Melanocyty tedy potřebují další genetické změny, aby obešly senescentní stav a vyvinul se nádor. (Fuse a spol., 1996).

Amplifikace MITF byla též nalezena v melanomových buňkách u menší části případů melanomu (Garraway a spol., 2005). Jeho hladina je zvýšena u nádorových buněčných linií melanomu i ve vzorcích nádorové tkáně převážně v raných stádiích vývoje nádoru (v pozdních stádiích je populace nádorových buněk značně heterogenní vzhledem k expresi MITF). MITF je tedy pokládán za faktor nutný k přežívání melanomových buněk (Garraway a Sellers, 2006; Levy a spol., 2006). MITF je tedy považován za příklad tzv. “lineage addiction oncogenes“, tedy “onkogenů“, které jsou zodpovědné za vznik a udržování identity buněčné linie, ale také nádorových buněk z této linie vzniklých, a jejich exprese udržuje přežívání nádorových buněk.



## **4.2 Růst nádoru**

V případě melanomu nádor roste ve dvou fázích: 1. fáze horizontálně-radiálního růstu, kdy atypické melanocyty pronikají do vyšších vrstev epidermis a při tom vznikají klony s různou rychlostí růstu a tvorby melaninu; 2. fáze vertikálního růstu, kdy buňky pronikají do koria (t.j. do nižších vrstev) a dále se tam množí. Biologicky nepříznivé vlastnosti nádoru jsou výhradně spojeny s jeho vertikálním růstem. Tento vertikální růst nádoru se histologicky měří hloubkou invaze melanomu od stratum granulosum po nejhluběji uloženou nádorovou buňku v milimetrech, což je histologická klasifikace podle Breslowa (Clemente a spol., 2005). Tloušťka nádoru je dlouhodobě nejvýznamnějším prognostickým faktorem, podle kterého se určuje radikalita chirurgického zákroku a indukuje případná adjuvantní léčba. Čím vyšší je hodnota podle Breslowa, tím horší je prognóza melanomu.

## **4.3 Typy melanomu**

### **4.3.1 Lentigo maligna melanom (LMM)**

Lentigo maligna melanom se vyskytuje převážně na obličeji a krku u starších osob v oblasti předchozího lentigo maligna. Klinický obraz se vyznačuje nestejnou, pigmentovanou nepřesně ohraničenou makulou, která se trvale zvětšuje a může dosáhnout i velikosti několika centimetrů. Po řadě let plošného šíření dochází k vertikálnímu růstu a vzniku pigmentovaného nebo amelanotického uzlu. Právě vyvyšování ložiska nad kožní povrch označuje přechod lentigo maligna v lentigo maligna melanom (Štork a spol., 2008).

### **4.3.2 Superficiálně se šířící melanom (SSM)**

Superficiálně se šířící melanom je nejčastějším typem melanomu. Vyskytuje se nejvíce u lidí ve středním věku v kterékoliv lokalizaci. Klinický obraz se vyznačuje horizontálním růstem, zpočátku pomalým zvětšováním stejnoměrně, později nerovnoměrně světle či tmavohnědě pigmentovaného, poměrně ostře ohraničeného ložiska, většího než 6mm. Ložisko se poté může začít vyvyšovat nad okolí, tvar se stává nepravidelným a po obvodě se tvoří nepravidelné výběžky a zářezy. V oblasti melanomu se mohou vyskytovat barevné rozdíly jeho jednotlivých částí. Prognóza zůstává příznivá v případě, kdy se nádor podaří odstranit ještě ve fázi horizontálního, na epidermis a papilární vrstvu koria omezeného růstu (Štork a spol., 2008).

### **4.3.3 Nodulární melanom (NM)**

Nodulární melanom je druhým nejčastějším typem maligního melanomu. Vyrůstá během krátké doby několika měsíců na klinicky nezměněné kůži nebo v získaném, atypickém nebo kongenitálním melanocytovém névu. Nodulární melanom se jeví jako různě veliký, nepravidelně pigmentovaný polokulovitý hrbol, obvykle široce přisedlý ke kůži. Povrch bývá hladký nebo se odlupuje, může i krvácet, být erodovaný a pokrývat se hemoragickou krustou. Vzácně může pigment zcela chybět – amelanotická forma. U NM jsou časté metastázy v regionálních uzlinách, plicích, mozku, játrech, kůži nebo v kostech. Prognóza je nepříznivá (Štork a spol., 2008).

#### **4.3.4 Akrolentiginózní melanom**

U bílé rasy vzácná varianta maligního melanomu, ale u u černocho je nejčastějším typem melanomu. Postihuje dlaně, plosky a subungvální oblasti. Začíná jako plošné, pigmentované, nepravidelné ložisko rostoucí invazivně do hlubších struktur kůže a obvykle dosahuje výrazné tloušťky. Pod nehtovými ploténkami imituje posttraumatické hemoragie. Důležité je imunohistochemické vyšetření, kdy nejčastěji používanými markery u melanomu jsou protein S-100 a protilátka HMB-45. Protein S-100 je velmi senzitivní, ale ne příliš specifický marker. Exprimují ho melanomové buňky a řada dalších nádorů, zejména neurálního původu. HMB-45 je monoklonální protilátka s relativně vysokou specificitou pro melanom a omezený počet jiných nádorů, jako jsou nádory prsu, feochromocytom nebo angiomyolipom (De Witt a spol., 2004).

#### **4.3.5 Zvláštní typy melanomu**

Slizniční melanom: Melanocyty jsou kromě kůže také ve slizničním epitelu. Primárně slizniční melanomy mohou vznikat v epitelu respiračního, gastrointestinálního nebo genitourinárního traktu. Jsou velmi vzácné, u bílé rasy představují asi 1%. Nejčastější lokalizací slizničního melanomu je sliznice ústní dutiny, nosu, vedlejších dutin nosních a hrtanu. Dalším relativně častým výskytem melanomu je sliznice v oblasti anorektální, zevních rodidel, pochvy, v oblasti jícnu a močové trubice. Stanovení diagnózy melanomu na sliznicích je obtížné, protože symptomy obvykle chybí a projeví se až v pokročilé fázi onemocnění, kdy nádor krvácí, případně způsobuje obstrukci oblasti, ve které roste (Tomicic a spol., 2003).

Oční melanom: Vzácný nádor, který představuje 3-5% všech melanomů. Postihuje převážně bílou rasu. Jeho výskyt se zvyšuje s věkem, nejčastější je u nemocných starších 50 let. Oční melanom se rozděluje na 2 varianty – uveální a konjunktivální. Uveální melanom vzniká z neuroektodermálních melanocytů duhovky, ciliárního tělíska nebo choroidey. Klinické příznaky se liší podle lokalizace nádoru, melanom duhovky se projevuje ztmavnutím

postižené části, při postižení ciliárního tělíska je patrná nádorová masa na periférii oka, chorioidální melanom vytváří vyvýšené uzlovité masy. Bolestivost oka nebývá častá, objevuje se až při vzniku sekundárního glaukomu. Uveální melanom metastázuje hematogenně, nejčastěji metastázuje do jater. Mortalita na uveální melanom odpovídá mortalitě kožního melanomu. Konjunktivní melanom – melanom spojivky, je extrémě vzácný u černé rasy a Asiatů. Může vznikat v předchozí spojivkové melnóze, konjunktiválním névu nebo zcela nově. Vytváří drobná i větší plošná nebo uzlovitá ložiska, histologicky většinou odpovídá superficiálně se šířícímu melanomu (Tomicic a spol., 2002).

#### **4.4 Ultrafialové záření a patofyziologie maligního melanomu**

Ultrafialové záření je považováno za významný rizikový faktor pro rozvoj kožního melanomu, neboť UV může poškodit imunitní funkci kůže a lokálně zvýšit produkci růstových hormonů. Po ozáření kůže ultrafialovými B paprsky pak dochází k trvalému poškození DNA melanocytů a keratinocytů, což je základní předpoklad k rozvoji onemocnění (Thompson a spol., 2005). V takto poškozené buňce dochází k aktivaci opravných mechanismů – inhibice DNA syntézy, zastavení buněčného cyklu v G1 fázi a aktivace opravy DNA. Pokud poškození DNA není buněčnými reparačními mechanismy opraveno, měla by buňka směřovat k apoptóze. Pokud je i ta narušena dochází k replikaci mutované DNA a vzniká buněčná linie s poškozenou genetickou informací. Postupným hromaděním těchto změn v buňce se kumulují další defekty strukturních genů, dochází k aktivaci onkogenů a naopak ke ztrátě tumor supresorových genů. Definitivně tak vzniká invazivní fenotyp a rozvíjí se maligní melanom.

#### **4.5 Diagnostika všech typů melanomu**

Včasná diagnostika je u maligního melanomu rozhodující. Určení, zda je pigmentové ložisko benigní nebo maligní, vyžaduje pečlivé klinické zhodnocení a vyšetření všech rysů, které odlišují růstově aktivní a většinou maligní léze od lézí stacionárních, převážně benigních. Pro maligní zvrát svědčí především tyto klinické známky: změna velikosti, tvaru, barvy a změna povrchu pigmentového útvaru. Mezi nejdůležitější pomocná vyšetření kromě důsledné anamnézy a klinického vyšetření pacienta patří epiluminiscenční dermatoskopické vyšetření manuálním či digitálním dermatoskopem. Mezi základní dermatoskopické rysy maligního melanomu patří hrubá, nepravidelná pigmentová síť, přítomnost prstencových zakončení pigmentových proužků v okraji ložiska způsobena junkčními hnízdy na periférii, radiální proužkování, nepravidelné hnědé globule (Massone a spol., 2005).

## **4.6 Léčba maligního melanomu**

### **4.6.1 Chirurgická léčba primárního melanomu**

Primární léčbou melanomu je vždy totální excize nádoru s ochranným lemem odpovídajícím pravděpodobné tloušťce nádoru. Tento postup je výhodný u klinicky jasné diagnózy melanomu. Pokud není diagnóza maligního melanomu jednoznačná, je vhodnější nejdříve provést neširokou excizi ložiska a teprve následně, podle histologického vyšetření indikovat reexcizi jizvy s odpovídajícím lemem. Probatorní biopsie je u melanomu indikována zřídka a provádí se zejména u rozsáhlých ložisek lentigo maligna melanoma na obličeji nebo u slizničního melanomu. U melanoma in situ se doporučuje excize s 5 mm ochranným lemem okolní zdravé tkáně. U superficiálně se šířícího melanomu, u něhož lze předpokládat hodnotu Breslowa do 1 mm, je dostatečná totální excize s 1 cm lemem. V případě, že se melanom vyvyšuje nad kožní povrch a předpokládá se hodnota Breslowa 1-4 mm, měla by být provedena totální excize s ochranným lemem 2 cm okolní zdravé tkáně. V případě pokročilého, nodulárního melanomu s povrchovou ulcerací a Breslowem větším než 4 mm by měla být excize s 3 cm lemem, při které se často na chirurgických pracovištích, zejména plastických, provádí i tkáňový posun či přiložení kožního transplantátu (Krajsová, 2006).

### **4.6.2 Adjuvantní léčba maligního melanomu**

Adjuvantní terapie, často také nazývaná pomocná terapie, obvykle následuje po operaci, při které již byla odstraněna všechna zjištěná ložiska nádorového onemocnění. Po operaci se většinou v terapii pokračuje, aby se snížilo riziko nepozorovaného průběhu onemocnění, které často následuje po operaci bez další léčby. Cílem adjuvantní léčby je úplné vyléčení pacienta, dále částečná či kompletní likvidace mikrometastáz, a tím prodloužení období mezi recidivami onemocnění, nebo prodloužení celkové doby přežití pacientů. O adjuvantní léčbě je nutné uvažovat u pacientů s vysokým rizikem relapsu onemocnění.

### **4.6.3 Lokální adjuvantní léčba**

Adjuvantní aktinoterapie (léčba ozářením) se využívá ke snížení rizika vzniku lokálních recidiv po totální excizi či odstranění uzlinových metastáz nebo po operacích rozsáhlých primárních, hlavně slizničních melanomů. Hlavním problémem je vznik fibrózy v ozařovaných oblastech a vznik končetinového lymfoedému, který je popisován jako pozdní následek u 30-60 % nemocných. Při vzniku mnohočetných metastáz je možné intralezionálně

aplikovat cytokíny, a to zejména IFN $\alpha$ , dále lze intralezionálně aplikovat cytostatika – hlavně neomycin a cisplatinu (Vojáčková a spol., 2006).

#### **4.6.4 Adjuvantní imunoterapie**

Interferon alfa (INF $\alpha$ ) patří do skupiny proteinů schopných inhibovat virovou replikaci, syntézu proteinů i nádorovou proliferaci. Přesný mechanismus jejich účinku není znám, ale předpokládá se, že stimulují fagocytózu makrofágů, aktivují NK buňky, zvyšují expresi HLA antigenů, expresi nádorových antigenů, mají přímý cytotoxický účinek, inhibují růst nádorových buněk a angiogenezi. U melanomu je nejvíce léčebně využíván interferon alfa (Krajsová, 2006).

#### **4.7 Prevence melanomu**

Melanom je onemocnění, kterému lze předcházet prevencí. Cílem primární prevence je snížení incidence melanomu. I když etiologie maligního melanomu je multifaktoriální, až 70-80 % melanomu vzniká v důsledku intenzivního slunění. Cílem sekundární prevence je včasná diagnóza melanomu v iniciálních stádiích. Součástí sekundární prevence jsou i screeningové programy zaměřené na sledování rizikových skupin obyvatelstva. Chemoprevence melanomu znamená podávání přírodních nebo syntetických látek s cílem zabránit vzniku maligního nádoru. V chemoprevenci jsou v současné době experimentálně zkoušeny statiny pro ovlivnění ras onkogenů a apoptózy, dále retinoidy, COX – 2 inhibitory a látky s fotoprotektivními a antioxidačními účinky: vitamíny C, E, D a beta–karoten. V lokální chemoprevenci se zkouší imiquimod a retinoidy (Margolin a spol., 2004).

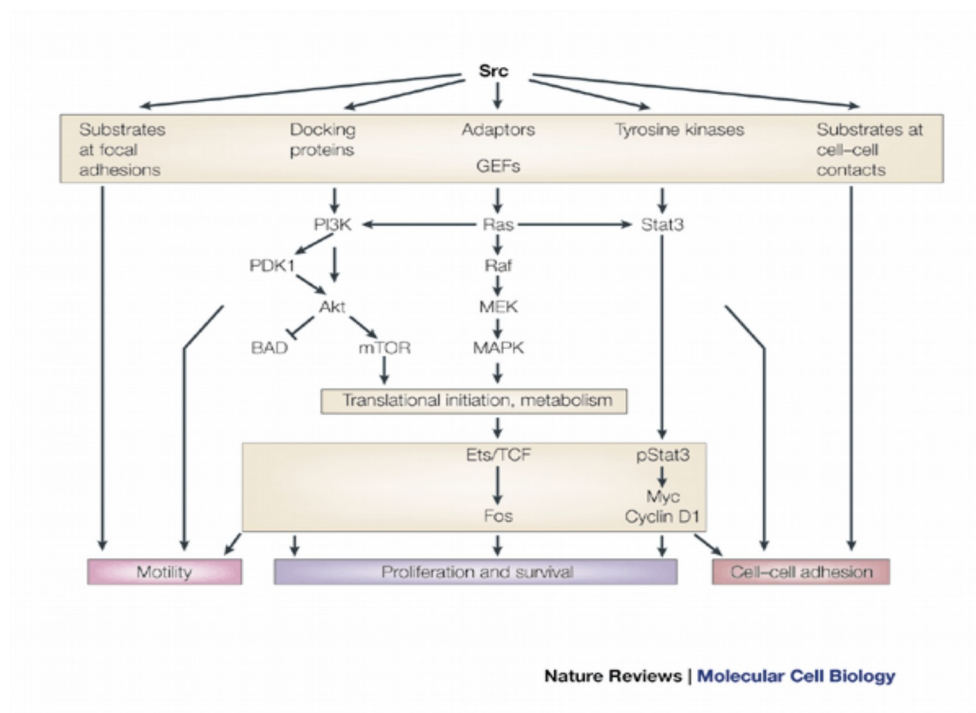
## 4.8 Src

Src je gen a stejnojmenný protein ze Src rodiny, který funguje jako noreceptorová tyrosin kináza, má velikost asi 60 kDa a na N-konci váže kyselinu myristovou. Díky této mastné kyselině se váže k membráně, nicméně tak slabě, že účinkem fosforylace z ní snadno disociuje do cytosolu (Pollard a spol., 2007). Skládá se z několika domén, které se od N-konce označují jako SH 4→1 (Src homology domain). SH4 se uplatňuje při asociaci s membránou, SH3 umožňuje interakci s polyprolinovými oblastmi, SH2 se váže na fosforylovaný tyrosin, SH1 je samotnou katalytickou doménou umožňující tyrosin kinázovou funkci Src (Lau a spol., 2013).

Jsou známy dvě varianty Src proteinu, c-Src a v-Src. c-Src je protoonkogen, který v kinázové doméně obsahuje tyrosin, jehož fosforylací je src inhibován, hraje významnou roli v buněčné signalizaci a diferenciaci (Pollard a spol., 2007). v-Src jako onkogen nachazející se v genomu viru Rousova sarkomu (RSV), se od c-Src liší C-terminálním koncem, daný tyrosin u něj chybí, a proto nemůže být inhibován. Má schopnost například přetvářet fibroblasty na nádorové buňky. Obě varianty src hrají významnou roli v nádorovém bujení

Na aktivitu Src kinás má vliv fosforylace dvou tyrosinových zbytků: Y-act (Y416) v kinasové oblasti a Y-tail (Y527) na C-konci. Autofosforylace Y-act zvyšuje aktivitu, kdežto fosforylace Y-tail kinázou Csk aktivitu potlačuje. Přírodní inhibitor Src, který by se vázal i na nefosforylovaný Y416-Src není znám. Byla připravena protilátka anti-pepY, která rozpoznává aktivní i neaktivní (fosfo- i nefosfo-) formy c i v-Src, ale neovlivňuje jejich katalytickou aktivitu (Pollard a spol., 2007). Uměle připravený inhibitor je protein A.

Src je napojen na signální dráhy po navázání ligandu na RTK (receptor tyrosine kinase)(Obr. č.1 Src buněčná signalizace), kdy dojde k dimerizaci receptoru, jeho aktivaci a autofosforylaci na určitých Tyr . Tím se vytvoří vazebná místa pro SH2 domény (Src homology domains). Tyto domény rozpoznávají a vážou specifické fosfotyrosinové sekvence, dále pak stimulací integrinů vážou ligandy, což vyvolává jejich shlukování a aktivaci přidružených cytoplazmatických tyrosin kináz. Po navázání ligandu na GPCR (G protein coupled receptors) dojde k výměně GDP za GTP na asociovaném G-proteinu a disociaci podjednotky  $\alpha$ -GTP od komplexu  $\beta\gamma$ . Další receptory, které signalizují skrz SFK (Src family kinases) jsou receptory T a B buněk, cytokinové a Fc receptory a receptory estrogenové. Signály downstream: Src fosforyluje PDGF na Y938 a tím iniciuje mitogenezi, ale inhibuje chemotaxi a reorganizaci aktinu; aktivuje MAPK dráhy (Martin a spol., 2001). Src je nejvíce exprimován v krevních destičkách a v mozku (Pollard a spol., 2007).



**Obr. 1** Src fosforyluje v místě tyrosinu substráty cytosolu, vnitřní strany plazmatické membrány či substráty buněčné matrix a buněčné adheze. Vzniklé komplexy iniciují dráhy, které regulují syntézu proteinů, genovou expresi, výstavbu cytoskeletu a mnoho dalších buněčných funkcí. Jsou uvedeny jen některé příklady signálních drah ovlivněných Src. Ty zahrnují RAS-mitogen aktivované protein kinázy (RAS-MAPK), které regulují expresi fos prostřednictvím fosforylace členů rodiny Ets transkripčních faktorů, fosfatidylinositol-3 kinasa AKT (PI3K-AKT) cestu, která reguluje translační iniciaci a přežívání buněk a STAT3 dráhu, která reguluje expresi myc a cyklinu D1. Fenotyp buňky tak odráží přímé účinky Src na buněčném povrchu, cytoplazmatické signální dráhy i genovou expresi regulované Src (Martin a spol., 2001).

## 4.9 Signální dráhy v melanomech

Přenos signálů je účinným mechanismem, který dovoluje rychlou a specifickou odpověď eukaryotických buněk i na malé změny v mimobuněčných a nitrobuněčných informacích. Mnohé kaskády protein kináz v signálních cestách jsou deregulovány při lidských nemocech a představují tak cenný cíl pro jejich terapii. Pro přežívání a proliferaci melanomových buněk jsou klíčové 2 hlavní signální dráhy, a to MAPK a AKT.

### 4.9.1 AKT/mTOR signální cesta

AKT je serin/treonin kináza známá také jako protein kináza B. Patří do skupiny AGC kináz. Kaskáda AKT je aktivována RTG, GPCR, intergriny, receptory B- a T-lymfocytů, cytokinovými receptory, a dalšími podněty, které vedou k nárůstu koncentrace fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfátů (PIP<sub>3</sub>). AKT disponuje proteinovou PH doménou (zvaná také jako Pleckstrin homologní doména). Tato doména se váže vysokou afinitou k fosfoinositidům, v případě PH domény se jedná o vazbu s fosfatidylinositol-3-4-5-trifosfátem (PIP<sub>3</sub>) nebo fosfatidylinositol-3-4-bifosfátem (PIP<sub>2</sub>). PI-3-kináza, aktivovaná vazbou na receptor G-proteinu či receptor tyrosin kinázy, fosforyluje PIP<sub>2</sub> na PIP<sub>3</sub>, a tím dochází k aktivaci AKT (Franke a spol., 2009).

AKT dále realizuje signál na základě fosforylace cílových proteinů. AKT je negativně regulována prostřednictvím nádorového supresoru PTEN (phosphatasa and tensin homolog), který slouží k defosforylaci PIP<sub>3</sub> zpět na PIP<sub>2</sub> a tím k inaktivaci AKT v signální dráze.

AKT je normálně fosforylována v poloze T450. Pokud AKT není fosforylována v této poloze, tak není složena správným způsobem. T450- nefosforylovaná AKT s patologickou konformací je ubiquitována a degradována v proteozomu. AKT je také fosforylována na T308 a S473. Mutovaná AKT je snadněji ubiquitinována a fosforylována než jeho divoký typ (Sarbasov a spol., 2005).

AKT se vyskytuje ve třech izoformách (AKT 1,2,3), které jsou downstream PI-3K. AKT je klíčovým proteinem v inzulinové signalizaci, prostřednictvím mTOR a p70 S6K reguluje růst buněk. Působí také na buněčný cyklus, reguluje CDK inhibitory p27 a p21, a nepřímo ovlivňuje hladinu cyklinu D1 a p53. AKT také zajišťuje přežívání buněk, inhibuje pro-apoptické signály. AKT dále reguluje vaskulární homeostázi a angiogenezi (Slomovitz a spol., 2012).

mTOR (mammalian target of rapamycin) je Ser/Thr kináza, která se podílí na regulaci translace. mTOR je kináza skupiny PIKK (PI3-kinase related kinases) (Obr.č.2 signální cesta PI3K/AKT/mTOR). Pro tuto skupinu kináz je charakteristická doména FAT (podle FRAP, ATM



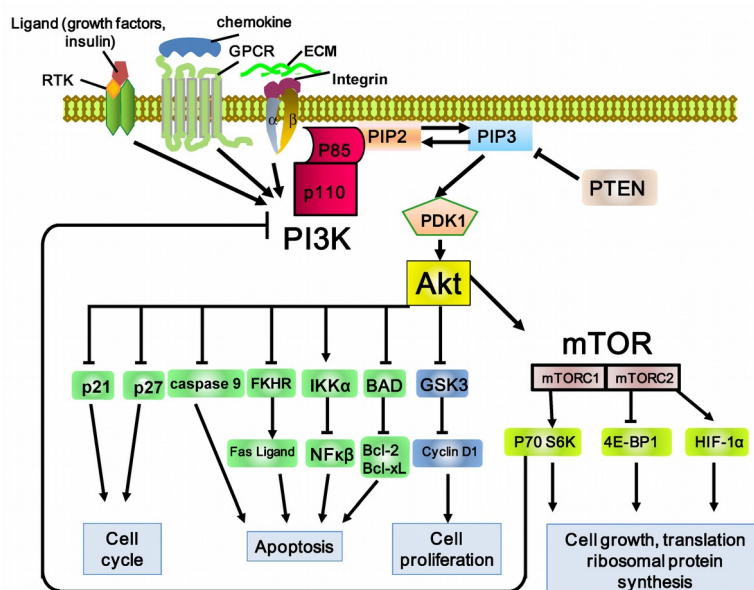
a TRRAP) a C koncová katalytická doména (FATC doména), která vykazuje vysokou sekvenční homologii s PI3 kinázou.

Mezi další proteiny skupiny PIKK patří TOR1p a TOR2p. mTOR reguluje růst buněk a buněčný cyklus prostřednictvím regulace proteosyntézy. Přímou či nepřímou reguluje fosforylaci řady molekul. Její molekulová hmotnost je 289 kDa, u člověka je kódovaná chromosomem 1p36.2. Skládá se přibližně z 20 tandemově se opakujících motivů homologní k proteinům TOR1 a TOR2 *S.cerevisiae* a sdílí s nimi asi 42% homologie.

mTOR vykazuje širokou substrátovou specifitu. V cytoplasmě se mTOR váže na svůj receptorový protein FKBP 12. mTOR se aktivuje autofosforylací na Ser2481. Jako důkaz, že jde o autofosforylaci se bere to, že kinázově inaktivní mutant mTOR tento zbytek fosforylovaný nemá. C koncové zbytky mTOR 2430-2450 tvoří supresorovou doménu, jejich odstranění vede ke stálé aktivaci mTOR. V této oblasti je 6 Ser/Thr zbytků, které mohou sloužit jako další regulační místa. Významné jsou Ser 2448 a Thr 2446. In vitro AKT přímo fosforyluje mTOR na Ser 2448. mTOR se aktivuje buď přes komplex Raptor-mTOR-mLST8, nebo růstovými faktory (GFR-PI3K-AKT-TSC1/2-dráha, dále pak Ppα-1A AR-Ca<sub>2+</sub>PLD-PA drahou, která je inhibována 1-butanolem nebo energetickým metabolismem (Slomovitz a spol., 2012).

Rapamycin inhibuje mTOR spojením s intracelulárním receptorem FKBP12 (12-kDa FK506-binding protein) (Huang a spol., 2003). PTEN fosfatáza negativně ovlivňuje mTOR signalizaci prostřednictvím interference s PI3K. mTOR aktivita je deregulovaná u mnoho typů nádorů v důsledku zvýšené aktivity PI3K nebo Akt (Guertin a spol., 2005).

O ovlivnění AKT/mTOR signální cesty Src onkogenem je rovněž známo. Podle jednoho sdělení je předfosforylace 2 tyrosinů v AKT molekule pomocí Src nutná pro její další aktivaci AKT (Jiang a spol., 2003). Pravděpodobně však nejde o univerzální mechanismus fungující ve všech typech buněk a AKT kináza je aktivována mnoha dalšími faktory. Aktivita AKT/mTOR cesty není tedy zcela vždy závislá na aktivitě Src. Onkogenní kináza Src však může aktivovat tuto signální cestu i nezávisle na AKT, pravděpodobně downstream od AKT v této cestě (Vojtěchová a spol., 2008).



**Obr. 2** Schématické znázornění PI3K/Akt/mTOR. PI3K cesta zahrnuje mnoho faktorů, jako receptor tyrosin kinázy (RTK), receptor G-proteinů (GPCR) a GTP-vazebné proteiny pro adaptorové proteiny. PI3K se skládá z katalytické podjednotky P110 a regulační podjednotky p85. PI3K fosforyluje PIP2 (fosfatidylinositol-3,4-bifosfát) a produkuje PIP3 (fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát). PIP3 pak aktivuje PDK1 (3-fosfoinositid-dependent kinázu 1), jejichž hlavní downstream je Akt. Fosforylovaná Akt podporuje buněčnou proliferaci, diferenciaci, přežívání a migraci. PTEN fosfatáza defosforyluje PIP3 a inhibuje aktivaci Akt. Fosforylace Akt indukuje aktivaci jednoho z hlavních následných efektorů mTOR. mTOR fosforyluje S6K1 a 4EBP1. Stimulační účinky jsou označeny šipkami a inhibiční účinky jsou označeny čarami, které končí v plochých liniích (Matsuoka and Yashiro, 2014).

#### 4.9.2 MAPK signální cesta

Stimulace řady tyrosin kinázových receptorů vede k rychlému nárůstu enzymatické aktivity podobných serin/treonin kináz, které se označují jako MAPK (mitogen activated protein kinases). Tyto tzv. „tlumiči“ extracelulárních signálů na intracelulární, regulují expresi genů, proliferaci a diferenciaci buňky. MAP kinázy se dělí do tří skupin:

- ERK (kam patří např. P44, někdy označované ERK1, resp. ERK2)
- JNK (c-jun N-terminal kinases) neboli SAPK (stress-activated kinases)
- p38 kinasy

Nejlépe charakterizovanou MAPK je ERK (extracellular signal-regulated kinase) (Obr.č.3 aktivace dráhy ERK/MAPK), která je důležitá v signalizaci buněčné proliferace na podnět růstových faktorů. Aktivací tyrosin kinázového receptoru jeho autofosforylací a následnou aktivací proteinu RAS vazbou GTP, je zahájena postupná aktivace MAPK dráhy (Campbell a

spol., 1998). Protein RAS nejprve aktivuje Ser/Thr kinázu RAF, jejíž rodina je tvořena třemi proteiny: ARAF, BRAF a CRAF. RAF fosforyluje a aktivuje druhou protein kinázu MEK. MEK je duálně specifická protein kináza, která aktivuje ERK fosforylací jak treoninových, tak tyrosinových zbytků. ERK kináza fosforyluje řadu jaderných a cytoplazmatických proteinů, což může vést buď k proliferaci nebo k diferenciaci buněk. Mutace RAS a BRAF genů jsou často nalézány u mnoha nádorových onemocnění spojených s rozvojem maligního melanomu.

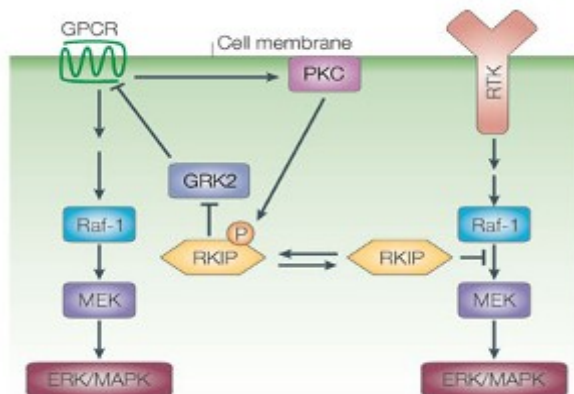
Mezi další MAP kinázy patří p38 a JNK/SAPK, jejichž aktivace především souvisí s účinkem stresových faktorů zevního prostředí způsobených ionizujícím nebo UV zářením, chemickým nebo hyperosmotickým stresem. Obě dráhy mohou být také aktivovány i nemitogenními signálními molekulami, jako jsou např. prozánětlivé cytokiny (Zanke a spol., 1996). Podílejí se na kontrole adaptace buněk, jejich množství, tvaru a migraci. Prolínání jednotlivých drah v buňce dokazuje, že při stálé aktivaci dráhy ERK, která je častá u maligního melanomu, může dojít i k aktivaci dráhy p38 a JNK/SAPK.

Kromě aktivace MAP kináz je protein RAS schopen aktivovat i několik dalších signálních drah. Příkladem je interakce s PI3 kinázou, jejíž aktivací dochází k indukci PIP3, která je schopna vazby na proteiny s PH doménou, např. kinázou AKT. Takto aktivovaná kináza ovlivňuje životaschopnost, růst a proliferaci buněk. Mimo jiné aktivuje i jaderný transkripční faktor NF- $\kappa$ B, který brání aktivaci programované buněčné smrti (Datta a spol., 1997).

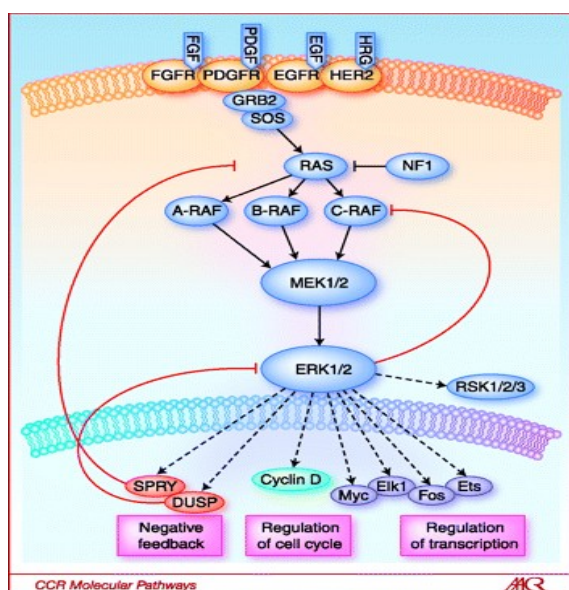
Proteiny MAPK p44 a p42 fungují v kaskádě protein kináz, které hrají kritickou roli v regulaci buněčného růstu a diferenciaci. Jsou aktivovány fosforylací treoninu a tyrosinu (202 a 204) protein kinázou MEK, která je aktivovaná fosforylací svých dvou serinových zbytků (217 a 221) a katalyzuje fosforylací obou, treoninu 202 i tyrosinu 204, v aktivní smyčce kinázové domény MAPK.

V literatuře není známo mnoho propojení MAPK a Src u melanomu, ale recentně bylo referováno, že Src inhibuje translokaci ERK1/2 do jádra (Wu a spol., 2013) a tím urychluje proliferaci melanomových buněk (Obr.č.4 RAS-RAF-MEK-ERK signální dráha). Zajímavé též je, že přirozená či získaná rezistence BRAF-mutovaných (V600E) melanomových buněk může být překonána inhibicí Src (Girotti a spol., 2013). BRAF je aktivován u více než 60% melanomů a silně aktivuje MAPK signální cestu, která však může být aktivována i jinými cestami, např. přes ne-kanonickou aktivaci Hedgehog signální cesty, na které se podílí rovněž Src (Chang a spol., 2010). Asi u 10% melanomů je mutován N-ras, který aktivuje MAPK kaskádu přes C-RAF. Knockdown ERK1 pomocí shRNA rovněž vedl k apoptose melanomových buněk (Qin a spol., 2012), což dále zdůrazňuje důležitost MAPK signalizace u melanomu. Bylo též referováno, že mutovaný BRAF reguluje proliferaci melanomových buněk přes transkripční faktor MITF (Wellbrock a spol., 2008), klíčový pro přežívání melanomových

buněk, neboť aktivovaná ERK2 kináza fosforyluje MITF a zvyšuje tak jeho degradaci. Tento mechanismus však pravděpodobně jen přispívá k aktivitě BRAF-V600E a signalizaci MAPK, neboť pouze úplné vyřazení MITF má za následek nepřežívání melanomových buněk (Ondrušová a spol., 2013). Delší dobu je známo i propojení Src a ARAF a CRAF. Src se synergisticky, spolu s RAS, podílí na aktivaci těchto dvou RAFs a způsobuje jejich fosforylaci na tyrosinu (Marais a spol., 1997). Tento mechanismus však chybí v případě BRAF, kterému chybí ekvivalentní tyrosin 341 přítomný v CRAF.



**Obr. 3** V nestimulovaných buňkách se inhibitor proteinu Raf (RKIP) váže na Raf a zabraňuje fosforylaci MEK. G-proteinem spřažené receptory (GPCR) jsou citlivé a internalizovány v reakci na fosforylaci GPCR kinázou-2 (GRK2). Jsou-li GPCR receptory aktivní, mohou indukovat proteinkinázu C (PKC) k fosforylaci RKIP na S153. Tato fosforylace inaktivuje RKIP jako inhibitor Raf-1, a převádí jej na inhibitor GRK2. GPCR signalizují dráhu ERK/MAPK přes MEK a Raf, která tím může přetrvávat. Nefosforylovaný RKIP normálně inhibuje Raf (Kolch a spol., 2005).



**Obr. 4** RAS-RAF-MEK-ERK signální dráha. MAPK je aktivována v lidských nádorech několika mechanismy včetně navázání ligandu na receptor tyrosin kinázy (RTK), mutační aktivací RTK, ztrátou nádorového supresoru NF1 nebo mutacemi v RAS, BRAF a MEK1. Fosforylace a tudíž aktivace ERK reguluje transkripci cílových genů, které podporují progresi buněčného cyklu a přežití tumoru. Dráha ERK obsahuje klasickou zpětnovazebnou smyčku, ve které se projevují zpětné vazby prvků Spry a DUSH rodiny proteinů, regulovány na úrovni ERK aktivity (Kolch a spol., 2005).

## 5 CÍLE PRÁCE

1. Určit účinek dasatinibu na inhibici fosforylace Src a signálních drah MAPK a AKT/mTOR
2. Určit účinek dasatinibu na proliferaci melanomových linií
3. Provéřit souvislost mezi přítomností mutace BRAF a citlivostí melanomových buněk k dasatinibu
4. Porovnat účinek dasatinibu a inhibitorů MAPK: U0126, Selumetinibu a PD98059

## 6 MATERIÁL A METODY

### 6.1 Přehled testovaných inhibitorů

**Dasatinib.** Je perorální multi-tyrosin kinázový inhibitor s účinkem asi na 18 různých nереceptorových i receptorových tyrosin kináz. Nejúčinněji však inhibuje kinázovou aktivitu proteinu Src ( $LC_{50}=0.55$  nM), včetně fúzního proteinu Bcr/Abl (3nM), receptoru faktoru kmenových buněk (c-kit) a destičkového růstového faktoru (PDFGR). Pro některé substráty in vitro je udávána  $LC_{50}$  hodnota pro Src 3 nM. Je tedy velmi efektivním inhibitorem Src tyrosin kinázy. Např. pro další kinázu z rodiny Src, Lyn je  $IC_{50}=8.5$  nM. Je používán jako protinádorový lék (komerční název SPRYCEL) u chronické myeloidní leukémie (CML) (s Bcr-Abl translokací) v chronické akcelerované nebo blastické fázi CML s rezistencí či intolerancí k předchozí léčbě včetně imatinibu-mesylátu, dále u Ph<sup>+</sup> akutní lymfoblastické leukémie (ALL) a u lymfoidní blastické CML s rezistencí či intolerancí k předchozí léčbě, u mnohočetného myelomu. Dasatinib se používá i u solidních nádorů, jako je gastrointestinální stromální tumor, kolorektální karcinom, maligní pleurální mezoteliom, nádory prostaty, nemalobuněčný karcinom plic, glioblastom. U mnoha dalších typů nádorů je v posledních fázích klinických zkoušek, jako jsou nádory hlavy, krku, vaječníku, prsu a u melanomu. Je více než 300x účinnější než jeho předchůdce, známý antileukémický lék Imatinib (komerční název GLEEVEC). Dasatinib je obecně dobře snášen. Myelosuprese je nejčastějším nežádoucím účinkem, který je však reverzibilní po snížení dávky, vysazení nebo přerušení. Mezi další nežádoucí účinky patří infekce a ingesce, hypersenzitivita IS, hypo-hypertyreóza, poruchy metabolismu a výživy, psychiatrické poruchy, poruchy nervového systému, poruchy oka, ucha, labyrintu a poruchy srdeční, dále poruchy gastrointestinální, respirační, mediastinální, močového ústrojí, reprodukce, kosterní a pojivové tkáně.

**Selumetinib (AZD6244).** Je silný, účinný, ATP-nezávislý, perorální inhibitor MEK1/2 kináz (a tím i ERK1/2 kináz). Jeho  $IC_{50}$  vůči čisté MEK1 je 14 nM. Používá se již léčebně u několika nádorových typů.

**U0126.** Je rovněž selektivním inhibitorem MEK. Působí inhibicí kinázové aktivity MEK1/2 a tím zabraňuje aktivaci MAP kinázy P42 a P44, které jsou kódovány v ERK2 a ERK1 genu, resp. MAPK p42/p44 jsou zapojeny do signální kaskády vyvolané LPS (lipopolysacharidový komplex) a dalšími ligandy prostřednictvím stimulace TLR (Toll-like

receptor). Používá se experimentálně v buněčných kulturách k inhibici aktivit MEK1/2 a downstream kináz ERK1/2. U0126 může být použit ke studiu úlohy ERK.

**PD98059.** Je inhibitorem ERK1/2 kináz a je též pro buňky permeabilní. Jeho IC50 je udáváno různě, od 1-20  $\mu$ M a je používán experimentálně k inhibici ERK1/2 v buněčných kulturách. K plné inhibici kinázové aktivity ERK1/2 se většinou používá 20 $\mu$ M.

## 6.2 Melanomové buněčné linie

Buněčné linie z metastatického melanomu (Tab.1 a 2) byly zakoupeny od firmy Cascade Biologics (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a American Type Culture Collection.

**Tab. 1** Použité melanomové linie a jejich původ

Linie	Typ nádoru	Původ
Hbl	Metastáze maligního melanomu	Neuroblastom
501 mel	Metastáze maligního melanomu	Kolorektální adenokarcinom
SK-MEL-28	Metastáze maligního melanomu	Kolorektální buňky karcinomu
MeWo	Metastáze maligního melanomu	Nemalobuněčný karcinom plic
SK-MEL-2	Metastáze maligního melanomu	Nemalobuněčný karcinom plic

**Tab. 2** Použité melanomové linie a jejich známý stav mutace BRAF a N-ras

Buněčná linie	Mutace BRAF	Mutace Ras	Citace
SK-MEL-28	V600E	?	Mol Cancer Ther.7,2008,2876-8379 Mol Cancer Ther.9,2010,3330-3341 Pigment Cell Melanoma Res.22,2009,785-798 Journal of Translational Medicine 8:39,2010,(1-11) Cell 132,2008,363-374
SK-MEL-2	WT	QG1RN-ras	Mol Cancer Ther.9,2010,3330-3341 Cell 132,2008,363-374
501 mel	V600E	?	Pigment Cell Melanoma Res.22,2009,785-798
MeWo	WT	WT	J.Biol.Chem.284,2009,12306-12317
HBL	WT	WT	Int.J.Biochem.Cell.Biol.44,2012,2244-2252



### 6.3 Kultivace buněk

Používané buněčné kultury byly adherentní, tj. buňky rostly na vhodném kultivačním povrchu polystyrenové kultivační nádoby (Nunclon™ Surface) její povrch je hydrofilní.

Buněčné linie kultivovány při 37°C v inkubátoru (New Brunswick Scientific, Innova<sup>R</sup> CO-170) při použití atmosféry obsahující 5% CO<sub>2</sub> a 10% CO<sub>2</sub>.

Většina linií byla kultivována v DMEM médiu s příslušnými suplementy (10% FBS, penicilin, streptomycin, glutamin), nebo v EMEM médiu s příslušnými suplementy (10% FBS, penicilin, streptomycin, glutamin, pyruvát, NAA), či v RMPI160 médiu s příslušnými suplementy (10% FBS, penicilin, streptomycin, glutamin).

Buňky v kultuře se množí exponenciálně (tzv. log-fáze) až do okamžiku, kde se v důsledku kontaktní inhibice začne růst buněk zpomalovat (dosažení plató). Krátce před koncem exponenciální fáze růstu byly buněčné kultury tzv. pasážovány. Adherentní buňky byly uvolněny od kultivačního povrchu i od sebe navzájem, byly naředěny se a přeneseny do nové kultivační nádoby s čerstvým médiem. K disociaci buněk byla použita kombinace odstranění dvojmocných iontů (vápníku a hořčíku) z média pomocí proteáz (trypsinu).

### 6.4 Inkubace buněk s inhibitorem

Jednotlivé inhibitory byly zakoupeny od firmy Selleckchem a LC Laboratories. Byly rozpuštěné v 100%-ním DMSO na koncentraci 10 až 50 mM. Výsledná koncentrace DMSO při *in vitro* experimentech byla maximálně 0,1 %. Účinek inhibitorů byl sledován v rozmezí koncentrací 0,01 – 40 μM (dasatinib), 0,3 – 30 μM (PD98059) a 500 nM – 126 μM (U0126).

Po 15 min, 1hod, 4 hod, 1, 2 resp. 4-denní kultivaci v přítomnosti testovaného inhibitoru se buňky několikrát opláchly 1x PBS a lyzovaly v RIPA pufru (Tab. 3) obsahující inhibitory proteáz a fosfatáz (Tab. 4) nebo byly zafixovány 3% paraformaldehydem a byly použity pro určení buněčné proliferace.

### 6.5 Příprava buněčných extraktů

Po odsání média se buňky opláchly vychlazeným 1x PBS (fyziologický roztok pufrovaný fosfátem) a na 90 mm misku se přidalo 0,5 ml 1x RIPA lyzačního pufru s přísadkami. Buňky se lyzovaly za lineárního třepání při 4°C na třepačce (Heidolph Polymax 1040) 15 minut, a poté 2-3x propipetovaly a sklídily do ependorf zkumavek, dále pak zcentrifugovaly při 4°C 15 minut na 10 000 rpm. Vzniklý supernatant se stáhl do nových ependorf zkumavek. Buněčné extrakty se skladovali při –80 °C.

**Tab. 3** Složení RIPA pufru

RIPA pufr (finální koncentrace)	RIPA pufr (pracovní koncentrace)
50 Mm TRIS pH 8,0	5,0 ml 1 M TRIS pH 8,0
150 mM NaCl	3,0 ml 5M NaCl
1% Nonidet P-40	10,0 ml 10% Nonidet P-40
0,1% SDS	0,5 ml 20% SDS
0,5% deoxycholát	10,0 ml 5% Na-deoxycholát
	+ddH <sub>2</sub> O do 100 ml, zfiltrvat 0,2 μm

**Tab. 4** Přidávky na 1m RIPA pufru

10 μl 1000x ALP mix (5mg/ml aprotinin + 2 mg/ml leupeptin + 2 mg/ml pepstatin)
50 μl 200 mM PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride)
1 tableta PhosSTOP (Phosphatase Inhibitor Cocktail Tables)
100 μl 100x COMPLETE EDTA-free (kyselina ethylendiamintetraoctová)

## 6.6 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinu byla stanovena na spektrofotometru (THERMO SCIENTIFIC Genesys 10S UV-VIS) při vlnové délce  $\lambda = 595$  nm v plastových kyvetách, při pokojové teplotě (Tab.5).

**Tab. 5** Obsah zkumavek při měření proteinů

1. zkumavka (BLANK): 800 μl ddH <sub>2</sub> O + 200 μl činidlo BIO-RAD
2. zkumavka (KALIBRACE): 790 μl ddH <sub>2</sub> O + 200 μl činidlo + 10 μl BSA (c= 1μg/μl)
3. zkumavka (VZOREK): 798 μl ddH <sub>2</sub> O + 200 μl činidlo BIO-RAD + 2μl vzorek

## 6.7 Určení buněčné proliferace (růst kolonií)

Po inkubaci s inhibítorem byly buňky zafixovány 3% paraformaldehydem, obarveny triarylmethanovým barvivem krystalovou violetí. Krystalová violet' (SIGMA) byla připravena jako 1% roztok v 50% metanolu a zfiltrvaná přes 0,45 μm filtr. Obarvené kolonie byly nafoceny a získané obrázky byly kvantifikovány pomocí softwaru ImageJ.

## 6.8 Růst buněk v měkkém agaru

Pokus byl proveden na 60mm Petriho miskách. Na vrstvu základního agaru (0,7% Noble Agar v kultivačním médiu s obsahem 15% FBS) byla nanášena vrstva vrchního agaru (0,45% Noble Agar v kultivačním médiu s obsahem 15% FBS), která obsahovala

5 x10<sup>4</sup> buněk. Misky byly převrstveny 4 ml kultivačního média s 15 % FBS a s 100 nM nebo 300 nM inhibitorem resp. DMSO. Médium bylo měněno dvakrát týdně. Po 21 dnech byly kolonie obarveny p-indonitrotetrazolovou violetí, nafoceny a kvantifikovány pomocí softwaru ImageJ..

## 6.9 Western bloty

### 6.9.1 SDS-PAGE

Western bloty byly provedeny standardně, po separaci proteinů metodou SDS-PAGE, tj. elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsíránem sodným (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). Byly použity gely s obsahem SDS, kde se horní úsek nazývá tzv. „stacking“ gel a dolní úsek „separační“ gel. Přesné složení gelů je uvedeno v Tab.č. 6 a 7. Buněčné extrakty byly připraveny v RIPA pufru obsahujícím inhibitory proteáz a fosfatáz. Před nanesením na gel byly vzorky smíchány s 5 x koncentrovaným vzorkovým pufrům (=loading pufr, přesné složení pufru a příprava vzorku před elektroforézou je uvedeno v tab.č.8 a 9) a zahřáté na 98 °C po dobu 2 minut. Na jamku bylo naneseno množství vzorku, které obsahovalo 10-15 µg celkových proteinů. Do jedné jamky gelu byl rovněž nanesen proteinový marker (Blue Protein Ladder, BIOSYSTEMS).

Jako elektroforetický pufr byl použitý 1x Tris-glycin-SDS pufr (25 mM Tris base, 190 mM glycin, 0,1% SDS, pH 8,3). Elektroforéza probíhala po dobu 90 minut při napětí 120 V.

Pro přenos proteinů z gelu na polyvinylou membránu PVDF (Immobilon P-Millipore) byl využitý elektroforetický transfer, tzv. elektroblot (TRANS-BLOT<sup>R</sup> SD, SEMI-DRY TRANSFER CELL BIO-RAD), při napětí 15 V po dobu 30 minut. Po ukončení transferu byla membrána vložena na 30 minut do lyofilizátoru (Concentrator 5301, Eppendorf), kde došlo k jejímu usušení a tím zároveň k fixaci vzorku.

**Tab. 6** Složení dolního „separačního“ gelu pro SDS-PAGE

	6%	8%	10%	12%	13,5%	15%
30% AA stock	2,4 ml	3,2 ml	3,96 ml	4,8 ml	5,4 ml	6,0 ml
1M TRIS pH 8,8	4,5 ml	4,5 ml	4,5 ml	4,5 ml	4,5 ml	4,5ml
20% SDS	0,06 ml	0,06 ml	0,06 ml	0,06 ml	0,06 ml	0,06 ml
dd H <sub>2</sub> O	4,94 ml	4,14 ml	3,38 ml	2,54 ml	1,94 ml	1,34 ml

- 84 µl 10% APS (ammonium persulfát) a 4,8 µl TEMED (tetramethylethylendiamin)

**Tab. 7** Složení horního „stacking“ gelu pro SDS-PAGE

30% AA stock	660 $\mu$ l
0,5 M TRIS pH 6,8	700 $\mu$ l
20% SDS	25 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	3,57 ml
10 % APS	50 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l

**Tab. 8** Složení 5 x konc. vzorkového pufru

7,5 ml	100% glycerol
1,5 g	SDS
0,2-0,3 ml	Bromfenol Blue

**Tab.9** Příprava vzorku před elektroforézou

10 $\mu$ l	vzorkový pufr
5 $\mu$ l	1M DTT (dithiotreitol)
35 $\mu$ l	vzorek

### 6.9.2 Blokování nespecifického vázání protilátek na membránu

Pro zajištění, aby se protilátky při inkubaci s membránou navazovaly specificky k antigenům na vzorcích a ne celkově k povrchu membrány bylo provedeno tzv. blokování membrány. Blokování membrány se provádělo v 5-10 % blokovacím roztoku (MILK-Blotto, Non-Fat SANTA CRUZ) a probíhalo 1 hodinu při pokojové teplotě za konstantního, lehkého protřepávání. Jako promývací roztok byl použitý 1x T-PBS, obsahující 1x PBS (phosphate buffered saline) s přidavkem detergentu pro snížení nespecifického pozadí (0,05% Tween 20).

### 6.9.3 Inkubace s protilátkami

Příslušný protein navázaný na membráně (PVDF) byl detekován pomocí primární protilátky. Výběr primární protilátky byl vázán příslušným antigenem a komerční dostupností dané protilátky. Primární protilátky byly pro experimenty ředěny v T-PBS nejčastěji v rozsahu 1/100 – 1/1000 ze zásobního roztoku 1mg/ml. Inkubační čas byl závislý na vazebné schopnosti protilátky k proteinu a také množství proteinu, obvykle 1-12 hodin za konstantního, lehkého třepání. Při déle trvající inkubaci (více jak 1 hodina) byla inkubace prováděna při teplotě 4°C pro zamezení mikrobiální kontaminace a tím zamezení degradace proteinů.

Pro vizualizaci primární protilátky byla použita značená sekundární protilátka, která rozpoznává primární protilátku a váže se na ni. Byly použité sekundární protilátky

konjugovány s reportérovým enzymem peroxidázou. Sekundární protilátka byla naředěna v promývacím roztoku. Inkubační doba byla 1 hodina při pokojové teplotě za konstantního protřepávání. Pro optimální výsledek bylo vhodné ředění zjištěno empiricky. Příliš velké ředění by vedlo k nízkému signálu, naopak příliš nízké ředění by vedlo k velkému nespecifickému pozadí.

#### **Použité primární protilátky (Cell Signaling)**

Anti-fosfo ERK1/2: p-p44/42 MAPK (Erk1/2)Thr202/Tyr204 (#9101)

Anti-nefosforylovaná, kontrolní p44/42 MAPK (Erk1/2) (#9102)

Anti-fosfo-src p-Src family (Y416) (#6943)

Anti-fosfo p-pS6 ribosomal (Ser235/236) (#2211)

Anti-fosfo p-Akt (Ser473) (D9E) (#4060)

Anti-fosfo p-Akt (Thr308) (#4056)

Anti-fosfo p-38 MAPK (Thr180/Tyr 182) (D3F9) (#4511)

Anti-fosfo SAPK/JNK (Thr 183/Tyr 185) (81E11) (#4668)

Anti-fosfo p-mTOR (Ser2448) (D9C2) (#5536)

Anti-fosfo p-MEK1/2 (Ser217/221) (41G9) (#9154)

Anti-fosfo p-p70S6K (Thr389) (#9206)

Anti B-RAF: Raf-B (H-145), Santa Cruz Biotechnology (sc-9002)

Anti-fosfo p-p70S6K (Thr389) (#9206)

Anti actin: b-actin (clone AC-74), Sigma (A 5316)

#### **Použité sekundární protilátky (Cell Signaling)**

Anti-rabbit, HRP-linked Antibody (#7074S)

Anti-mouse, HRP-linked Antibody (#7076S)

#### **6.9.4 Detekce**

Pro detekci proteinů byl použit chemiluminiscenční systém využívající křenovou peroxidázu.

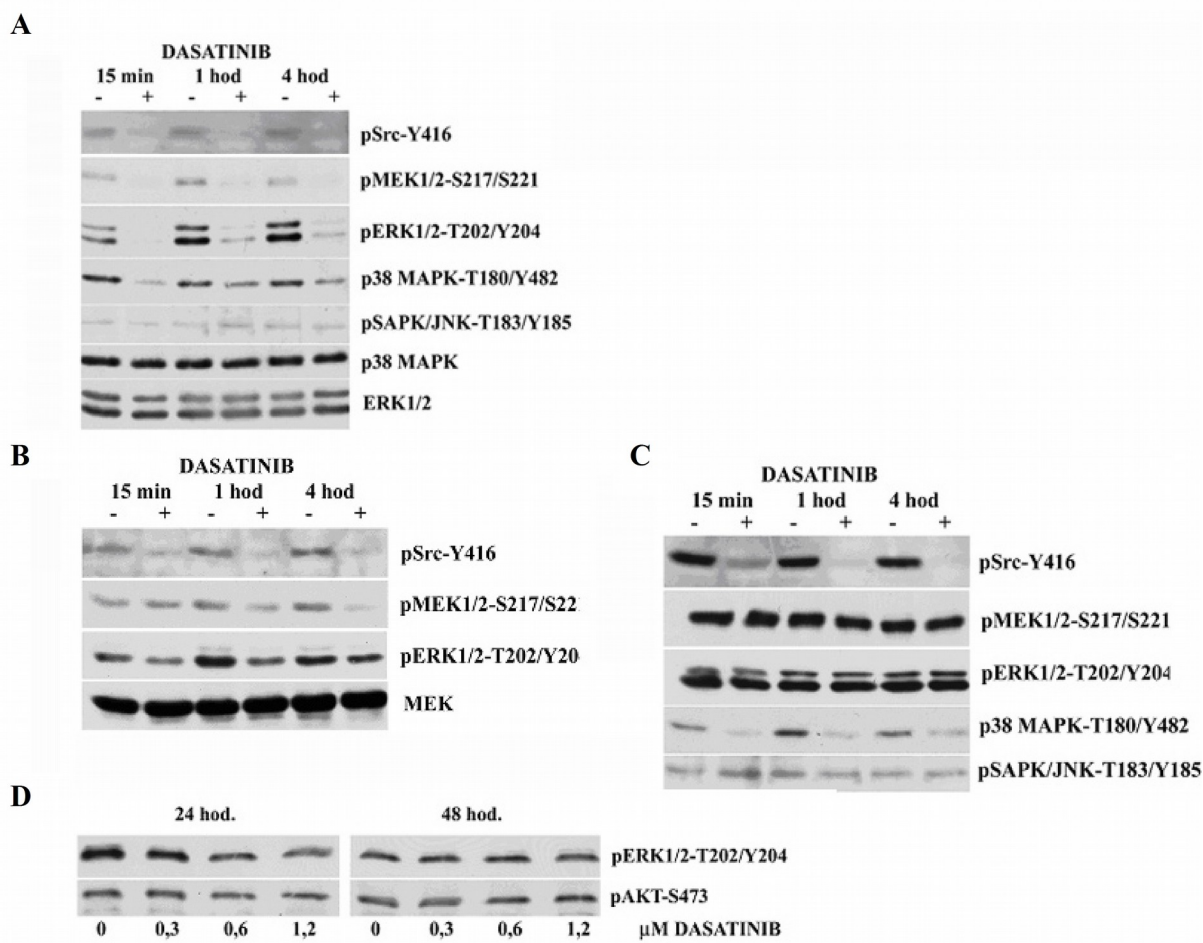
Membrána byla převrstvena směsí roztoků ECL 1 (luminol, kyselina kumarová, 1M TRIS-HCL, pH 8,5, H<sub>2</sub>O) a ECL 2 (1M TRIS-HCL pH 8,5, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O) v poměru 1:1. Po dobu 1 min. bylo množství chemiluminiscenčního signálu, které je úměrné množství navázaného enzymu a přímo úměrné množství detekovaného proteinu, detekováno na autoradiografický film (UltraCruz). Film byl vyvolán v přístroji KODAK za použití činidla RPX-OMAT LO a X-OMAT EX II.

## 7 VÝSLEDKY

### 7.1 Vliv dasatinibu na Src a MAPK

Byl sledován vliv dasatinibu na fosforylaci Src a MAPK u buněčných liniích Hbl, 501mel a SK-MEL-28. Po 15 min, 1 hod, 4 hod, 24 hod, resp. 48 hod.-inkubaci s 200 nM dasatinibem byly buňky sklizeny do RIPA pufru a analyzovány pomocí Western blotu.

V pokusech bylo potvrzeno, že dasatinib inhibuje fosforylaci Src u všech testovaných melanomových linií (obr. 5A, 5B, 5C). Melanomové linie se však lišily v inhibici MAPK signální cesty po inkubaci s dasatinibem. U melanomových buněk Hbl byla již po 15min.-inkubaci s 200nM dasatinibem inhibována signální cesta MEK/ERK a p38 MAPK (Obr. 5A). U melanomových buněk 501mel bylo pozorováno slabší inhibice MAPK signální dráhy (Obr. 5B), kterou výrazně neovlivnila ani dvoudenní inkubace a vyšší koncentrace dasatinibu (obr. 5D). U buněčné linie SK-MEL-28 nebyl pozorován také žádný vliv na hlavní MAPK cestu MEK/ERK, ani na JNK. Fosforylace p38 kinázy u SK-MEL-28 inhibována byla (Obr. 5C).



**Obr. 5** Účinek 200nM dasatinibu na fosforylaci Src a signální dráhy MAPK u melanomových buněk:

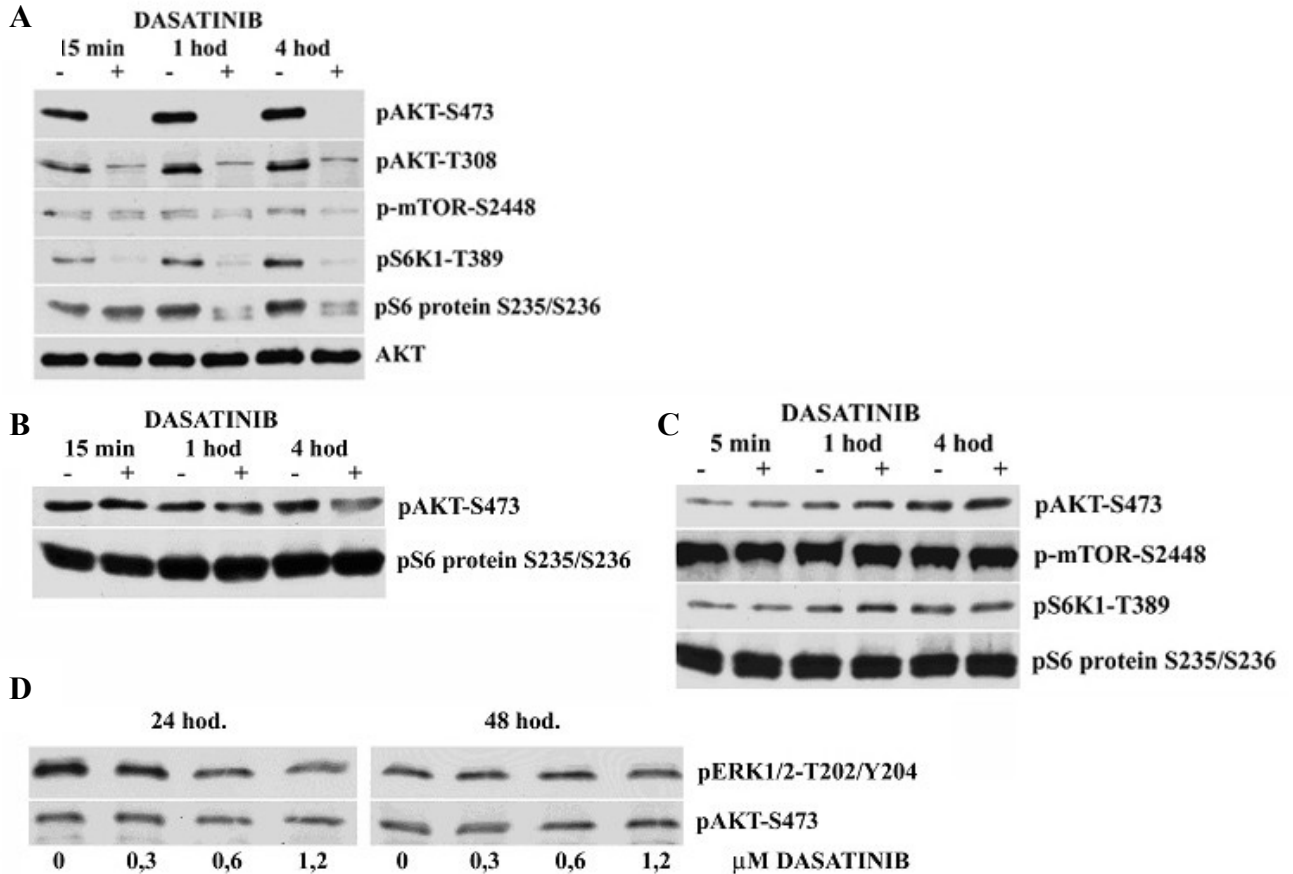
- A. Hbl
- B. 501 mel
- C. SK-MEL-28
- D. Účinek různých koncentrací dasatinibu na signální dráhu MAPK a AKT u buněk 501mel

## 7.2 Vliv dasatinibu na AKT/mTOR

Byl sledován vliv dasatinibu na fosforylaci složek dráhy AKT/mTOR u buněčných linií Hbl, 501 mel a SK-MEL-28. Po 15 min, 1 hod, 4 hod, 24 hod, resp. 48 hod.-inkubaci s 200 nM dasatinibem byly buňky sklizeny do RIPA pufru a analyzovány pomocí Western blotu.

Melanomové buněčné linie se po inkubaci s 200 nM dasatinibem lišily v inhibici signální dráhy AKT/mTOR. U melanomových buněk Hbl byla inhibována fosforylace AKT, mTOR (i

když u této kinázy méně), S6K1 kinázy i S6 proteinu (Obr. 6A). Buňky 501mel nereagovali na účinek dasatinibu (obr. 6B) a ani stoupající délka inkubace a koncentrace dasatinibu nezpůsobily výraznou inhibici AKT signální dráhy (obr. 6C). U SK-MEL-28 buněk byla krátkodobá inkubace s dasatinibem (200 nM) zcela bez účinku na fosforylaci složek signální dráhy AKT (obr. 6D).



**Obr. 6** Účinek 200nM dasatinibu na signální dráhu Akt u melanomových buněk:

- A. Hbl
- B. 501 mel
- C. SK-MEL-28
- D. Účinek různých koncentrací dasatinibu na signální dráhu MAPK a Akt u 501mel buněk

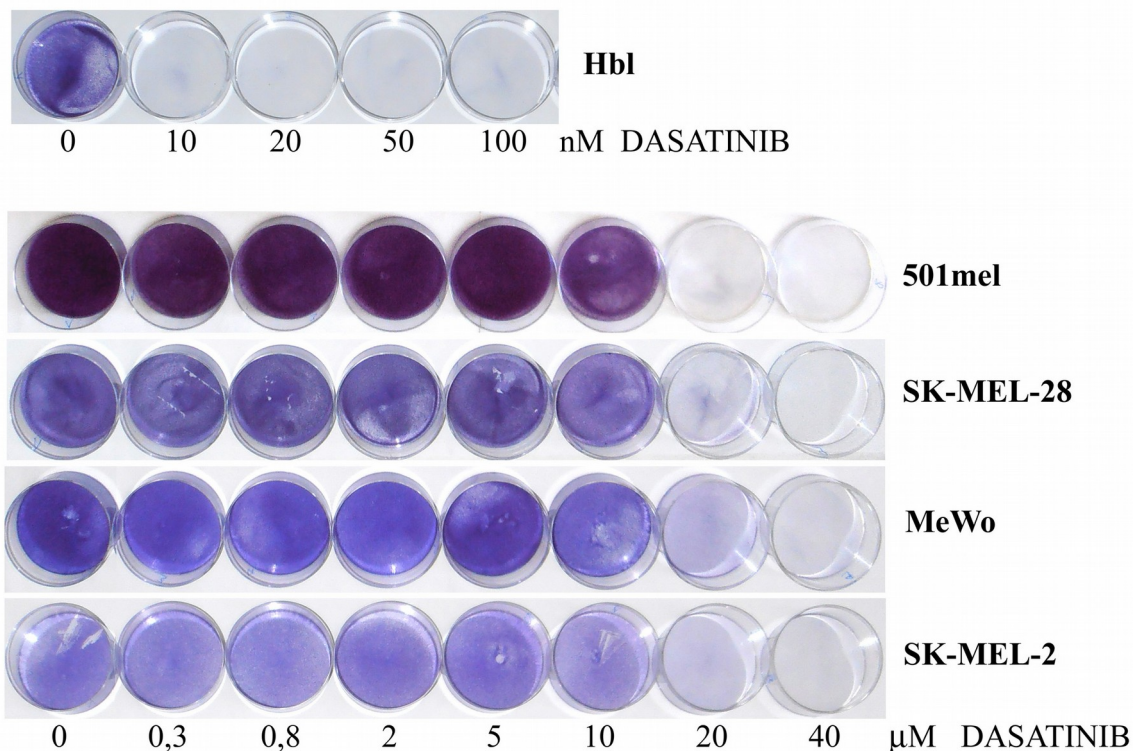
### 7.3 Vliv dasatinibu na proliferaci

Byl sledován vliv dasatinibu na proliferaci 5 buněčných linií. Proliferace byla sledována jako růst kolonií po dobu 6 dnů.

Citlivost na dasatinib u Hbl byla více než o 3 řády větší než citlivost na dasatinib u ostatních linií (obr. 7). Dasatinib v koncentraci 10 nM úplně potlačil proliferaci u Hbl buněk.



U ostatních linií byla potřebná koncentrace dasatinibu 20  $\mu\text{M}$ . Mutace genu BRAF nemá na tuto citlivost vliv. (Stav mutace genu BRAF viz. Tab. 2)

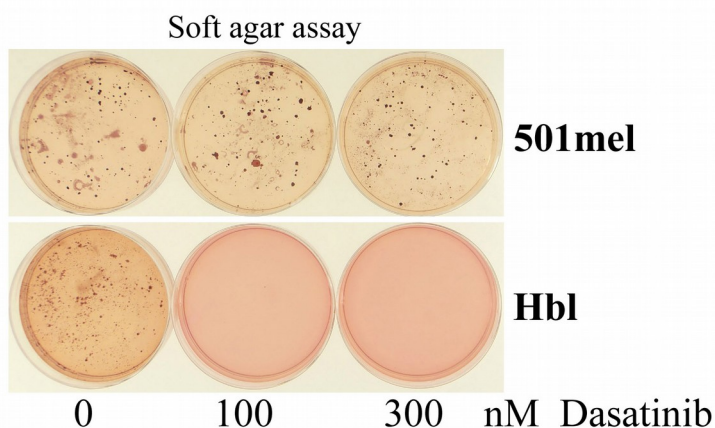


**Obr. 7** Účinek dasatinibu na proliferaci melanomových buněk

#### 7.4 Vliv dasatinibu na růst kolonií v měkkém agaru

Byl testován vliv dasatinibu na růst kolonií v měkkém agaru a citlivost tvorby kolonií u dvou buněčných linií, Hbl, citlivé na dasatinib, a 501 mel, resistentní vůči dasatinibu. Testovány byly dvě koncentrace dasatinibu, 100 a 300 nM.

Po 21 dnech kultivace Hbl buněk v měkkém agaru v médiu s 100 nM dasatinibem nebyla pozorována žádná tvorba kolonií. U buněk 501 mel ani vyšší koncentrace dasatinibu 300 nM neinhibovala tvorbu kolonií a buňky tvořili kolonie stejně jako v kontrole bez dasatinibu (obr. 8).



**Obr. 8** Účinek dasatinibu na růst kolonií 501 mel a Hbl buněk v měkkém agaru

### 7.5 Vliv U0126, Selumetinibu a PD9809 na MAPK

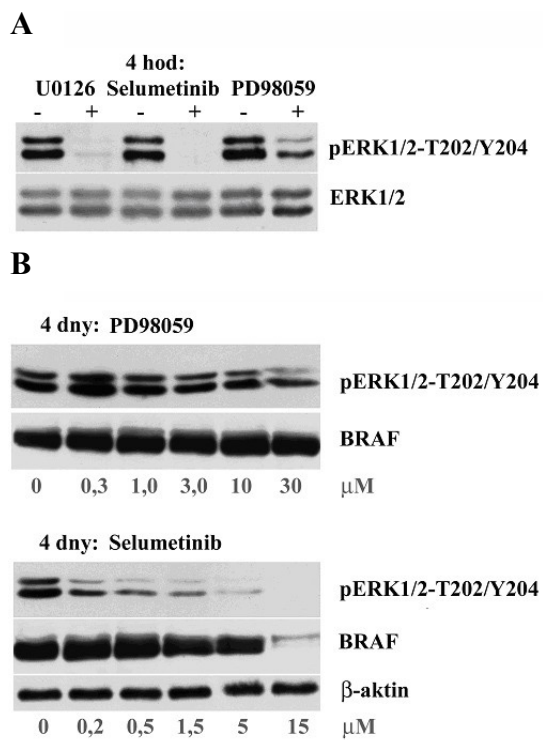
Byl proveden kontrolní pokus, ve kterém byl sledován vliv inhibitorů U0126, Selumetinibu a PD9809 na MAPK u buněčných liniích Hbl, 501 mel a SK-MEL-28. Po 4 hod, resp. 4 denní-inkubaci s příslušným inhibitorem byly buňky sklizeny do RIPA pufru a analyzovány pomocí Western blotu.

Inhibitory MEK U0126 a Selumetinib a inhibitor ERK1/2 PD98059 po krátké 4 hodinové inkubaci inhibovaly fosforylaci ERK1/2 v Hbl buňkách (obr. 9A). Po čtyřdenní inkubaci Hbl buněk ve stoupající koncentraci PD98059 a Selumetinibu se snižovala fosforylace ERK1/2 (v případě Selumetinibu mnohem výrazněji) a v nejvyšší koncentraci Selumetinibu rovněž prudce klesla exprese BRAF (obr. 9B). Výsledky fosforylace ERK1/2 korelují s proliferací buněk zjištěnou pomocí růstu kolonií (viz. Obr. 14 a 15).

U buněčné linie 501mel, inhibitory U0126, Selumetinib a PD98059 kompletně inhibovaly MAPK signální dráhu po 4 hodinách, tedy výsledek byl odlišný od účinku dasatinibu (obr. 10A). Při kontrolní inhubaci 501mel buněk ve stoupajících koncentracích inhibitorů PD98059 a Selumetinibu došlo při vyšších koncentracích PD98059 k inhibici MAPK cesty (zmenšená fosforylace ERK1/2). Selumetinib, inhibitor MEK1/2, způsobil mnohem silnější a při vyšších koncentracích kompletní inhibici cesty MAPK (obr. 10B). Tyto výsledky korelovaly s proliferačními experimenty (buněčná proliverace viz. obr. 14 a 15). Selumetinib se jevil jako mnohem účinnější inhibitor MAPK cesty.

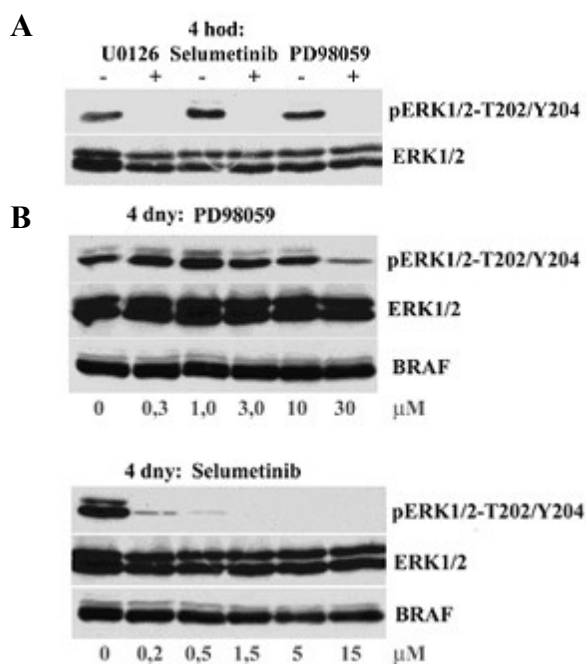
U buněčné linie SK-MEL-28 bylo opět dosaženo kompletní inhibice fosforylace ERK1/2 pomocí U0126, Selumetinibu a PD98059 po 4 hodinách (obr. 11A). Výsledky fosforylace ERK1/2 za přítomnosti inhibitorů PD98059 a Selumetinibu po dobu 4 dnů byly

podobné jako u 501mel buněk (i když SK-MEL-28 byly o něco méně citlivé k Selumetinibu) (obr. 11B). Výsledky opět korelovaly s růstem buněčných kolonií (buněčná proliferace viz. obr. 14 a 15).).



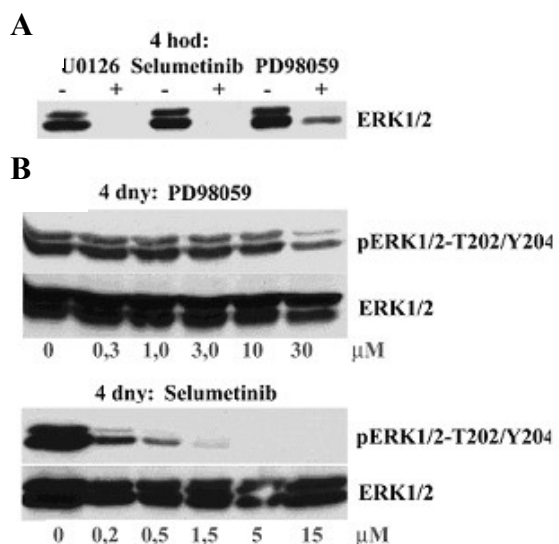
### Obr. 9

- Účinek inhibitorů MAPK na signální dráhu ERK1/2 u buněk Hbl
- Účinek inhibitorů PD98059 a Selumetinibu na signální dráhu MAPK u buněk Hbl po 4 denní-inkubaci



**Obr. 10**

- A. Účinek inhibitorů MAPK na signální dráhu ERK1/2 u buněk 501 mel.
- B. Účinek inhibitorů PD98059 a Selumetinibu na signální dráhu MAPK u buněk 501 mel po 4-denní inkubaci.



**Obr. 11**

- A. Účinek inhibitorů MAPK na signální dráhu ERK1/2 u buněk SK-MEL-28.
- B. Účinek inhibitorů PD98059 a Selumetinibu na signální dráhu MAPK u buněk SK-MEL-28 po 4-denní inkubaci.

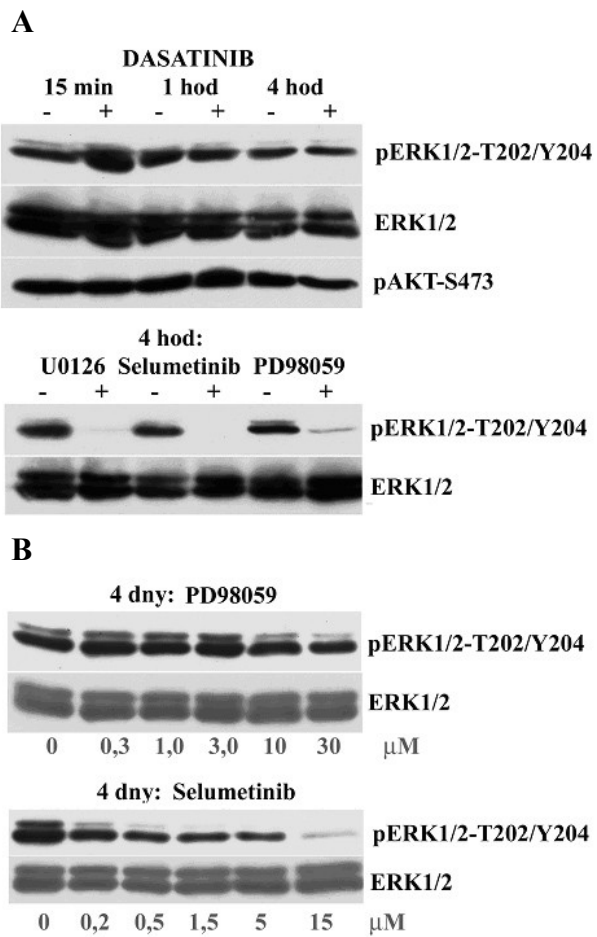
## 7.6 Vliv dasatinibu, U0126, Selumetinibu a PD98059 na MAPK u MeWo a SK-MEL-2

Dosažené výsledky s použitými buněčnými liniemi naznačovaly, že citlivost melanomových buněčných linií k dasatinibu může souviset s přítomností mutace BRAF (V600E) (Hbl-nemutovaný BRAF, 501 mel a SK-MEL-28 – mutovaný BRAF). Pro potvrzení byly testovány další 2 melanomové linie s nepřítomnou mutací BRAF (V600E), MeWo a SK-MEL-2.

Bylo sledován vliv inhibitorů na MAPK u buněčné linie MeWo. Po 15 min, 1 hod, 4 hod, resp. 4-denní inkubaci s inhibitorem byly buňky sklizeny do RIPA pufry a analyzovány pomocí Western blotu.

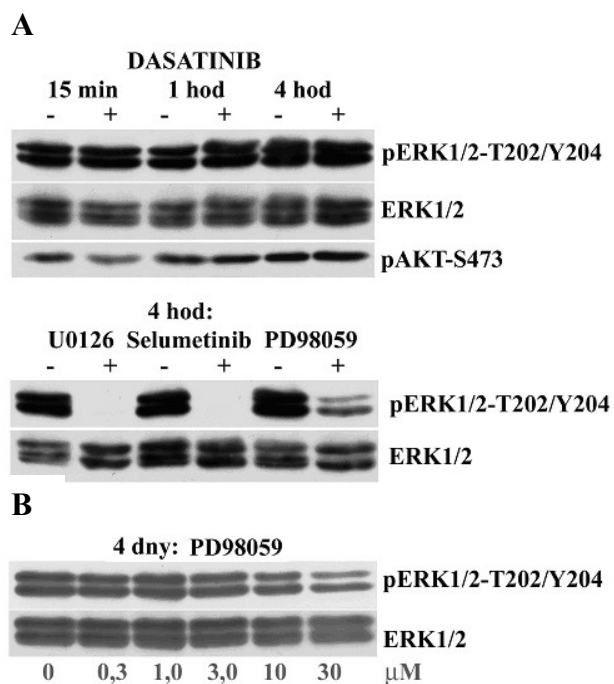
Po 4-hodinové inkubaci s dasatinibem byla fosforylace ERK1/2 inhibována jen nepatrně, při kratších inkubacích vůbec. Kontrolní pokus s inhibitory U0126, Selumetinibem a PD98059 ukázal účinnost těchto inhibitorů na MAPK cestu (inhibice fosforylace ERK1/2) (obr. 12A). Inhibitor ERK1/2 PD98059 ve stoupajících koncentracích byl téměř neúčinný při inhibici fosforylace ERK1/2. Inhibitor MEK Selumetinib byl sice o něco účinnější, ale méně účinný než u 501mel a SK-MEL-28 buněk, které mají mutovaný BRAF. Inkubace s inhibitory trvala 4 dny (obr. 12B).

Podobně byl dasatinib zcela neúčinný u buněk SK-MEL-2. Kontrolní experimenty prokázaly inhibici inhibitory MEK/ERK (obr. 13A). PD98059 byl téměř neúčinný při inhibici fosforylace ERK1/2 při 4-denní inkubaci.(obr. 13B) Výsledky se Selumetinibem nejsou ukázány, protože již při první nízké koncentraci po kontrole zcela zahubil buňky a extrakt tedy nešlo připravit. To korelovalo s extrémní citlivostí SK-MEL-2 k Selumetinibu v proliferačních pokusech (Obr. 15).



**Obr. 12**

- A. Účinek dasatinibu a inhibitorů MAPK na signální dráhu MAPK u buněk MeWo
- B. Účinek inhibitoru PD98059 a Selumetinibu na signální dráhu MAPK u buněk MeWo po delší 4-denní inkubaci.



**Obr. 13**

- A. Účinek dasatinibu a inhibitorů MAPK na signální dráhu MAPK u buněk SK-MEL-2.  
 B. Účinek inhibitoru PD98059 na signální dráhu MAPK u buněk SK-MEL-2 po delší 4-denní inkubaci.

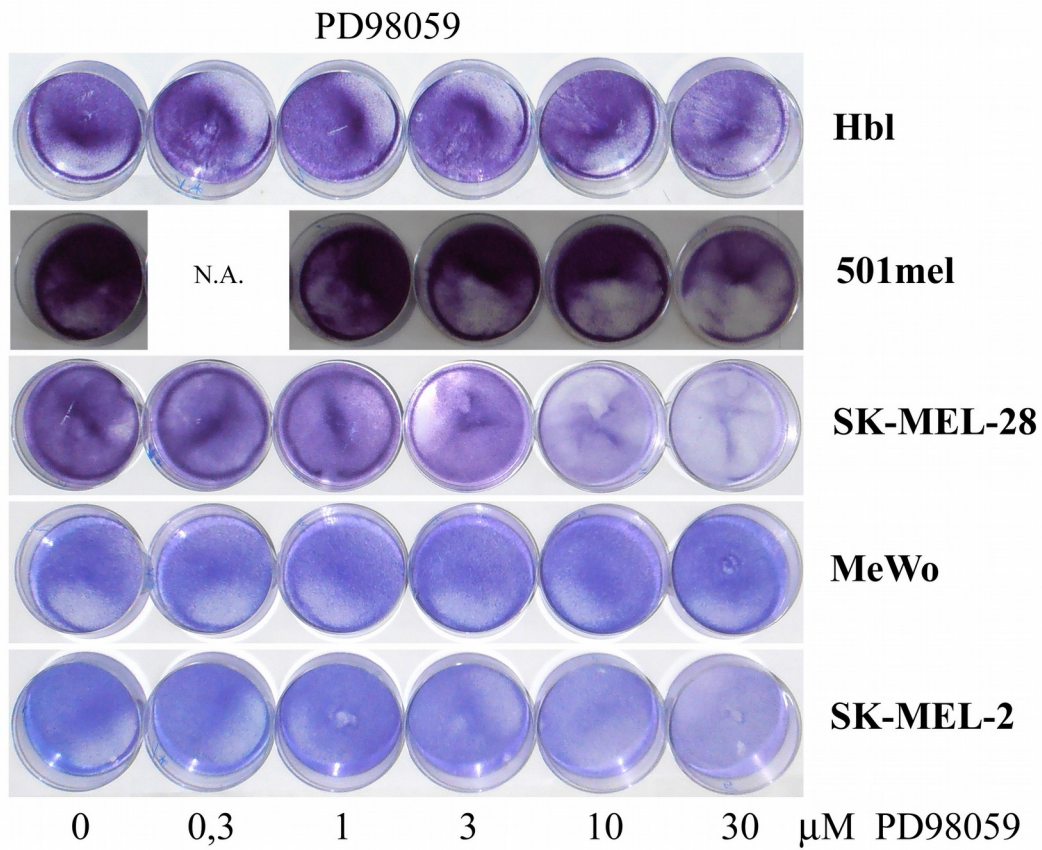
### 7.7 Vliv PD98059 a Selumetinibu na proliferaci

Byl sledován vliv inhibitoru ERK1/2 PD98059 a inhibitoru MEK Selumetinibu na proliferaci 5 buněčných linií. Proliferace byla sledována jako růst kolonií po dobu 6 dnů.

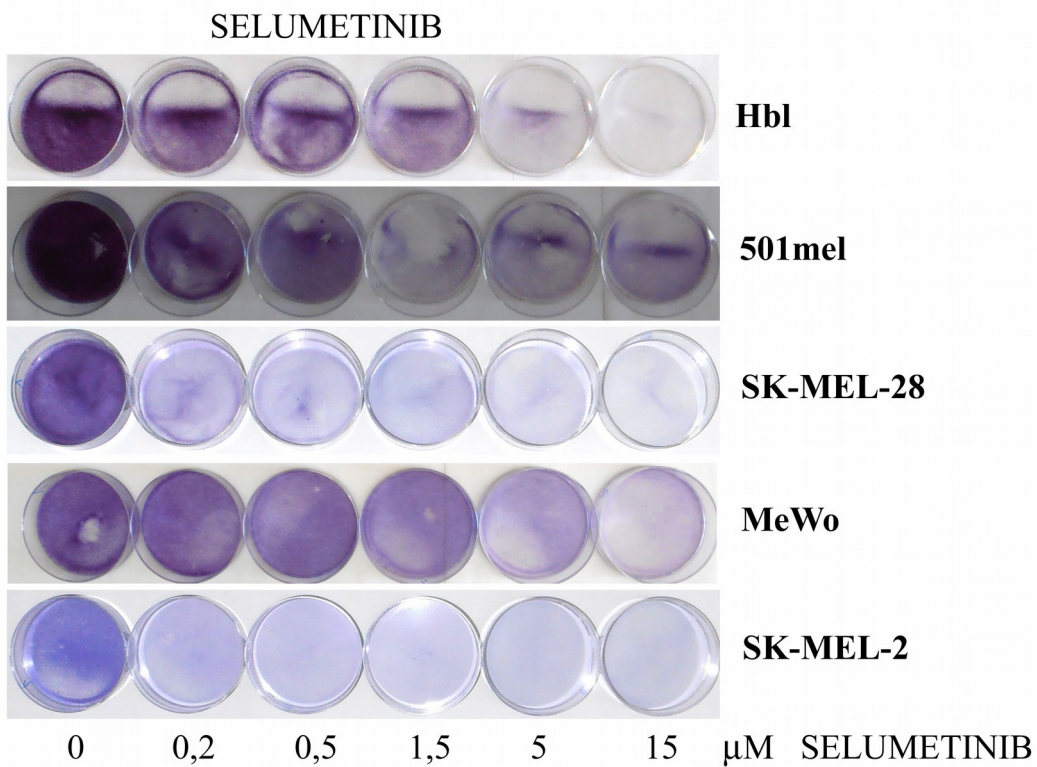
Všechny linie se chovaly jako resistantní vůči inhibitoru PD98059, určitá citlivost při vyšších koncentracích byla zaznamenána u buněk SK-MEL-28 a 501mel (obr. 14).

V případě Selumetinibu byly buňky celkově mnohem citlivější. Nejvíce reagovali SK-MEL-2 a HBl. Relativně málo reagovali buňky 501 mel a nejméně MeWo (obr. 15).





**Obr. 14** Vliv PD98059 na proliferaci melanomových buněk



**Obr. 15** Vliv selumetinibu na proliferaci melanomových buněk



## 8 DISKUZE

V předkládané diplomové práci byl zkoumán vliv dasatinibu, multikinázového inhibitoru mnoha tyrosin kináz, který silně inhibuje kinázovou aktivitu onkogenu Src. Začíná se rovněž používat při léčbě melanomu. Ukazuje se však, jak vyplývá i z těchto výsledků, že tyto léčebné zásahy “cílené” léčby mají stále malý racionální molekulární podklad, neboť není znám přesný molekulární mechanismus jejich působení a zejména získané resistance. Klinicky příznivá odpověď uvedených léků je jen u malého procenta pacientů.

Ve více než 60% případů melanomu je mutován gen BRAF, jeden ze tří RAF onkogenů. Melanomy s BRAF mutací (téměř vždy V600E) se léčí mimo jiné inhibitorem BRAF vemurafenibem, avšak některé nádory (i buněčné linie) jsou přirozeně rezistentní nebo rezistenci získají během léčby. MAPK cesta je přitom stále aktivována, což ukazuje na možnosti aktivovat tuto klíčovou dráhu i alternativně bez aktivovaného BRAF. K léčbě melanomu se začíná používat i Selumetinib, silný inhibitor MEK1/2, a tedy i silný inhibitor výkonné kinázy MAPK cesty ERK1/2.

Dasatinib jako možný inhibitor proliferace melanomových buněk byl zkoumán minimálně ze dvou důvodů. Za prvé, inhibice signální dráhy AKT/mTOR, která je rovněž deregulována u melanomu, bylo dříve dosaženo pomocí inhibice onkogenní Src kinázy, a to i za přítomnosti konstitučně aktivní AKT kinázy, neboť se mělo za to, že aktivovaný Src je nezbytný pro aktivaci AKT (Vojtěchová a spol., 2008). Src tedy pravděpodobně může působit na tuto dráhu i downstream od AKT. Za druhé, podávání dasatinibu výrazně rušilo získanou rezistenci melanomových buněk vůči vemurafenibu, inhibitoru aktivovaného BRAF (Girotti a spol., 2013).

V počátečních pokusech s buněčnými liniemi lidského melanomu Hbl (BRAF wt) a 501mel a SK-MEL-28 (obě BRAF V600E) byly získány výsledky, které indikovaly, že citlivost melanomových buněk k dasatinibu se může řídit mutací BRAF. Buňky s wt BRAF (Hbl) byly více než 1000x citlivější v proliferačních studiích než buňky s mutovaným BRAF (501mel a SK-MEL-28) (Obr. 7 a 8). Rovněž v korelaci s těmito výsledky byly signální dráhy MAPK i AKT/mTOR zcela inhibovány u Hbl buněk, nikoliv však u buněk 501mel a SK-MEL-28 (Obr. 5, 6, 9, 10 a 11). K verifikaci těchto výsledků bylo zapotřebí provést experimenty s větším množstvím buněčných linií, a to zejména s buňkami BRAF wt. Zvolili jsme tedy další 2 buněčné linie s wt BRAF, a to MeWo a SK-MEL-2 buňky. Překvapivě, obě tyto buněčné linie byly necitlivé vůči vysokým dávkám dasatinibu, a podobaly se tedy v tomto ohledu buňkám 501mel a SK-MEL-28 (Obr. 7). Rovněž inhibice obou hlavních signálních cest (MAPK a AKT/mTOR) nebylo možné dosáhnout pomocí dasatinibu (Obr. 12

a 13). Citlivost vůči dasatinibu se tedy neřídila přítomností nemutovaného či mutovaného BRAF onkogenu. Hbl buňky jsou mimořádně citlivé vůči dasatinibu, avšak molekulární podklad proč pouze tyto buňky jsou citlivé není zatím uspokojivě vysvětlen. U všech buněčných linií byla pozorována relativní neúčinnost PD98059 vůči proliferaci všech zkoumaných buněčných linií (Obr. 14), avšak inhibitor MEK1/2 Selumetinib byl mnohem více účinný, nejvíce v buňkách SK-MEL-2 (Obr. 15). Podobná velmi rozdílná účinnost dasatinibu vůči proliferaci buněk byla u melanomových linií v jiném experimentálním uspořádání popsána již dříve (Eustace a spol., 2008). Ze zatím získaných výsledků vyplývá poněkud překvapivý závěr, že samotný aplikovaný dasatinib je ve většině melanomových linií neúčinný jako protinádorový lék, neboť v tolerovatelných dávkách nemá vliv na buněčnou proliferaci, byť je tento přípravek v posledních fázích klinických zkoušek pro léčbu melanomu.

Navíc je nutné zjistit podklad pro extrémní rozdílnost buněk Hbl, jež jsou extrémně citlivé vůči dasatinibu, a ostatních buněk melanomových buněčných linií, které jsou vůči dasatinibu necitlivé. Je možné, že kombinace s jinými léčivy učiní dasatinib účinným protinádorovým lékem u melanomu.

Jeho zjištěná neúčinnost u zkoumaných buněk (kromě Hbl linie) je zjevně způsobena jeho neschopností inhibovat obě hlavní signální cesty, MAPK a AKT/mTOR u melanomových buněk. Dále proto je zkoumáno spojení na další signální dráhy (např. Hedgehog) důležité při proliferaci melanomových buněk a dosažení současné inhibice obou zmíněných signálních drah kombinací dostupných inhibitorů, které přicházejí v úvahu i při terapeutickém zásahu u melanomu.

## 9 ZÁVĚR

Maligní melanom je vysoce zhoubné onemocnění, které patří mezi stále častěji se vyskytující nádorová onemocnění.

Současná léčba spočívá zejména v chirurgickém odstranění nádorů s následnou chemoterapií a radioterapií. Dasatinib je u některých typů nádorů používán jako protinádorový lék v kombinaci s dalšími chemoterapeutiky, a u jiných typů nádorů je v poslední fázi klinických zkoušek. Stále není jasný přesný molekulární mechanismus jeho působení u jednotlivých nádorových typů. V této práci byl zkoumán vliv několika inhibitorů (Selumetinib, U0126, PD9809, Dasatinib) na melanomové buněčné linie. U všech buněčných linií byla pozorována relativní neúčinnost PD98059 vůči proliferaci všech zkoumaných buněčných linií, ale Selumetinib byl relativně účinný, nejvíce v buňkách SK-MEL-2. Překvapivým závěrem je, že samostatně aplikovaný dasatinib je ve většině melanomových linií neúčinný až na buňky Hbl, které vykazují extrémní citlivost na Dasatinib.

## 10 LITERATURA

Bantscheff M, Eberhard D, Abraham Y a spol. (2007) Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors. *Nat Biotechnol* 25 (9), 1035-44.

Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL a spol. (1998) Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 17, 1395-413.

Chang H, Li Q, Moraes RC a spol. (2010) Activation of Erk by sonic hedgehog independent of canonical hedgehog signalling. *Int J Biochem Cell Biol* 42 (9), 1462-71.

Clemente C, Cochran AJ, Elder DE a spol. (1991) Histopathologic diagnosis of dysplastic nevi: concordance among pathologists convened by the World Health Organization Melanoma Programme. *Hum Pathol* 22 (4), 313-9.

Datta R, Kojima H, Yoshida K a spol. (1997) Caspase-3-mediated cleavage of protein kinase C theta in induction of apoptosis. *J Biol Chem* 272 (33), 20317-20.

Davies H, Bignell GR, Cox C a spol. (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417 (6892), 949-54.

Eustace AJ, Crown J, Clynes M a spol. (2008) Preclinical evaluation of dasatinib, a potent Src kinase inhibitor, in melanoma cell lines. *J Transl Med* 6:53. doi: 10.1186/1479-5876-6-53., 53-6.

Fuse N, Yasumoto K, Suzuki H a spol. (1996) Identification of a melanocyte-type promoter of the microphthalmia-associated transcription factor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 219 (3), 702-7.

Franke H, Sauer C, Rudolph C a spol. (2009) P2 receptor-mediated stimulation of the PI3-K/Akt-pathway in vivo.

Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA a spol. (2005) Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* 436 (7047), 117-22.

- Garraway LA a Sellers WR. (2006) Lineage dependency and lineage-survival oncogenes in human cancer. *Nat Rev Cancer* 6 (8), 593-602.
- Girotti MR, Pedersen M, Sanchez-Laorden B a spol. (2013) Inhibiting EGF receptor or SRC family kinase signaling overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Cancer Discov* 3 (2), 158-67.
- Gnoni A, Marech I, Silvestris N a spol. (2011) Dasatinib: an anti-tumour agent via Src inhibition. *Curr Drug Targets* 12 (4), 563-78.
- Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. (2007) Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445 (7130), 851-7.
- Guertin DA a Sabatini DM. (2005) An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol Med* 11 (8), 353-61.
- Huang S a Houghton PJ. (2003) Targeting mTOR signaling for cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* 3 (4), 371-7.
- Jiang T a Qiu Y. (2003) Interaction between Src and a C-terminal proline-rich motif of Akt is required for Akt activation. *J Biol Chem* 278 (18), 15789-93.
- Krajsová I (2006) *Melanom*. Maxdorf, Praha, 332.
- Kolch W (2005) Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors.
- Lau KH, Stiffel V, Amoui M (2012) An osteoclastic protein-tyrosin phosphatase regulates the  $\beta$ 3-integrin, syk, and shp1 signaling through respective src-dependent phosphorylation in osteoclasts.
- Levy C, Khaled M, Fisher DE. (2006) MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* 12 (9), 406-14.
- Marais R, Light Y, Paterson HF a spol. (1997) Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *J Biol Chem* 272 (7), 4378-83.
- Margolin KA. (2004) Biochemotherapy for melanoma: rational therapeutics in the search for weapons of melanoma destruction. *Cancer* 101 (3), 435-8.

- Massone C, Di Stefani A, Soyer HP. (2005) Dermoscopy for skin cancer detection. *Curr Opin Oncol* 17 (2), 147-53.
- Martin JL, Avkiran M, Quinlan RA, Cohen P, Marber MS (2001) Antiischemic effects of SB203580 are mediated through the inhibition of p38alpha mitogen-activated protein kinase: Evidence from ectopic expression of an inhibition-resistant kinase.
- Matsuoka T a Yashiro M. (2014) The Role of PI3K/Akt/mTOR Signaling in Gastric Carcinoma. *Cancers (Basel)* 6 (3), 1441-63.
- McCarthy M (2015) US melanoma prevalence has doubled over past 30 years.
- Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS a spol. (2005) BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436 (7051), 720-4.
- Ondrusova L, Vachtenheim J, Reda J a spol. (2013) MITF-independent pro-survival role of BRG1-containing SWI/SNF complex in melanoma cells. *PLoS One* 8 (1), e54110.
- Pollard TD, Earnshaw W (2007) *Cell Biology*. 2 vyd., Saunders, 928.
- Qin J, Xin H, Nickoloff BJ. (2012) Specifically targeting ERK1 or ERK2 kills melanoma cells. *J Transl Med* 10:15. doi: 10.1186/1479-5876-10-15., 15-0.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM a spol. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307 (5712), 1098-101.
- Slomovitz BM a Coleman RL. (2012) The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 18 (21), 5856-64.
- Stork J a spol. (2008) *Dermatovenerologie*. Galén, Praha, 393-399.
- Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. (2005) Cutaneous melanoma. *Lancet* 365 (9460), 687-701.
- Tomicic J, Wanebo Hj (2003) Mucosal melanomas.
- Vojáčková N, Šebková M, Knotová N a spol. (2006) Metastázující kožní melanom léčený chirurgicky a radioterapií s hypertermií. *Česko-slovenská dermatologie*, 88-90.
- Vojtechova M, Tureckova J, Kucerova D a spol. (2008) Regulation of mTORC1 signaling by Src kinase activity is Akt1-independent in RSV-transformed cells. *Neoplasia* 10 (2), 99-107.

Wellbrock C, Rana S, Paterson H a spol. (2008) Oncogenic BRAF regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor MITF. PLoS One 3 (7), e2734.

de Wit NJ, van Muijen GN, Ruitter DJ. (2004) Immunohistochemistry in melanocytic proliferative lesions. Histopathology 44 (6), 517-41.

Wu J, Liao X, Yu B a spol. (2013) Dasatinib inhibits primary melanoma cell proliferation through morphology-dependent disruption of Src-ERK signaling. Oncol Lett 5 (2), 527-32.

Zanke BW, Rubie EA, Winnett E a spol. (1996) Mammalian mitogen-activated protein kinase pathways are regulated through formation of specific kinase-activator complexes.