

191

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE
KATEDRA BIOCHEMIE



Inhibitory histondeacetylasy jako potenciální léčiva při protinádorové terapii

Bakalářská práce

Monika Bambousková

Školitel: RNDr. Jitka Poljaková, Ph.D.

Přírodovědecká fakulta UK
KNIHOVNA CHEMIE

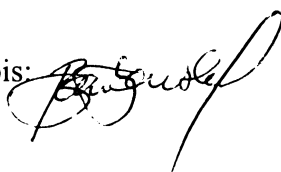


3233141142

Praha 2007

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Jitky Poljakové, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne: 7.6.2004

Podpis: 

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Jitce Poljakové, Ph.D. za výborné vedení a ochotu. Dále děkuji také svým rodičům a přátelům za podporu během celého studia.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	4
1. CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE.....	6
2. ÚVOD.....	7
2.1. LÉČEBNÉ PRINCIPY NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ.....	7
2.2. CÍLENÁ TERAPIE.....	8
3. KARCINOGENEZE.....	10
3.1. BUNĚČNÝ CYKLUS A MUTACE.....	10
3.1.1. REGULACE BUNĚČNÉHO CYKLU.....	11
3.1.2. ONKOGENY A TUMOR-SUPRESOROVÉ GENY.....	12
3.2. APOPTÓZA.....	13
3.3. ANGIOGENEZE.....	13
4. EPIGENETICKÉ MECHANISMY A JEJICH ROLE PŘI KARCINOGENEZI.....	15
4.1. STRUKTURA CHROMATINU.....	15
4.1.1. HISTONY A JEJICH MODIFIKACE.....	17
4.1.2. METHYLACE DNA.....	19
4.2. ENZYMY S HISTONDEACETYLASOVOU A HISTONACETYLTRANSFERASOVOU AKTIVITOU.....	20
4.2.1. ABERANTNÍ AKTIVITA HDAC A HAT PŘI VÝVOJI MALIGNÍHO ONEMOCNĚNÍ.....	22
4.2.2. INHIBICE HDAC.....	23
5. INHIBITORY HISTONDEACETYLASY.....	27
5.1. KRÁTKÉ MASTNÉ KYSELINY.....	28
5.1.1. BUTYRÁT.....	29
5.1.2. FENYLBUTYRÁT A FENYLACETÁT.....	31
5.1.3. KYSELINA VALPROOVÁ (VALPROÁT).....	32
5.2. HYBRIDNÍ POLÁRNÍ SLOUČENINY NA BÁZI HYDROXAMOVÉ KYSELINY.....	38
5.2.1. SAHA.....	39
5.2.2. TRICHOSTATIN A.....	44
5.3. CYKlickÉ TETRAPEPTIDY.....	45
5.3.1. DEPSIPEPTID.....	46
5.4. SPECIFITA ÚČINKU INHIBITORŮ HDAC.....	47
6. ZÁVĚR.....	49
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	51

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABHA	z angl. „azelaic bishydroxamic acid“
Ac0-4	acetylované histony, Ac0 = neacetylovaný, Ac4 = čtyři acetylované zbytky
AML	akutní myeloidní leukémie
APL	akutní promyelocytární leukémie
ATRA	„all-trans“ retinové kyseliny
Aza-dc	5-aza-2'-deoxycytidin
bp	páry bází
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CBHA	z angl. „m-carboxycinnamic acid bis-hydroxamide“
CBP	z angl. „cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein“
CDK	cyklin-dependentní kinasy
CIP	CDK inhibující proteiny
CML	chronická myeloidní leukémie
DMSO	dimethylsulfoxid
DNMT	DNA-methyltransferasa
	receptor pro epidermální růstový faktor (z angl. „epidermal growth factor
EGFR	receptor“)
eNOS	endoteliální NO-synthasa
ER	estrogenový receptor
HAT	histonacetyltransferasa
HDAC	histondeacetyasa
HDLP	homologní bakteriální enzym histondeacetylasy
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (z angl. „human immunodeficiency virus“)
HMBA	hexamethylenbisacetamid
HPC	hybridní polární sloučeniny
CHAPS	z angl. „cyclic hydroxamic acid containing peptides“
INF- α	interferon α
kDa	kilodalton
MCP	z angl. "methyl-CpG-binding protein"

MDB	z angl. "methylated DNA binding protein"
MDS	myelodisplastický syndrom
MEL	myší erytroleukemické buňky
NaBu	butyrát sodný
NAD ⁺	nikotinamiddinukleotid
NB	neuroblastom
NCR	z angl. "natural cytotoxic receptors"
NIS	Na/I symportér
NK	„zabíječské buňky“ (z angl. „natural killer cells“)
PA	fenylacetát
PB	fenylbutyrát
PBS	z angl. „phosphate buffered saline“
PLZF	z angl. „promyelocytic leukenemia zinc finger gene“
PML	promyelotická leukémie
RA	kyselina retinová
Rb	retinoblastomový protein
SAHA	z angl. „suberoylanilide hydroxamic acid“
TNF- α	z angl. „tumor necrosis factor α “
TRAIL	z angl. „tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand“
TSA	trichostatin A
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (z angl. „vascular endothelial growth factor“)
VPA	kyselina valproová
VPM	valpromid
WAF	z angl. „wild-type p53-activated fragment“
IC ₅₀	koncentrace inhibitoru způsobující 50% inhibici enzymu

1. CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Inhibitory histondeacetylasy jsou látky s nedávno zjištěnou protinádorovou aktivitou. V současnosti jsou intenzivně zkoumány jako potenciální protirakovinná léčiva a procházejí již I. či II. fází klinických zkoušek. Cílem této bakalářské práce je nashromáždit a shrnout dosavadní poznatky o těchto látkách.

2. ÚVOD

Mezi nejzávažnější problémy současné medicíny patří nádorová onemocnění. Právě rakovina tvoří jednu z nejčastějších příčin úmrtí spolu s kardiovaskulárními a některými infekčními chorobami. Celosvětová statistika z roku 2002 uvádí 24,6 milionů nemocných, 10,9 milionů nově diagnostikovaných případů a 6,7 milionů úmrtí následkem nádorových onemocnění [1]. Současný životní styl zahrnuje mnoho negativních vlivů, potenciálně vedoucích ke vzniku nádorového onemocnění. Je však otázkou, do jaké míry je vznik zhoubného rakovinného bujení podmíněn právě těmito vlivy a do jaké míry je ovlivněn dědičnými dispozicemi. Proces vedoucí ke vzniku zhoubného nádoru je několikastupňový. Je tedy třeba, aby bylo akumulováno více změn, umožňujících buňce vymanit se ze systému buněčné regulace. Tento proces může trvat i mnoho let. Proto ve většině případů ke vzniku zhoubného nádoru dochází v pozdějším věku, nicméně nádorové onemocnění se objevuje i u dětí a to především ve velmi raném věku.

Rakovina představuje velmi různorodou skupinu onemocnění. Z toho důvodu léčba, která je účinná proti jednomu typu rakoviny, nemusí být úspěšná proti jinému typu nádorového onemocnění. Rovněž pacienti se stejným onemocněním mohou na stejnou léčbu reagovat rozdílně. Na základě poznatků z molekulární biologie nádorového procesu se hledají nové léčebné strategie, účinnější metody diagnostické medicíny a způsoby prevence. Preventivní lékařská vyšetření mohou zajistit včasnou diagnózu, která je pro úspěšnost terapie klíčová.

Inhibitory histondeacetylas (inhibitory HDAC), kterými se tato bakalářská práce zabývá, tvoří skupinu látek zkoumaných nyní jako potenciální protinádorová léčiva. Svou roli však sehrávají rovněž i v prevenci nádorového onemocnění .

2.1. LÉČEBNÉ PRINCIPY NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

Úspěšná léčba rakoviny a hledání nových léčebných strategií je předmětem bádání mnohých vědních oborů. **Chemoterapie** používá **cytotoxických** a **cytostatických** látek. Je zaměřená proti cílům - strukturám, jež jsou společné všem buňkám, což způsobuje ale i

nežádoucí účinky, neboť zasahují také proti nenádorovým buňkám. Další léčebnou metodou je **radioterapie**, která využívá ionizujícího záření k zahubení rakovinných buněk v cílové tkáni za účelem kurativním (dosažení vyléčení nádoru) nebo paliativním (zmírnění obtíží způsobených nádorem). V diagnostice a léčbě pacientů postižených solidními nádory se obvykle uplatňují rovněž **chirurgické metody**. U časných nádorových stadií bývají také jediným nutným zákrokem (kurativním). V jiných případech se chirurgie zapojuje i do paliativní léčby pacientů s pokročilým nádorovým onemocněním.

Existuje možnost využití **hormonální léčby**, která je podmíněná přítomností hormonových receptorů uvnitř, nebo na povrchu nádorové buňky. Buňky nádorů orgánů závislých na hormonálních podnětech si tuto závislost totiž mohou ponechat. Další léčebnou strategií je **imunoterapie**, která stimuluje imunitní systém a pomáhá rozpoznat a zničit nádorové buňky. Principem je podávání protilátek, které se váží na receptory buněk nádoru. Nicméně zatím je v klinické praxi pouze zřídka využívána.

Některá léčiva nebo léčebné metody působí lépe v součinnosti, pokud jsou indikována současně, pak hovoříme o **kombinované léčbě** [2].

2.2. CÍLENÁ TERAPIE

Pokrok v poznání rakoviny na molekulární úrovni otevírá nové možnosti pro terapeutický zásah. Perspektivní metodou léčby zhoubných nádorů je nyní **cílená terapie**. Cílená terapie účinkuje na molekulární procesy specifické pro nádorové buňky, což vyžaduje jejich dokonalou znalost. Při hledání **signálních drah** a molekul, charakteristických pro určitý typ rakovinných buněk, je nejdříve třeba odhalit přítomné mutované geny. Tak se děje například při epidemiologickém výzkumu, kdy se sleduje frekvence výskytu určité změny v genetické informaci ve spojení s jedním typem rakoviny. Jiná situace například nastává, je-li znám buněčný pochod jehož součástí je komponenta (molekula) kódovaná mutovaným genem. V takovém případě pak můžeme měnit ostatní komponenty dané dráhy a sledovat, kdy dá tato změna vzniknout určitému typu rakoviny [3]. Prvním racionálně navrženým terapeutikem pro léčbu chronické myeloidní leukémie (CML) byl na počátku devadesátých let minulého století **Gleevec®** (imatinib mesylát). Ten

se ukázal být příkladem úspěšného navržení a vývoje léku se specifickým účinkem pro potřeby léčby určitého rakovinného onemocnění [4].

Dnes je v klinické praxi využíváno několik typů cílené léčby, jedním z nich je například léčba diferenciací, využívající látky z biochemické skupiny retinoidů, mezi něž patří „all-trans“ retinové kyseliny (ATRA). Tyto látky jsou označeny jako **induktory diferenciaci**. ATRA jsou využívány například k léčbě akutní promyelocytární leukémie (APL). Příkladem kombinační léčby je použití ATRA v součinnosti s inhibitory HDAC, o kterém pojednávají mnohé studie [5-8]. Další skupiny cílených protinádorových léčiv pak tvoří například látky s antiangiogenním účinkem, inhibitory proteasomů, inhibitory tyrosinkinasy a jiné.

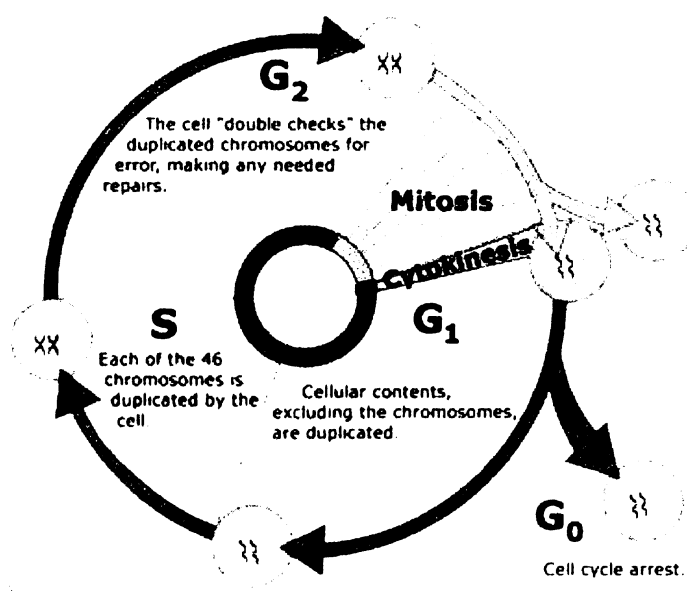
Poznatky o tom, že při mnohých patologických procesech, včetně rakoviny, se s velkou měrou uplatňují **epigenetické** alterace, přináší možnosti nové terapie, zaměřené právě na tyto změny. Předmětem studia se stávají enzymy kontrolující epigenetické mechanismy. Mezi takové enzymy patří v současnosti především **histondeacetylasy** a **DNA-methyltransferasy (DNMT)** [9]. Inhibitory HDAC jsou skupinou potenciálních cílených léčiv, které **indukují diferenciaci, zastavují nekontrolovaný buněčný růst a navozují apoptózu *in vivo***, i u transformovaných buněk při pokusech *in vitro*. Jejich prostřednictvím lze rovněž učinit nádorové buňky citlivější k léčbě pomocí jiných terapeutik [10].

3. KARCINOGENEZE

Rakovinné onemocnění je výsledkem mutací určitých genů a epigenetických změn, které vymaní buňky z obvyklé regulace buněčného dělení. Jedná se o přirozený výběr v populaci buněk, které tvoří živý organismus. Aby buňka mohla projít maligní transformací a stala se tak rakovinnou, musí být podrobena působení řady faktorů, které jsou ve většině případů souhrou genetických dispozic a vlivu vnějšího prostředí.

3.1. BUNĚČNÝ CYKLUS A MUTACE

Buněčným cyklem je označován uspořádaný soubor úkonů, které musí buňka provést, aby mohla úspěšně zkopírovat svou genetickou informaci a přenést ji na další generaci buněk. U mnohobuněčných organismů dochází k dělení buněk- **proliferaci** jak u zrodu nového individua, tak i v průběhu celého života. Většina buněk dospělého lidského těla se dělí různě rychle, některé se po svém vzniku dále již nedělí. Délka buněčného cyklu a jeho jednotlivých fází pak závisí na typu proliferaujících buněk. Buněčný cyklus eukaryotních buněk je rozdělen do čtyř fází, jeho schéma je uvedeno na obr. 1. V **M-fázi**



Obrázek 1. Průběh buněčného cyklu. Převzato z [11].

probíhá mitóza (proces dělení jádra) a cytokineze (proces dělení celé buňky). M-fáze trvá relativně krátkou dobu vzhledem k celkové délce buněčného cyklu. U **proliferujících** buněk následuje **G₁-fáze**, v níž probíhá iniciace syntézy DNA. Během **S-fáze** dochází k replikaci chromosomů. Následuje **G₂-fáze**, ve které buňka již obsahuje dvě sady chromosomů. Obě fáze G₁ a G₂ představují pro buňku prostor pro potřebný růst a duplikaci organel. Celý úsek, ve kterém se buňky nedělí označujeme jako **interfázi**. Při **diferenciaci** vstupují buňky do klidové fáze, tzv. **G₀-fáze**, kde se dále nedělí. Celý cyklus obsahuje několik kontrolních bodů (z angl. „checkpoints“), ve kterých buňka ověřuje, zda všechny úkony, které měly být do té doby provedeny, byly provedeny správným způsobem (kompletně replikovaná a spárovaná DNA, tvorba mitotického vřeténka, atd.). Pokud tomu tak není, buněčný cyklus za normálních okolností dále nepokračuje. Kontrolní body zajišťují, že buňka neprojde do další fáze buněčného cyklu pokud není správným způsobem dokončena fáze předchozí. Chyby v regulaci průchodu těmito body mohou vést k přenosu mutovaného genomu na další generaci buněk. Tyto genetické mutace mohou způsobit ztrátu růstových supresorů, zvýšení produkce látek podporujících růst a jiné aberace, charakteristické pro nádorové bujení [12].

3.1.1. REGULACE BUNĚČNÉHO CYKLU

Primární komponenty procesů v buněčném cyklu jsou **cyklin-dependentní kinasy (CDK)**. Tato rodina příbuzných serin-threoninových kinas je regulována asociací s regulačními **cykliny** a fosforylačními a defosforylačními reakcemi. Další úroveň regulace CDK zabezpečují **CIP** proteiny (*CDK inhibující proteiny*). specificky inhibující CDK. CDK a cykliny jsou klíčovými sloučeninami ve funkci kontrolních bodů buněčného cyklu. Ztráta této kontroly je odpovědná za nekontrolovaný růst buněk, ale rovněž s sebou nese pro tyto buňky i ztrátu některých ochranných mechanismů. Proto jsou buňky s nefunkčními kontrolními body k některým látkám citlivější. Identifikace genů pro proteiny fungující v kontrolních bodech, charakteristika jejich normální funkce a jejich změny v důsledku buněčného stresu jsou důležitými aspekty ve vývoji nových protirakovinných cílených léčiv [13].

Inhibitory histondeacetylasy (inhibitory HDAC) blokují proliferaci buněk obnovením exprese inhibitorů CDK, která u některých nádorových buněk nefunguje. V důsledku toho se buněčný cyklus zastavuje ve fázi G₁ nebo G₂ a u určitých typů transformovaných buněk dochází k diferenciaci, v některých případech k apoptóze [14].

3.1.2. ONKOGENY A TUMOR-SUPRESOROVÉ GENY

Genetická poškození způsobující nádorová onemocnění se týkají převážně dvou skupin genů majících klíčový vliv na buněčnou regulaci. Jedná se o protoonkogeny a tumor-supresorové geny. Aktivací protoonkogenů vznikají onkogeny, které přispívají k proliferaci nádorových buněk. Tyto geny kódují většinou proteiny CIP s funkcí inhibitorů CDK. Jedná se jak o zvýšenou expresi těchto genů, tak o vznik hyperaktivních produktů. Tumor-supresorové geny naopak brání proliferaci, proto jejich poškození má za následek nekontrolovaný růst. Geny z obou výše uvedených skupin nejčastěji kódují proteiny, které řídí průchod buněčným cyklem, apoptotické a antiapoptotické děje.

Několik tumor-supresorových genů hraje důležitou roli ve funkci kontrolních bodů, jsou to například gen **p53** a gen **RB** jehož produktem je **retinoblastomový protein (Rb)**. Ztráta těchto genů, nebo mutace v nich je běžným znakem mnoha typů rakovinných onemocnění [15]. Ztrátu funkce Rb mohou způsobovat i mutace deregulující fosforylaci Rb. Protein **p53** zastavuje buněčný cyklus buněk s poškozenou DNA. Protein p53 je velice nestabilní transkripční faktor, jeho nestabilita vychází z rychlé proteosomální degradace (aktivovanou polyubikvitinací proteinu). p53 je modifikován různými způsoby, v závislosti na poškození DNA. Když nedojde k jeho degradaci, aktivuje transkripci specifických genů, které pomáhají buňce vyrovnat se s poškozením DNA. Jeden z těchto genů kóduje protein **p21^{CIP}**, který inhibuje všechny savčí cyklin-CDK komplexy, další geny pak například fungují jako spouštěče apoptózy [3].

3.2. APOPTÓZA

Apoptóza, programovaná buněčná smrt je spouštěna buď „vnější“, nebo „vnitřní“ cestou. V případě „vnitřní“ cesty hraje důležitou roli tumor-supresorový gen *p53*. Pokud je odhaleno poškození DNA, které již nemůže být opraveno, spustí se syntéza proteinů, které poškozují mitochondrie. Uvolňují se z nich například cytochrom c a apoptózu indukující protein, či další proteiny, které zahajují aktivaci **kaspas**, což vede k degradačním reakcím uvnitř buňky. U zahájení apoptózy „vnější“ cestou se tak děje přes povrchové receptory buněčné membrány z rodiny TNF- α (z angl. „tumor necrosis factor α “). Takto jsou likvidovány malignizované nebo virovou infekcí napadené buňky [16].

Důležitá je rovnováha mezi proapoptotickými a antiapoptotickými signály. Ukázalo se, že některé nádory mají schopnost inhibovat apoptózu. Například v buňkách maligního lymfomu byla nalezena zvýšená exprese proteinu Bcl-2, který má antiapoptotickou aktivitu, způsobenou mutací v genu *p53* [16].

Všechny stárnoucí zdravé buňky mají omezenou schopnost dělení. O tom rozhodují **telomery**, konečné úseky chromosomů, které se s každým dělením zkracují a enzymy **telomerasy**, syntetizující tyto úseky. Existují ale i „nesmrtelné“ nádorové buněčné linie s trvalou schopností se dělit (například kultivované He-La buňky z nádoru děložního krčku).

Farmakologická modulace procesů spojených s apoptózou je jednou z možných budoucích cest pro léčbu nádorových onemocnění a jiných procesů spojených se stárnutím [16].

3.3. ANGIOGENEZE

Aby mohl vznikající nádor (jak primární, tak sekundární) růst a zvětšovat svoji hmotu, je třeba, aby byly jeho buňky vyživovány. Angiogeneze je proces, kdy se vyvíjí nové krevní zásobení tkání, jak zdravých, tak ale i tumorových. Nádor bez krevního zásobení je schopen dorůst velikosti asi 2 mm, což průměrně odpovídá počtu řádově 10^6 buněk. Nádory bez krevního zásobení, v případě že například nesekretují hormony, málokdy způsobují vážnější problémy, protože jejich růst je vyvážen odumíráním

nevyživovaných buněk. Většina nádoru je schopná indukovat vznik svého vlastního krevního zásobení a zajistit si tak potřebnou výživu. Tento proces se skládá z několika dílčích kroků: degradace bazální laminy, která obklopuje nejbližší kapiláry, migraci endoteliálních buněk do nitra nádoru, dělení těchto buněk, výstavba kapilár a formování nové membrány kolem vytvořené kapiláry.

Některé nádory produkují růstové faktory stimulující angiogenezi, jiné dovedou přimět okolní normální buňky, aby pro ně tyto faktory syntetizovaly a sekretovaly. Mezi takové faktory patří například **vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF)**.

Vytvoření krevního zásobení dovoluje nádoru zvětšovat svoji velikost, tím pádem se zvyšuje i pravděpodobnost vzniku dalších nebezpečných mutací iniciovaných buněk a vaskularizace nádorové tkáně rovněž participuje na vzniku metastáz.

Látky zabraňující angiogenezi, například antagonisté receptorů pro faktor VEGF, mají rovněž potenciální terapeutický účinek v léčbě rakovinných onemocnění. Ačkoliv se nové krevní zásobení intenzivně tvoří hlavně během embryonálního vývoje, konstantně vzniká i v dospělosti, proto inhibitory angiogeneze mohou mít určité vedlejší účinky [3].

4. EPIGENETICKÉ MECHANISMY A JEJICH ROLE PŘI KARCINOGENEZE

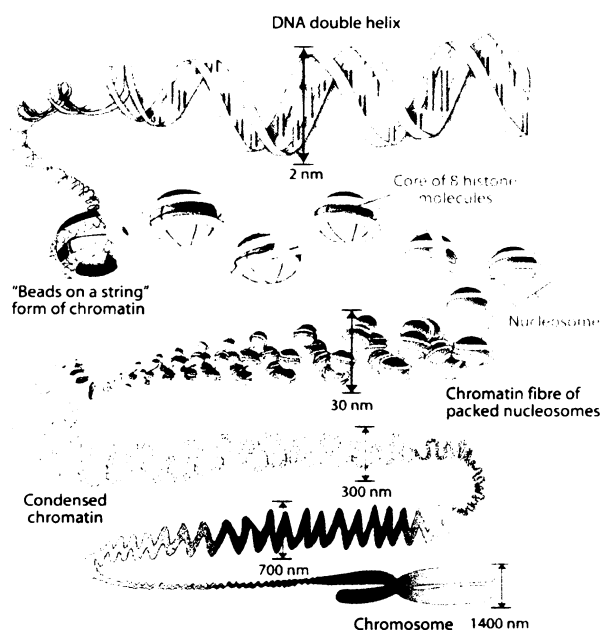
Karcinogeneze je následkem abnormalit v určitých genech. Ty jsou způsobeny mutací v onkogenech, v tumor-supresorových genech a rovněž změnami v epigenetických mechanismech. Epigenetické změny modifikují funkci genů, aniž by měnily jejich nukleotidovou sekvenci a během buněčného dělení jsou přenášeny na další generaci buněk. Epigenetické změny jsou potenciálně reversibilní procesy, což z nich činí možný cíl terapeutického zásahu [17]. Vývoj nádoru je řízen souhrou těchto procesů od počátečních až do konečných stádií. Mezi epigenetické mechanismy, jejichž alterace jsou pozorovány u nádorových buněk patří především **modifikace histonů** a **methylace DNA**. Tyto mechanismy participují při modelování struktury **chromatinu** [18].

Inhibitory HDAC působí na úrovni modifikace histonů, ale ovlivňují i funkci jiných proteinů (transkripčních faktorů, chromatinových proteinů se strukturální funkcí, enzymů podílejících se na modelování chromatinu) [19-21]. K pochopení mechanismu působení inhibitorů HDAC, je třeba popsat strukturu chromatinu, jakým způsobem ovlivňují řízení funkce genů a enzymy, které se na těchto dějích podílejí.

4.1. STRUKTURA CHROMATINU

Celková délka DNA obsažená v jediném jádře lidské buňky je asi 2 m. V buňkách je DNA rozdělena do dynamických celků – **chromosomů**, kdy každý je tvořen jedinou dlouhou molekulou DNA. Chromosomy svou podobu a uspořádání výrazně mění v závislosti na fázi buněčného cyklu, ve které se buňka nachází. V interfázi, kdy dochází k transkripci a replikaci chromosomální DNA, je jejich struktura rozvolněná, zatímco při dělení buněk, v M-fázi buněčného cyklu, zaujímají chromosomy svou nejkondensovanější formu, kdy jejich délka je zhruba 1,3 – 10 μm . Aby byla buňka schopná vytvořit takový stupeň kondenzace, je chromosomální DNA sbalována na několika úrovních, jak je znázorněno na obr. 2 (str. 16) [22]. DNA tvoří nejprve dynamický komplex s pomocnými proteiny, zvaný **chromatin**. Obecná struktura chromatinu je společná všem eukaryotním organismům. Základním stupněm uspořádání chromatinu jsou **nukleosomy**, opakující se

jednotky tvořené DNA a proteiny - **histony**. Nukleosomy jsou struktury velké v průměru asi 10 nm, jádrem každého nukleosomu je **histonový oktamer**, kolem kterého je DNA obtočena. Mezi nukleosomy je volná „spojovací“ DNA. V komplexu chromatinu jsou přítomny i nehistonové proteiny a RNA. Kondensovaná forma chromatinu je svinutá podobně jako spirála a tvoří vlákna (filamenta) o šířce asi 30 nm. Na další úrovni sbalení je chromatin kotven na proteinové chromosomální „lešení“ tvořené nehistonovými proteiny. Následnou organizací celého komplexu je v závislosti na fázi buněčného cyklu utvářen chromosom.

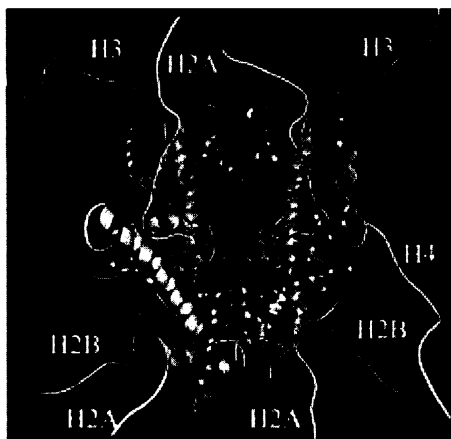


Obrázek 2. Struktura chromatinu. Chromosomální DNA v komplexu s histony tvoří nukleosomy, ty jsou základním stupněm uspořádání chromatinu. Chromatin je sbalen do vláken, která podléhají další kondenzaci. Převzato z [23].

Chromatin je dynamický komplex. Jeho více rozvolněnou strukturu nazýváme **euchromatin**, strukturu kompaktnější pak **heterochromatin**. DNA v heterochromatinu je méně přístupná interakcím s proteiny, enzymy a transkripčními faktory, proto se v oblastech heterochromatinu nachází inaktivní geny. Transkribované geny jsou lokalizovány v oblastech euchromatinu [3].

4.1.1. HISTONY A JEJICH MODIFIKACE

Histony jsou malé basicke proteiny jejichž primární strukturu tvoří 105 – 135 aminokyselinových zbytků. Základem každého nukleosomu je histonový oktamer, kolem kterého se vine dvojšroubovice DNA o délce 146 bp a vytváří 1,75 superhelikálních závitů. Rozeznáváme pět hlavních typů histonů, proteinů asociovaných s eukaryotickou DNA: H1, H2A, H2B, H3 a H4. Struktura histonu H1 se nejvíce liší v závislosti na druhu, ostatní histony jsou vysoce konzervované, jejich struktura vykazuje vysokou podobnost i mezi vzdálenými druhy [3]. Jádru nukleosomu, jehož struktura je znázorněná na obr. 3, je složeno ze dvou molekul každého histonu H2A, H2B, H3 a H4, kdy histony H3 a H4 tvoří tetramer $(H3 - H4)_2$ a histony H2A a H2B tvoří dva dimery H2A – H2B [21]. Histony H1 se uplatňují jako spojovací částice, lokalizované mimo nukleosomální jádra. Participují při utváření struktury chromatinu do vyšších úrovní kondenzace [24].

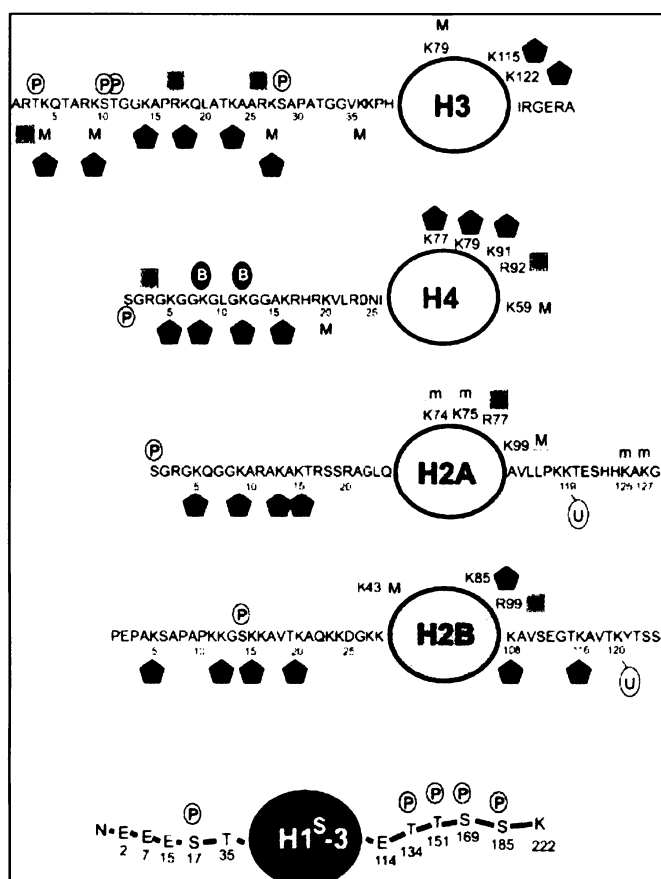


Obrázek 3. Nukleosom – struktura histonového oktameru. Znázorněny jsou vyčnívající řetězce jednotlivých histonů. Převzato z [25].

Nukleosomální histony podléhají několika typům posttranslačních modifikací, z nichž nejvýznamnější jsou modifikace histonů H3 a H4, které mají svou C–terminální doménu ukrytou uvnitř nukleosomu, zatímco N–terminální doména směřuje z nukleosomu ven. Histony jsou bohaté na kladně nabitě aminokyselinové zbytky, na lysin a arginin a právě tyto aminokyselinové zbytky histonových řetězců vyčnívajících z nukleosomu bývají nejčastěji modifikovány [26]. Mezi takové modifikace patří **acetylace** a **deacetylace** ϵ -aminoskupiny lysinových zbytků, **methylace** lysinových a argininových zbytků,

fosforylace serinových zbytků, ubikvitinace lysinových zbytků a biotinylace. Sbalení chromatinu je stabilizováno interakcemi mezi N-konci histonů nukleosomového jádra a histonem H1, vázaným na DNA mezi nukleosomy.

Histon H1 je modifikován pouze fosforylací [21]. Modifikacemi nukleosomálních histonů a H1 dochází k destabilizaci vyšších struktur chromatinu. Ze všech histonů nukleosomu mají H3 a H4 největší vliv na kompaktilitu chromatinového vlákna. K tomu aby mohly histony interagovat se specifickými proteinovými doménami jsou zapotřebí jejich specifické modifikace. Příkladem je bromodoména nalezená u některých transkripčních faktorů a proteinů modelujících strukturu chromatinu, která se váže na acetylovaný lysinový zbytek [21]. Uspořádání chromatinu je spojeno s transkripční aktivitou genů, proto histonové modifikace ovlivňující strukturu chromatinu mají podíl na regulaci genové exprese. Obr. 4 poskytuje přehled o velkém množství kombinací histonových modifikací, které mohou modelovat strukturu chromatinu.



Obrázek 4. Aminokyselinové sekvence lidských histonových proteinů a modifikace některých aminokyselinových zbytků. H1^S – 3 je myší typ histonu H1. Methylace (M), acetylace (Ac), fosforylace (P), ubikvitinace (U) a biotinylace (B). Symbolem (m) je značena poloha methyace, u které není zcela prokázáno, že se na daném místě vyskytuje. Převzato z [21].

Histony interagují se záporně nabitou fosfátovou kostrou DNA díky kladně nabitým aminokyselinovým zbytkům ve své aminokyselinové sekvenci. Acetylací ϵ -aminoskupiny lysinových zbytků se jejich kladný náboj kompenzuje a interakce s DNA je zeslabena. DNA v nukleosomu už není tak silně vázaná na histony a stává se dostupnější proteinům a enzymům přistupujícím z okolí [27]. Opakem je proces deacetylace, kdy jsou acetylové skupiny odstraňovány a interakce DNA s histony se zesiluje. Schéma acetylace a deacetylace je znázorněno na obr. 5 (str. 21). Obě reakce jsou katalyzovány enzymy s **acetyltransferasovou aktivitou (HAT)** a **histondeacetylaseovou aktivitou (HDAC)**. Acetylované histony jsou asociovány především s transkripčně aktivními oblastmi chromatinu, protože rozvolňují jeho strukturu a činí tak DNA přístupnější, ale mohou napomáhat i vazbě transkripčních faktorů na promotor a tak rovněž podpořit transkripci určitých genů [20].

4.1.2. METHYLACE DNA

Jiným epigenetickým mechanismem ovlivňujícím transkripci genů je **methylace DNA**. Jedná se především o methylace cytosinu, kde methylové skupiny tvoří části kovalentní struktury molekuly DNA. Geny s methylovanou DNA jsou obecně transkripčně inaktivní, což je způsobeno znesnadněním vazby transkripčních faktorů (např. **AP-2** a **c-Myc**) na DNA. Jiným mechanismem „vypínání“ genů pomocí methylace je interakce methylované DNA s různými represorovými komplexy zprostředkovaná proteiny **MDB** (z angl. „methylated DNA-binding proteins“). **DNA-methyltransferasa (DNMT)** působí v komplexu s **HDAC** a **MCP** (z angl. „Methyl-CpG-binding protein“) [28].

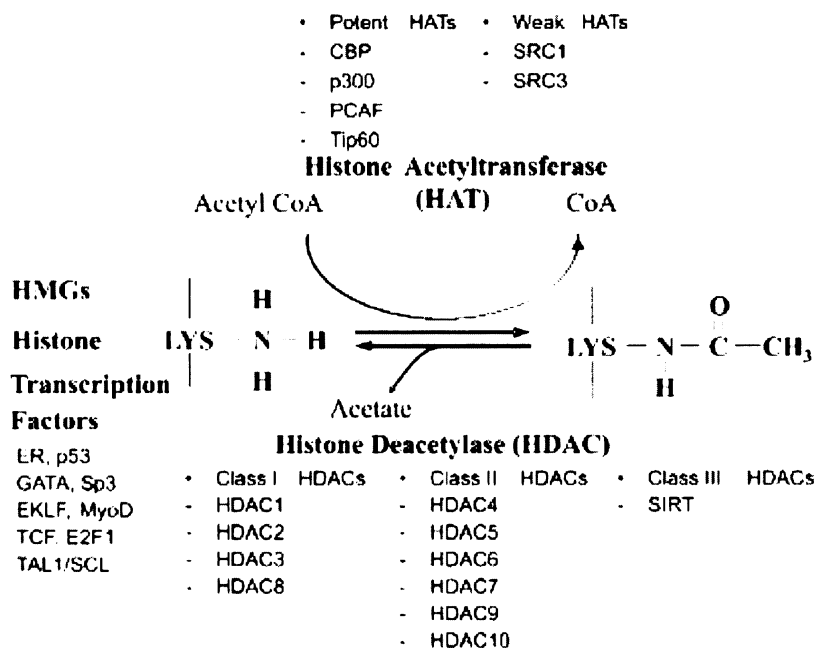
Součástí těchto komplexů jsou proteiny modelující strukturu chromatinu mezi něž patří i **HDAC** [29, 30]. Do nedávné doby panovalo přesvědčení, že methylace DNA je ireversibilní reakce, zprostředkovávaná pouze enzymy s DNA-methyltransferasovou aktivitou. V takovém případě by demethylace genomu mohla proběhnout pouze při replikaci, kdy je DNA-methyltransferasa nepřítomná a demethylace by byla nemožná u nedělících se buněk (např. mozkových buněk). Bylo však zjištěno, že demethylace DNA probíhá i mimo buněčné dělení [31]. Farmakologické ovládnutí procesu methylace tedy nabízí atraktivní terapeutické využití. Aktivní demethylace je indukována nebo inhibována

skrze acetylaci histonů, proto látky ovlivňující aktivitu HDAC a HAT enzymů zasahují do regulace transkripce řízené mechanismem methylace a demethylace. Acetylované histony zpřístupňují demethylase vlákno DNA. Inhibice HDAC potenciálně může „vymazat“ stabilní methylace DNA v buňkách, které se již nedělí [29].

4.2. ENZYMY S HISTONDEACETYLASOVOU A HISTONACETYLTRANSFERASOVOU AKTIVITOU

Histony v chromatinu eukaryotických buněk se nachází ve stavu acetylovaném, nebo deacetylovaném. Za tuto konverzi odpovídají dva druhy enzymů: HAT a HDAC. Substrátem obou typů enzymů jsou ϵ -aminoskupiny lysinových zbytků lokalizované na N-koncích histonů. HAT i HDAC jsou součástí velkých enzymových komplexů, regulujících transkripční aktivitu genů jako třeba ATP-dependentní chromatin-modelující komplexy.

HAT obvykle fungují jako transkripční koaktivátory a po vazbě na genový promotor, zprostředkované transkripčními faktory, acetylují histony promotoru a tak podporují jeho funkci při transkripci. Mezi proteiny s HAT aktivitou patří v savčích buňkách CBP (z angl. „cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein“), který váže cAMP, dále pak protein p300, faktor PCAF (z angl.: „p300/CBP-associated factor“) a Tip60 (z angl. „HIV Tat interactive 60-kDa protein“). SRC-1 a SRC-3 (z angl. „Steroid Receptor Coactivators“) jsou proteiny s HAT aktivitou, povolávané k funkci steroidními receptory [32]. Proteiny s HAT aktivitou se podílí na aktivaci genové exprese, mohou však v některých případech hrát roli i při represii transkripce [33].



Obrázek 5. Dynamika acetylace a deacetylace histonů, reakce katalyzované HAT a HDAC. Převzato z [25].

Doposud bylo identifikováno 18 proteinů s HDAC aktivitou. Jsou klasifikovány do tří hlavních rodin. Lidské HDAC třídy I zahrnují HDAC1, 2, 3 a 8, do třídy II pak patří HDAC4, 5, 6, 7, 9, 10 a 11. Histondeacetylasy 1 a 2 se uplatňují při snižování exprese genů, kdy jsou asociovány s multiproteinovými komplexy společně se Sin 3 (z angl. „Switch independent protein 3“) a NuRD (z angl. „Nucleosome Remodeling and histone Deacetylase“). HDAC3 a celá třída II nejsou asociovány s těmito proteiny, nýbrž s proteiny N-CoR a SMRT. Mnohé transkripční represory a korepresory tedy využívají při své funkci multiproteinové komplexy obsahující HDAC, vázané na specifické oblasti genových promotorů. Třetí třídou identifikovaných enzymů s histondeacetylaseovou aktivitou jsou proteiny třídy SIRT, které nemají homologní katalytické jádro s předešlymi typy HDAC. Známe 7 lidských SIRT proteinů, na rozdíl od HDAC tříd I a II jejich aktivita závisí zcela na přítomnosti NAD⁺ (jsou NAD⁺ dependentními enzymy) [24]. Dynamický proces acetylace a deacetylace spolu s enzymy, které se na reakcích podílejí je znázorněn na obr. 5.

Rentgenografické studie struktury enzymových proteinů s HDAC aktivitou prokázaly přítomnost zinkového atomu v katalytickém centru enzymů HDAC třídy I i II. Hlavní katalytické uskupení HDAC má tvar „válcovité kapsy“ a nachází se v něm asparagin-histidinový systém přenosu náboje. Do katalytického centra enzymu se váže N-

acetylovaný lysin substrátů. Deacetylasové jádro savčí HDAC1 je tvořeno více než 390 aminokyselinovými zbytky [34].

HDAC a HAT mohou regulovat genovou expresi rovněž acetylací a deacetylací nehistonových proteinů, transkripčních faktorů jako jsou p53, GATA-1, TFIIE a dalších proteinů figurujících v aktivaci a represí transkripce [35].

4.2.1. ABERANTNÍ AKTIVITA HDAC A HAT PŘI VÝVOJI MALIGNÍHO ONEMOCNĚNÍ

Patologická změna aktivity HAT a HDAC je evidentně spojena s karcinogenezí. Špatná funkce HAT, způsobená amplifikací, translokací nebo nadměrnou expresí genů byla identifikována u určitých typů rakovin. Například mutovaný protein p300 byl nalezen u kolorektálních, žaludečních i u jiných epiteliálních primárních nádorů. Ztráta heterozygocity v *p300* je spojená s výskytem glioblastomů, hepatocelulárních karcinomů a leukemií [36, 37]. U akutní myeloidní leukémie (AML) byla nalezena translokace a fúze genu kódujícího CPB [38]. Poškození funkce CPB může být rovněž způsobeno onkogenními virovými proteiny inhibujícími histonacetyltransferasovou aktivitu CPB proteinu [39].

V případě HDAC je ve spojení s nádorovými procesy pozorována její nadměrná aktivita. Neznáme ale přímé spojení mezi známou alterací v expresi HDAC a určitým typem rakoviny, jako je tomu u HAT. V rakovinných buňkách s nadměrně exprimovanou HDAC dochází k represí tumor-supresorových genů kódujících proteiny jako jsou p53, p21 a gelsolin [40-42], zatímco exprese látek aktivních v tumorových buňkách je deregulována. Příkladem jsou hypoxií indukovaný faktor-1 (HIF-1) a vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) [43]. Aberantní funkce HDAC6 byla nalezena i u některých neurodegenerativních onemocnění jako Alzheimerova choroba, kde způsobuje hypoacetylaci tubulinu [44].

Příkladem role HDAC při vývoji nádoru je aberantní interakce s retinoblastomovým proteinem Rb. Rb aktivuje transkripční represor E2F a poté je rekrutován komplex jehož součástí je HDAC. U některých druhů rakovin exprimuje lidský papilomavirus onkoprotein E7, ten se váže na Rb a předchází interakci s HDAC. Onkovir tak aktivuje aberantní transkripci genů [45].

Abnormální aktivita HDAC, způsobená vlivem alterovaných proteinů nádorových buněk, je běžná u hematologických rakovinných onemocnění. U těchto druhů rakovin fúzuje *PML* (z angl. „*ProMyelocytic Leukemia gene*“), nebo *PLZF* (z angl. „*Promyelocytic Leukemia Zinc Finger gene*“) s genem pro α -receptor kyseliny retinové (*RAR- α*). Vznikají tak onkoproteiny **PML-RAR- α** a **PLZF-RAR- α** , které působí jako aberantní represory transkripce a fungují v součinnosti s multiproteinovým komplexem obsahujícím HDAC. Afinita fúzního proteinu ke komplexům obsahujícím HDAC je mnohokrát vyšší, než v případě normální funkce *RAR- α* . Buňky postižené touto abnormalitou nediferencují a vzniká akutní promyelocytární leukémie (APL). Důsledkem této represe je ztráta citlivosti buňky na fyziologickou koncentraci kyseliny retinové. V buňkách, které exprimují *PML-RAR- α* je možné farmakologickou dávkou ATRA způsobit disociaci represorového komplexu obsahujícího HDAC a proteinu *RAR- α* . Jiná situace nastává u pacientů s fúzním proteinem *PLZF-RAR- α* , kdy jedno z vazebných míst normálního proteinu *PLZF* v komplexu s *RAR- α* neváže retinovou kyselinu, proto pacienti s tímto poškozením špatně odpovídají na léčbu pomocí ATRA. Pokud je však funkce HDAC inhibována (pomocí inhibitorů HDAC), může být citlivost na ATRA obnovena [7, 46].

Transkripční represe zprostředkovaná HDAC rovněž hraje roli v patogenezi lymfomů a některých typů myeloidní leukémie. U non-Hodgkinovi nemoci je maligní transformace lymfoidních buněk spojena s nadměrným přepisem transkripčního represoru *LAZ3/BCL6*, kde je vliv HDAC rovněž předpokládán. Dalším příkladem působení HDAC v nádorových buňkách je přítomnost HDAC v multiproteinových komplexech s transkripčními faktory *AML-1* a *ETO*, kde tyto dva faktory fúzují u některých subtypů AML v důsledku chromosomální translokace [24].

Acetylovaný protein p53 má delší poločas života. V buňkách se snižuje jeho ubiquitinace a podléhá proto tak rychle proteosomální degradaci [47].

4.2.2. INHIBICE HDAC

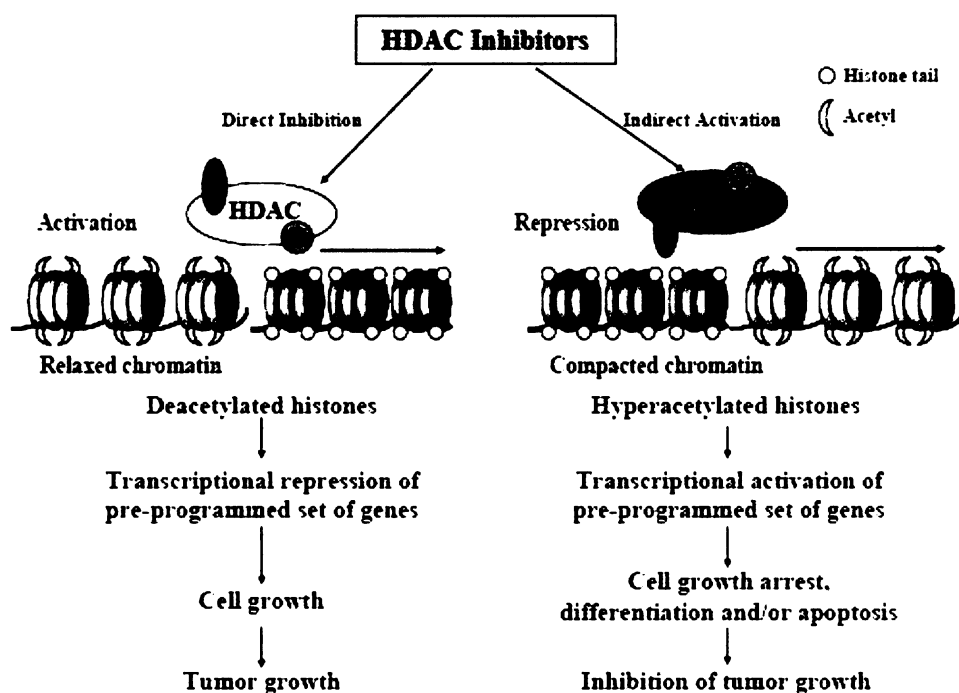
Aberantní genová exprese enzymů s HAT aktivitou vedoucí k jejich inaktivaci nebo nadměrná exprese HDAC se uplatňují při karcinogenezi. Protože tyto epigenetické změny v genové expresi jsou potenciálně reversibilní, lze tam, kde se na těchto změnách podílí

nadměrná aktivita histondeacetylas použít jejich inhibitory. Inhibice aktivity HDAC je tedy možným cílem pro terapeutický zásah a inhibitory HDAC, jako potenciální protinádorová chemoterapeutika, se stávají předmětem racionálního navrhování cílených léčiv.

Inhibice HDAC specifickými inhibitory způsobuje v buňkách změny na molekulární úrovni. Mezi tyto změny patří alterace v acetylaci proteinů a následná změna exprese daných genů a na základě toho vznikající změny v buněčné morfologii. Schéma působení inhibitorů HDAC je znázorněno na obr. 6 (str. 25). Inhibitory HDAC zpomalují proliferaci transformovaných buněčných linií. Omezení růstu nádorů bylo pozorováno u xenograftů různých solidních tumorů, včetně například pediatrických neuroblastomů [48].

Inhibitory histondeacetylas zvyšují acetylaci histonů *in vivo* a indukují buněčnou diferenciaci nebo apoptózu v závislosti na typu buněk. Modifikují acetylaci heterochromatinu i během mitózy, což má za následek aberantní regulaci kontrolních bodů při mitóze, destabilizaci chromosomu a v některých případech apoptózu. Některé nádorové buňky nejsou při léčbě inhibitory HDAC schopny zastavit buněčný cyklus, tedy diferencovat, což je odlišuje od buněk normálních, u kterých je diferenciace udržována řádným způsobem. V takových případech je pozorována rovněž apoptóza nádorových buněk [49].

Inhibitory HDAC spouští selektivně signály způsobující smrt AML buněk. Ta je způsobena aktivací promotoru genu *p21*, což má v tomto případě za následek zvýšenou expresi TRAIL-receptorů (receptory vážící TRAIL z angl. „Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand“) [50].



Obrázek 6. Molekulární mechanismus působení inhibitorů HDAC. Transkripční represe v oblasti heterochromatinu, zprostředkovaná HDAC vede k nádorovému růstu; transkripční aktivace zprostředkovaná HAT zastavuje buněčný cyklus a růst, navozuje diferenciaci a v některých případech apoptózu. HDAC inhibitory blokují aktivitu HDAC přímo a aktivitu HAT nepřímo. Převzato z [51].

Další biologickou aktivitou inhibitorů HDAC je zvýšení acetylace chaperonu hsp90. V důsledku toho dochází k destabilizaci komplexu hsp90 s proteiny, které jsou pak špatně sbalovány a podléhají proteosomální degradaci. Mezi proteiny, jejichž množství je v buňce tímto způsobem snižováno, patří například EGFR (z angl. „epidermal growth factor receptor“) [52]. Protinádorovou aktivitou HDAC inhibitorů je také inhibice angiogeneze, která je způsobena změnou exprese nebo stability klíčových proteinů řídících vaskularizaci tkáně [53].

Aktivita HDAC inhibitorů je studována rovněž v kombinaci s jinými léčebnými principy, kde v transformovaných buněčných liniích působí aditivně a synergisticky (např. s radiační terapií, s ATRA a dalšími) [54]. Inhibitory HDAC působí kooperativně při léčbě hematologických i některých solidních malignancí s analogy retinoidů. Při *in vitro* i *in vivo* experimentech bylo účinněji dosaženo diferenciace buněk [55], než při léčbě samotnými látkami jednotlivě. V kombinaci se zvyšuje jejich cytotoxicita vůči buňkám neuroblastomu *in vitro* i na *in vivo* xenograftu [49].

Inhibice HDAC působí synergisticky s demethylací DNA, dochází k opětovné expresi genů, umlčených v nádorových procesech. Tomu nasvědčuje fakt, že apoptóza

nádorových buněk probíhá v mnohem větší míře, pokud jsou účinky HDAC inhibitorů a inhibitorů methyltransferasy vzájemně kombinovány [28].

Bylo zjištěno, že inhibicí HDAC lze aktivovat méně než 2% všech genů. Mnohé tumor-supresorové geny nebo geny proapoptotických proteinů jsou deaktivovány methylací i represí zprostředkovanou HDAC zároveň. Mezi tyto proteiny patří např. p16^{INK4a}, p14^{ARF}, p15^{INK4b}, hMLH1, p73, Rb, BRCA1, VHL, APC a další [56, 57]. Molekulárním cílem zásahu inhibitorů HDAC jsou i proteiny CPB a p300 s HAT aktivitou [39].

5. INHIBITORY HISTONDEACETYLASY

V posledních letech je zkoumáno mnoho látek se schopností inhibovat enzymatickou aktivitu HDAC. Patří mezi ně látky získané z přírodních zdrojů (metabolity mikrobiálních kultur), stejně jako látky z chemických knihoven a látky uměle syntetizované přímo k tomuto účelu. Nyní je známo přes 80 různých inhibitorů HDAC [27, 58]. Studuje se jejich vliv na posttranslační modifikace proteinů a faktorů. Jejich působením se mění regulace genů důležitých pro průběh buněčného cyklu, diferenciaci a apoptózu [59]. Při pokusech *in vitro* i *in vivo* se sleduje schopnost těchto látek zastavit růst nádorových buněk, přimět je k diferenciaci a v některých případech navodit apoptózu. Některé z těchto látek podstupují v dobře tolerovatelných dávkách klinické fáze testování [60]. Původní inhibitory HDAC byly nalezeny jako fermentační produkty kultur mikroorganismů. První přírodní látka u níž byla potvrzena HDAC inhibiční aktivita je **butyrát sodný** (NaBu). Je to krátká mastná kyselina vznikající v těle jako produkt střevních bakterií. Častým předmětem studií je také **trichostatin A** (TSA), který je metabolickým produktem streptomycet [51]. Dále například **depsipeptid**, poprvé izolovaný z kultury *Chromobacterium violaceum* [61].

Na základě struktury se zkoumané inhibitory HDAC rozdělují do šesti základních skupin: deriváty hydroxamové kyseliny, cyklické tetrapeptidy, mastné kyseliny s krátkým řetězcem, syntetické deriváty pyridylkarbamátu, syntetické deriváty benzamidů a ketony. Některé známé sloučeniny jsou uvedeny v tabulce 1. V následujících kapitolách budou podrobně popsány jen některé významnější sloučeniny z přehledu v tabulce 1 (str. 28).

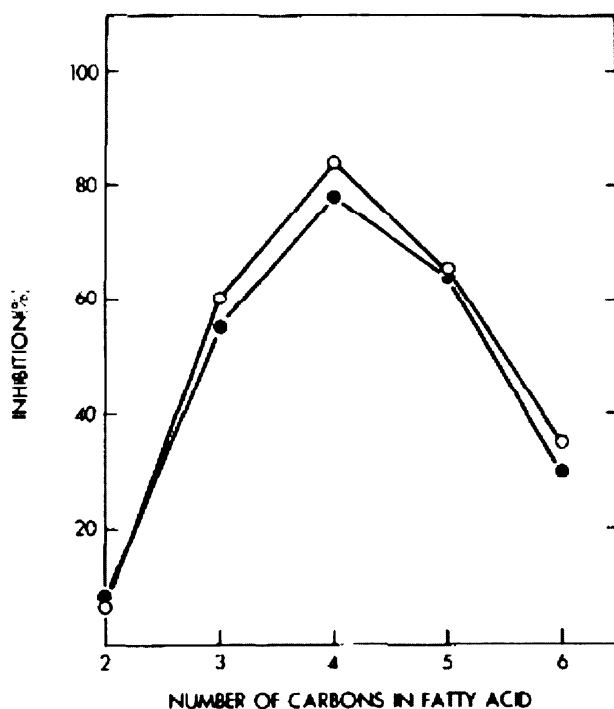
Tabulka 1. Přírodní a syntetické inhibitory HDAC. Převzato z [51].

SKUPINA	PŘÍKLADY
Hybridní polární sloučeniny (HPC) na bázi hydroxamové kyseliny	Trichostatin A (TSA) SAHA (z angl. „suberoylanilide hydroxamic acid“) CBHA (z angl. „m-carboxycinnamic acid bis-hydroxamide“) ABHA (z angl. „azelaic bishydroxamic acid“) NVP-LAQ824 LBH589 Oxamflatin PXD101 Scriptaid Pyroxamid
Cyklické tetrapeptidy	Depsipeptid (FK228, FR901228) Apicidin Trapoxin HC-toxin Chlamydocin Depudesin CHAPS*
Krátké mastné kyseliny	Kyselina valproová (VPA) Fenylbutyrát (PB) Fenylacetát (PA) Butyrát sodný (NaBu) AN-9 (Pivanex)
Syntetické deriváty pyridylkarbamátu	MS-275
Syntetické deriváty benzamidu	CI-994 (N-acetyldinalin)
Ketony	Triflouromethylketon α -ketomidy

* CHAPS (z angl. „cyclic hydroxamic acid containing peptides“)

5.1. KRÁTKÉ MASTNÉ KYSELINY

Do této skupiny patří klinicky testovaný butyrát. Tato sloučenina ale nevykazuje žádnou specifitu a má značné vedlejší účinky. Naproti tomu kyselina valproová (VPA) efektivně inhibuje aktivitu HDAC i v klinicky aplikovatelných dávkách, kdy je její toxicita nízká [62]. K vyvolání účinku v podobě acetylace histonů je potřeba dosáhnout relativně vysoké koncentrace (mM), což je u některých z těchto látek obtížné [51].



Obrázek 7. Inhibice HDAC krátkými mastnými nerozvětvenými kyselinami *in vitro*. Pokus proveden se dvěma typy histondeacetylasy, izolovanými z buněk telecího brzlíku (označeny ● a ○). Na ose x je znázorněn počet uhlíkových atomů inhibující sloučeniny a na ose y je procentuálně vyjádřena míra inhibice HDAC vzhledem k aktivitě HDAC bez přidání inhibitorů. Použita byla 0,25 mM koncentrace inhibujících sloučenin, koncentrace histonů byla 440 µg/ml. Převzato z [63].

Obr. 7 ukazuje inhibici dvou histondeacetylasek různě dlouhými nerozvětvenými mastnými kyselinami. Nejúčinnějším inhibitorem je butyrát, ale i propionát a pentanoát mají inhibiční aktivitu k HDAC [63]. Relativně nízké požadavky na délku uhlíkového řetězce tedy poukazují na možný mechanismus účinku těchto sloučenin, kdy při inhibici HDAC tyto látky působí spíše jako vážící se detergenty [63].

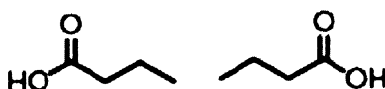
5.1.1. BUTYRÁT

Butyrát je čtyřuhlíkatá krátká mastná kyselina produkovaná mikroflórou tlustého střeva. Struktura butyrátu je uvedena na obr. 8 (str. 30). V polovině sedmdesátých let bylo vypracováno několik studií o tom, jak butyrát sodný (NaBu) zastavuje buněčnou proliferaci, mění buněčnou morfologii a pozměňuje genovou expresi v savčích buněčných kulturách [64]. Později bylo objeveno, že butyrát zvyšuje acetylaci histonů v kultivovaných HeLa buňkách („nesmrtelné“ buňky karcinomu děložního krčku) a

erytroleukemických buňkách [65] a nakonec byl na základě dalších studií mechanismus protinádorového působení butyrátu přisouzen inhibici HDAC [66-69].

Molekuly butyrátu mohou obsadit hydrofobní katalytickou kapsu enzymu, ale ukázalo se, že butyrát je nekompetitivním inhibítozem HDAC, neasociuje tedy s místem vazby substrátu [63].

Butyrát inhibuje růst nádorových buněk tlustého střeva při *in vivo* pokusech na potkanech, kdy předchází růstu chemicky indukovaných nádorů [70], i při *in vitro* pokusech s kolorektálními lidskými nádorovými liniemi [71, 72]. Koncentrace butyrátu mající tento efekt *in vitro* je srovnatelná s koncentrací zjištěnou v savčím střevě. Protože butyrát vzniká v tlustém střevě anaerobní fermentací vlákniny, předpokládá se, že právě tato látka je důležitým spojovacím článkem mezi prevencí rakoviny tlustého střeva a dietou bohatou na vlákninu [73].



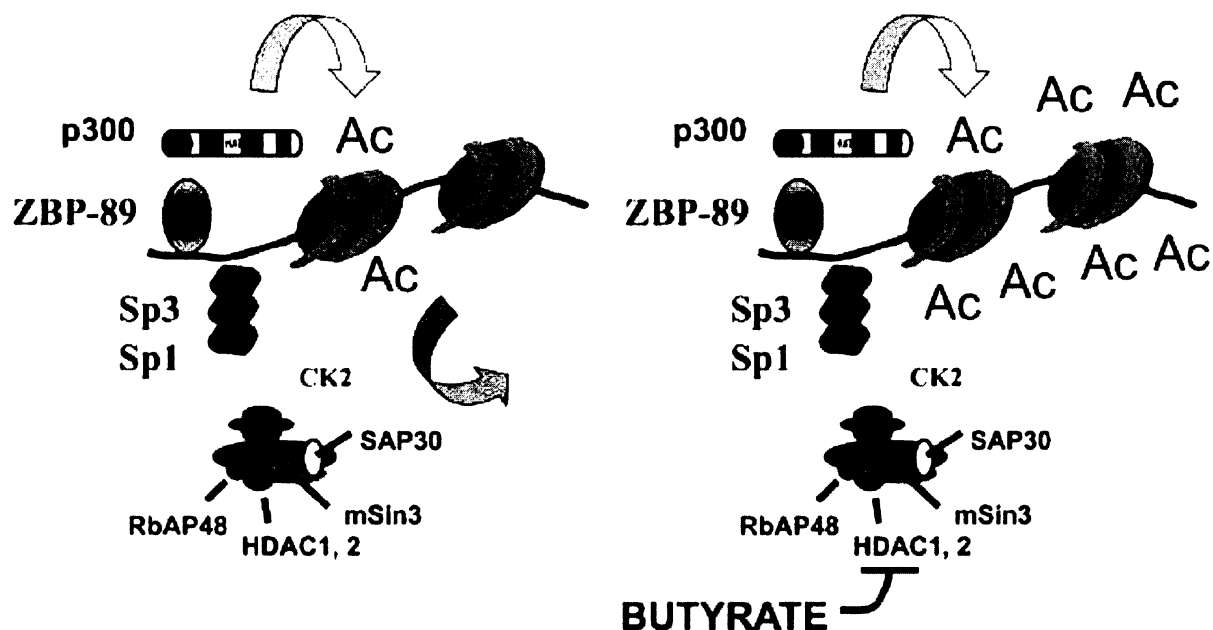
Obrázek 8. Struktura butyrátu. Převzato z [25].

Zdá se, že omezení růstu střevních karcinomů při léčbě butyrátem není způsobeno apoptózou. Inhibiční efekt butyrátu je v těchto případech reversibilní, tzn. vymizí po přerušení léčby a buňky jsou schopny znovu „rozběhnout“ buněčný cyklus a proliferovat [71].

Ve studii pojednávající o represi a indukci genů pomocí butyrátu jsou uvedeny některé butyrát-responzivní geny, tedy geny, jejichž expresi butyrát ovlivňuje. Promotory těchto genů mají tzv. butyrát-responzivní elementy. Tyto elementy je možno rozdělit do dvou skupin na základě jejich DNA sekvence. Zajímavá je skupina genů, jejichž butyrát-responzivními elementy jsou místa vážící transkripční faktory Sp1 a Sp3, mezi ně patří gen pro protein p21^{WAF1/CIP1} (WAF1 z angl. „Wild-type p53-Activated Fragment I“), inhibitor CDK2 (cyklin dependentní kinasy 2), důležitého regulačního proteinu v buněčném cyklu [25, 74]. Mechanismus je znázorněn na obr. 9 (str. 31). Indukce exprese mRNA tohoto proteinu (p21) skrze aktivaci genového promotoru, probíhá cestou nezávislou na p53. Buněčný cyklus se tak zastavuje ve fázi G₁. U lidských nádorových buněk tlustého střeva kultivovaných v médiu byl maximální efekt pozorován při koncentraci butyrátu 5 mM. Při zvýšení koncentrace až na 20 mM se tento efekt dále již nezvětšuje. Toto koncentrační

rozmezí přibližně odpovídá koncentraci butyrátu v tlustém střevě. V protinádorové aktivitě butyrátu vůči tumorovým buňkám střev je kromě aktivace proteinu p21 pravděpodobně zahrnut i jiný mechanismus v podobě acetylace nehistonových proteinů a DNA methylace [75].

Butyrát způsobuje inhibici HDAC nejen v rakovinných buňkách tlustého střeva. Mechanismus působení byl demonstrován na maligních buňkách prsu [25], prostaty [76] a dalších.

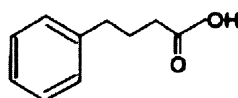


Obrázek 9. Model mechanismu indukce proteinu p21^{WAF1/CIP1}, inhibujícího CDK2 butyrátem. Na schématech je znázorněn promotor genu p21^{WAF1/CIP1}, kde Sp1 protein ZBP-89 (z angl. „zinc finger DNA binding protein 89“) asociuje s p300 (p300 má acetyltransferasovou aktivitu) a s elementem vázícím Sp1 na DNA. Na druhé straně Sp3 rekrutuje komplex proteinů a HDAC1 i HDAC2. Mezi těmito dvěma procesy je tak ustavena rovnováha, kdy na levé straně obrázku vyúsťuje tato rovnováha v nízkou acetylaci histonů a gen tak není přepisován. V přítomnosti butyrátu je HDAC aktivita inhibována, histony jsou hyperacetylovány a transkripce probíhá. Převzato z [25].

5.1.2. FENYLBUTYRÁT A FENYLACETÁT

Strukturně podobný fenylbutyrát (PB) vykazuje rovněž povahu inhibitoru HDAC, jeho strukturu znázorňuje obr. 10 (str. 32). Zvyšuje také radiosenzitivitu mnohých nádorových linií [77] a zesiluje efekt jiných chemoterapeutik. Jeho účinek byl potvrzen například na prsních, mozkových, ovariálních a rovněž střevních nádorových buňkách s multirezistencemi na chemoterapeutika [78]. Metabolitem PB je fenylacetát (PA), jehož inhibiční aktivita vůči HDAC je často zkoumána ve spojení s PB. Obě tyto sloučeniny jsou

relativně netoxické [79]. PA je využíván k léčbě hyperamonémie spojené s poruchami močovinového cyklu. PB i PA mají vysokou volnou frakci nevázaných molekul v lidské plasmě, více molekul je tedy schopných interagovat s nádorovými buňkami [80]. Tyto aspekty jsou dobrým předpokladem pro využití PB v klinické praxi, v současnosti tato sloučenina podstupuje fáze I a II klinického testování [81].

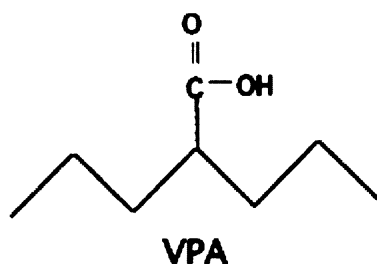


Obrázek 10. Struktura fenylbutyrátu. Převzato z [7].

Aktivita PB a PA byla testována na rakovinných buňkách maligního mozkového nádoru - meduloblastomu. Obě sloučeniny mají díky strukturním předpokladům (krátké mastné kyseliny) výhodnou schopnost prostupovat snadněji přes hematoencefalickou bariéru. Kritická je tedy v tomto případě lipofilita molekul, která je vyšší u PB. Jelikož PA je metabolitem PB, slouží PB v podstatě jako „posel“ PA do mozkových nádorů [82, 83]. Tam již působí PA, který prokazatelně způsobuje u buněk meduloblastomu jejich akumulaci ve fázi G_0/G_1 . PB je účinnějším diferenciačním činidlem než PA. Kombinační léčba s jinými chemoterapeutiky ukázala, že PA i PB zvyšují účinnost jiných léků [81].

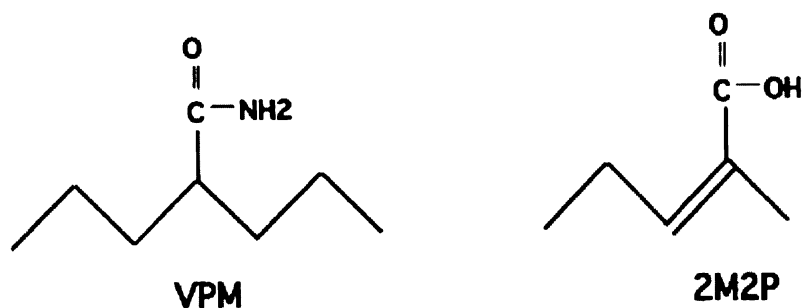
5.1.3. KYSELINA VALPROOVÁ (VALPROÁT)

Kyselina valproová (VPA), 2-propylpentanová kyselina (struktura na obr. 11, str. 33), je mastná kyselina s krátkým rozvětveným řetězcem. V roce 1962 byl náhodně objeven její protikřečový účinek během experimentů, kdy byla používána jako rozpouštědlo pro látky zkoumané jako potenciálně protikřečové. VPA je zaběhlým lékem v klinické praxi, od sedmdesátých let je používána jako antiepileptikum u dětí i dospělých [84]. Stále více se však studuje její účinnost i při jiných obtížích a chorobách jako jsou bolesti hlavy, migrény, schizofrenie a jiné patologické procesy mozku. Od roku 1996 se rovněž zkoumá její protinádorová aktivita [85]. Nyní prochází I. a II. fází klinického testování jako protinádorové terapeutikum.



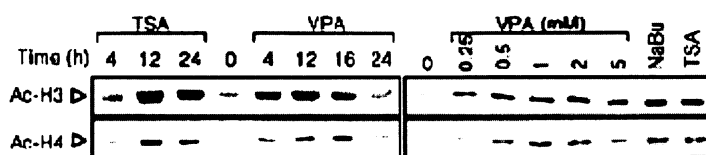
Obrázek 11. Struktura kyseliny valproové. Převzato z [84].

Aby bylo dosaženo antikonvulsivních účinků, je VPA podávána tak, aby se její koncentrace v krevním séru pohybovala mezi hodnotami 346 - 693 μM (50 – 100 $\mu\text{g/ml}$). Při vyšších koncentracích než 693 μM má VPA hematotoxický účinek [86]. Dalším toxickým efektem VPA je zřídka se vyskytující fatální hepatotoxicita [53]. VPA je jinak pacienti vesměs dobře snášena, při indikaci těhotným pacientkám se však ukázaly její teratogenní účinky [87]. Tyto účinky byly zkoumány na myších embryích a embryích žáby rodu *Xenopus*. Prokázalo se, že VPA způsobuje vrozené malformace, především defekty neurální trubice [62]. Různé modifikace molekuly VPA vedou ke sloučeninám se separovanými účinky, buďto teratogeními a nebo antiepileptickými. To nasvědčuje, že teratogenicita VPA je způsobena jiným mechanismem než její antiepileptický účinek. Teratogenní analoga VPA jsou ta, která váží na α -uhlík volnou karboxylovou skupinu, vodík a dvě alkylové skupiny. Analoga, u nichž je karboxylová skupina přeměněna na amid, jako je valpromid (VPM), nebo sloučenina 2-2-propylpentenoová kyselina (2M2P), která má na α -uhlíku jako další substituent metylovou skupinu (obě struktury uvedeny na obr. 12), nezpůsobují stejné defekty na myších embryích jako VPA. Přesto mají tato analoga stále schopnost tlumit chemicky vyvolané křeče u myší.



Obrázek 12. Některá strukturní analoga VPA, využívána při studování mechanismu způsobujícího teratogenicitu a protikřečový účinek kyseliny valproové. Převzato z [84].

K zachování teratogenity jsou tedy nutné určité strukturální charakteristiky, kterémůžeme nalézt i u butyrátu. Podobné malformace a retardace růstu embryí způsobuje také trichostatinem A(TSA). Teratogenní vlastnosti VPA jsou způsobeny její schopností inhibovat HDAC, jak bylo ověřeno na základě podobných teratogenních účinků s TSA při testech s embryi obratlovců, strukturálních podobností s jinými inhibitory HDAC a pozorovanou hyperacetylací histonů H3 a H4 a proteinu p53 (obvyklých substrátů HDAC) v testovaných buněčných kulturách. Hyperacetylace histonů H3 a H4 je znázorněna na obr. 13, jako výsledek pokusu s nádorovými buňkami teratokarcinomu. Inhibici HDAC *in vitro* způsobuje VPA již v rozsahu uvedených terapeutických koncentrací nalezených v krevním séru pacientů léčených na epilepsii. VPA je opticky aktivní sloučenina, existují proto dva stereoizomery. Oba mají antiepileptický účinek, ukázalo se však že pouze jeden stereoizomer (S)-VPA je teratogenní a inhibuje enzymy s histondeacetylasovou aktivitou [62, 88].



Obrázek 13. Hyperacetylace histonů H3 a H4 teratokarcinomových buněk dosažená léčbou VPA.

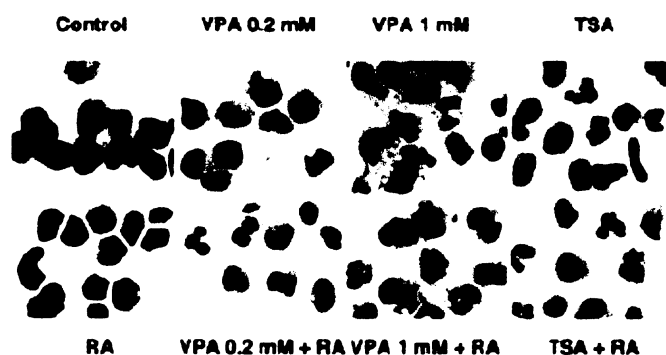
VPA indukuje akumulaci hyperacetylovaných histonů H3 a H4. Časový průběh účinku i koncentrace VPA byly stanoveny metodou „western blot“, analýzou extraktů buněk teratokarcinomu F9. Když není uvedeno jinak je použita koncentrace VPA 1 mM. Pro srovnání uvedeny výsledky pokusů s TSA (100 nM) a NaBu (5 mM). Převzato z [88].

VPA indukuje proteosomální degradaci HDAC2 a selektivně inhibuje katalytickou aktivitu HDAC třídy I [89]. VPA neinhubuje HDAC6 a 10, které náleží do třídy II. Tyto jsou strukturně odlišné od ostatních HDAC třídy I a II, kde hlavní rozdíl spočívá ve struktuře katalytické domény. Tato odlišnost může být důvodem jejich necitlivosti k VPA. Protože HDAC6 je zodpovědná za acetylaci cytoplasmatického α -tubulinu [90], mohla by být VPA používána jako semiselektivní HDAC inhibitor.

Když byla VPA identifikována jako inhibitor HDAC, začala být intenzivněji zkoumána její protinádorová aktivita. Při testech *in vitro* bylo prokázáno, že VPA způsobuje diferenciaci u buněk různých nádorových linií. V buňkách teratokarcinomu VPA indukuje specifický typ diferenciaci, charakteristický sníženou proliferací,

morfológickými alteracemi, jinou expresí genů a akumulací transkripčního faktoru AP-2. Stejně morfológické změny a akumulaci AP-2 pozorujeme u buněk s diferenciací indukovanou TSA. VPA rovněž narušuje proliferaci buněčných kultur HT-29 nádoru tlustého střeva a buněčných kultur MT-450 rakoviny prsu [91]. VPA při *in vivo* testech provedených na zvířecích modelech, na krysách s xenograftem lidského nádoru prsu MT-450, zpomaluje růst primárních nádorů a zmenšuje velikost a počet metastáz. VPA překonává represi transkripce způsobenou expresí PML-RAR- α u transformovaných myších hematopoetických progenitorových buněk a způsobuje jejich diferenciaci, ne však apoptózu jako TSA. K tomu nedochází ani při relativně vysoké koncentraci VPA (3 mM) [88]. Diferenciace u hematopoetických progenitorových buněk je závislá na proteinu p21, jehož reexpresi lze pomocí VPA vyvolat [84]. U buněčné linie akutní myeloidní leukémie Kasumi-1, ve kterých je exprimován translokační produkt AML1/ETO, způsobuje samotná VPA částečnou diferenciaci [88].

VPA je první terapeuticky účinná látka s prokázanou schopností rušit stabilní metylace DNA i mimo replikaci, tedy mimo fázi dělení buňky, v postmitotických tkáních nacházejících se třeba v mozku. Skrze zvýšenou acetylaci histonů, způsobovanou VPA, se usnadňuje přístupnost demethylasy k DNA. Demethylací genů dochází k jejich reexpresi [29].



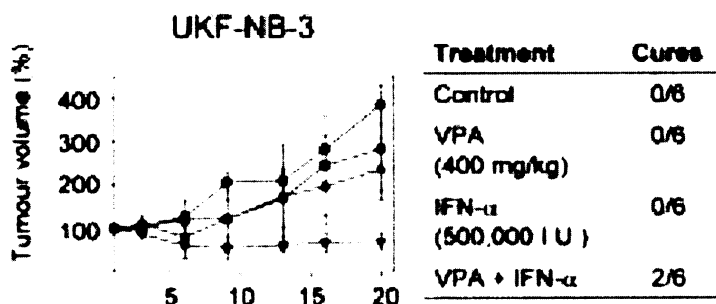
Obrázek 14. Morfológické změny způsobené kombinovanou léčbou VPA a RA. Primární buňky z kostní dřeně pacienta s nově diagnostikovanou AML, obarvené podle Giemsy byly kultivovány po dobu 5 dní spolu s RA (1 μ M) a VPA (0,2 mM nebo 1 mM) a pro srovnání s TSA (240 nM) samotným, nebo v kombinaci s RA. Převzato z [88].

Na základě výsledků výzkumu působení inhibitorů HDAC v kombinaci s kyselinou retinovou (RA) na buňky AML, byla zkoumána odpověď leukemických AML buněk i na

kombinaci kyseliny valproové a RA. Při vystavení buněk Kasumi-1 nejprve VPA a následně RA byl diferenciační účinek zesílen. Při pokusech *in vitro* s leukemickými buňkami, které byly odebrány pacientům s AML se ukázala kombinace VPA/RA být minimálně stejně silným diferenciačním prostředkem jako kombinace TSA/RA [88].

Na obr. 14 (str. 35) jsou viditelné morfologické změny primárních buněk z kostní dřeně pacienta s nově diagnostikovanou AML po podání VPA. Na základě tohoto pozorování a jiných analýz byl nalezen i větší počet buněk podléhajících apoptóze po podání VPA, nežli po podání TSA. Odpověď na léčbu byla vyvolána u přibližně 40% testovaných pacientů s myelodysplastickým syndromem (MDS) [86]. VPA a RA indukují myeloidní diferenciaci i u pacientů s chemoterapeuticky rezistentní AML [8].

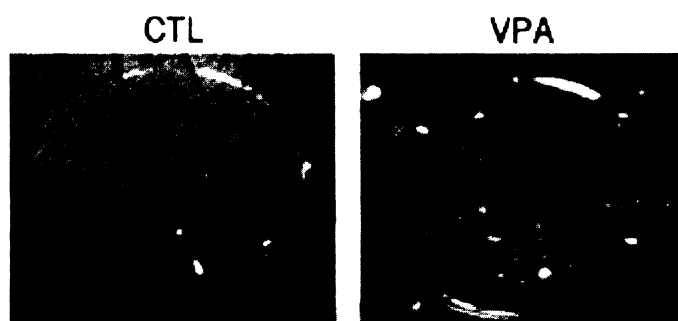
VPA v kombinaci s RA a inhibítozem DNA-methyltransferasy (DNMT) Aza-dc (5-aza-2'-deoxycytidin) překonává epigenetické bariéry tumor-supresorového genu *RARβ2* u lidské nádorové buněčné linie MCF-7 rakoviny prsu. Transkripční aktivace genového promotoru *RARβ2-RARE* samotnou VPA bez Aza-dc není tolik účinná. Spojení aktivit inhibitorů HDAC a inhibitorů DNMT je tedy v případě RA-dependenční obnovy exprese *RARβ2-RARE* u buněk MCF-7 účinnější. Při koncentraci 250 μM (která je přípustná v rámci terapeutického rozsahu koncentrace VPA nalezené u epileptických pacientů léčených VPA) je inhibována proliferace rakovinných buněk. V této kombinaci by VPA mohla být použita pro léčbu i chemoprevenci rakoviny prsu. Kombinace VPA a Aza-dc má rovněž antileukemickou aktivitu. Na základě předešlého výzkumu byla tato kombinace podrobena fázi I a II klinického testování u pacientů s leukémií. Nízké dávky Aza-dc a VPA v dávkách do 50 mg/kg mohou být bezpečně podávány leukemickým pacientům, v některých případech však může být léčba komplikovaná neurotoxickými účinky [92].



Obrázek 15. Velikost nádorů xenograftu neuroblastomových buněk UKF-NB-3 transplantovaných myším po léčbě kyselinou valproovou v kombinaci s interferonem-α. VPA v dávce 400 mg/kg za den (▲), IFN-α 500.000 IU/den (■), VPA 400 mg/kg za den + IFN-α 500.000 IU/den (▼), kontrolní roztok pufru PBS (●). Převzato z [85].

Protirakovinná aktivita VPA je pozorována i vůči buňkám neuroblastomu (NB) a je synergisticky zvýšena použitím interferonu- α (INF- α). Při této kombinované léčbě dochází ke kumulaci buněk v G₁-fázi. INF- α nemá vliv na acetylaci histonů v jádrech NB buněk. Při testech se zvířaty byl zpomalován růst nádorů NB buněk UKF-NB-3 a u dvou ze šesti zvířat došlo ke kompletnímu vyléčení. Výsledky kombinované léčby jsou znázorněny na obr. 15 (str. 36). Léčba samotnou VPA nevedla v tomto případě ke kompletnímu vyléčení ani u jednoho z testovaných zvířat [85].

VPA rovněž při použití terapeutických koncentrací inhibuje proliferaci a migraci lidských endoteliálních buněk a působí proti formování nových kapilár, působí tedy jako inhibitor angiogeneze při *in vitro* i *in vivo* pokusech, jak je ukázáno na obr. 16. Tyto efekty jsou způsobeny snížením exprese enzymu endoteliální NO-synthasy (eNOS) v důsledku inhibice HDAC. *In vitro* byl tento efekt pozorován při koncentracích 0,5 a 1mM – což jsou koncentrace obvykle pozorované v krevní plasmě pacientů léčených VPA. Podávání VPA březím myším samicím vede ke značné redukci angiogeneze u embrya. Teratogenní účinky VPA jsou způsobeny její antiangiogenní aktivitou a ta může být také příčinou hepatotoxicity VPA [53].



Obrázek 16. Antiangiogenní efekt kyseliny valproové znázorněný na kuřecí chorioalantoické membráně. 30x zvětšeno. Převzato z [53].

Ukázalo se, že terapie pomocí VPA může být spojena s vývojem myelodisplastických změn v kostní dřeni a může vést k sekundární leukémii, způsobené zvýšeným poškozením DNA v důsledku chronické inhibice HDAC [93]. VPA potlačuje expresi membránových receptorů NCR (z angl. „natural cytotoxic receptors“) „zabíječských buněk“ (NK), což snižuje jejich cytotoxicitu vůči nádorovým buňkám. U AML byly nalezeny NK buňky s nedostatkem právě těchto receptorů. VPA tedy nejspíš snižuje expresi NCR, což oslabuje imunitní kontrolu zprostředkovanou NK buňkami [94].

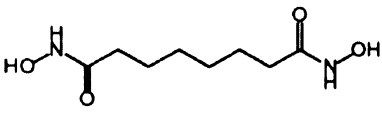
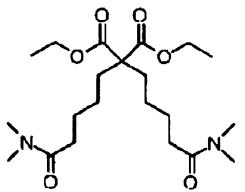
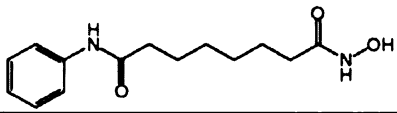
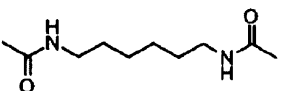
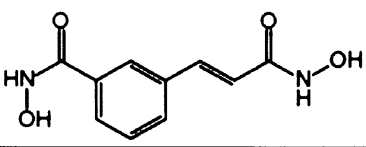
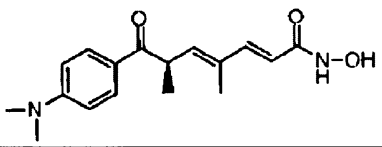
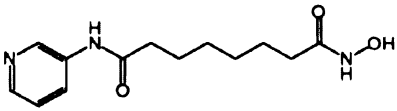
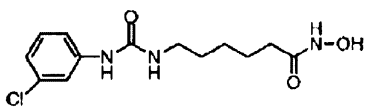
VPA podávaná orálně má biologický poločas průměrně 16 h, pro srovnání poločas strukturně příbuzného butyrátu je asi 5 min. Podávaná orálně má téměř 100% dostupnost. Je to látka komerčně dostupná a může být podávána i chronicky, s akceptovatelnou toxicitou [95]. Některé možné neurotoxické účinky VPA by mohly být odstraněny vhodnou modifikací její molekuly. Díky mnohaletému klinickému využití poskytuje VPA relativně bezpečnou a prověřenou alternativu k testování aktivity inhibitorů HDAC při terapii maligních onemocnění .

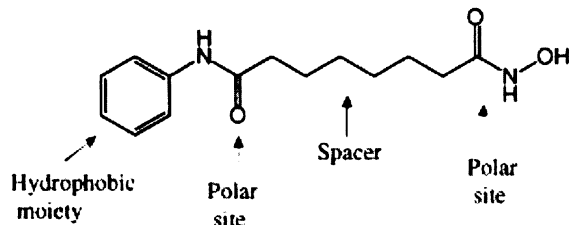
5.2. HYBRIDNÍ POLÁRNÍ SLOUČENINY NA BÁZI HYDROXAMOVÉ KYSELINY

Další skupinou inhibitorů HDAC jsou hybridní polární sloučeniny (HPC), které začaly být syntetizovány pro jejich schopnost přimět buňky k diferenciaci, v některých případech k apoptóze. Některé struktury jsou uvedeny v tabulce 2 (str. 39). Mezi HPC první generace patří HMBA (z angl. „hexamethylenbisacetamid“), který je jejich „prototypem“. Mezi HPC druhé generace pak patří SAHA (z angl. „suberoylanilide hydroxamic acid“) a CBHA (z angl. „m-carboxycinnamic acid bis-hydroxamide), které se ukázaly být asi 2000x účinnějšími induktory diferenciaci buněk, než původní HMBA. Při výzkumu s buněčnými kulturami *in vitro* HMBA nezvyšuje acetylaci histonu H4 jako ostatní HPC. Buňky rezistentní na SAHA mají zkříženou rezistenci k TSA, ale nejsou rezistentní k HMBA, proto zřejmě HMBA indukuje diferenciaci buněk jiným způsobem, než-li HPC druhé generace. Přestože HMBA vyvolal remisi onemocnění u pacientů s MDS a AML, o jeho dalším klinickém využití se neuvažuje, protože v důsledku nutných vysokých dávek pro léčbu má značné vedlejší účinky [96].

Hydroxamové kyseliny se koordinují k zinkovému atomu enzymu skrze jejich CO a OH skupiny na funkčním polárním konci, viz obr. 17 (str. 39). Navíc je vazba upevněna vodíkovými můstky skupin CO, NH a OH inhibitorů a aminokyselinových zbytků v katalytickém centru enzymu. Hydrofobním koncem molekuly interagují s povrchem katalytického místa [97].

Tabulka 2. Sloučeniny na bázi hydroxamové kyseliny. Převzato z [96].

<p>SBHA</p> 	<p>EMBA</p> 
<p>SAHA</p> 	<p>HMBA</p> 
<p>CBHA</p> 	<p>TSA</p> 
<p>Pyroxamid</p> 	<p>3-Cl-UCHA</p> 

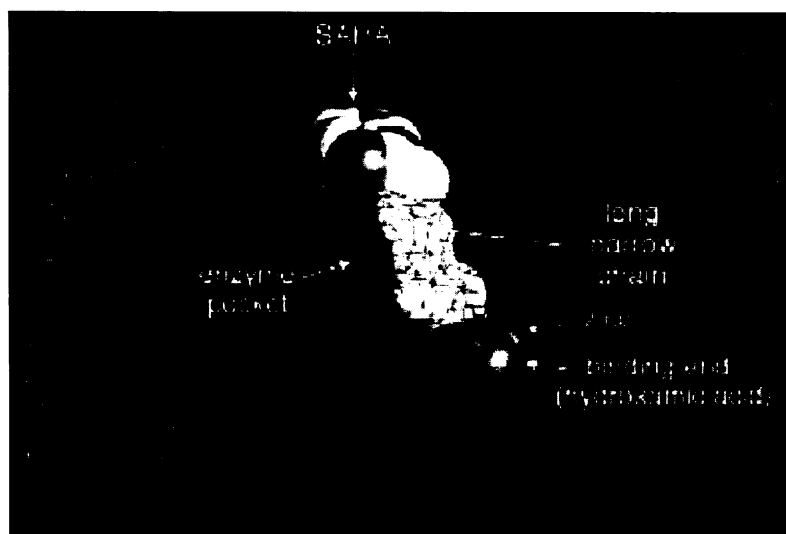


Obrázek 17. Struktura molekuly SAHA a její části. Hydroxamová část vazající zinkový atom na pravém konci zobrazených molekul je spojena přes spojovací řetězec (z angl. „spacer“) s hydrofobní částí. Převzato z [27, 34].

5.2.1. SAHA

SAHA (z angl. „suberoylanilide hydroxamic acid“) byla syntetizována proto, aby se zjistilo, zda-li je možné zvýšit aktivitu HPC sloučenin přidáním fenylové skupiny na jeden z konců molekuly. Její struktura je podobná struktuře TSA (tabulka 2), která je přírodním produktem bakterií. Obr. 18 ukazuje způsob inhibice HDAC touto sloučeninou. Hydrofobní konec SAHA je v kontaktu s aminokyselinovými zbytky na povrchu „kapsy“

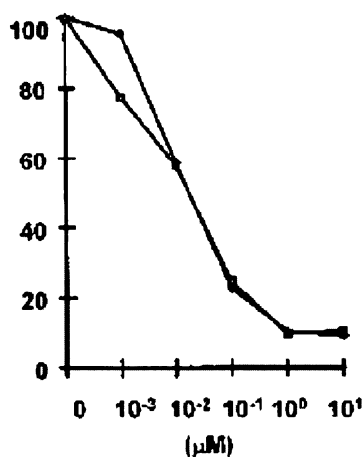
ve struktuře enzymu. Hydroxamová část SAHA se váže k zinkovému atomu na dně „kapsy“.



Obrázek 18. SAHA se váže do katalytického centra HDAC, jehož tvar je znázorněn mřížkovou strukturou. Převzato z [34].

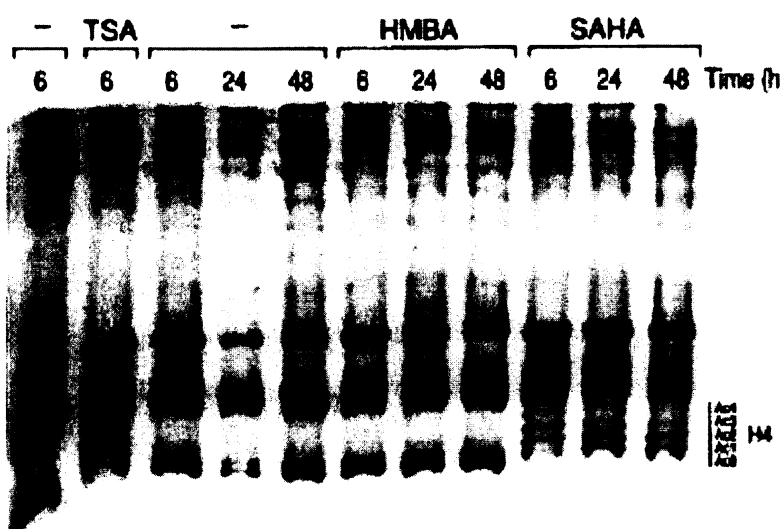
SAHA inhibuje aktivitu purifikovaných HDAC1 a HDAC3 při použitých koncentracích nižších než 100 nM. Akumulace acetylovaných histonů v buněčných kulturách je dosaženo při nízkých, mikromolárních, (μM) koncentracích viz obr. 19 (str. 41) [96].

SAHA způsobuje zastavení buněčného cyklu ve fázích G_1 a G_2 v závislosti na buněčném typu a použité dávce. Selektivně indukuje expresi $p21^{\text{WAF1/CIP1}}$ inhibitoru CDK a indukuje apoptózu nezávisle na p53 u lidské leukemické buněčné linie U937 [98]. SAHA zprostředkovává štěpení a aktivaci proteinu Bid s proapoptotickou aktivitou. V důsledku toho jsou cytochromy c uvolněny z mitochondrií. Přestože SAHA indukuje kaspasovou aktivitu, není apoptóza způsobená SAHA přímo s touto indukcí spojena [99].



Obrázek 19. SAHA inhibuje aktivitu HDAC1 (■) a HDAC3 (□). Extrakt z buněk Jurkat (kultura lidských leukemických periferních T-buněk) byl podroben imunoprecipitaci s polyklonálním antisérem proti HDAC1 a HDAC3 a testován na aktivitu HDAC v přítomnosti a nepřítomnosti SAHA. Rostoucí koncentrace SAHA: 0,001; 0,01; 0,1; 0,33; 1; 10; a 100 μM. Na ose Y je uvedena deacetylase aktivita v procentech. Převzato z [96].

SAHA indukuje diferenciaci, způsobuje zastavení buněčného růstu, nebo apoptózu širokého spektra transformovaných buněčných kultur. Diferenciace, způsobená léčbou pomocí SAHA byla pozorována u MEL buněk (myší erytroleukemické buňky) a lidských nádorových buněk močového měchýře. Acetylace histonu H4 v MEL buňkách je znázorněna na obr. 20. Apoptóza je pak indukována například u lidských myelomových buněk, lidských myelomonocytárních



Obrázek 20. SAHA způsobuje acetylaci histonu H4. MEL (myší erytroleukemické buňky) byly kultivovány se SAHA při koncentraci 2,5 μM, HMBA (5mM) a TSA (75 nM) po dobu (h) uvedenou v horní části. Histony byly extrahovány z buněk a analyzovány. Stupeň acetylce H4 je označen: Ac0 = neacetylovaný, Ac1 = monoacetylovaný, Ac2 = diacetylovaný, Ac3 = triacetylovaný, Ac4 = tetraacetylovaný. Kontrola je označena symbolem „-“. Převzato z [96].

leukemických buněk, u buněk lidských neuroblastomů a T-buněk akutní leukémie. Diferenciace i apoptóza byly sledovány u lidských rakovinných buněk prostaty a lidských plicních adenokarcinomů. SAHA mění signalizaci zprostředkovanou VEGF a působí tak jako silné antiangiogenní činidlo [100].

Při testování 60 buněčných linií byla určena IC_{50} pro SAHA od 500 nM do 5 μ M. Dávka potřebná k vyvolání apoptózy s maximálním efektem u neuroblastomových buněk je od 2 μ M vyš. Tento efekt je však velmi nízký u normálních buněk, proto toxicita ke zdravým tkáním nekomplikuje klinické využití SAHA u pacientů [100].

SAHA působí synergisticky při kombinované léčbě RA, rovněž kombinovaná léčba s dalšími terapeutiky (Aza-dc, decitabin) dále zvyšuje efekt na proliferaci, diferenciaci a apoptózu u mnohých nádorových buněčných linií. Kombinace SAHA s antimetabolitem 5-fluorouracilem má silný antiproliferativní účinek na buňky kolorektálního karcinomu s mutovaným i přirozeným typem p53. V kombinaci s imatinib mesylátem (Gleevec®, viz kapitola 2.2.) zvyšuje SAHA jeho účinnost u CML buněk, které jsou vůči němu rezistentní [101, 102]. Minimální koncentrace inhibitoru proteasomu bortezimibu v kombinaci se SAHA zvyšuje apoptózu lidských leukemických buněk [103].

U transgenních myších buněk s fúzními geny *PML-RAR- α* , jako v případě jiných inhibitorů HDAC, SAHA inhibuje růst a navozuje apoptózu ve zvýšené míře v kombinaci s ATRA [7]. Kultivace některých lidských nádorových buněk v přítomnosti SAHA zvyšuje účinnost jejich následné léčby pomocí etoposidu, ellipticinu, doxorubicinu nebo cisplatiny, ne však při následné léčbě s inhibitorem topoisomerasy, camptothecinem [104]. Léčba buněk v opačném pořadí, tedy nejdříve pomocí některého z uvedených léčiv a následně kultivací se SAHA nevede ke zvýšení cytotoxicity samotného léčiva. Nadměrná exprese některých antiapoptotických genů (např. gen kódující protein Bcl-2) v leukemických buňkách může rušit apoptogenní aktivitu SAHA, nemá však vliv na její regulační efekt buněčného cyklu a diferenciaci [98, 105, 106]. Předpokládá se proto, že SAHA by mohla být kombinována s látkami blokujícími expresi Bcl-2. pro větší efektivitu léčby. Z jiných než chemoterapeutických léčebných strategií byla SAHA testována v kombinaci s radioterapií, kdy byl prokázán její synergistický účinek na léčbu kultivovaných buněk karcinomu prostaty [107].

Při sledování aktivity SAHA *in vivo* má značný protinádorový účinek, potvrzený studiemi s xenografty lidských nádorových buněk prostaty, prsu a tlustého střeva. Protinádorová aktivita byla rovněž testována na myším transgenním modelu s APL. SAHA

u těchto myší snižuje incidenci, zmnožení a velikost nádorů. U potkanů s karcinomem prsních žláz SAHA inhibuje růst a způsobuje regresi nádorů během pětitydenní léčby. Při všech těchto testech nebyla aktivita SAHA provázena žádnými vážnějšími toxickými účinky [107].

Pokusy na myších s xenograftem lidských buněk nádoru prostaty CWR22, kdy byla zvířatům podávána SAHA v dávkách 25, 50 a 100 mg/kg/den intraperitoneálně, vykazovaly vzhledem ke kontrolním zvířatům redukci velikosti nádorů o 78% až 97%. V nádorech léčených zvířat byla potvrzena zvýšená acetylace histonů H3 i H4. Toxické účinky, které byly pozorovány v tomto případě byly pouze minimální [107].

Také kombinovaná léčba SAHA s ATRA byla testována *in vivo* na transgenních myších s lidskou APL. SAHA byla podávána rovněž intraperitoneálně v dávkách 50 mg/kg s ATRA 1,5 mg/kg. Výsledkem léčby byla 55% remise APL a prodloužení doby života testovaných zvířat bez vedlejších toxických účinků. Žádná remise nemoci nebyla pozorována v případě léčby jednotlivými látkami [7]. Kombinovaná léčba athymických myší s xenograftem meduloblastomu (buňky D 283) se SAHA (200 mg/kg/den) a RA (100 mg/kg/den) podávanými orálně buďto každý druhý den nebo denně po dobu 7 dní s následující 7 denní přestávkou, vykazovala 4 kompletní odpovědi, 10 částečných a 4 stabilizace nádoru mezi 29 léčenými zvířaty. Celková doba léčby činila 4 týdny [107].

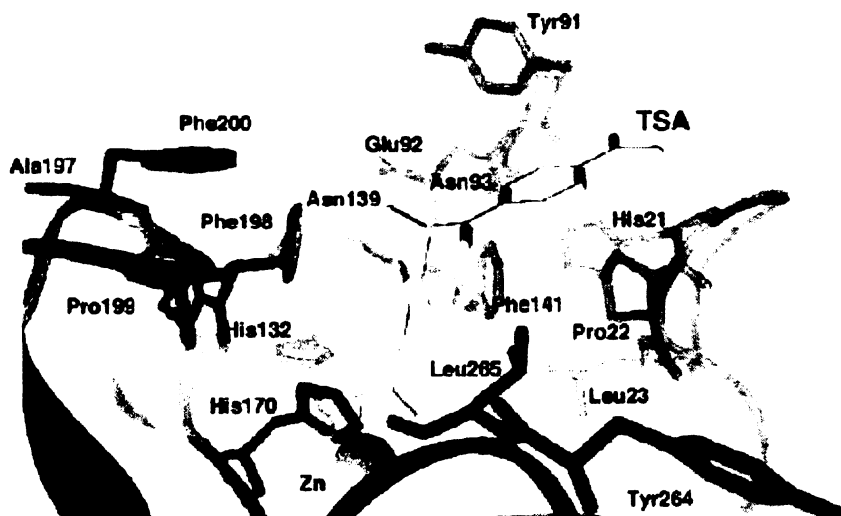
Mezi hlavní toxické účinky SAHA zjištěné pomocí testů na zvířatech (potkanech a psech) patří ztráta na váze, anorexie, hemolytická anémie a některé další. Toxické účinky byly reversibilní a vymizely během 12 - 14 dnů. Nebyly pozorovány žádné nežádoucí účinky na kardiovaskulární systém, ani žádné vážnější nevratné poškození orgánů [107]. Mezi genotoxické účinky testované *in vitro* patří chromozomální aberace u 28% testovaných buněk při koncentraci 100 µg/ml a mutagenicita [107].

Provádí se klinické studie fáze I i II s použitím SAHA u dospělých se solidními i hematologickými malignancemi. Toxické účinky limitující dávku jsou anorexie, dehydratace, průjem a únava jak u pacientů se solidními, tak s hematologickými malignancemi.

5.2.2. TRICHOSTATIN A

Trichostatin A je jedním z prvních identifikovaných inhibitorů HDAC, jeho struktura je uvedena v tabulce 2 (str. 39). Byl izolován jako přírodní fungistatické antibiotikum z mikroorganismů streptomycet. Asi 10 let po první izolaci TSA byly objeveny jeho schopnosti indukovat diferenciaci leukemických buněk a zastavovat buněčný cyklus normálních fibroblastů ve fázích G₁ a G₂. Jedině (R)-TSA je aktivním inhibitorem HDAC a způsobuje akumulaci hyperacetylovaných histonů u mnoha savčích buněčných linií [100]. Jako induktor morfologických změn u transformovaných buněk působí již v nanomolárních koncentracích [27].

Na obr. 21 je znázorněn mechanismus inhibice HDLP, což je homologní enzym histondeacetylasy s deacetylasovou aktivitou izolovaný z bakterie *Aquifex aeolicus*. Patrný je vstup alifatického řetězce TSA do hydrofóbní kapsy katalytického jádra enzymu a jeho interakce s místem vazby substrátu [27].



Obrázek 21. Trojrozměrný model interakce homologního enzymu histondeacetylasy (HDLP) izolovaného z bakterie *Aquifex aeolicus* s trichostatinem A. TSA zapadá do katalytického místa homologního enzymu HDAC s deacetylasovou aktivitou. Popsány jsou aminokyselinové zbytky v blízkosti inhibující molekuly, včetně jejich polohy v peptidovém řetězci enzymu. Převzato z [27].

TSA specificky spouští apoptózu buněčných linií lymfoidního a kolorektálního karcinomu. Tento proces probíhá přes obnovu exprese proteinů potřebných pro aktivaci kaspas a jejich přeměnu z proenzymů na funkční, katalyticky aktivní proteasy [108].

Byla potvrzena i vysoká protinádorová aktivita TSA *in vitro* i *in vivo* k buněčným liniím prsních karcinomů. Tyto výsledky potvrzují HDAC jako cíl terapeutického zásahu při léčbě rakoviny prsu [109]. Již dlouhou dobu je při léčbě rakoviny prsu využíván tamoxifen (antiestrogenní léčivo), který působí proti vlivu estrogenu na nádorové buňky prsu. Některé nádorové buňky však vykazují ztrátu estrogenového receptoru α (ER α) a stávají se tak rezistentní vůči tamoxifenu, přestože strukturně podobný receptor ER β zůstává v těchto buňkách zachován. Aktivita ER je negativně regulována funkcí HDAC. Pomocí TSA bylo dosaženo zvýšené exprese ER β a tím byla nádorovým buňkám navrácena citlivost vůči tamoxifenu [110]. Samotný TSA zvyšuje ubikvitinaci cyklinu D1, který je regulátorem buněčného cyklu v přechodu z G₁-fáze do S-fáze a je důležitým prvkem ve vývoji nádorových buněk prsu. Ubikvitinací je cyklin D1 předurčen k degradaci v cytoplazmě. Terapie zaměřená proti cyklinu D1 je vysoce specifická pro léčbu prsních nádorových onemocnění [111]. Výsledky studií s TSA tedy potvrzují možné využití inhibitorů HDAC v oblasti léčby rakoviny prsu.

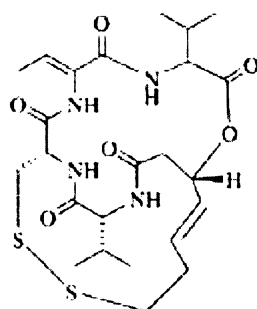
Významné změny v buněčné morfologii, diferenciaci a proliferaci byly způsobeny TSA i u nádorových ovariálních buněčných liniích. Byla pozorována snížená fosforylace Rb a následkem toho zvýšená aktivita p21. Rovněž bylo patrné snížení aktivity proteinu Id1 (z angl. „inhibitor of differentiation/DNA binding protein“), který funguje jako transkripční faktor a má důležitou roli v morfogenezi některých typů buněk (např. epitelálních) [112].

5.3. CYKLIČKÉ TETRAPEPTIDY

Cyklické peptidy s epoxidovou částí nejspíše chemicky modifikují aktivní části nukleofilů pomocí epoxy skupiny a vytvářejí vodíkové vazby. Předpokládá se, že tyto sloučeniny inhibují HDAC interakcí epoxidové skupiny se zinkovým kationtem nebo s aminokyselinovými zbytky ve vazebném centru. Vysoká labilita epoxidu v *in vivo* podmínkách činí některé z těchto sloučenin farmakologicky méně zajímavé. HDAC inhibitory, spadající do skupiny cyklických peptidů, mají prokazatelně vysokou inhibiční aktivitu k HDAC. Některé z nich, jako cyklické tetrapeptidy apicidin a depsipeptid (často nazývaný FK228 nebo FR910228), jsou přírodní produkty. Ty vyvolávají inhibici HDAC již při nanomolárních koncentracích.

5.3.1. DEPSIPEPTID

Depsipeptid byl izolován jako fermentační produkt z bakterií *Chromobacterium violaceum* [113], jeho struktura je znázorněna na obr. 22. Má prokázanou cytotoxickou aktivitu proti myším i lidským nádorovým buňkám. Ukázal se být účinným proti buňkám plicních i prsních karcinomů a melanomům [114, 115]. V klinické fázi I byl testován účinek depsipeptidu na kožní a periferní lymfomy T-buněk. Léčba u některých pacientů vyvolala částečnou nebo kompletní odpověď na podané léčivo [116].

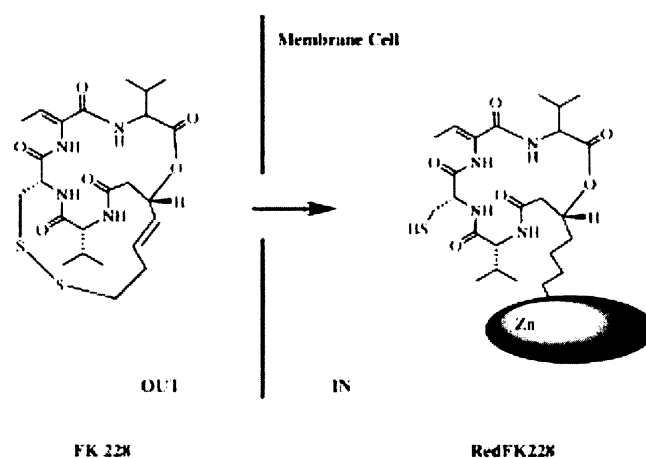


Obrázek 22. Struktura depsipeptidu. Převzato z [26].

V inhibici histondeacetylasy lidských nádorových linií je depsipeptid asi 10x účinnější než TSA, běžně užívaný při sledování inhibice HDAC [117]. K tomu aby byla vyvolána acetylace proteinu p53 pomocí TSA je obvykle nutné ozářit buňky gama [118], nebo UV zářením [119, 120] a nebo použít další inhibitor HDAC. Depsipeptid je pro svou účinnost využíván při výzkumu acetylace p53. Depsipeptid indukuje expresi p21^{WAF1/CIP} a bylo dokázáno, že tento efekt je částečně zprostředkován acetylací p53. Stejně jako například u butyrátu, indukce p21^{WAF1/CIP} probíhá i dalším mechanismem, nezávislým na p53, cestou přes transkripční faktory Sp1 a Sp3 [47].

Při pokusech s depsipeptidem bylo zjištěno, že indukuje expresi Na⁺/I⁻ symportéru (NIS) v thyroideálních nádorových buňkách. Radiojodidová léčba těchto nádorů je obvykle komplikována neschopností tumorových buněk vychytávat jód. Po třídenní léčbě thyroideálních nádorových linií depsipeptidem byla prokázána normální exprese mRNA pro proteiny NIS. Léčba indukovala akumulaci ¹²⁵I v buňkách, což dokazuje opětovnou resyntézu NIS. Tohoto efektu je dosaženo i v nízkých koncentracích depsipeptidu *in vitro*. Depsipeptid prochází klinickými testy při nichž bylo u pacientů zjištěno, že přibližně 90% cirkulující látky je vázáno na proteiny, nicméně k dosažení efektivní koncentrace v krevní plasmě lze použít i dávky dosahující až 500 ng/ml, které nevykazují žádnou vážnější toxicitu [121].

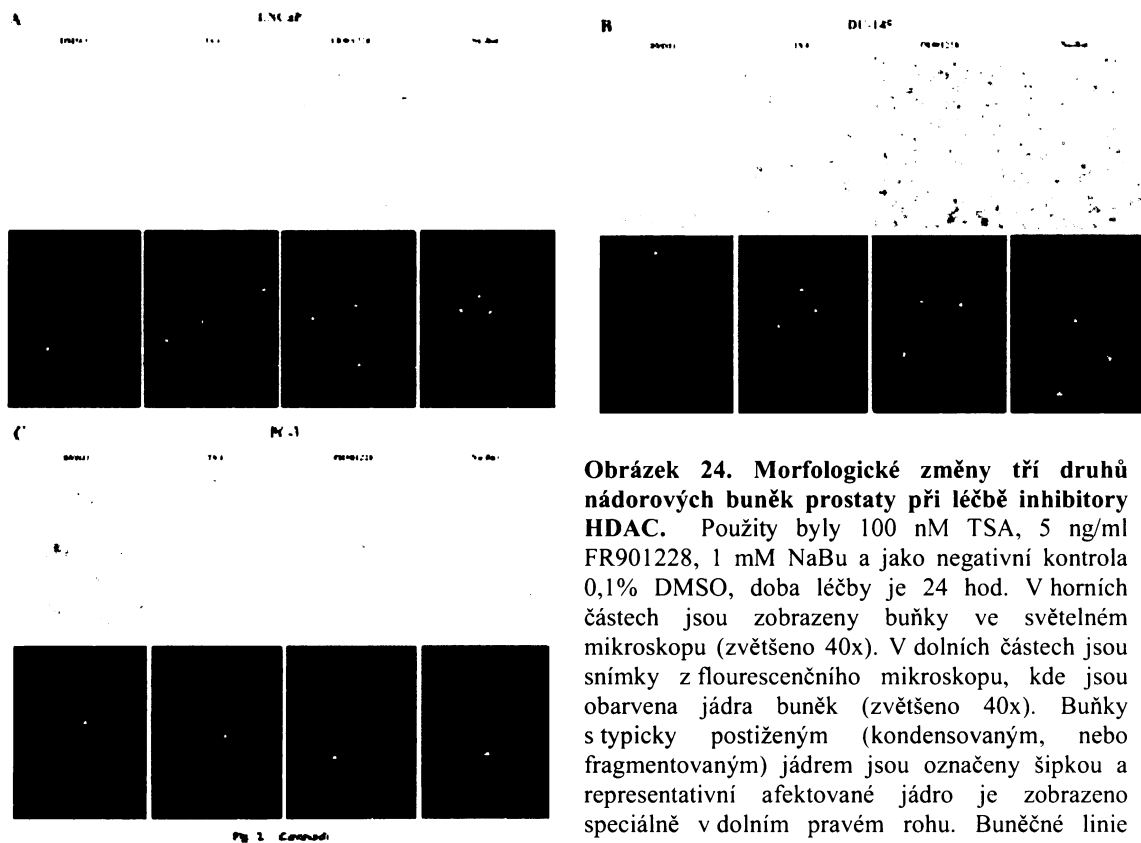
Mechanismus inhibice HDAC depsipeptidem není doposud přesně znám. Jedna z hypotéz předpokládá, že disulfidový můstek se v nitrobuněčných podmínkách redukuje a vzniká volný konec, čtyřuhlíkatý řetězec mezi jednou ze sulfhydrylových skupin a cyklickým depsipeptidovým jádrem (viz obr. 23). Tato SH skupina může reagovat cysteinovým zbytkem přítomným v katalytickém centru enzymu a vytvořit tak kovalentní disulfidovou vazbu. Kovalentní charakter této vazby byl prokázán. Hydrofobní povaha depsipeptidu usnadňuje jeho průchod buněčnou membránou [27].



Obrázek 23. Pravděpodobný mechanismus inhibice HDAC depsipeptidem (FK 228). Disulfidový můstek je v nitrobuněčném prostředí redukován (RedFK228) na aktivní formu, která interaguje se zinkovým atomem v katalytickém centru HDAC. Převzato z [26].

5.4. SPECIFITA ÚČINKU INHIBITORŮ HDAC

U rakovinných buněk prostaty byl demonstrován specifický účinek inhibitorů HDAC, konkrétně NaBu, TSA a depsipeptidu (na obr. 24 na str. 48 depsipeptid označován jako FR901228). Charakter účinku je však silně závislý na buněčném typu, i na vlastnostech použitých inhibitorů HDAC. Na obr. 24 je znázorněno jak se projevuje rozdílný účinek odlišných inhibitorů HDAC na morfologii různých nádorových linií tohoto onemocnění. Je tedy předmětem dalších výzkumů vyvinout takové sloučeniny HDAC, které budou účinkovat vůči všem těmto buněčným druhům [76].



Obrázek 24. Morfologické změny tří druhů nádorových buněk prostaty při léčbě inhibitory HDAC. Použity byly 100 nM TSA, 5 ng/ml FR901228, 1 mM NaBu a jako negativní kontrola 0,1% DMSO, doba léčby je 24 hod. V horních částech jsou zobrazeny buňky ve světelném mikroskopu (zvětšeno 40x). V dolních částech jsou snímky z fluorescenčního mikroskopu, kde jsou obarvena jádra buněk (zvětšeno 40x). Buňky s typicky postiženým (kondenzovaným, nebo fragmentovaným) jádrem jsou označeny šipkou a reprezentativní afektované jádro je zobrazeno speciálně v dolním pravém rohu. Buněčné linie rakoviny prostaty A: LNCaP, B: DU-145, C: PC-3. Převzato z [76].

6. ZÁVĚR

Nedávné studie potvrzují účast epigenetických abnormalit při patogenezi nádorového procesu. Potenciální reversibilita epigenetických dějů dává podnět k vývoji farmakologických látek ovlivňujících epigenetické procesy. Největší podíl na protinádorové aktivitě inhibitorů HDAC má jejich schopnost obnovení transkripce genů, jejichž exprese je během vývoje nádoru potlačena. Způsob, jakým inhibitory HDAC zasahují do exprese genů, je inhibice aktivity enzymů histondeacetylas. Dochází k alteraci modifikací substrátů HDAC, mezi které patří jaderné histonové proteiny i cytoplazmatické a jaderné nehistonové proteiny. Funkce některých proteinů je ovlivněna inhibicí HDAC i nepřímo, tzn. přes aktivitu jiných proteinů. Z nedávných výzkumů vyplývá, že ovlivnění epigenetických mechanismů jako jsou modifikace histonových proteinů jsou slibným cílem léčby mnoha nemocí.

Množství genů, jejichž exprese je ovlivnitelná inhibitory HDAC, je omezené. Jedná se většinou o geny hrající klíčovou roli v regulaci buněčného cyklu, buněčné diferenciaci a proliferaci, což jsou stěžejní procesy narušené během karcinogeneze. Toho lze s výhodou využít při léčbě nádorových onemocnění. Bylo identifikováno množství látek s inhibiční aktivitou k HDAC. V poslední době je těmto látkám věnována stále větší pozornost, o čemž svědčí rostoucí počet publikací pojednávajících o problematice inhibice HDAC ve spojení s protinádorovou terapií. Byla potvrzena jejich schopnost zastavit růst, navodit diferenciaci nebo apoptózu u mnoha druhů kultivovaných transformovaných a nádorových buněk *in vitro* i u xenograftů *in vivo*. Některé z inhibitorů HDAC prochází klinickým testováním, kde potvrzují protinádorovou aktivitu proti solidním tumorům i hematologickým nádorovým onemocněním.

Je třeba dále studovat molekulární mechanismy podléhající vlivu inhibitorů HDAC a regulační mechanismy jakými se tyto látky uplatňují při léčbě nádorových onemocnění. Aspektem budoucího studia by se měl stát také pleiotropní efekt inhibitorů HDAC a rozsah jejich působení v buňce na molekulární úrovni. V rámci této problematiky je potřebné také další studium aktivity, funkce a specifity různých druhů histondeacetylas. Tyto znalosti lze využít při vývoji nových inhibitorů HDAC, zaměřených jak proti histondeacetylasům různých tříd, tak třeba jen proti některým HDAC.

Další práce by se rovněž měly zaměřit na pochopení specifity účinku inhibitorů HDAC. Stále je málo poznatků o tom, proč některé transformované buňky podléhají snadněji následkům inhibice HDAC, než buňky normální. Zatím není také zcela definovaná specifita inhibitorů HDAC vůči různým subtypům rakovinných onemocnění.

V oblasti klinického výzkumu by se mělo stát předmětem dalšího studia upřesňování nejúčinnějších terapeutických strategií, minimalizace toxicity látek, doprovázené vývojem nových účinnějších inhibitorů HDAC. Pozornost by měla být zaměřena také na kombinovanou léčbu s cytotoxickými, diferenciacními a jinými druhy terapie, která skýtá v oblasti léčby nádorových onemocnění velký příslib do budoucna.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1 Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. and Pisani, P. (2005) Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **55**, 74-108
- 2 Klener, P. (2002) *Klinická onkologie*. Galén, Praha
- 3 Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky and Darnell (2004) *Molecular Cell Biology*. W.H.Freeman, New York
- 4 Druker, B. J. (2002) STI571 (Gleevec(TM)) as a paradigm for cancer therapy. *Trends Mol Med* **8**, 14-18
- 5 Mongan, N. P. and Gudas, L. J. (2005) Valproic acid, in combination with all-trans retinoic acid and 5-aza-2V-deoxycytidine, restores expression of silenced RARb2 in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* **4**, 477-486
- 6 Ferrara, F. F., Fazi, F., Bianchini, A., Padula, F., Gelmetti, V., Minucci, S., Mancini, M., Pelicci, P. G., Coco, F. L. and Nervi, C. (2001) Histone Deacetylase-targeted Treatment Restores Retinoic Acid Signaling and Differentiation in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Res* **61**, 2-7
- 7 He, L.-Z., Tolentino, T., Grayson, P., Zhong, S., Warrell, R. P., Jr., Rifkind, R. A., Marks, P. A., Richon, V. M. and Pandolfi, P. P. (2001) Histone deacetylase inhibitors induce remission in transgenic models of therapy-resistant acute promyelocytic leukemia. *J Clin Invest* **108**, 1321-1330
- 8 Nervi, C., Coco, F. L., Minucci, S., Careddu tech, A., Fiorini, R., Finolezzi, E., Noguera, N., Travaglini, L., Gelmetti, V., Diverio, D., Fenu, S., Mancini, M., Tatarelli, C., Spiriti, M. A. A., Petti, M. C., Cimino, G., Mandelli, F., Amadori, S. and Pelicci, P. G. (2004) Valproic Acid Plus Retinoic Acid Induce Myeloid Differentiation in Chemotherapy-Resistant Acute Myeloid Leukemia Patients. *ASH Annual Meeting Abstracts* **104**, 1805
- 9 Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. and Jones, P. A. (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* **429**, 457-463
- 10 Hede, K. (2006) Histone Deacetylase Inhibitors Sit at Crossroads of Diet, Aging, Cancer. *J Natl Cancer Inst* **98**, 377-379
- 11 <http://images1.clinicaltools.com> (12. 5. 2007)
- 12 Hartwell, L. H., and Kastan, M.B. (1994) Cell cycle control and cancer *Science* **266**, 1821-1828
- 13 Qiu, L., Burgess, A., Fairlie, P. D., Leonard, H., Parsons, G. P. and Gabrielli, G. B. (2000) Histone Deacetylase Inhibitors Trigger a G2 Checkpoint in Normal Cells That Is Defective in Tumor Cells. *Mol Biol Cell* **11**, 2069-2083
- 14 Sowa, Y., Orita, T., Minamikawa, S., Nakano, K., Mizuno, T., Nomura, and H., a. S., T. (1997) Histone deacetylase inhibitor activates the WAF1/Cip1 gene promoter through the Sp1 sites. *Biochem Biophys Res Commun* **241**, 142-150
- 15 Elledge, S. J. (1996) Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* **274**, 1664-1672
- 16 Topinková, E. (2002) Apoptóza - programovaná buněčná smrt a stárnutí. pp. http://www.sanquis.cz/clanek.php?id_clanek=40
- 17 Feinberg, A. P. (2001) Cancer epigenetics takes center stage. *PNAS* **98**, 392-394
- 18 Baylin, S. B., Esteller, M., Rountree, M. R., Bachman, K. E., Schuebel, K. and Herman, J. G. (2001) Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* **10**, 687-692

- 19 Digel, W. and Lubbert, M. (2005) DNA methylation disturbances as novel therapeutic target in lung cancer: Preclinical and clinical results. *Crit Rev Oncol Hematol* **55**, 1-11
- 20 Gilbert, J., Gore, S. D., Herman, J. G. and Carducci, M. A. (2004) The Clinical Application of Targeting Cancer through Histone Acetylation and Hypomethylation. *Clin Cancer Res* **10**, 4589-4596
- 21 Espino, P. S., Drobnic, B., Dunn, K. L. and R., D. J. (2005) Histone modifications as a platform for cancer therapy. *J Cell Biochem* **94**, 1088-1102
- 22 Voet, D. and Voet, J. G. (2004) *Biochemistry*. Wiley, Hoboken N.J.
- 23 www.epitron.eu (12. 5. 2007)
- 24 Mei, S., Ho, A. D. and Mahlknecht, U. (2004) Role of histone deacetylase inhibitors in the treatment of cancer (Review). *Int J Oncol* **25**, 1509-1519
- 25 Davie, J. R. (2003) Inhibition of Histone Deacetylase Activity by Butyrate. *J Nutr* **133**, 2485S-2493
- 26 Monneret, C. (2005) Histone deacetylase inhibitors. *Eur J Med Chem* **40**, 1-13
- 27 Yoshida, M., Furumai, R., Nishiyama, M., Komatsu, Y., Nishino, N. and Horinouchi, S. (2001) Histone deacetylase as a new target for cancer chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* **V48**, S20-S26
- 28 Cameron, E. E., Bachman, K. E., Myöhänen, S., Herman, J. G. and Baylin, S. B. (1999) Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* **21**, 103-107
- 29 Detich, N., Bovenzi, V. and Szyf, M. (2003) Valproate Induces Replication-independent Active DNA Demethylation. *J Biol Chem* **278**, 27586-27592
- 30 Schubeler, D., Lorincz, M. C., Cimbara, D. M., Telling, A., Feng, Y.-Q., Bouhassira, E. E. and Groudine, M. (2000) Genomic Targeting of Methylated DNA: Influence of Methylation on Transcription, Replication, Chromatin Structure, and Histone Acetylation. *Mol Cell Biol* **20**, 9103-9112
- 31 Lucarelli, M., Fusco, A., Strom, R. and Scarpa, S. (2001) The Dynamics of Myogenin Site-specific Demethylation Is Strongly Correlated with Its Expression and with Muscle Differentiation. *J Biol Chem* **276**, 7500-7506
- 32 Spencer, V. A. and Davie, J. R. (1999) Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene* **240**, 1-12
- 33 Waltzer, L. and Bienz, M. (1995) Drosophila CBP represses the transcription factor TCF to antagonize Wingless signalling. *Nature* **395**, 521-525
- 34 Marks, P. A., Richon, V. M. and Rifkind, R. A. (2000) Histone Deacetylase Inhibitors: Inducers of Differentiation or Apoptosis of Transformed Cells. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1210-1216
- 35 Glozak, M. A., Sengupta, N., Zhang, X. and Seto, E. (2005) Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* **363**, 15-23
- 36 Giles, R., Peters, D. and Breuning, M. (1998) Conjunction dysfunction: CBP/p300 in human disease. *Trends Genet* **14**, 178-183
- 37 Gayther, S., Batley, S., Linger, L., Bannister, A., Thorpe, K., Chin, S., Daigo, Y., Russell, P., Wilson, A., Sowter, H., Delhanty, J., Ponder, B., Kouzarides, T. and Caldas, C. (2000) Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers. *Nat Genet* **24**, 300-303
- 38 Rowley, J., Reshmi, S., Sobulo, O., Musvee, T., Anastasi, J., Raimondi, S., Schneider, N., Barredo, J., Cantu, E., Schlegelberger, B., Behm, F., Doggett, N., Borrow, J. and Zeleznik-Le, N. (1997) All patients with the T(11;16)(q23;p13.3)

- that involves MLL and CBP have treatment-related hematologic disorders. *Blood* **90**, 535-541
- 39 Goodman, R. and Smolik, S. (2000) CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* **14**, 1553-1577
- 40 Van Lint, C., Emiliani, S. and Verdin, E. (1996) The expression of a small fraction of cellular gene is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr* **5**, 245-254
- 41 Hoshikawa, Y., Kwon, H. J., Yoshida, M., Horinouchi, S. and Beppu, T. (1994) Trichostatin A induces morphological changes and gelsolin expression by inhibiting histone deacetylase in human carcinoma cell lines. *Exp Cell Res* **214**, 189-197
- 42 Saito, A., Yamashita, T., Mariko, Y., Nosaka, Y., Tsuchiya, K., Ando, T., Suzuki, T., Tsuruo, T. and Nakanishi, O. (1999) A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors. *PNAS* **96**, 4592-4597
- 43 Kim, M. S., Kwon, H. J., Lee, Y. M., Baek, J. H., Jang, J.-E., Lee, S.-W., Moon, E.-J., Kim, H.-S., Lee, S.-K., Chung, H. Y., Kim, C. W. and Kim, K.-W. (2001) Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat Med* **7**, 437 - 443
- 44 Hempen, B. and Brion, J. P. (1996) Reduction of acetylated alpha-tubulin immunoreactivity in neurofibrillary tangle-bearing neurons in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **55**, 964-972
- 45 Magnaghi-Jaulin, L., Groisman, R., Naguibneva, I., Robin, P., Lorain, S., le Villain, J., P. , Troalen, F., Trouche, D. and A., H.-B. (1998) Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature* **391**, 601-605
- 46 He, L. Z., Guidez, F., Tribioli, C., Peruzzi, D., Ruthardt, M., Zelent, A. and Pandolfi, P. P. (1998) Distinct interactions of PML-RARalpha and PLZF-RARalpha with co-repressors determine differential responses to RA in APL. *Nat Genet* **18**, 126-135
- 47 Zhao, Y., Lu, S., Wu, L., Chai, G., Wang, H., Chen, Y., Sun, J., Yu, Y., Zhou, W., Zheng, Q., Wu, M., Otterson, G. A. and Zhu, W.-G. (2006) Acetylation of p53 at Lysine 373/382 by the Histone Deacetylase Inhibitor Depsipeptide Induces Expression of p21Waf1/Cip1. *Mol Cell Biol* **26**, 2782-2790
- 48 Jaboin, J., Wild, J., Hamidi, H., Khanna, C., Kim, C. J., Robey, R., Bates, S. E. and Thiele, C. J. (2002) MS-27-275, an Inhibitor of Histone Deacetylase, Has Marked in Vitro and in Vivo Antitumor Activity against Pediatric Solid Tumors. *Cancer Res* **62**, 6108-6115
- 49 Coffey, D. C., Kutko, M. C., Glick, R. D., Butler, L. M., Heller, G., Rifkind, R. A., Marks, P. A., Richon, V. M. and La Quaglia, M. P. (2001) The Histone Deacetylase Inhibitor, CBHA, Inhibits Growth of Human Neuroblastoma Xenografts in Vivo, Alone and Synergistically with All-Trans Retinoic Acid. *Cancer Res* **61**, 3591-3594
- 50 Nebbioso A, C. N., Voltz E, et al (2005) Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. *Nat Med* **11**, 77-84
- 51 Bi, G. and Jiang, G. (2006) The Molecular Mechanism of HDAC Inhibitors in Anticancer Effects. *Cell Mol Immunol* **3**, 285-290
- 52 Magnaghi-Jaulin, L., Ait-Si-Ali, S. and Harel-Bellan, A. (2000) Histone acetylation and the control of the cell cycle. *Prog Cell Cycle Res* **4**, 41-47

- 53 Michaelis, M., Michaelis, U. R., Fleming, I., Suhan, T., Cinatl, J., Blaheta, R. A., Hoffmann, K., Kotchetkov, R., Busse, R., Nau, H. and Cinatl, J., Jr. (2004) Valproic Acid Inhibits Angiogenesis in Vitro and in Vivo. *Mol Pharmacol* **65**, 520-527
- 54 Camphausen, K., Burgan, W., Cerra, M., Oswald, K. A., Trepel, J. B., Lee, M.-J. and Tofilon, P. J. (2004) Enhanced Radiation-Induced Cell Killing and Prolongation of γ H2AX Foci Expression by the Histone Deacetylase Inhibitor MS-275. *Cancer Res* **64**, 316-321
- 55 Nagy, L., Kao, H.-Y., Chakravarti, D., Lin, R. J., Hassig, C. A., Ayer, D. E., Schreiber, S. L. and Evans, R. M. (1997) Nuclear Receptor Repression Mediated by a Complex Containing SMRT, mSin3A, and Histone Deacetylase. *Cell* **89**, 373-380
- 56 Esteller, M. (2002) CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* **21**, 5427-5440
- 57 Mayo, M. W., Denlinger, C. E., Broad, R. M., Yeung, F., Reilly, E. T., Shi, Y. and Jones, D. R. (2003) Ineffectiveness of Histone Deacetylase Inhibitors to Induce Apoptosis Involves the Transcriptional Activation of NF- κ B through the Akt Pathway. *J Biol Chem* **278**, 18980-18989
- 58 Acharya, M. R., Sparreboom, A., Venitz, J. and Figg, W. D. (2005) Rational Development of Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Agents: A Review. *Mol Pharmacol* **68**, 917-932
- 59 N. Tsuji, M. K., K. Nagashima, Y. Wakisaka, K.A. Koizumi, (1976) New antifungal antibiotics, Trichostatin., *J. Antibiot.* **29**, 1-6
- 60 Kelly, W. K., O'Connor, O. A. and Marks, P. A. (2002) Histone deacetylase inhibitors: from target to clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs* **11**, 1695-1713
- 61 Richon, V. M. and O'Brian, J. (2002) Histone Deacetylase Inhibitors: A New Class of Potential Therapeutic Agents for Cancer Treatment. *Clin Cancer Res* **8**, 662-664
- 62 Phiel, C. J., Zhang, F., Huang, E. Y., Guenther, M. G., Lazar, M. A. and Klein, P. S. (2001) Histone Deacetylase Is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen. *J Biol Chem* **276**, 36734-36741
- 63 Cousens, L. S., Gallwitz, D. & Alberts, B. M. (1979) Different accessibilities in chromatin to histone acetylase. *J Biol Chem* **254**, 1716-1723
- 64 Prasad, K. N. and Sinha, P. K. (1976) Effect of sodium butyrate on mammalian cells in culture: a review. *In Vitro* **12**, 125-132
- 65 Riggs, M. G., Whittaker, R. G., Neumann, J. R. & Ingram, V. M. (1977) n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells. *Nature* **268**, 462-464
- 66 Candido, E. P. M., Reeves, R. & Davie, J. R. (1978) Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell* **14**, 105-113
- 67 Sealy, L. C., R. (1978) The effect of sodium butyrate on histone modification. *Cell* **14**, 115-121
- 68 Boffa, L. C., Vidali, G., Mann, R. S. and Allfrey, V. G. (1978) Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate. *J Biol Chem* **253**, 3364-3366
- 69 Vidali, G., Boffa, L. C., Bradbury, E. M. and Allfrey, V. G. (1978) Suppression of histone deacetylation by butyrate leads to accumulation of multiacetylated forms of histones H3 and H4 and increased DNase I-sensitivity of the associated DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**, 2239-2243

- 70 McIntyre, A., Gibson, P. R. and Young, G. P. (1993) Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model. *Gut* **34**, 386-391
- 71 Barnard, J. A. and Warwick, G. (1993) Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT-29 cells. *Cell Growth Differ* **4**, 495-501
- 72 Whitehead, R. H., Young, G. P. and Bhathal, P. S. (1986) Effects of short chain fatty acids on a new human colon carcinoma cell line (LIM1215). *Gut* **27**, 1457-1463
- 73 McIntyre, A., Young, G. P., Taranto, T., Gibson, P. R. and Ward, P. (1991) Different fibers have different regional effects on luminal contents of rat colon. *Gastroenterology* **101**, 1274-1281
- 74 Yang, J., Kawai, Y., Hanson, R. W. and Arinze, I. J. (2001) Sodium butyrate induces transcription from the G alpha(i2) gene promoter through multiple Sp1 sites in the promoter and by activating the MEK-ERK signal transduction pathway. *J Biol Chem* **276**, 25742-25752
- 75 Archer, S. Y., Meng, S., Shei, A. and Hodin, R. A. (1998) p21WAF1 is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *PNAS* **95**, 6791-6796
- 76 Fronsdaal, K. and Saatcioglu, F. (2005) Histone deacetylase inhibitors differentially mediate apoptosis in prostate cancer cells. *Prostate* **62**, 299-306
- 77 Miller, A. C., Whittaker, T., Thibault, A., and Samid, D. (1997) Modulation of radiation response of human tumour cells by the differentiation inducers, phenylacetate and phenylbutyrate. *Int J Radiat Biol* **72**, 211-218
- 78 Shack, S., Miller, A., Liu, L., Prasanna, P., Thibault, A., and Samid, D., (1996) Vulnerability of multidrug-resistant tumor cells to the aromatic fatty acids phenylacetate and phenylbutyrate. *Clin Cancer Res* **2**, 865-872
- 79 Piscitelli, S. C., Thibault, A., Figg, W. D., Tompkins, A., Headlee, D., Lieberman, R., Samid, D., and Myers, C. E. (1995) Disposition of phenylbutyrate and its metabolites, phenylacetate and phenylacetylglutamine. *J Clin Pharmacol* **35**, 368-373
- 80 Boudoulas, S., Lush, R. M., McCall, N. A., Samid, D., Reed, E., and Figg, W. D. (1996) Plasma protein binding of phenylacetate and phenylbutyrate, two novel antineoplastic agents. *Ther Drug Monit* **18**, 714-720
- 81 Li, X. N., Parikh, S., Shu, Q., Jung, H. L., Chow, C. W., Perlaky, L., Leung, H. C. E., Su, J., Blaney, S. and Lau, C. C. (2004) Phenylbutyrate and Phenylacetate Induce Differentiation and Inhibit Proliferation of Human Medulloblastoma Cells. *Clin Cancer Res* **10**, 1150-1159
- 82 Liu, L., Shack, S., Stetler-Stevenson, W. G., Hudgins, W. R., and Samid, D. (1994) Differentiation of cultured human melanoma cells induced by the aromatic fatty acids phenylacetate and phenylbutyrate. *J Invest Dermatol* **103**, 335-340
- 83 Engelhard, H. H., Homer, R. J., Duncan, H. A., and Rozental, J. (1998) Inhibitory effects of phenylbutyrate on the proliferation, morphology, migration and invasiveness of malignant glioma cells. *J Neurooncol* **37**, 97-108
- 84 Gurvich, N., Tsygankova, O. M., Meinkoth, J. L. and Klein, P. S. (2004) Histone Deacetylase Is a Target of Valproic Acid-Mediated Cellular Differentiation. *Cancer Res* **64**, 1079-1086
- 85 Michaelis, M., Suhan, T., Cinatl, J., Driever, P. H. and Cinatl, J. J. (2004) Valproic acid and interferon-alfa synergistically inhibit neuroblastoma cell growth in vitro and in vivo. *Int J Oncol*, 1795-1799

- 86 Kuendgen, A., Strupp, C., Aivado, M., Bernhardt, A., Hildebrandt, B., Haas, R., Germing, U. and Gattermann, N. (2004) Treatment of myelodysplastic syndromes with valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid. *Blood* **104**, 1266-1269
- 87 Blaheta, R. A., Nau, H., Michaelis, M. and Cinatl Jr, J. (2002) Valproate and Valproate-Analogues: Potent Tools to Fight Against Cancer. *Curr Med Chem* **9**, 1417-1433
- 88 Gottlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Kramer, O. H., Schimpf, A., Giavara, S., Sleeman, J. P., Lo Coco, F., Nervi, C., Pelicci, P. G. and Heinzl, T. (2001) Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* **20**, 6969-6978
- 89 Krämer, O. H., Zhu, P., Ostendorff, H., Golebiewski, M., Tiefenbach, J., Peters, M. A., Brill, B., Groner, B., Bach, I. and Heinzl, T. (2003) The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *EMBO J* **22**, 1–10
- 90 Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X. F., and Yao, T. P. . (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* **417**, 455–458
- 91 Werling, U., Siehler, S., Litfin, M., Nau, H. and Gottlicher, M. (2001) Induction of differentiation in F9 cells and activation of peroxisome proliferator-activated receptor α by valproic acid and its teratogenic derivatives. *Mol Pharmacol* **59**, 1269-1276
- 92 Garcia-Manero, G., Kantarjian, H., Sanchez-Gonzalez, B., Faderl, S., Verstovsek, S., Ravandi, F., Rytting, M., Cortes, J., Wierda, W., Hoshino, K., Yang, H., Santos-Malave, C., Fiorentino, J., Jabbour, E., Rosner, G. and Issa, J.-P. (2004) Results of a Phase I/II Study of the Combination of 5-aza-2'-Deoxycytidine (DAC) and Valproic Acid (VPA) in Patients (pts) with Leukemia. *ASH Annual Meeting Abstracts* **104**, 263
- 93 Coyle, T. E., Bair, A.K., Stein, C., Vajpayee, N., Mehdi, S. and Wright, J. (2005) Acute leukemia associated with valproic acid treatment: a novel mechanism for leukemogenesis? *Am J Hematol* **78**, 256–260
- 94 Ogbomo, H., Michaelis, M., Kreuter, J., Doerr, H. W. and Cinatl, J. (2007) Histone deacetylase inhibitors suppress natural killer cell cytolytic activity. *FEBS Lett* **581**, 1317-1322
- 95 Loscher, W. (1999) Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action. *Prog Neurobiol* **58**, 31-59
- 96 Richon, V. M., Emiliani, S., Verdin, E., Webb, Y., Breslow, R., Rifkind, R. A. and Marks, P. A. (1998) A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *PNAS* **95**, 3003-3007
- 97 Finnin, M. S., Donigian, J. R., Cohen, A., Richon, V. M., Rifkind, R. A., Marks, P. A., Breslow, R. and Pavletich, N. P. (1999) Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* **401**, 188-193
- 98 Vrana, J., Decker, R., Johnson, C., Wang, Z., Jarvis, W., Richon, V., Ehinger, M., Fisher, P. and Grant, S. (1999) Induction of apoptosis in U937 human leukemia cells by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) proceeds through pathways that are regulated by Bcl-2/Bcl-XL, c-Jun, and p21CIP1, but independent of p53. *Oncogene* **18**, 7016 - 7025
- 99 Ruefli, A. A., Ausserlechner, M. J., Bernhard, D., Sutton, V. R., Tainton, K. M., Kofler, R., Smyth, M. J. and Johnstone, R. W. (2001) The histone deacetylase

- inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. *PNAS* **98**, 10833-10838
- 100 Eckschlager, T. osobní sdělení.
- 101 Nimmanapalli, R., Fuino, L. and Stobaugh, C. e. a. (2003) Cotreatment with the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) enhances imatinib-induced apoptosis of Bcr-Ablpositive human acute leukemia cells. *Blood* **101**, 3236-3239
- 102 Yu, C., Rahmani, M. and Almenara, J. e. a. (2003) Histone deacetylase inhibitors promote STI571-mediated apoptosis in STI571-sensitive and -resistant Bcr/Abl+ human myeloid leukemia cells. *Cancer Res* **63**, 2118-2126
- 103 Yu, C., Rahmani, M. and Conrad, D. e. a. (2003) The proteasome inhibitor bortezomib interacts synergistically with histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis in Bcr/Abl+ cells sensitive and resistant to STI571. *Blood* **102**, 3765-3774
- 104 Kim, M. S., Blake, M., Baek, J. H., Kohlhagen, G., Pommier, Y. and Carrier, F. (2003) Inhibition of Histone Deacetylase Increases Cytotoxicity to Anticancer Drugs Targeting DNA. *Cancer Res* **63**, 7291-7300
- 105 Mitsiades, N., Mitsiades, C. S., Richardson, P. G., McMullan, C., Poulaki, V., Fanourakis, G., Schlossman, R., Chauhan, D., Munshi, N. C., Hideshima, T., Richon, V. M., Marks, P. A. and Anderson, K. C. (2003) Molecular sequelae of histone deacetylase inhibition in human malignant B cells. *Blood* **101**, 4055-4062
- 106 Peart, M. J., Tainton, K. M., Ruefli, A. A., Dear, A. E., Sedelies, K. A., O'Reilly, L. A., Waterhouse, N. J., Trapani, J. A. and Johnstone, R. W. (2003) Novel Mechanisms of Apoptosis Induced by Histone Deacetylase Inhibitors. *Cancer Res* **63**, 4460-4471
- 107 Eckschlager, T. (2006) Osobní sdělení. Praha
- 108 Medina, V., Edmonds, B., Young, G. P., James, R., Appleton, S. and Zalewski, P. D. (1997) Induction of Caspase-3 Protease Activity and Apoptosis by Butyrate and Trichostatin A (Inhibitors of Histone Deacetylase): Dependence on Protein Synthesis and Synergy with a Mitochondrial/Cytochrome c-dependent Pathway. *Cancer Res* **57**, 3697-3707
- 109 Vigushin, D. M., Ali, S., Pace, P. E., Mirsaidi, N., Ito, K., Adcock, I. and Coombes, R. C. (2001) Trichostatin A Is a Histone Deacetylase Inhibitor with Potent Antitumor Activity against Breast Cancer in Vivo. *Clin Cancer Res* **7**, 971-976
- 110 Eun, R. J., Soo-Jeong, L., Eun Sook, L., Gajin, J., Tae-You, K., Yung-Jue, B. and Jong-Soo, L. (2004) The histone deacetylase inhibitor trichostatin A sensitizes estrogen receptor -alfa negative breast cancer cells to tamoxifen. *Oncogene* **23**, 1724-1736
- 111 Alao, J., Stavropoulou, A., Lam, E., Coombes, R. and Vigushin, D. (2006) Histone deacetylase inhibitor, trichostatin A induces ubiquitin-dependent cyclin D1 degradation in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cancer*. **5**, doi: 10.1186/1476-4598-1185-1188
- 112 Strait, K. A., Dabbas, B., Hammond, E. H., Warnick, C. T., Ilstrup, S. J. and Ford, C. D. (2002) Cell Cycle Blockade and Differentiation of Ovarian Cancer Cells by the Histone Deacetylase Inhibitor Trichostatin A Are Associated with Changes in p21, Rb, and Id Proteins. *Mol Cancer Ther* **1**, 1181-1190
- 113 Ueda, H., Nakajima, H., Hori, Y., Goto, T. and Okuhara, M. (1994) Action of FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium*

- violaceum no. 968, on Ha-ras transformed NIH3T3 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* **58**, 1579–1583
- 114 Ueda, H. and Hori, Y. e. a. (1994) FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum* No. 968, I: taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties, and antitumor activity. *J Antibiot* **47**, 301-310
- 115 Ueda, H., Manda, T. and Matsumoto, S. e. a. (1994) FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum* No. 968, III: antitumor activities on experimental tumors in mice. *J Antibiot* **47**, 315-323
- 116 Piekarz, R. L., Robey, R., Sandor, V., Bakke, S., Wilson, W. H., Dahmouh, L., Kingma, D. M., Turner, M. L., Altemus, R. and Bates, S. E. (2001) Inhibitor of histone deacetylation, depsipeptide (FR901228), in the treatment of peripheral and cutaneous T-cell lymphoma: a case report. *Blood* **98**, 2865-2868
- 117 Zhu, W. G., R. R. Lakshmanan, M. D. Beal, and G. A. Otterson. (2001) DNA methyltransferase inhibition enhances apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors. *Cancer Res* **61**, 1327–1333
- 118 Vaziri, H., S. K. Dessain, E. Ng Eaton, S. I. Imai, R. A. Frye, T. K. Pandita, L. Guarente, and R. A. Weinberg. (2001) hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* **107**, 149–159
- 119 Cheng, H. L., R. Mostoslavsky, S. Saito, J. P. Manis, Y. Gu, P. Patel, R. Bronson, E. Appella, F. W. Alt, and K. F. Chua. (2003) Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 10794–10799
- 120 Ito, A., Lai, C. H., Zhao, X., Saito, S., Hamilton, M. H., Appella, E. and Yao, T. P. (2001) p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *EMBO J.* **20**, 1331–1340
- 121 Kitazono, M., Robey, R., Zhan, Z., Sarlis, N. J., Skarulis, M. C., Aikou, T., Bates, S. and Fojo, T. (2001) Low Concentrations of the Histone Deacetylase Inhibitor, Depsipeptide (FR901228), Increase Expression of the Na⁺/I⁻ Symporter and Iodine Accumulation in Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma Cells. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 3430-3435

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