

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOLOGIE A TOXIKOLOGIE



Vliv statinů na Ras/Raf/ERK signální kaskádu v modelové linii A431

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Hradec Králové, 2011

Tomáš Smutný

Děkuji Doc. PharmDr. Petru Pávkovi, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce a poskytnutí odborných materiálů.

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

.....

OBSAH

ZKRATKY.....	- 5 -
1 ÚVOD.....	- 7 -
2 ZADÁNÍ PRÁCE.....	- 8 -
3 OBECNÁ ČÁST.....	- 9 -
3.1 STATINY.....	- 9 -
3.1.1 HISTORIE.....	- 9 -
3.1.2 INDIKACE.....	- 10 -
3.1.3 DÁVKOVÁNÍ.....	- 11 -
3.1.4 RIZIKA A MOŽNÉ NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY STATINŮ.....	- 11 -
3.1.5 INTERAKCE STATINŮ.....	- 12 -
3.1.6 FARMAKODYNAMICKÉ VLASTNOSTI.....	- 13 -
3.1.7 FARMAKOKINETICKÉ VLASTNOSTI.....	- 16 -
3.1.7.1 ABSORPCE.....	- 16 -
3.1.7.2 DISTRIBUCE.....	- 16 -
3.1.7.3 METABOLISMUS.....	- 17 -
3.1.7.4 ELIMINACE.....	- 17 -
3.2 RTK/RAS/RAF/MEK/ERK KASKÁDA.....	- 18 -
3.2.1 RTK.....	- 18 -
3.2.2 RAS.....	- 20 -
3.2.3 MAPK (MITOGENEM AKTIVOVANÉ PROTEINKINÁZY).....	- 21 -
3.2.4 RAF.....	- 21 -
3.2.5 MEK.....	- 21 -
3.2.6 ERK.....	- 22 -
3.3 OVLIVNĚNÍ RAS/RAF/MEK/ERK KASKÁDY.....	- 24 -
3.3.1 INHIBICE RTK.....	- 24 -
3.3.2 ZÁSAH DO POSTTRANSLAČNÍ MODIFIKACE PROTEINŮ.....	- 25 -
3.3.2.1 STATINY.....	- 27 -
3.3.2.2 INHIBITORY FT A GGT.....	- 28 -
3.3.2.3 BISFOSFONÁTY.....	- 28 -
3.3.3 DALŠÍ PŘÍSTUPY.....	- 29 -
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	- 30 -
4.1 REAGENCIE.....	- 30 -
4.2 BUNĚČNÁ LINIE A431.....	- 31 -
4.2.1 POPIS BUNĚČNÉ LINIE.....	- 31 -
4.2.2 KULTIVACE.....	- 31 -
4.3 METODA GENE REPORTER ASSAY: PATH DETECT® Elk1 TRANS-REPORTING SYSTEM.....	- 31 -
4.3.1 PRINCIP.....	- 31 -
4.3.2 PRACOVNÍ POSTUP.....	- 33 -

4.4 BICINCHONINIC ACID (BCA) ASSAY	- 34 -
4.4.1 PRINCIP	- 34 -
4.4.2 PRACOVNÍ POSTUP	- 34 -
4.5 CELL TITER 96[®] AQUEOUS ONE SOLUTION CELL PROLIFERATION ASSAY	- 35 -
4.5.1 PRINCIP	- 35 -
4.5.2 PRACOVNÍ POSTUP	- 36 -
4.6 RAS GTPase CHEMI ELISA.....	- 36 -
4.6.1 PRINCIP	- 36 -
4.6.2 PRACOVNÍ POSTUP	- 37 -
4.7 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ	- 38 -
5 VÝSLEDKY.....	- 39 -
5.1 PATH DETECT[®] EIk1 TRANS-REPORTING SYSTEM	- 39 -
5.2 CELL TITER 96[®] AQUEOUS ONE SOLUTION CELL PROLIFERATION ASSAY	- 44 -
5.3 RAS GTPase CHEMI ELISA.....	- 45 -
6 DISKUZE	- 47 -
7 ZÁVĚR.....	- 49 -
8 LITERATURA	- 50 -
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	- 53 -
ABSTRAKT	- 55 -
ABSTRACT	- 56 -

Zkratky

NADH	nikotinamiddinukleotid
NADPH	nikotinamiddinukleotidfosfát
KVO	kardiovaskulární onemocnění
CYP	cytochrom P450
INR	mezinárodní normalizovaný poměr, international normalized ratio
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A
LDL	nízkodenzitní lipoprotein, low density lipoprotein
HDL	vysokodenzitní lipoprotein, high density lipoprotein
VLDL	velmi nízkodenzitní lipoprotein, very low density lipoprotein
C _{max}	maximální koncentrace
RTK	receptor s tyrosin kinázovou aktivitou, receptor tyrosine kinase
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru, epidermal growth factor receptor
EGF	epidermální růstový faktor, epidermal growth factor
GPCR	receptor spřažený s G-proteinem, G-protein-coupled receptor
PTPs	fosfotyrosin fosfatázy, phosphotyrosine phosphatases
SH2	Src homologie 2, Src homology 2
Grb2	protein spjatý s receptorem pro růstový faktor 2, growth factor receptor bound protein 2
SOS	son of sevenless
Shc	doména obsahující Src homologii, Src homology domain-containing
GEFs	faktory vyměňující guaninový nukleotid, guanine nucleotide exchange factors
GAPs	aktivační protein GTPázy, GTPase activating protein
GTP	guanosintrifosfát
GDP	guanosindifosfát
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinázy, mitogen-activated protein kinases
MEK	MAPK/ERK kináza, MAPK/ERK kinase
RBD	doména vázající Ras, Ras-binding domain
ERK	kináza regulována extracelulárním signálem, extracellular signal-regulated kinase
PAK1	serin/threonin-proteinkináza 1, serine/threonine-protein kinase 1
DSPs	duálně specifické fosfatázy, dual specificity phosphatases
MKP	MAPK fosfatázy

PAC1	fosfatáza aktivovaných buněk, phosphatase of activated cells
SREs	sérum responsivní elementy, serum response elements
MNK	kináza interagující s MAPK, MAPK-interacting kinase
RSK	ribosomální S6 kináza, ribosomal S6 kinase
MSK	mitogenem a stresem aktivovaná proteinkináza, mitogen-and stress-activated protein kinase
FT	farnesyl transferáza
GGT	geranylgeranyl transferáza
RCE1	enzym konvertující Ras 1, Ras converting enzym 1
ICMT	isoprenylcystein karboxymetyltransferáza, isoprenylcystein carboxymethyltransferase
FTI	inhibitor farnesyl transferázy
GGTI	inhibitor geranylgeranyl transferázy
FPP	farnesyl-pyrofosfát
GST	glutathion S-transferáza

1 Úvod

Statiny jsou významná léčiva potlačující endogenní syntézu cholesterolu. Uplatňují se v široké klinické praxi v rámci terapie dyslipidemií a prevence kardiovaskulárních onemocnění. Zásahem do biosyntézy steroidních látek blokují i řadu prekurzorů, které hrají důležitou roli ve funkci buněčných signálních kaskád.

Důležitou signální kaskádu, která má klíčovou úlohu v udržení tkáňové homeostázy, představuje ERK kaskáda. Podílí se na regulaci buněčné proliferace a přežívání buněk. Její zvýšená aktivita je popisována v řadě nádorových buněčných linií.

Součástí ERK kaskády je protein Ras, enzym s GTPázovou aktivitou. Jeho funkce je podmíněna posttranslační modifikací lipidy. Navázání isoprenoidů, farnesyly či geranylgeranylu na Ras, zajistí jeho správné fungování v plazmatické membráně.

Vznik isoprenoidů jako prekurzorů cholesterolu, je negativně ovlivněn statiny, které tak zasahují do posttranslačních úprav proteinů včetně Ras. Vznik neplnohodnotného Ras vede k potlačení aktivované ERK signální kaskády. Tato skutečnost předurčuje statiny ke studiu jejich aplikace jako potenciálních cytostatik.

2 Zadání práce

Cílem této experimentální diplomové práce je studium vlivu statinů (simvastatinu, pravastatinu, lovastatinu a atorvastatinu) na signální kaskádu Ras/Raf/MEK/ERK v buněčné linii A431. Efekt statinů by mohl mít příznivý cytostatický efekt u nádorů s aktivovanou kaskádou Ras/Raf/MEK/ERK.

V této práci chceme s využitím molekulárně biologických metod na buněčné linii A431 prozkoumat mechanismus vlivu statinů na buněčnou kaskádu Ras/Raf/MEK/ERK. Pro tento účel využijeme Ras GTPase Chemi ELISA Kit od firmy Aktive Motif a PathDetect[®] Elk1 trans-Reporting System od firmy Agilent Technologies.

Dále chceme pozorovat vliv statinů na buněčnou aktivitu, a to prostřednictvím CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) od firmy Promega.

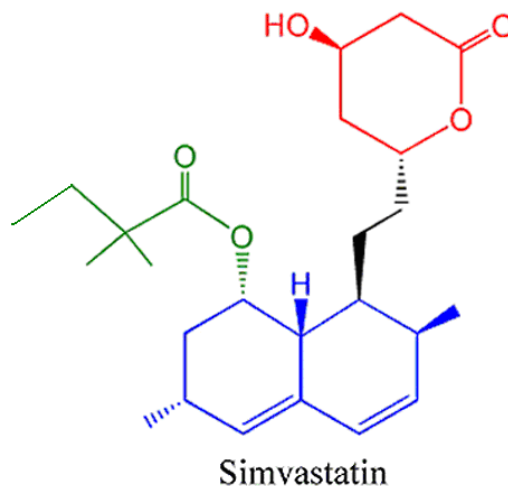
3 Obecná část

3.1 Statiny

Následující přehled popisuje význam statinů, léčiv zasahujících nejen do metabolismu lipidů. V úvodu uvádíme charakteristiku statinů, které jsme využili v experimentální části naší práce. Výčet zahrnuje simvastatin, pravastatin, lovastatin a atorvastatin. Obecné informace lze přenést na celou skupinu statinů. Odlišné vlastnosti jednotlivých zástupců jsou vymezeny v textu.

3.1.1 Historie

Prototypem inhibitorů 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A (HMG-CoA) reductázy byl mevastatin izolovaný v roce 1976 z extraktů *Penicillium citrinum* a *Penicillium brevicompactum*. Kvůli své toxicitě se ale nedostal do klinické praxe. Prvním klinicky použitelným statinem se stal lovastatin (syn. mevinolin, 1987). Je to methylovaný analog mevastatinu izolovaný z hub *Aspergillus terreus* a *Monascus ruber*. Sodná sůl fluvastatinu byla zavedena do terapie v roce 1994. V roce 1997 přišly do praxe vápenatá sůl atorvastatinu a sodná sůl cerivastatinu (Hartl a kol., 2006). O molekulární struktuře statinů podává informaci obr. 1.



Obr. 1. Chemická struktura statinů

Chemický vzorec simvastatinu představuje základní konstitutivní části molekuly statinů. Strukturální charakteristikou je částečně hydrogenované naftalenové jádro (modře), které je obvykle součástí molekuly. Jádro se poutá k hydrofóbní části HMG-CoA reductázy. Esterovou vazbou je k základnímu skeletu připojen modifikovaný 2-methylbutanoylový zbytek (zeleně) a skrze dvouuhlíkatou spojku (černě) útvar podobný mevalonové kyselině (červeně), která kompetitivně inhibuje HMG-CoA reductázu. Lovastatin a simvastatin (syntetický analog lovastatinu, nese 2,2-dimethylbutanoylový řetězec místo 2-methylbutanoylového) jsou proléčiva (viz níže). Jejich lakton se hydrolyzuje na celek odpovídající 3,5-dihydroxyvalerové kyselině. Pravastatin má otevřený lakton a podává se ve formě soli (od lovastatinu se liší záměnou methylové skupiny za hydroxy skupinu vázané k jádru). V případě atorvastatinu je naftalenové jádro nahrazeno substituovaným pyrrolem. Postraní 2-methylbutanoylový řetězec je zaměněn za 4-fluorfenyl. Je podáván podobně jako pravastatin ve formě soli (viz níže) (Jiří Hartl a kol., 2006).

3.1.2 Indikace

Statiny jsou indikovány v léčbě primární hypercholesterolemie, homozygotní familiární hypercholesterolemie a kombinované dyslipidémie. Uplatňují se také jako léčiva, užívaná v primární prevenci kardiovaskulárních onemocnění (KVO) u pacientů s aterosklerózou nebo diabetes mellitus, kteří mají normální nebo zvýšené hladiny cholesterolu a v rámci sekundární prevence u manifestované ischemické choroby srdeční. Medikace statiny vede prokazatelně ke snížení mortality a morbidit na KVO (pozn. vliv lovastatinu na snížení mortality nebyl zatím stanoven) (*Souhrny údajů o přípravcích, 2011*).

3.1.3 Dávkování

Simvastatin se užívá v síle od 5 do 80 mg denně, podaný v jednorázové perorální dávce večer. Maximální dávka se volí pouze u pacientů se závažnou hypercholesterolémií a s vysokým rizikem KVO. U hypercholesterolémie se obvykle bere 10 až 20 mg simvastatinu denně a u prevence KVO 20 až 40 mg denně. Simvastatin se stejně tak jako další statiny používá v monoterapii nebo v kombinované terapii spolu se sekvestranty žlučových kyselin. Podmínkou léčby statiny je dodržování nefarmakologických opatření (dieta, fyzická aktivita aj.). V případě těžké renální insuficience vyžaduje užívání statinů (kromě atorvastatinu) zvýšenou opatrnost, což obvykle obnáší limitaci dávky.

Pravastatin se podává perorálně jednou denně a nejlépe večer. Obvykle se užívá 10-40 mg pravastatinu u hypercholesterolémie a 40 mg u prevence KVO.

Obvyklá startovací dávka lovastatinu je 20 mg. Maximální denní dávka může být upravena až na 80 mg. Lovastatin se užívá perorálně obvykle během večere (viz farmakokinetika). Podání statinů na noc dosahuje lepších výsledků než jejich užívání ráno (neplatí u atorvastatinu, který má dlouhý biologický poločas). Vysvětlením je skutečnost, že syntéza cholesterolu probíhá hlavně večer.

Terapii atorvastatinem zahájíme dávkou 10 mg. Podávaná denní dávka atorvastatinu může být zvýšena až na 80 mg (*Souhrny údajů o přípravcích, 2011*).

3.1.4 Rizika a možné nežádoucí účinky statinů

Statiny mohou způsobit myopatii, která se projevuje jako svalová bolest nebo slabost spolu se zvýšením hladiny kreatinkinázy desetinásobně nad horní hranici standardu. Vzácně může přecházet do rhabdomyolýzy, masivní svalové destrukce kosterního svalstva (hladina kreatinkinázy přesahuje i 30-40 krát limitní mez), s akutním selháním ledvin, které je důsledkem myoglobinurie. Nicméně selhání ledvin nemusí vždy nastat. V několika případech vedl tento vzácný stav k úmrtí pacienta. Riziko myopatie se zvyšuje s nárůstem hladin statinů v plasmě. V případě podezření na myopatii je nezbytné přerušit léčbu. Svalové symptomy, jsou-li spojeny s terapií statiny, se obvykle po vysazení léčiva vytráčí.

Statiny mohou negativně ovlivnit i funkci jater. Během terapie se doporučuje provádět funkční jaterní testy. Pokud dojde ke zvýšení hladin sérových transamináz (alaninaminotransferáz, aspartátaminotransferáz) na více než trojnásobek normy a zvýšené parametry přetrvávají, je doporučeno statiny vysadit. Ukončení užívání statinů obvykle vede k pozvolnému poklesu hladin transamináz na úroveň před jejich podáváním. Z uvedených

důvodů se statiny nesmí užívat u aktivního onemocnění jater nebo nevysvětleného přetrvávajícího zvýšení sérových transamináz (*Souhrny údajů o přípravcích, 2011*).

Nicméně jsou statiny obvykle dobře snášeny. Vzácně se objevují gastrointestinální poruchy jako zácpa, průjem, nauzea, zvracení a abdominální bolesti. Byla popsána nespavost, únava, anémie, exantém, alopecie, poruchy nervového systému, hepatitida a poruchy zraku jako důsledek podávání statinů. U lovastatinu je podezření, že způsobuje zákal čočky. Přestože neexistuje jednoznačný důkaz, doporučuje se provádět pravidelná oftalmologická vyšetření.

Není známa rizikovost statinů pro těhotné ženy. Žádné kontrolované klinické studie, které by řešily otázku bezpečnosti statinů v těhotenství nebyly provedeny. Po dobu těhotenství je nezbytné přerušit podávání statinů. Ateroskleróza je chronický proces, a proto se předpokládá, že pouhé přerušení léčby statiny během těhotenství významně neovlivní dlouhodobá rizika spojená s hypercholesterolémií (*Souhrny údajů o přípravcích, 2011, Špinarová a Vítovec, 2005*).

3.1.5 Interakce statinů

Riziko myopatie, včetně rhabdomyolýzy je zvýšeno při současném užívání fibrátů a niacinu (v dávce ≥ 1 g denně) se statiny. Možným vysvětlením interakce s genfibrozilem (představitelem fibrátů) je zablokování glukuronidace fibrátem a tím i biotransformace statinů.

Důležitou roli v interakcích statinů hrají silné inhibitory CYP3A4, antimykotika azolového typu (itakonazol, ketokonazol), makrolidová antibiotika (klaritromycin, erythromycin, telitromycin), inhibitory HIV proteázy a nefazodon (antidepresivum), které zvyšují jejich plazmatické hladiny. Silné inhibitory jsou proto při současném užívání některých statinů (simvastatinu, lovastatinu) kontraindikovány. Pokud neexistuje jiná možnost léčby, lze na dobu užívání itakonazolu, ketokonazolu, erytromycinu, klaritromycinu nebo telitromycinu užívání statinů pozastavit. Podobně účinkuje i grapefruitová šťáva, jejíž konzumace je v průběhu terapie statiny kontraindikována (nebo není doporučována). Riziko svalového poškození roste i s podáváním danazolu (syntetického steroidu) a amiodaronu. V případě slabších inhibitorů CYP3A4, cyklosporinu, verapamilu a diltiazemu, je nezbytná zvýšená opatrnost (obvykle nepřekračovat příslušnou dávku statinu). Na druhé straně u některých statinů (pravastatinu) nebylo pozorováno ovlivnění hladin léčiva v klinicky signifikantní míře systémem CYP P450. Léky zasahující do systému CYP mohou být

s pravastatinem s opatrností užívány. V případě atorvastatinu není podávání inhibitorů CYP vysloveně kontraindikováno (*Souhrny údajů o přípravcích, 2011*, Špinarová a Vítovec, 2005).

Souběžné podávání statinů s induktory cytochromu P450 3A4 (např. efavirenzem, rifampicinem, třezalkou tečkovanou) může vést ke snížení plazmatických koncentrací statinů.

Ukazuje se, že simvastatin a lovastatin mírně zvyšují účinky perorálních kumarinových antikoagulancií. Vyskytly se velmi vzácné případy zvýšení mezinárodního normalizovaného poměru (INR), proto je žádoucí měřit protrombinový čas na začátku léčby zmíněnými statiny a v jejím průběhu. Naopak dlouhodobé podávání pravastatinu a warfarinu nevyvolalo změny antikoagulačního účinku.

Pryskyřice (cholestyramin, kolestipol) mohou snižovat biodostupnost statinů. Této interakci lze zabránit odstupňovaným podáním statinů (alespoň 1 hodinu před podáním pryskyřice).

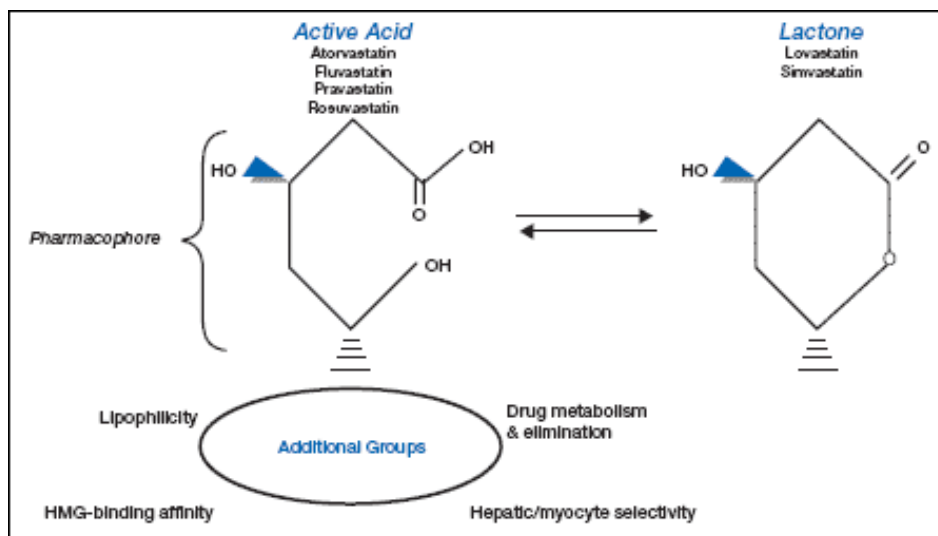
Inhibitory P-glykoproteinu (cyklosporin) obvykle zvyšují dostupnost statinů, které mohou být substrátem P-glykoproteinu (*Souhrny údajů o přípravcích, 2011*, Špinarová a Vítovec, 2005).

3.1.6 Farmakodynamické vlastnosti

Simvastatin je aktivován především v játrech hydrolýzou inaktivního laktonu za vzniku β -hydroxykyseliny (obr. 2.). V plasmě probíhá hydrolýza simvastatinu jen velmi pomalu. Vzniklý metabolit simvastatinu silně inhibuje HMG-CoA reduktázu, klíčový rychlost určující enzym v biosyntéze cholesterolu a dalších steroidů. HMG-CoA reduktáza katalyzuje přeměnu HMG-CoA na mevalonát (obr. 3. a 4.).

Pravastatin a atorvastatin jsou, podobně jako simvastatin, kompetitivní, reverzibilní a specifické inhibitory HMG-CoA reduktázy. Tyto statiny jsou nicméně podávány již v aktivní formě.

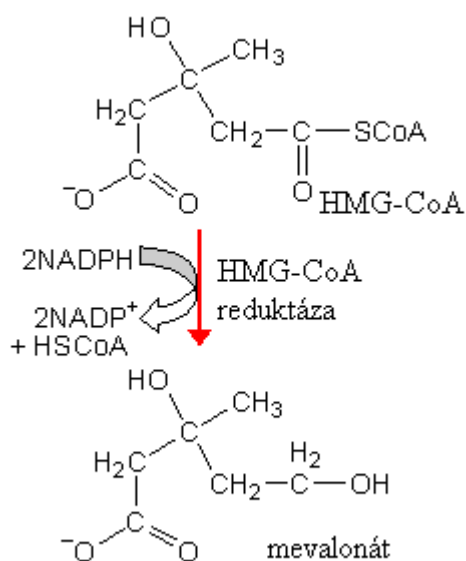
Lovastatin je proléčivo a jeho aktivace otevřením laktonu na β -hydroxykyselinu je obdobné jako u simvastatinu (*Souhrny údajů o přípravcích, 2011*, Špinarová a Vítovec, 2005).



Obr. 2. Farmakofofor statinů

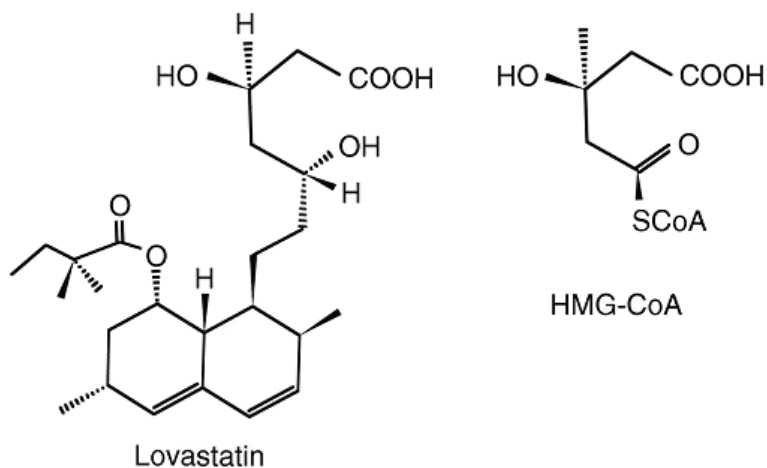
Následující schéma představuje farmakologicky aktivní místo molekuly (farmakofofor) statinů. Proléčiva (simvastatin, lovastatin) se metabolizují hydrolyzou laktonového kruhu na aktivní metabolit β -hydroxykyselinu, která kompetitivně inhibuje HMG-CoA reduktázu. Pravastatin a atorvastatin jsou podány již v aktivní formě. Pro úplnost jsou uvedeni další zástupci statinů fluvastatin a rosuvastatin.

Výsledným efektem zablokování HMG-CoA reduktázy je negativní ovlivnění syntézy intracelulárního cholesterolu. To způsobí zmnóžení LDL receptorů na povrchu hepatocytů („lační po cholesterolu“), které vyústí ve zvýšení clearance cirkulujícího LDL. Statiny tedy snižují normální, ale i zvýšené hladiny LDL cholesterolu. Základní dávka statinů snižuje LDL cholesterol asi o 27 % a její zdvojnásobení vždy o dalších přibližně 7 %. Podstatou klinického účinku statinů je také snížení hladiny VLDL cholesterolu (prekurzoru LDL), plazmatické hladiny triglyceridů, celkového cholesterolu, mírné zvýšení hladin HDL cholesterolu a apolipoproteinu A. Dochází rovněž k významnému poklesu hladiny apolipoproteinu B. V terapeutických dávkách není HMG-CoA reduktáza plně blokována. Tím je zajištěna přítomnost pro organismus nezbytného mevalonátu (*Souhrny údajů o přípravcích, 2011, Špinarová a Vítovec, 2005*).



Obr. 3. Přeměna 3-hydroxy-3-metylglutaryl-CoA na mevalonát

Reakce je katalyzována HMG-CoA reduktázou, která je místem zásahu statinů.



Obr. 4. Srovnání HMG-CoA s farmakoforem lovastatinu

Z obrázku je možné porovnat molekulu HMG-CoA s aktivním farmakoforem lovastatinu, který soutěží o aktivní místo HMG-CoA reduktázy.

Statiny mají i nelipidové účinky. Uvádí se, že snižují riziko trombogeneze útlumem inhibitoru aktivátoru plasminogenu typu I, tomboxanu B₂ a trombomodulinu. Dále zlepšují funkci cévního endotelu zásahem do syntézy oxidu dusnatého (statiny zvyšují jeho syntézu). Stabilizují aterosklerotický plát potlačením zánětlivé a imunitní reakce v cévní stěně (spolupůsobí i snížení LDL cholesterolu) (Špinarová a Vítovec, 2005).

3.1.7 Farmakokinetické vlastnosti

3.1.7.1 Absorpce

Simvastatin se dobře vstřebává a má vysoký first-pass efekt. Současné požití potravy neovlivňuje vstřebání simvastatinu. Biologická dostupnost aktivní formy (β -hydroxykyseliny) v systémovém oběhu je po perorálním podání simvastatinu nižší než 5 % podané dávky. Maximální koncentrace (C_{\max}) aktivních inhibitorů je dosaženo přibližně za 1 až 2 hodiny po požití.

Pravastatin se užívá perorálně v aktivní formě (v tabletě ve formě soli pravastatinum natrium). First-pass efektu v játrech podléhá 66% pravastatinu. Hodnoty C_{\max} je dosaženo za 1 až 2 hodiny po podání. Průměrně se po perorálním podání absorbuje 34% dávky. Pravastatin proniká především do hepatocytů a pro ostatní buňky je jeho dostupnost nižší. Potrava, přestože snižuje dostupnost pravastatinu, neovlivňuje vlastní snížení cholesterolu. Lze ho tedy podávat s jídlem i nalačno.

Lovastatin podléhá podobně jako ostatní statiny rozsáhlému efektu prvního průchodu játry. Méně než 5 % užití dávky lovastatinu dosáhne systémové cirkulace. Maximálních koncentrací v plazmě je dosaženo v průběhu 2 až 4 hodin. Na rozdíl od ostatních statinů, je absorpce lovastatinu zvýšena potravou, a proto se užívá v průběhu večere.

Atorvastatin se velmi dobře absorbuje po perorálním podání (v tabletě ve formě soli atorvastatinum calcicum trihydricum). Podání není závislé na příjmu potravy či denní době. C_{\max} je dosaženo za 1-2 hodiny. Poněkud nízká absolutní biodostupnost (12 %) je připisována presystémové eliminaci (na sliznici GIT a/nebo efektem prvního průchodu játry) (*Souhrny údajů o přípravcích, 2011*).

3.1.7.2 Distribuce

Simvastatin, lovastatin a jejich aktivní metabolity se extenzivně vážou na plazmatické proteiny (více než 95 %). Vazba atorvastatinu na plazmatické bílkoviny je také významná

(více jak 98 %). Pravastatin se na bílkoviny v krevní plazmě váže pouze z 55 % (*Souhrny údajů o přípravcích, 2011*).

3.1.7.3 *Metabolismus*

Simvastatin je substrátem cytochromu P450 CYP3A4, ale není jeho inhibitorem. Hlavními metabolity simvastatinu v lidské plasmě jsou β -hydroxykyselina a čtyři další aktivní metabolity.

Pravastatin se metabolizuje na 3- α -hydroxy isomerický metabolit, který má ve srovnání s aktivní formou desetinásobně až čtyřicetinásobně nižší inhibiční schopnost vůči HMG-CoA reduktáze. Na rozdíl od simvastatinu není pravastatin systémem CYP významně metabolizován a téměř neovlivňuje P-glykoprotein.

Lovastatin je hydrolyzován v játrech na aktivní β -hydroxykyselinu. Byly identifikovány další tři lakton-hydroxykyselinové metabolitové páry, které inhibují HMG-CoA. Lovastatin je metabolizován enzymem CYP3A4.

Atorvastatin je prostřednictvím CYP3A4 metabolizován na orto- a parahydroxylové deriváty a různé beta-oxidační produkty. V *in vitro* modelech, studujících účinnost orto- a parahydroxylových derivátů inhibovat HMG-CoA reduktázu, se ukázalo, že jsou tyto metabolity v efektu rovnocenné k aktivnímu atorvastatinu. Důležitou roli v metabolismu atorvastatinu hraje také mechanismus glukuronidace (*Souhrny údajů o přípravcích, 2011*).

3.1.7.4 *Eliminace*

Pravastatin se vylučují močí (až 20 % *p.o.* podaného pravastatinu) a stolicí. Simvastatin, lovastatin a atorvastatin jsou vylučovány především žlučí (stolicí). Vzhledem k inhibiční aktivitě aktivních metabolitů dosahuje atorvastatin oproti ostatním statinům (okolo 1,5-3 hodin) dlouhého biologického poločasu v plazmě (14 hodin). Poločas inhibiční aktivity je pak okolo 20-30 hodin (*Souhrny údajů o přípravcích, 2011*).

3.2 RTK/Ras/Raf/MEK/ERK kaskáda

Tato kaskáda hraje klíčovou roli v buněčné proliferaci a udržuje tkáňovou homeostázu. Významně se podílí na potlačení apoptózy a podporuje přežívání buněk. Důležitost ERK kaskády v buněčné proliferaci a přežívání buněk se odráží v tumorigenese. Zvýšená aktivita ERK signální kaskády byla zaznamenána v desítkách nádorových buněčných linií. Podkladem patogeneze je mutace ERK signálních komponent (Min a kol., 2011).

3.2.1 RTK

RTK rodina zahrnuje skupinu membránově vázaných receptorů s vnitřní tyrosin kinázovou aktivitou, které katalyzují přenos fosfátu z ATP na hydroxylové skupiny tyrosinů cílových proteinů. Téměř všechny RTK jsou monomerní receptory vázané v plazmatické membráně, které po vazbě ligandu dimenzují a autofosforylují tyrosin. RTK zprostředkovávají fyziologické funkce buňky, jako je proliferace, diferenciace, přežití a migrace (*The ERK Signal Transduction Pathway, 2011, Zwick a kol., 1999*).

Na podkladě struktury jsou RTK členěny do dvaceti podrodin, které sdílí homogenní úseky. EGFR podrodina se skládá ze čtyř příbuzných receptorů: EGFR (erbB1), HER2 (erbB2/neu), HER3 (erbB3) a HER4 (erbB4).

Receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR) spouští buněčnou kaskádu nejen po obsazení epidermálním růstovým faktorem (EGF), ale také po obsazení GPCR (receptoru spřažených s G-proteinem) ligandy nebo cytokiny. Na druhé straně EGFR může být aktivován i v nepřítomnosti vlastního ligandu. Příkladem takové stimulu EGFR je hyperosmotický šok buňky. Pro úplnost lze uvést i účinky UV, γ -záření, oxidantů (peroxid vodíku), iontů těžkých kovů, které také spouští tento receptor. Možným vysvětlením mechanismu nespecifických signálů může být interference s činností fosfotyrosin fosfatáz (PTPs). Protože aktivita RTK musí být antagonizována PTPázami, vede eliminace této negativní kontroly k uvolnění signalizace. ERK kaskáda může být aktivována i GPCR, které zahrnují velkou skupinu receptorů na buněčném povrchu. Řada stimulů např. světlo, neurotransmitery a hormony indukují změny konformace GPCR, které vyústí v aktivaci G proteinů a efektorů (kináz). Tato zjištění vedla k přehodnocení názoru, že ERK signální cesta je specifická pouze pro RTKázy.

RTKázy se skládají z extracelulární glykosylované domény, která váže ligand. Spojení extracelulární domény s cytoplazmatickou doménou zajišťuje transmembránový „single helix“. Cytoplazmatická doména zahrnuje proteinové tyrosin kinázové jádro a regulační

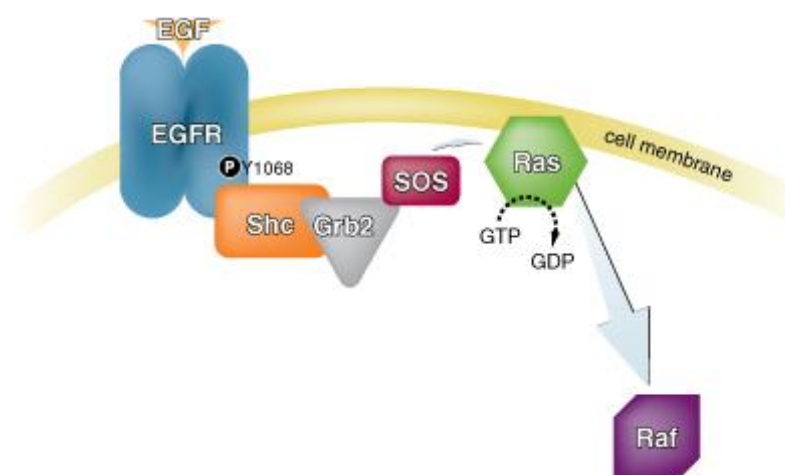
oblasti, které jsou místem autofosforylace a fosforylace dalších kináz (*The ERK Signal Transduction Pathway, 2011*).

EGFR obsahuje v cytoplazmatické doméně přinejmenším devět tyrosinových zbytků schopných fosforylace. Sedm z nich jsou autofosforylační místa, která zajišťují rozeznání a uskupení signálního komplexu. Tvoří vazebná místa pro Src homology 2 (SH2) a fosfotyrosinové vazebné domény různých signálních proteinů.

Jedním z nich je protein spjatý s receptorem pro růstový faktor 2 (Grb2), cytosolický adaptor, který obsahuje centrální SH2 doménu lemovanou dvěma SH3 doménami. SH3 domény mu umožňují spojení s oblastmi bohatými na prolin faktoru son of sevenless (SOS).

Fosforylovaný tyrosin aktivovaného EGFR je vazebným místem pro SH2 doménu Grb2 buď přímo nebo skrze asistenci dalšího SH2 adaptoru Shc. Přenos Grb2 spolu se SOS z cytoplazmy do plazmatické membrány na EGFR umožní, že se SOS dostává k membránově vázané kináze Ras. SOS zesiluje uvolnění GDP a záměnu za GTP na Ras. Záměna GDP za GTP vede k aktivaci enzymu Ras (obr. 5.) (*The ERK Signal Transduction Pathway, 2011*).

Zvýšená exprese EGFR v nádorech má negativní prognostický význam. Gen pro EGFR je protoonkogen lokalizovaný na dlouhém raménku chromozomu 7, lokusu 22 (7q22). Jeho aktivace může být zapříčiněna genovou amplifikací, mutací nebo nadprodukcí růstových faktorů (Adam a kol., 2005).



Obr. 5. Úsek ERK kaskády od EGFR k Raf

Schéma popisuje situaci na plazmatické membráně, ve které je zakotven RTK, EGFR. Aktivace receptoru je zahájena navázáním ligandu EGF k EGFR a umožní vazbu cytosolického adaptoru Grb2 na samotný receptor. Grb2 je poután k faktoru SOS. Ukotvení Grb2/SOS k receptoru je možné přímo nebo prostřednictvím dalšího adaptoru Shc. SOS se tak dostává z cytoplazmy k membránově vázanému Ras, který pomáhá aktivovat.

3.2.2 Ras

Ras je enzym, který váže a hydrolyzuje GTP. Je-li nukleotidové vazebné místo proteinu Ras obsazeno GDP, je Ras v neaktivní formě. Přepnutí Ras do aktivního stavu zajišťují proteiny s regulační funkcí, které se označují jako faktory vyměňující guaninový nukleotid (GEFs) umožňující uvolnění GDP z Ras. Obsazení prázdného nukleotid vazebného místa GTP aktivuje enzym. GTP je oproti GDP v buňce v nadbytku. Tato skutečnost vysvětluje, proč se do neobsazeného místa enzymu dostává právě GTP. GTPáza se inaktivuje vnitřní aktivitou, která hydrolyzuje GTP na GDP. Celou reakci urychlují aktivační proteiny GTPázy (GAPs) (*Ras GTPase Chemi ELISA Kit, 2011*).

Nadrodina Ras je skupinou GTPáz s nízkou molekulovou hmotností, která zahrnuje zástupce proteinů Rho (př. RhoA, Rac1 a Cdc42) a Ras. Tyto proteiny hrají roli molekulárních přepínačů. Ras reguluje řadu buněčných funkcí, které zahrnují buněčnou proliferaci a diferenciaci. K členům Ras patří Ras (H, K, N, R, M a TC21), Rap (1A, 1B, 2A a 2B) a Ral (A a B).

Ras proteiny jsou tvořeny přibližně 190 aminokyselinami a jsou strukturně velmi konzervativní. Hlavní rozdíly mezi proteiny jsou v hypervariabilní doméně, která se nalézá poblíž C-konce a předurčuje proteiny k rozdílným biologickým úlohám (*Ras GTPase Chemi ELISA Kit, 2011, Walker a Olson, 2005*).

Jsou popsány mutace proteinů Ras, které trvale aktivují tyto enzymy (zvyšují intenzitu a/nebo trvání signálu) a následně i sestupné členy kaskády. Mutace přispívají k iniciaci a k rozvoji nádorů narušením normální regulace intracelulární signální kaskády. Kontinuálně vysílaný signál z Ras vede ke stimulaci buněčné proliferace. Mutace jsou omezeny na úzký počet míst v molekule Ras a narušují GAP-indukovanou hydrolyzu GTP, čímž zabraňují inaktivaci Ras. Hyperaktivita Ras může být i důsledkem zvýšené exprese RTK nebo jeho aktivační mutace. Pro Rho nejsou známy aktivační mutace, ale očekává se, že jeho zvýšená exprese vyústí v zesílení signálu kaskády. Mutace v Ras genu jsou přítomny v asi 30 % lidských nádorů. Jsou popsány v K-ras genu u nádorů tračníku a pankreatu, v H-ras genu rakoviny močových cest a měchýře a N-ras mutace je spojována s leukémií (*Ras GTPase Chemi ELISA Kit, 2011, Walker a Olson, 2005*).

Aktivovaný Ras přenáší signál na další efektory jako je Raf-1. Fosforylovaný Raf-1 je zahrnut v dalším úseku kaskády v MAPKách. Aktivita Ras má přirozeně jen přechodný ráz, neboť se po určité době hydrolyzuje GTP na GDP a enzym se dostává do inaktivního stavu. Tím se vypíná aktivita celé signální cesty (*Ras GTPase Chemi ELISA Kit, 2011, Walker a Olson, 2005*).

3.2.3 MAPK (mitogenem aktivované proteinkinázy)

Dalším stupněm kaskády jsou MAPK kinázy (obr. 6.). Signální řetězec je v této části třístupňový. Je složen z apikální MAPK kinázy kinázy (MAP3K, Raf), MAPK kinázy (MEK/MKK) a MAPK.

Jejich funkcí je přenášet signály řady buněčných působků (cytokinů, růstových faktorů aj.) z povrchu buňky do intracelulárních odpovědí (genové exprese, migrace, buněčné proliferace aj.). Hrají také roli v embryonálním vývoji a zánětlivé odpovědi (*The ERK Signal Transduction Pathway, 2011*, Min a kol., 2011).

3.2.4 Raf

Raf je Ser/Thr protein kináza, která katalyzuje fosforylaci hydroxylových skupin Ser a Thr zbytků proteinů.

Savci disponují třemi typy Raf proteinů. Ty mají velikost v intervalu od 70 do 100 kDa. Nejlépe prostudovaný je Raf-1, který se patrně účastní tvorby tkání, méně pak A-Raf a B-Raf.

Raf má na N-konci dvě oblasti, doménu vázající Ras (RBD) a doménu bohatou na cystein, kterými se váže k Ras. Ukazuje se, že odlišné izoformy Ras aktivují Raf různou mírou, např. K-Ras váže Raf-1 do plazmatické membrány účinněji a více aktivuje navázaný Raf-1 než H-Ras.

Raf-1 má čtyři aktivační místa: Ser338, Tyr341, Thr491 a Ser494, na které se vážou fosfáty. Mutace těchto míst vede ke kontinuální aktivitě nezávislé na Ras. Na druhé straně může fosforylace Raf vést také k inhibici. Fosforylace Ser259 na Raf-1 pomocí Akt vede právě ke vzniku inhibičního konformačního stavu. Fosfatázy PP1 a PP2A zaměřené na Ser259 naopak přispívají k aktivaci Raf-1 (*The ERK Signal Transduction Pathway, 2011*).

3.2.5 MEK

Fosforylovaný Raf aktivuje MAPK/ERK kinázu 1 (MEK1) a MEK2. Někdy jsou označovány jako MKK1 a MKK2. Na rozdíl od některých výše uvedených kináz (Ras nebo Raf) nebyl doposud popsán onkoprotein odvozený od MEKáz.

MEK-1 a MEK-2 mají okolo 45 kDa a sdílí z 80 % podobnou sekvenci. Není známo, proč existují dva typy MEK, nicméně MEKázy jsou v savčích buňkách všudypřítomné. Aktivace MEK1 a MEK2 je zprostředkována skrze Raf fosforylací Ser na pozicích 217 a 221.

Odlíšné Raf isoformy odlíšné aktivují jednotlivé MEKázy. A-Raf je slabý aktivátor, B-Raf preferenčně aktivuje MEK-1 a Raf-1 účinně aktivuje obě MEKázy.

Ve srovnání s Raf je MEK ve vysoké koncentraci, což zajišťuje amplifikaci signálu. Na MEK se nachází další dvě regulační místa, která ovlivňují pozitivně/negativně jeho aktivitu. První místo, na Ser298, které je fosforylováno pomocí PAK1, pomáhá k aktivaci MEK1 vlivem Raf-1. Naopak fosforylace neznámou kinázou na Ser212 snižuje aktivitu MEK1 (*The ERK Signal Transduction Pathway, 2011*).

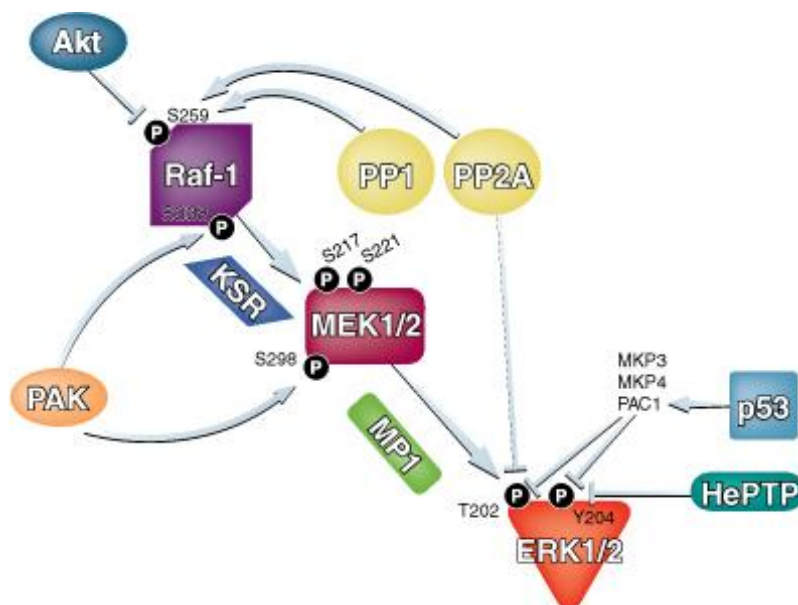
3.2.6 ERK

MAPKázy ERK1 a ERK2 jsou 44 a 42 kDa Ser/Thr kinázy s 90% sekvenční homologií. ERK1 a ERK2 jsou exprimovány ve většině savčích tkání s vyšší hladinou ERK2 než ERK1. Ukazuje se, že jeden ERK může alespoň částečně kompenzovat funkci druhého.

ERKázy jsou aktivovány fosforylací na Thr a Tyr (Thr202/Tyr204 u ERK1 a Thr185/Tyr187 na ERK2). Stejně jako u MEK, nebyly identifikovány *in vivo* mutace, které by aktivovaly ERK.

Unikátní pozici v regulaci ERK zajišťují duálně specifické fosfatázy (DSPs), které defosforylují Thr a Tyr místa. Z výše uvedeného vyplývá, že odtržení fosfátů z těchto míst negativně ovlivní aktivitu ERK (*The ERK Signal Transduction Pathway, 2011, Min a kol., 2011*). Bylo identifikováno přinejmenším devět DSPáz, které jsou terminologicky označovány také jako MAPK fosfatázy (MKPázy). S inaktivací ERK jsou spojeny hlavně MKP3, MKP4 a fosfatáza aktivovaných buněk (PAC1). Nejlépe prostudovanou DSPázou je MKP3, která má větší specifitu k ERK než k jiným MAPKázám. Kromě DSPáz jsou v defosforylaci ERK2 zahrnuty i fosfatázy PP2A a HePTP na Thr185 a Tyr187.

Na základě těchto informací lze shrnout, že trvání a rozsah ERK aktivace jsou kontrolovány rovnováhou aktivit MEKáz a DSPáz. ERK reguluje na růstový faktor reagující cíle v cytosolu a také translokuje do jádra, kde fosforyluje řadu transkripčních faktorů regulujících genovou expresi (*The ERK Signal Transduction Pathway, 2011*).



Obr. 6. Úsek ERK kaskády od Raf k ERK

Je patrný schématický popis MAPKáz, které zahrnují sestupný třístupňový celek, tvořený Raf/MEK/ERK. Raf má čtyři aktivační místa a jedno inhibiční na Ser259. Hydrolýzou fosfátové skupiny na Ser259 pomocí fosfatáz PP1 a PP2A dochází k aktivaci Raf. Naopak fosforylace Ser259 pomocí Akt, vede ke vzniku inhibičního konformačního stavu. Aktivace MEK1/2 je zprostředkována skrze Raf fosforylací Ser na pozicích 217 a 221. Ser298, který je fosforylován PAK1 pomáhá k aktivaci MEK1. Naopak fosforylace neznámou kinázou na Ser212 snižuje aktivitu MEK1. Kinázy ERK1/2 jsou aktivovány fosforylací na Thr a Tyr výše postaveným MEK. Důležitou roli v aktivitě ERK hrají DSPázy (MKP3, MKP4, PAC1), které inaktivují ERK defosforylací Thr a Tyr míst. V defosforylaci (deaktivaci) ERK2 jsou zahrnuty i fosfatázy PP2A a HePTP na Thr a Tyr (Thr185 a Tyr187).

Mezi cytosolické substráty pro ERK patří některé výše položené složky kaskády. Změnou aktivačního stavu jednotlivých proteinů dochází k zpětnovazební regulaci celého signálního řetězce. ERK fosforyluje SOS a tím destabilizuje komplex Grb2/SOS. Následkem toho SOS nemůže interferovat s plazmatickou membránou a aktivovat Ras. Dalším cílem fosforylace ERK je EGFR na Thr669. Navázání fosfátu na toto místo vede k inaktivaci receptoru. ERK také snižuje degradaci MKPáz (fosforylací), které přepínají ERK do neaktivního stavu. ERK tak negativně reguluje sama sebe. V cytosolu ERK fosforyluje řadu kináz jako jsou mitogenem a stresem aktivované proteinkinázy (MNK) nebo ribosomální S6 kinázy (RSK), které se podílí na regulaci řady proteinů (*The ERK Signal Transduction Pathway, 2011*).

Aktivovaný ERK také translokuje do jádra, kde má důležitou úlohu v regulaci genové exprese a replikace DNA. ERKázy vlastně přenáší odpověď buňky na růstový faktor do podoby genové regulace. ERKázy fosforylují řadu jaderných transkripčních faktorů. Pravděpodobně nejlépe popsáným transkripčním faktorem je Elk1, který je přímo fosforylován ERK1 a ERK2. Fosfáty se vážou na řadu míst Elk1, která zahrnují Ser383. Elk1 se podílí na aktivaci transkripce řady mitogen-inducibilních genů, které jsou regulovány sérum responsivními elementy (SREs) (*The ERK Signal Transduction Pathway, 2011*).

3.3 Ovlivnění Ras/Raf/MEK/ERK kaskády

S deregulací ERK kaskády je spojena řada nádorů. Odhalení komponent v této signální cestě a objasnění jejich vztahů otevřelo nové možnosti v nádorové terapii. Byla připravena řada lidských monoklonálních protilátek a malých molekulových inhibitorů proti EGFR. Stejně tak se řada přístupů zaměřila na Ras (*The ERK Signal Transduction Pathway, 2011*).

Na rozdíl od léčiv poškozujících DNA, zasahují nové látky na úrovni proteinů s regulačními a signálními účinky. Tato léková skupina představuje cílenou terapii (targeted therapy) v léčbě nádorů. Přes svoji selektivitu k buněčným proteinům mají i nežádoucí účinky, neboť částečně ovlivňují fyziologické pochody v buňkách (Adam a kol., 2005).

Zásahy do regulace signální kaskády naráží na celou řadu bariér. Na úrovni kináz nastává problém se specifitou inhibice, strukturní podobností jednotlivých kináz a se zapojením kináz do řady regulačních procesů, které nemusí zahrnovat jen buněčnou proliferaci (*The ERK Signal Transduction Pathway, 2011*).

3.3.1 Inhibice RTK

Receptory spojené s tyrosin kinázovou aktivitou jsou místem zásahu „targeted therapy“ v léčbě nádorových onemocnění. Význam tohoto přístupu demonstrují malé molekuly obsahující chinazolinaminové jádro, jako jsou gefitinib (Iressa) a erlotinib (Tarceva), které inhibují kinázovou aktivitu EGFR obsazením ATP vazebného místa na intracelulární doméně receptoru. Tyto sloučeniny jsou indikovány např. v léčbě nemalobuněčného karcinomu plic (Min a kol., 2011, Adam a kol., 2005, *Tarceva, 2011, Iressa, 2011*).

K anti-EGFR přístupům patří i monoklonální protilátky (volné nebo s navázaným toxinem či radionuklidem), antisense oligonukleotidy nebo protinádorové vakcíny.

Cetuximab (Erbix) je chimerická monoklonální protilátka, která se váže extracelulárně na EGFR a brání vazbě možných aktivátorů (Adam a kol., 2005).

Protilátky mohou být konjugovány s toxinem nebo s radionuklidem. Po navázání protilátky na receptor je toxin uvolněn do buňky a buňku usmrtí. Radionuklid, který je zdrojem β záření, může po připojení protilátky k buňce poškodit nejen ji, ale i sousední nádorové buňky, na které se pro špatné cévní zásobení protilátka nenavázala. K nežádoucím účinkům vede nespecifická vazba protilátky na jiné tkáně a dochází tím ke snížení efektu terapie. Pro úplnost lze uvést protilátku trastuzumab (Herceptin), která extracelulárně obsazuje HER-2 receptor a blokuje jeho funkci. Největšího významu dosahuje u karcinomu prsu, kde je HER-2 nadměrně exprimován (Adam a kol., 2005).

Antisense oligonukleotidy nemají zatím větší klinický význam. Jsou to krátké jednořetězce oligonukleotidů komplementární k sekvenci cílové mRNA. Záměrem je snížit expresi genu pro EGFR nebo jeho ligandů (Adam a kol., 2005).

3.3.2 Zásah do posttranslační modifikace proteinů

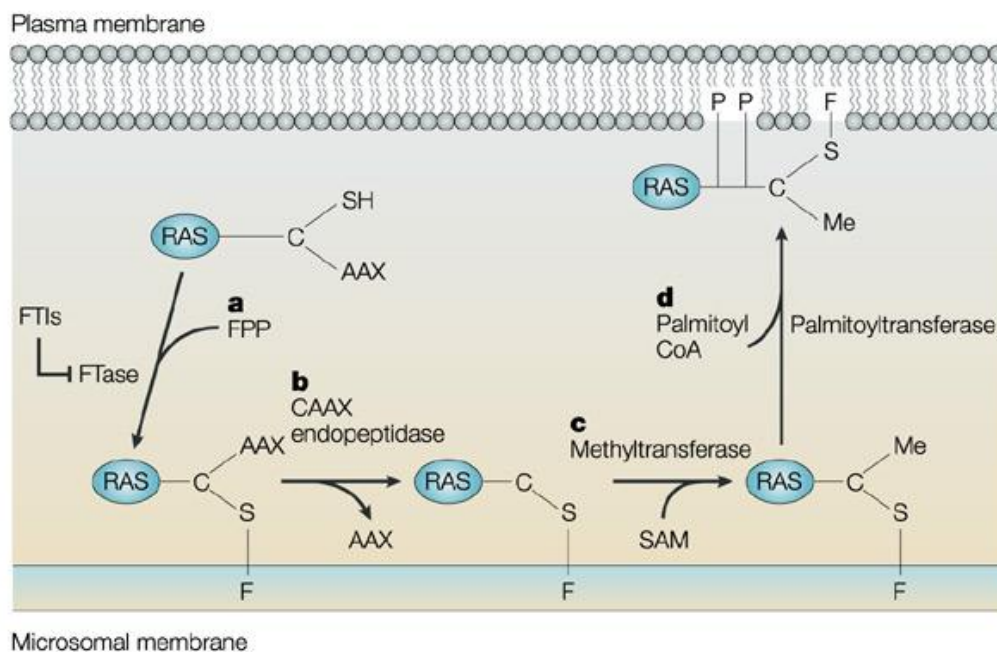
Klíčovým regulačním mechanismem membránových proteinů z hlediska jejich lokalizace a funkce je jejich posttranslační modifikace lipidy, která se označuje jako prenylace (obr. 7.). Během prenylace se ireverzibilně a kovalentně připojují meziproducty metabolické přeměny HMG-CoA reductázy farnesyl (15C) nebo geranylgeranyl (20C) k cysteinovým zbytkům na C-konci mnoha proteinů. Farnesyl představuje lineární řetězec tří isoprenových jednotek a geranylgeranyl je tvořen ze čtyř isoprenových jednotek. Isopren je nenasycený uhlovodík s pěti atomy uhlíku a jedním metylovým rozvětvením.

Ras proteiny jsou obvykle farnesylovány a Rho proteiny geranylgeranylovány (s několika výjimkami). V eukaryotických buňkách podléhá posttranslační modifikaci lipidy většina členů nadrodiny Ras, ale i γ podjednotka trimerových G proteinů a řada ostatních kináz (Ali a kol., 2010, Walker a Olson, 2005, Adam a kol., 2005).

Ras proteiny obsahují na C-konci CAAX box, dle kterého je Ras modifikován buď farnesyl transferázou (FT) nebo geranylgeranyl transferázou (GGT), cytoplasmatickými enzymy, které prenylují cystein (C) CAAX boxu. Pokud končí box (X) serinem, methioninem nebo glutaminem je Ras farnesylován. Je-li (X) leucin nebo isoleucin je Ras přednostně

geranylgeranylován. Značka (A) označuje zbytek alifatické aminokyseliny (Wojtkowiak a kol., 2009, Morgan a kol., 2005).

Prenylovaný Ras je transportován na endoplasmatické retikulum, kde podléhá dalším změnám. Na endoplasmatickém retikulu je přítomen enzym konvertující Ras 1 (RCE1), který proteolyticky odstraní tři zbytky aminokyselin (AAX). Poté následuje methylace isoprenylovaného C-koncového cysteinového (C) zbytku isoprenylcystein karboxymetyltransferázou (ICMT). Zpracovaný protein je dopraven do plazmatické membrány a může být dále modifikován fosforylací. H-Ras a K-Ras jsou zvláštním případem, neboť jsou také palmitoylovány (Ali a kol., 2010, Wojtkowiak a kol., 2009, Walker a Olson, 2005).



Nature Reviews | Cancer

Obr. 7. Prenylace Ras

Obrázek popisuje posttranslační modifikace proteinu Ras. V prvním kroku (a) dochází k navázání farnesyly na SH-skupinu zbytku cysteinu na C-konci Ras (prenylace) za katalytického působení FT. Prostřednictvím RCE1 je na endoplasmatickém retikulu Ras zbaven AXX zbytku na C-konci (b). Následně je cysteinový zbytek methylován ICMT. Takto modifikovaný Ras je transportován do plazmatické membrány. U některých isoform Ras dochází před ukotvením v membráně k navázání palmitoylu (d).

3.3.2.1 Statiny

Statiny, jak bylo uvedeno (viz výše), zasahují do syntézy cholesterolu zablokováním HMG-CoA reduktázy. Tím inhibují deacetylaci HMG-CoA na mevalonát a koenzym A. Zastavení syntézy cholesterolu v tomto kroku má za následek zablokování syntézy ergosterolu, ale i isoprenoidů farnesyly a geranylgeranylu, které jsou nezbytné pro posttranslační modifikaci Ras. Tato skutečnost předurčuje statiny jako vhodné objekty ke studiu jejich potenciálního cytostatického působení (Ali a kol., 2010).

V pokusech navíc statiny indukovaly apoptózu nádorových buněk tím, že zablokovaly prenylaci proteinů, které apoptózu regulují. Zdá se, že statiny více podporují apoptózu a více inhibují proliferaci u maligních buněk než u buněk nemaligních. Příčinou je patrně vyšší exprese HMG-CoA reduktázy a větší požadavky na isoprenoidy u nádorových buněk (Herrero-Martin a López-Rivas, 2008).

Statiny byly v řadě klinických studií hodnoceny z hlediska prevence rakoviny. Ve velkých randomizovaných klinických studiích, zabývajících se vlivem statinů na prevenci KVO, se nepotvrdilo významné snížení výskytu rakoviny při užívání statinů. Kritika těmto závěrům oponuje tvrzením, že výskyt rakoviny nebyl „end point“ studií a sledovaná doba účinku statinů na prevenci rakoviny byla relativně krátká. K tomu se připojují velké observační, retrospektivní studie, které potvrzují, že užití statinů je asociováno se snížením výskytu rakoviny (Vaklavas a kol., 2011).

Z výsledků observační studie provedené v Nizozemí na 3129 pacientech vyplývá, že u pacientů užívajících statiny se snižuje nebezpečí vzniku rakoviny o 20 % v porovnání s těmi, kteří statiny neužívali. Nebyl zaznamenán podstatný rozdíl mezi pohlavími nebo věkovými skupinami. Efekt roste s délkou trvání terapie. Vezmeme-li v potaz častý výskyt rakoviny ve společnosti a relativní redukci rizika rakoviny o 20 % po podání statinů, které jsou v populaci široce užívány, slibuje terapie statiny značný efekt na veřejné zdraví (Graaf a kol., 2004).

Inhibice HMG-CoA reduktázy statiny by mohla být spojována s upregulací tohoto enzymu. Tato zpětná vazba by mohla být teoreticky příčinou získané rezistence na statiny při dlouhodobém podávání. Tím by došlo k návratu rizika výskytu rakoviny na původní mez. V citované nizozemské studii se tato hypotéza nepotvrdila. Ze studie vyplývá, že statiny poskytují ochranu, i pokud jsou užívány déle než 4 roky. Pacienti, kteří ukončili terapii před více než 6 měsíci, jsou vystaveni stejnému riziku jako ti, kteří statiny neužívali (Graaf a kol., 2004).

3.3.2.2 *Inhibitory FT a GGT*

Na přípravu inhibitorů FTázy (FTI) a GGTázy (GGTI) I bylo vynaloženo značné úsilí. Blokáda FTázy a GGTázy měla za cíl potlačit Ras a Rho prenylací, a tím rozpojit signalizaci ERK kaskády. Navzdory tomu se ukázalo, že podávané inhibitory FTázy v monoterapii nevedly k terapeutickému cíli. Důvod neúspěchu léčby vysvětluje skutečnost, že nejčastěji mutované Ras, N-Ras a K-Ras, jsou nejen farnesylovány, ale také geranylgeranylovány a FTI neblokuje GGTázu. Lze shrnout, že klinická účinnost inhibitorů prenylace je omezena alternativní prenylací některých isoform Ras. Na rozdíl od předchozích Ras je H-Ras pouze farnesylován. Řešením rezistence by mohla být kombinovaná terapie inhibitorů FTázy a GGTázy I, která ale na zvířecích modelech vykazuje značnou toxicitu (Walker a Olson, 2005, Morgan a kol., 2005).

Například v buňkách mnohočetného myelomu byl zaznamenán zvýšený výskyt aktivujících Ras mutací. Preklinické studie s užíváním FTI, lovastatinu a GGTI poskytly nadějně výsledky. Nicméně klinické zkoušky ale nepřinesly optimistické závěry, neboť se během monoterapie FTI, tipifarnibem (Zarnestra) objevila rezistence k terapii. Ukázalo se, že většina Ras mutací u mnohočetného myelomu je v K- a N-Ras. Alternativní prenylace zde tedy pravděpodobně nabývá na významu (Morgan a kol., 2005).

Kromě tipifarnibu se do klinického zkoušení dostal i lonafarnib (Sarasar). Obě léčiva inhibují FT kompetici s CAAX boxem (Wojtkowiak a kol., 2009).

V popředí zájmu je synergistické působení kombinací FTI (inhibice enzymu FT) se statiny (zablokování syntézy substrátů pro FT a GGT). Demonstrativní pokusy ukázaly, že ko-terapie FTI/lovastatin spolupůsobí u buněk mnohočetného myelomu na jejich proliferaci. Kombinace významně inhibuje práci všech isoform Ras a tím silněji blokuje sestupnou ERK signální kaskádu (Morgan a kol., 2005).

Původně se myslelo, že FTI jsou pouze inhibitory Ras. Nicméně FTI dokázaly potlačit i nádory, ve kterých nebyl gen *Ras* mutován. Předpokládá se, že FTI působí i na některé kontrolní body mitózy přes např. Rho B, TGF a další (Adam a kol., 2005).

3.3.2.3 *Bisfosfonáty*

Další skupinou terapeutických sloučenin, které inhibují Ras a Rho posttranslační modifikaci jsou bisfosfonáty. Novější generace bisfosfonátů obsahujících dusík inhibuje farnesyl-pyrofosfátsyntázu (FPPsyntázu). Tento enzym je nezbytný pro syntézu farnesyl-pyrofosfátu (FPP), který je základní složkou pro vlastní prenylací substrátů. Zůstává otázkou, zda protinádorový efekt pozorovaný *in vitro* a na zvířecích modelech, bude aplikovatelný

v klinické praxi v účinné léčbě tumorů. Účinnou terapii by mohla představovat kombinace statinu a bisfosfonátu. Tato dvě léčiva by zasáhla do biosyntetické cesty FPP na dvou klíčových místech (Walker a Olson, 2005).

3.3.3 Další přístupy

Inhibitory RCE1 by mohly vést ke snížení aktivace Ras a Rho. Důvodem by byla jejich aberantní subcelulární lokalizace.

Závěrečným krokem v posttranslační modifikaci Ras a Rho proteinů je methylace isoprenylovaného cysteinu na C-konci pomocí ICMT. Zablokování tohoto enzymu teoreticky povede k narušení funkce a chybnému umístění H-Ras, K-Ras, N-Ras a RhoA v plasmatické membráně. Inhibiční účinky na ICMT byly popsány u methotrexátu (Walker a Olson, 2005).

Další přístupy k ovlivnění GTPáz vedou přes zásah do vazby GTP k těmto enzymům. Existovaly snahy o vytvoření guaninových mimetik. Účinek těchto analogů je však negativně ovlivněn vysokou koncentrací GTP v buňce a vysokou afinitou Ras a Rho jak ke GDP tak GTP. Více efektivní by mohlo být zablokování GEFs a tím schopnosti aktivovat GTPázy (Walker a Olson, 2005).

4 Experimentální část

4.1 Reagencie

Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM Médium (Sigma-Aldrich)

Glutamin (Sigma-Aldrich)

Fetální bovinní sérum, FBS (PAA)

Neesenciální aminokyseliny, NEAA (Sigma-Aldrich)

PBS fosfátový pufr: 10mM fosfátový pufr, pH 7,5, 150mM NaCl

Trypsin (Sigma-Aldrich)

Opti-MEM (Minimum Essential Medium) I Reduced Serum Medium (Invitrogen)

Dimethylsulfoxid, DMSO (Sigma-Aldrich)

TransFectin™ Lipid Reagent (BIO-RAD)

pGL5luc, reportérový plasmid (Promega)

pFA2-ELK1 plasmid (Stratagene)

Epidermální růstový faktor, EGF (Sigma-Aldrich)

Simvastatin (Sigma-Aldrich)

Atorvastatin (Sigma-Aldrich)

Lovastatin (Sigma-Aldrich)

Pravastatin (Sigma-Aldrich)

U0126 (Sigma-Aldrich)

Erlotinib (Sigma-Aldrich)

Gefitinib (Sigma-Aldrich)

Passive Lysis Buffer (Promega)

Luciferase Assay Buffer II (Promega)

Luciferase Assay Substrat, luciferinový roztok (Promega)

CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent (Promega)

Roztok A (BCA Reagent A): Na₂CO₃, NaHCO₃, BCA, tartaran sodný (Sigma-Aldrich)

Roztok B (BCA Reagent B): 4% CuSO₄ (Sigma-Aldrich)

Ras GTPase Chemi ELISA Kit (Aktive Motif):

Complete Lysis/Binding Buffer

GST-Raf-RBD

Wash Buffer

Antibody Binding Buffer
H-Ras antibody (primární protilátka)
HRP antibody (sekundární protilátka)
Chemiluminescent Reagent
Reaction Buffer
Protease Inhibitor Cocktail

4.2 Buněčná linie A431

4.2.1 Popis buněčné linie

A431 je modelovou buněčnou linií, která je odvozena z epidermálního karcinomu vulvy 85 leté ženy. Buňky nesou abnormálně velký počet EGFR a jsou tedy vhodné ke studiu buněčného cyklu a signálních kaskád spojených s rakovinou. Obsahují nefunkční p53, tumor supresorový gen, a jsou tedy velmi citlivé k mitogenním stimulům. Pikomolární koncentrace EGF podporují buněčný růst, zatímco nanomolární koncentrace EGF růst inhibují.

4.2.2 Kultivace

Linii jsme kultivovali v DMEM médiu obsahujícím 2 mM glutamin, 10 % fetálního bovinního séra a 1 % neesenciálních aminokyselin při 37 °C a 5% CO₂. A431 buňky jsme pasážovali při konfluenci (70-80 %) s použitím 0,25% trypsinu. Nasazovali jsme je v koncentraci 20 000-40 000 buněk na cm² plochy kultivačního plata (*A431 cell line human, 2011, A431, 2011*).

4.3 Metoda gene reporter assay: PathDetect[®] Elk1 trans-Reporting System

4.3.1 Princip

PathDetect[®] Elk1 trans-Reporting System je určen k hodnocení *in vivo* aktivity buněčné kaskády (ERK), ovlivněné pomocí experimentálních stimulů. Zapnutý signální řetězec vyústí ve fosforylaci Elk1 transkripčního faktoru, jehož aktivitu lze kvantifikovat použitím tohoto testu (obr. 8.).

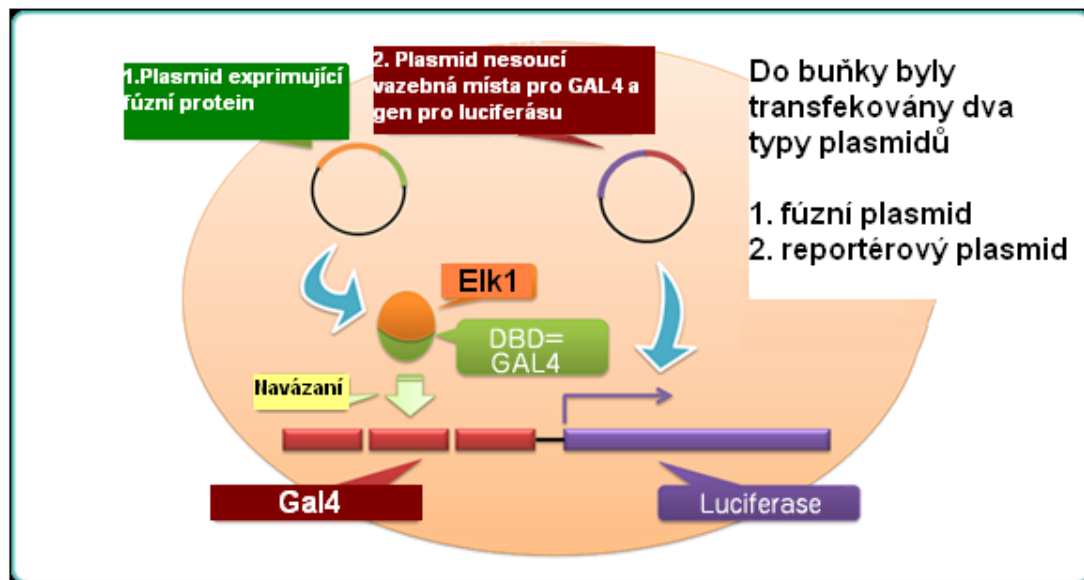
Buňky jsou ko-transfekovány fúzním a reportérovým plasmidem. Fúzní plasmid je vektor, do kterého je vložena sekvence pro fúzní protein. Ten se skládá z aktivační domény

Elk1, která je spojena s kvasinkovou GAL4 DNA vazebnou doménou. Fúzní plasmid obsahuje také promotor, který zajišťuje konstitutivní expresi fúzního proteinu. Pokud je sledovaná signální kaskáda spuštěna, dochází k fosforylaci exprimovaného fúzního proteinu.

Reportérový plasmid obsahuje syntetický promotor s tandemovými repetitivy kvasinkových GAL4 vazebných míst, které kontrolují expresi luciferázového genu ze světlušky *Photinus pyralis*. GAL4 DNA vazebná doména aktivovaného fúzního proteinu se váže na promotor reportérového plasmidu a spouští přepis luciferázového genu do mRNA. Po transkripci a následné translaci genu je exprese luciferázy detekována chemiluminiscenčně. Výsledný signál odráží aktivitu sledované kaskády a tedy míru fosforylovaného fúzního proteinu (*PathDetect Trans-Reporting Systems, 2011*).

K vnesení plasmidů do buňky je využito lipofekce, která je založena na principu lipozómalní transfekce. Lipozómy jsou koloidní částice obsahující kationické lipidy. Vlivem elektrostatických interakcí tvoří komplex s negativně nabitou nukleovou kyselinou. Lipozómy se v komplexu s DNA spojují s buněčnou membránou, čímž umožňují inkorporaci nukleové kyseliny do buňky (Felgner a kol., 1987).

TransFectin™ Lipid Reagent je patentový přípravek od firmy Bio-Rad, který se používá k transfekci nukleových kyselin do savčích buněk. Obsahuje kationické sloučeniny a co-lipid (1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine). Transfekci lze provést v médiu se sérem, ale i bez něj. Doporučený poměr DNA (v µg): TransFectin (v µl) k tvorbě komplexů by měl být v rozmezí 1:2 až 1:3 (*TransFectin Lipid Reagent, 2011*).



Obr. 8. Gene reporter assay

Schéma zobrazuje buňku, do které byla lipofekcí vnesena dvojice plasmidů. Plasmid č. 1 kóduje fúzní protein sestávající se z Elk1 domény a GAL4 DNA vazebné domény. Po aktivaci Elk1 domény fosforylací vstoupnými členy kaskády (ERK) dochází k vazbě GAL4 DNA vazebné domény na Gal4 promotorové oblasti plasmidu č. 2, kódujícího luciferázu. Výsledným efektem je exprese luciferázy, která je detekována chemiluminiscencí.

4.3.2 Pracovní postup

1. Nasadili jsme 48-jamkovou destičku s 200 000 buňkami na jamku (plocha 1 cm²). Přidali jsme 175 µl média obsahující 2 mM glutamin, 10 % fetálního bovinního séra, 1 % neesenčních aminokyselin (plné médium) na jamku a inkubovali 24 hodin.
2. Před vlastní transfekcí jsme vyměnili plné medium za 150 µl nového plného média.
3. Připravili jsme si 60 µl transfekční směsi na jamku. Transfekční směs se sestávala ze dvou podílů: první z 30 µl Opti-MEM média na jamku s DNA reportérovým plasmidem (200 ng na jamku) a fúzním plasmidem Elk1 (75 ng na jamku) a druhý podíl z 30 µl Opti-MEM média na jamku s TransFectinTM Lipid Reagentem (v poměru 1:2 vůči DNA plasmidům), po 5 minutách jsme oba podíly smíchali a nechali inkubovat 20 minut. Na každou jamku jsme přidali objem 60 µl transfekční směsi a následně inkubovali 24-26 hodin.
4. Po inkubaci jsme odsáli plné médium s transfekční směsí a přidali Opti-MEM 100 µl na každou jamku na 6-8 hodin.

5. Poté jsme k buňkám přidali roztoky 220 μ l na jamku. Roztoky se skládaly z Opti-MEM a testovaných látek v příslušných koncentracích rozpuštěných v DMSO. V kontrolním vzorku jsme použili 1 % DMSO v Opti-MEM. Následovala několikahodinová (dle rozpisu pokusu) inkubace v temperovaném buněčném inkubátoru.
6. Odstranili jsme médium a omyli buňky pomocí PBS ohřátého na 37 °C.
7. Lyzaci buněk jsme provedli přidáním pufru (Passive lysis buffer) v množství 100 μ l na jamku, a destičku jsme nechali zamrazit. Vzniklé krystaly zlyzovaly buňky.
8. Z každé jamky jsme odpipetovali 40 μ l lyzátu na 96-jamkovou destičku a přidali 40 μ l Luminolu.
9. Chemiluminiscenci světluškové luciferázy jsme analyzovali na destičkovém spektrofotometru Genios Plus (Tecan).
10. Aktivitu buněk v jamce jsme vztáhli k celkovému proteinu lyzátu. K určení celkového proteinu jsme použili test Bicinchoninic Acid Assay. Z každé jamky jsme použili 20 μ l lyzátu.

4.4 Bicinchoninic Acid (BCA) Assay

4.4.1 Princip

Je to metoda sloužící ke kvantifikaci celkového proteinu. Její podstatou je redukce měďnatých iontů na měďné pomocí proteinů (pozn. cystein, cystin, tryptofan, tyrosin a peptidová vazba jsou schopné redukce měďnatých iontů na měďné) v alkalickém prostředí. Měďné ionty reagují s BCA za vzniku rozpustného fialového komplexu, který absorbuje světlo při 540-590 nm. Velikost absorbance je úměrná množství proteinu ve vzorku (*Bicinchoninic Acid Kit, 2011*).

4.4.2 Pracovní postup

1. Připravili jsme si pracovní roztok smícháním 50 objemových dílů roztoku A s jedním dílem roztoku B.
2. Napipetovali jsme 10-25 μ l (dle designu pokusu) sledovaných vzorků na jamky 96-jamkové destičky.

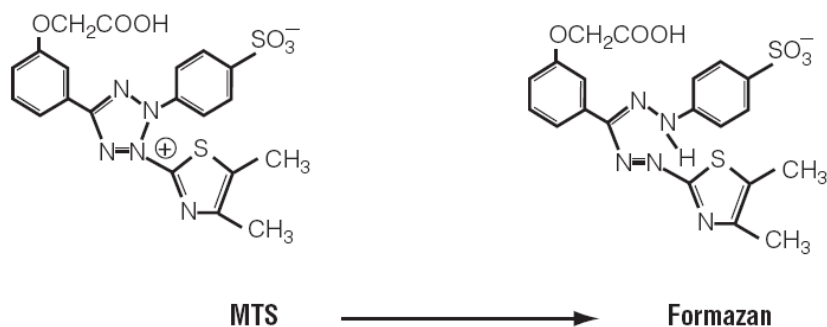
3. Přidali jsme 200 μl pracovního roztoku k sledovaným vzorkům na každou jamku a pipetováním promíchali.
4. Uzavřenou destičku jsme inkubovali 30 min při teplotě 37 $^{\circ}\text{C}$.
5. Pomocí spektrofotometru Genius Plus (Tecan) jsme při vlnové délce 590 nm změřili absorbanci vzorků a vyhodnotili výsledky.

4.5 CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

4.5.1 Princip

Tato kolorimetrická assay využívá ke kvantifikaci životaschopných buněk v testech buněčné proliferace a cytotoxicity tetrazolinovou sůl MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] a reagens PES (phenazine ethosulfate). Podstata testu spočívá v redukcí MTS na barevný, v médiu rozpustný formazan (na rozdíl od metody využívající MTT, odlišnou tetrazolinovou sůl, kde je navíc jeden krok, spočívající v rozpuštění formazanových krystalů) pouze metabolicky aktivními buňkami (obr. 9.). Tím je zajištěna detekce výlučně viabilních buněk. Výsledný roztok se kvantifikuje za použití čtečky destiček při vlnové délce 490 nm, což je maximum absorpance formazanu.

Štěpení MTS na formazan realizuje reduktázový systém, který je součástí mitochondriálního dýchacího řetězce a je aktivní pouze v živých buňkách. Redukce vyžaduje pyridinové kofaktory NADH a NADPH. Proliferující buňky jsou metabolicky aktivnější než neproliferující, a proto je test vhodný i k učení proliferace (*CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS), 2011*).



Obr. 9. Popis redukce MTS na barevný formazan

4.5.2 Pracovní postup

1. Nasadili jsme buňky linie A431 na 96-jamkovou destičku. Přidali jsme 100 μ l média obsahující 2 mM glutamin, 10 % fetálního bovinního séra, 1 % neesenciálních aminokyselin (dále plné médium) na jamku a inkubovali 24 hodin.
2. Po 24 hodinách jsme plné médium odsáli a přidali Opti-MEM 100 μ l na každou jamku na 6-8 hodin („pretreatment“).
3. Poté jsme k buňkám přidali roztoky 100 μ l na jamku. Roztoky se skládaly z Opti-MEM a testovaných látek v příslušných koncentracích rozpuštěných v DMSO. 1 % DMSO v Opti-MEM jsme použili jako kontrolní vzorek. Následovala několikahodinová (dle designu pokusu) inkubace v temperovaném buněčném inkubátoru.
4. Nechali jsme plně roztát CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent (reagens) přibližně 90 minut při pokojové teplotě.
5. Na každou jamku plata do roztoku jsme napipetovali 20 μ l reagentu.
6. Destičku jsme inkubovali 1-4 hodiny při 37 °C a 5% CO₂.
7. Následně jsme vyhodnotili absorbanci jednotlivých jamek při 490 nm na destičkovém spektrofotometru Genios Plus (Tecan).

4.6 Ras GTPase Chemi ELISA

4.6.1 Princip

S Ras GTPase Chemi ELISA je možné detekovat a kvantifikovat aktivitu Ras. Kit obsahuje Raf-RBD protein spojený s GST (glutathion *S*-transferázou), který je nanášen a fixován na glutathionem potaženou 96-jamkovou destičku. Aktivované Ras ve vzorku obsahují specifická vazebná místa pro RBD efektoru Raf, kterou inaktivní Ras neváže. Raf-RBD je tedy využívána k izolaci aktivované Ras na jamce destičky. Vázaný Ras je detekován inkubací s primárními protilátkami, které detekují H-Ras a K-Ras u lidských vzorků. Přidáním sekundárních protilátek spojených s křenovou peroxidázou a reagenčního roztoku, dochází ke chemiluminiscenci, kterou detekujeme. Na rozdíl od tradiční metody pro monitorování Ras aktivace jako western blot ušetří ELISA čas a vyžaduje menší množství testovaného vzorku (*Ras GTPase Chemi ELISA Kit, 2011*).

4.6.2 Pracovní postup

1. Nasadili jsme buňky linie A431 na 6-jamkovou destičku (400 000 buněk na jamku). Přidali jsme 1000 μ l média obsahující 2 mM glutamin, 10 % fetálního bovinního séra, 1 % neesenciálních aminokyselin (dále plné médium) na jamku a inkubovali 24 hodin.
2. Po inkubaci jsme odsáli plné médium a jamky jsme opláchli PBS ohřátým na 37 °C.
3. Následně jsme k buňkám přidali roztoky 500 μ l na jamku. Roztoky se sestávaly z Opti-MEM a testovaných látek v příslušných koncentracích rozpuštěných v DMSO. Jako kontrolní vzorek jsme použili 1 ‰ DMSO v Opti-MEM. Následovala 24 hodinová inkubace v temperovaném buněčném inkubátoru.
4. Opláchli jsme buňky 5 ml vychlazeného PBS. Následně jsme k buňkám přidali 500 μ l pufru Complete Lysis/Binding Buffer. Vysokou adhezenci buněk jsme řešili použitím škrabky, kterou jsme strhli buňky ze dna jamek plata.
5. Buněčné lyzáty jsme přesunuli do mikrozkušavek a inkubovali po dobu 15 minut v centrifuzě vychlazené na 4 °C.
6. Jednotlivé mikrozkušavky jsme 10 sekund míchali na vortexu a 10 minut centrifugovali (14000 rpm, 4 °C). Z každé zkumavky byl odebrán supernatant. Z části supernatantu (20 μ l v triplicátu) jsme změřili obsah celkového proteinu ve vzorcích prostřednictvím Bicinchoninic Acid Assay. Ze zjištěných hodnot absorbance jsme relativizovali výsledky z ELISA testu.
7. Aktivovali jsme destičku kitu přidáním 1 μ l GST-Raf-RBD zředěného v 49 μ l pufru Complete Lysis/Binding Buffer na jamku destičky.
8. Adhezivní páskou jsme překryli plato a inkubovali 1 hodinu při 4 °C za mírného třepání.
9. Každou jamku jsme 3krát opláchli 200 μ l 1X Wasch Bufferu. Po každém opláchnutí jsme otočili destičku nad výlevkou a nechali ležet v převrácené poloze na absorpčním papíře.
10. Na každou jamku jsme nanесли 120 μ l supernatantu. Potáhli jsme plato adhezivní páskou a inkubovali 1 hodinu při pokojové teplotě za mírného třepání.
11. Po 1 hodině inkubace jsme opláchli každou jamku 3krát. Viz bod 9.
12. Poté jsme na každou jamku pipetovali 50 μ l zředěné H-Ras protilátky (v poměru 1:500 s 1X Antibody Binding Bufferem) a překryli plato páskou při 1 hodinové inkubaci bez třepání. Opláchli jsme plato podle bodu 9.

13. Po navázání primární protilátky jsme přidali 50 μ l zředěné HRP protilátky (sekundární) v poměru 1:5000 s 1X Antibody Binding Bufferem na jamku a podobně jako v předchozím kroku zakryli adhezivní páskou plato při 1 hodinové inkubaci bez třepání.
14. Během inkubace jsme si ohřáli Chemiluminescent Reagent a Reaction Buffer na pokojovou teplotu.
15. Po 1 hodině následovalo proplachování jamek plata jako v bodě 9., přičemž jsme oplachování opakovali 4 krát nikoliv 3krát.
16. Na každou jamku jsme přidali 50 μ l Chemiluminescent Working Solution (pokojové teploty) připravený z Chemiluminescent Reagent a Reaction Buffer.
17. Chemiluminiscenci jsme detekovali na destičkovém spektrofotometru Genios Plus (Tecan).

4.7 Statistické vyhodnocení výsledků

Pro statistické vyhodnocení výsledků jsme použili nepárový Studentův t-test nebo AVOVA analýzu s Dunnettovým post hoc testem (GrapPad software). Za statisticky významnou jsme považovali hladinu významnosti na úrovni $p < 0.05$.

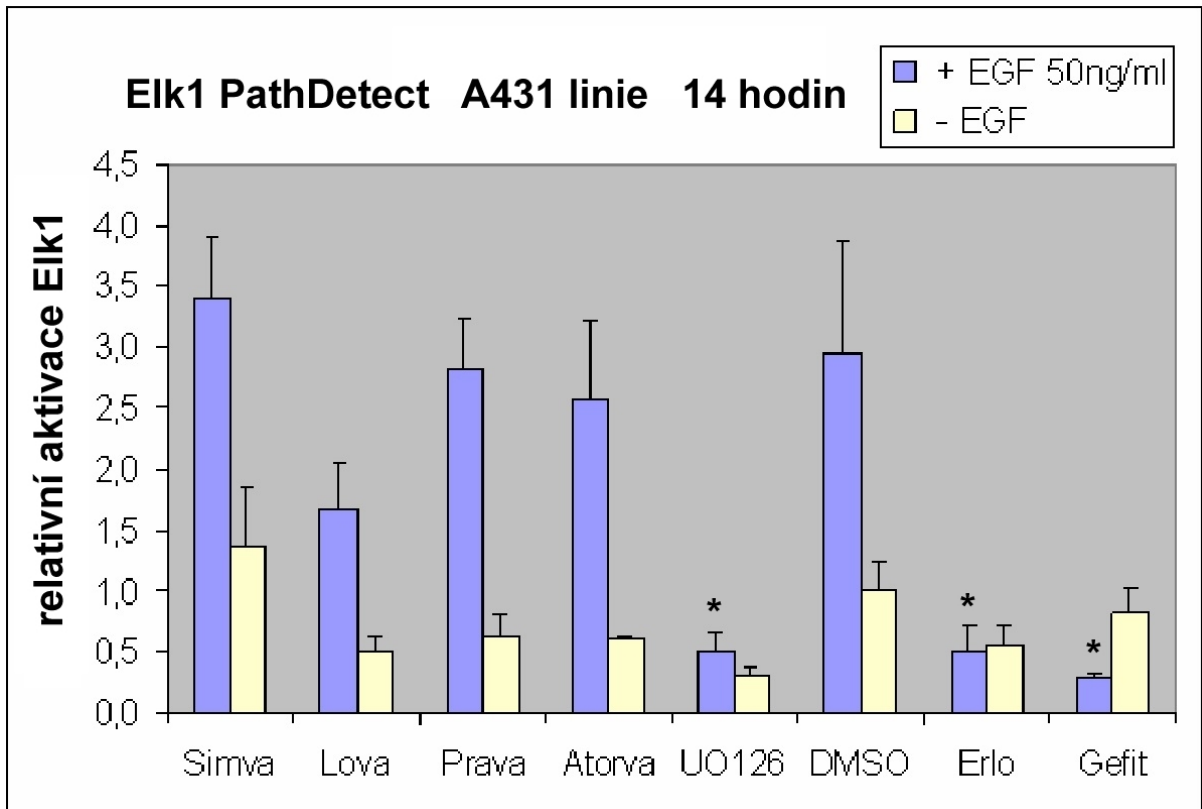
5 Výsledky

5.1 PathDetect[®] Elk1 trans-Reporting System

Pokusy jsem provedli na buněčné linii A431 se čtyřmi zástupci statinů (simvastatin, lovastatin, pravastatin, atorvastatin (30 μM)), každý v triplikátu. Jako pozitivní kontrolu jsme zvolili modelovou látku U0126 (10 μM), inhibitor MEK1/2, a cytostatika (erlotinib (10 μM) a gefitinib (10 μM)) působící na úrovni EGFR, rovněž v triplikátu. Experimenty probíhaly na 48-jamkových destičkách v uspořádání: první polovina destičky - testované látky a druhá polovina destičky - testované látky s EGF (50 ng/ml). Jamky bez testovaných látek pouze s EGF nám tvořily kontrolu pro statistické vyhodnocení efektu statinů. Aktivitu buněk na jamce jsme vztáhli k celkovému proteinu lyzátu. K jeho stanovení jsme použili Bicinchoninic Acid Assay.

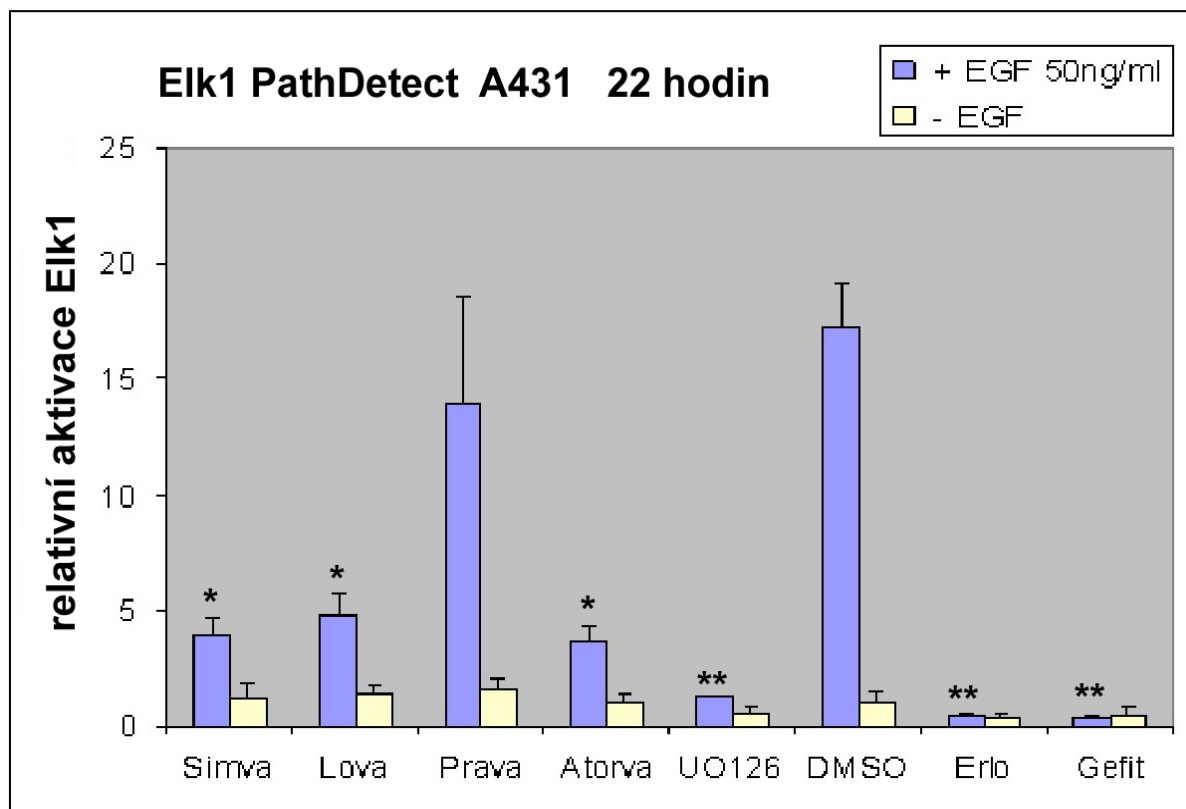
Na polovině destičky jsme pracovali s roztoky testovaných látek s EGF (50 ng/ml). Tento růstový faktor nám umožnil aktivovat sledovanou kaskádu a pozorovat efektivněji vliv látek na aktivitu Elk1 oproti srovnávací polovině destičky bez EGF.

První pokus sledoval vliv statinů na Elk1 aktivaci po 14 hodinové expozici buněk testovanými látkami (obr. 10.), druhý po 22 hodinách (obr. 11.) a třetí po 40 hodinách (obr. 12.).



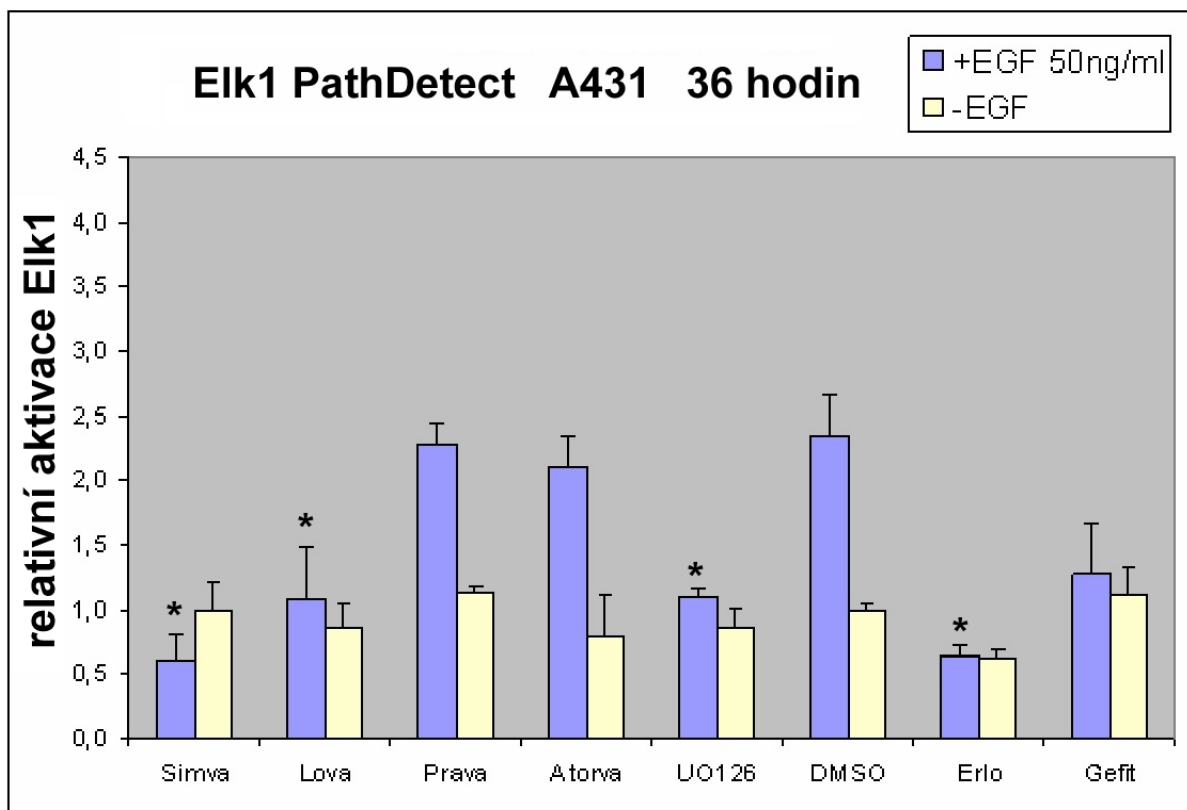
Obr. 10. PathDetect[®] Elk1 trans-Reporting System na buněčné linii A431 s vybranými látkami po 14 hodinách.

Již po 14 hodinách od přidání látek k buňkám jsme pozorovali vliv EGF (50 ng/ml) na Elk1 aktivaci, převyšující svoji aktivitou několika násobně kontrolu (DMSO, 1 %). Inhibitory erlotinib (Erlo), gefitinib (Gefit), U0126 (10 μ M) významně snížily aktivitu Elk1 na aktivované polovině destičky v porovnání s kontrolou s EGF. Vliv statinů na Elk1 nebyl v této časové fázi kromě lovastatinu signifikantní.



Obr. 11. PathDetect[®] Elk1 trans-Reporting System na buněčné linii A431 s vybranými látkami po 22 hodinách.

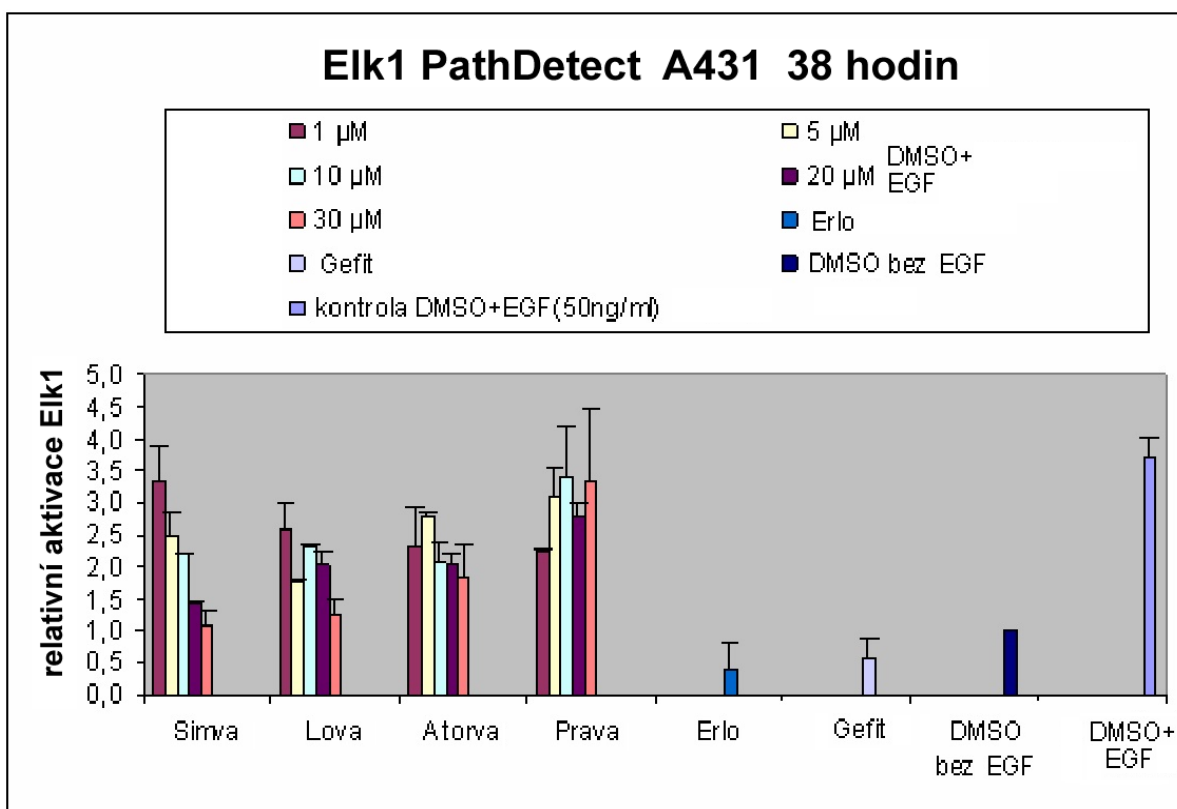
Po 22 hodinách inhibitory erlotinib (Erlo, 10 μ M), UO126 (10 μ M), a gefitinib (Gefit, 10 μ M) intenzivně potlačily aktivitu Elk1 ($p < 0.01$). Statisticky významný ($p < 0.05$) byl i efekt statinů. Zatímco v uspořádání statin bez EGF jsme nezaznamenali signifikantní zásah do aktivity Elk1, tak v modelu statin (vyjma pravastatinu) s EGF byla ve srovnání s kontrolou (vzorek s EGF) aktivita Elk1 signifikantně snížena ($p < 0.05$).



Obr. 12. PathDetect® Elk1 trans-Reporting System na buněčné linii A431 s vybranými látkami po 40 hodinách

Po 40 hodinách se aktivita Elk1 snižuje ve srovnání s předchozím experimentem (obr. 11.). Rozdíl signálu mezi kontrolou s EGF (50 ng/ml) a vzorkem s DMSO (1 ‰) není tak výrazný. Podobně efekt statinů s EGF (vyjma simvastatinu a lovastatinu) na aktivitu Elk1 ztrácí na významu. V uspořádání statinů bez EGF jsme nedetkovali, podobně jako v předchozích dvou pokusech (obr. 10. a 11.), signifikantní rozdíl od kontroly (1 ‰ DMSO).

Následující experiment jsme provedli na 48-jamkové destičce pouze v designu statin s EGF (50 ng/ml). Simvastatin, lovastatin, atorvastatin a pravastatin jsme připravili v duplikátech v koncentrační řadě 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M. Jako pozitivní kontrolu jsme zvolili erlotinib (10 μ M) a gefitinib (10 μ M) s EGF (50 ng/ml). Kontrolu, ke které jsme vztahovali účinek statinů a cytostatik, tvořilo EGF (50 ng/ml) a DMSO (1 ‰). Pokus jsme vyhodnotili po 38 hodinách.

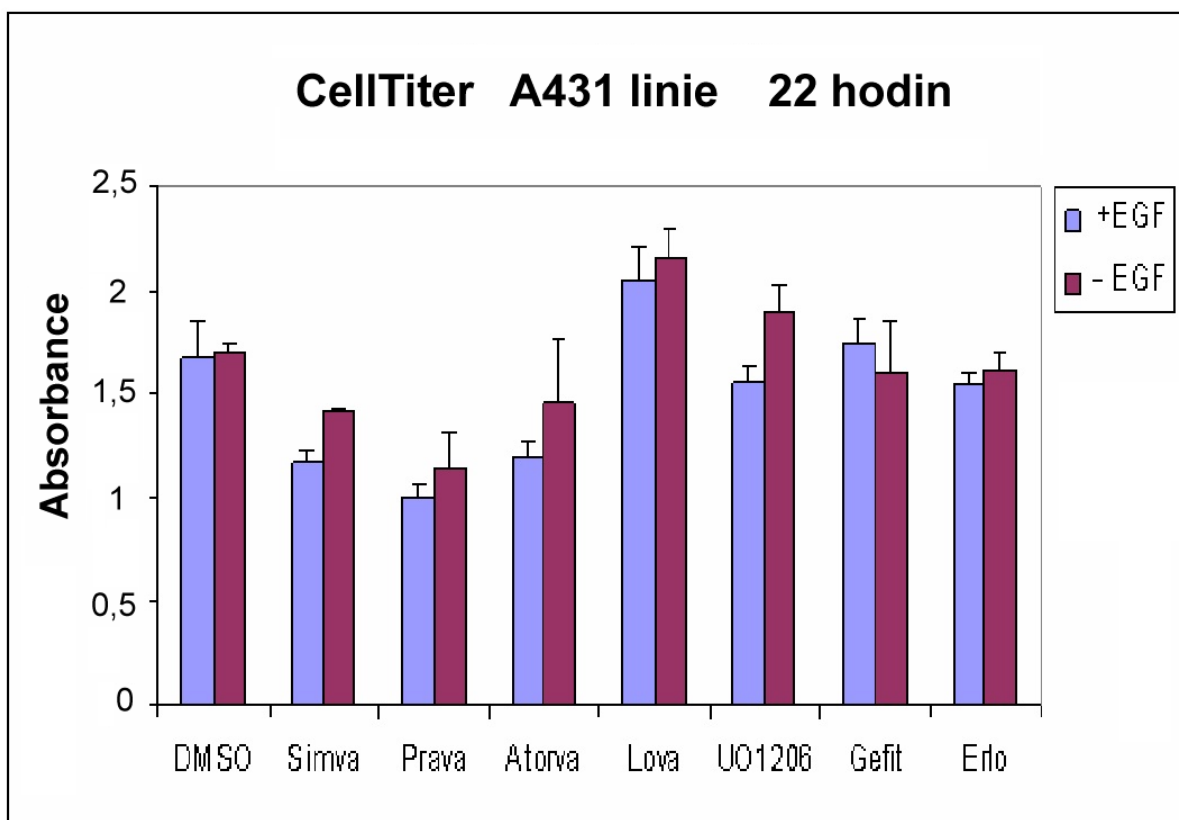


Obr. 13. PathDetect[®] Elk1 trans-Reporting System na buněčné linii A431 s koncentračními řadami statinů po 38 hodinách

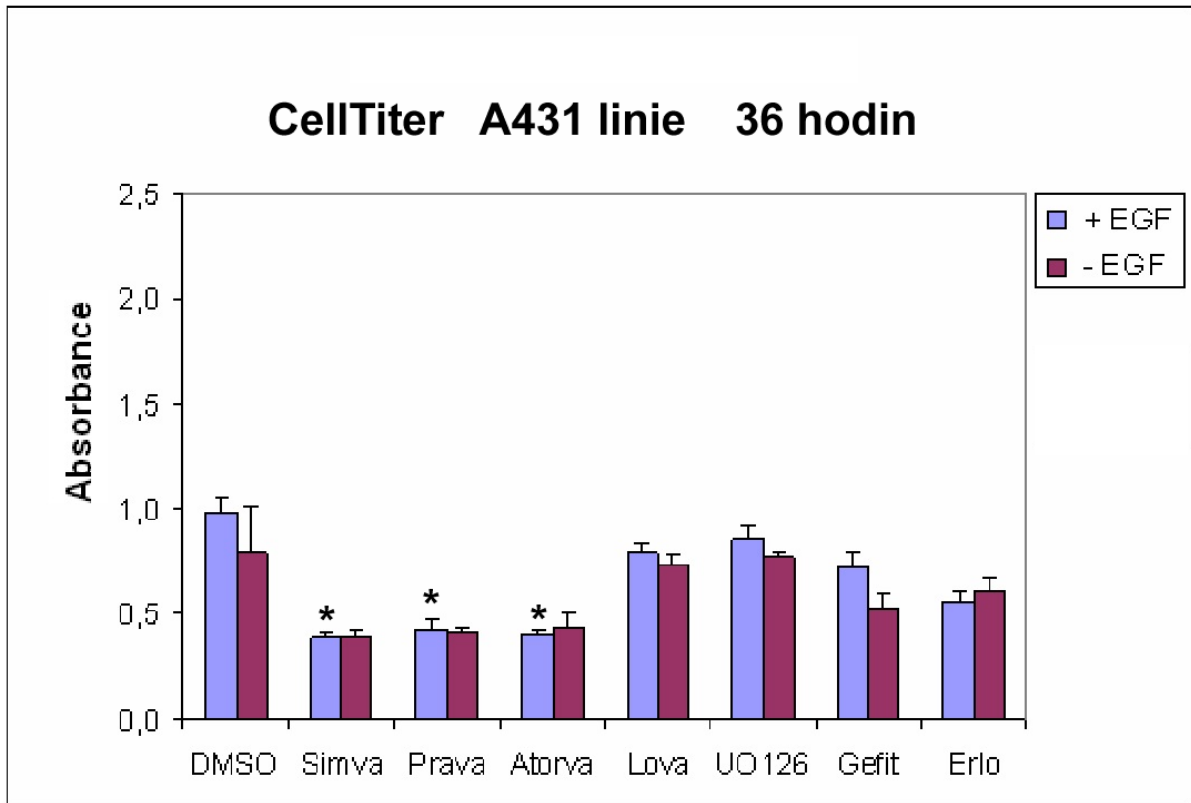
Tímto experimentem jsme popsali závislost aktivity Elk1 na koncentraci statinů (v čase 38 hodin). U simvastatinu, lovastatinu a atorvastatinu je možné pozorovat sestupnou aktivitu Elk1 na rostoucí koncentraci statinů. Vliv koncentrace pravastatinu na aktivitu Elk1 jsme nepotvrdili. Pozitivními kontrolami (erlotinib (10 μ M) a gefitinib (10 μ M) s EGF (50 ng/ml)) i samotnou kontrolou s EGF (50 ng/ml) jsme validovali metodu.

5.2 CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

Pracovali jsme na 96-jamkových destičkách s testovanými látkami v kvadruplikátech. Jedna identická polovina destičky byla v designu: látka s EGF (50 ng/ml) a druhá polovina destičky: látka bez EGF. Testovali jsme simvastatin (30 μ M), lovastatin (30 μ M), atorvastatin (30 μ M), pravastatin (30 μ M), inhibitory erlotinib (30 μ M), gefitinib (30 μ M) a U0126 (20 μ M). Kontrolu nám tvořily jamky s EGF (50 ng/ml) (obr. 14. a 15.).



Obr. 14. CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay na buněčné linii A431 s vybranými látkami po 22 hodinách



Obr. 15. CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay na buněčné linii A431 s vybranými látkami po 36 hodinách

Z výsledků je patrné, že nezaznamenáváme významné rozdíly v mitochondriální aktivitě u jednotlivých vorků s/bez EGF. Efekt některých statinů (simvastatin, pravastatin, atorvastatin) je patrný především po 36 hodinovém experimentu ve srovnání s kontrolou a tento efekt byl statisticky signifikantní ($p < 0.05$).

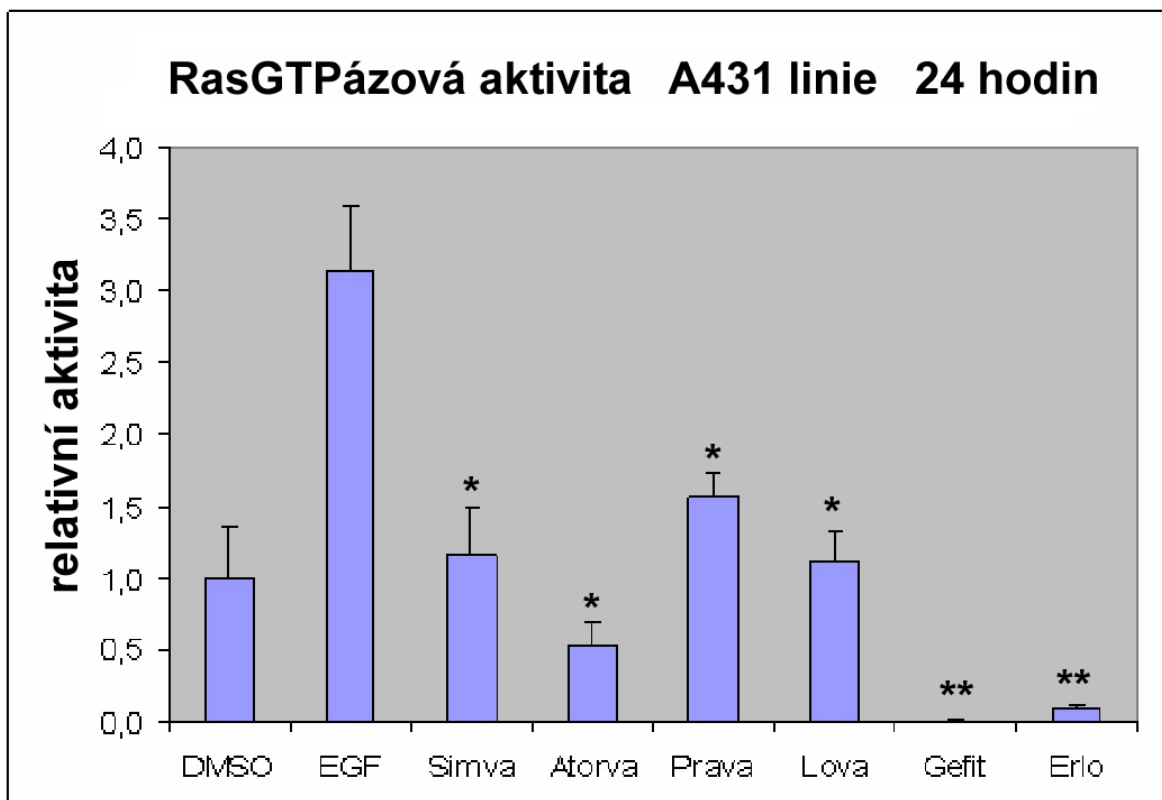
5.3 Ras GTPase Chemi ELISA

Buňky linie A431 jsem kultivovali na 6-jamkových platech s testovanými látkami po dobu 24 hodin. Aktivitu Ras jsme analyzovali z buněčného lyzátu.

Ras GTPase Chemi ELISA experiment jsem provedli v designu čtyř zástupců statinů (simvastatin, lovastatin, pravastatin, atorvastatin (30 μ M)), každý v triplikátu (lovastatin v duplikátu). Jako pozitivní kontrolu jsme použili cytostatika (erlotinib (30 μ M) a gefitinib (30 μ M)) v duplikátu. Pokus jsme realizovali na glutathionem potažené 96-jamkové destičce v uspořádání: testované látky s EGF (50 ng/ml). Duplikátem jamek bez testovaných látek

pouze s EGF (50 ng/ml) jsme si vytvořili kontrolu. Aktivitu Ras na jamce jsme vztáhli k celkovému proteinu lyzátu. K jeho stanovení jsme použili BCA assay (obr. 16.).

Významný účinek EGF a výrazný efekt cytostatik erlotinibu a gefitinibu potvrzují citlivost testu. Z obr. 16. je patrné, že statiny svoji aktivitou potlačují aktivitu Ras.



Obr. 16. Ras GTPase Chemi ELISA na buněčné linii A431 s vybranými látkami po 24 hodinách

Z buněk exponovaných testovanými látkami jsme připravili lyzáty. Buňky, které byly vystaveny statinům (30 μ M) spolu s EGF (50 ng/ml) měli signifikantně nižší ($p < 0.05$) aktivitu Ras oproti kontrole (EGF (50 ng/ml)). Erlotinib (30 μ M) a gefitinib (30 μ M) spolu s EGF (50 ng/ml) významně snížily aktivitu Ras ve srovnání s kontrolou ($p < 0.01$).

6 Diskuze

Cílem této experimentální práce bylo ověřit vliv vybraných statinů (simvastatinu, pravastatinu, lovastatinu a atorvastatinu) na aktivitu transkripčního faktoru Elk1 a enzymu Ras na buněčné linii A431. Dále jsem testovali účinek statinů na buněčnou viabilitu linie A431.

Na základě našich výsledků předpokládáme, že statiny snižují aktivitu transkripčního faktoru Elk1. Podstata efektu pravděpodobně spočívá v zásahu statinů do signální kaskády RTK/Ras/Raf/MEK/ERK. Nelze však vyloučit alternativní cestu aktivace Elk1 jinou signální cestou. Pokud porovnáme jednotlivé zástupce, tak simvastatin a lovastatin nejdéle potlačují aktivitu Elk1. To může souviset s jejich strukturou, neboť obě zmíněné molekuly představují proléčiva na rozdíl od atorvastatinu a pravastatinu. U pravastatinu jsme hodnověrně nepotvrdili efekt na aktivitu Elk1 transkripčního faktoru. Statiny potlačují aktivitu Elk1 úměrně s jejich zvyšující se koncentrací (vyjma pravastatinu).

Metodou CellTiter jsme chtěli zjistit, jak ovlivní statiny mitochondriální aktivitu buněk (což nepřímo indikuje možný cytotoxický účinek statinů). Vysoký signál se dá reprodukovat jako zvýšená buněčná aktivita či proliferace. Naopak nízký signál jako cytotoxický účinek testovaných látek. Z výsledků nezaznamenáváme významné rozdíly v mitochondriální aktivitě mezi buňkami s/bez EGF. Statiny mírně negativně zasahují do této aktivity až po 36 hodinách od přidání k buňkám (obr. 15).

Vliv statinů na aktivaci proteinu Ras je v posledních letech v popředí vědeckého zájmu, neboť přítomnost mutovaného Ras je podkladem patogeneze řady lidských nádorů. Zásah do deregulované signalizační funkce enzymu Ras statiny, vytváří předpoklad pro účinný boj s rakovinou (Walker a Olson, 2005).

Řada experimentálních prací se zaměřila na sledování vlivu statinů na aktivitu Ras. Při expozici MCF10A lidských epitelových buněk prsu simvastatinem a lovastatinem se snížil isoprenylovaný H-Ras v membránové frakci, zatímco se zvýšil neprenylovaný H-Ras v cytosolické frakci. To dokazuje, že statiny inhibují membránové ukotvení H-Ras v MCF10A buňkách. Změny v obou frakcích byly závislé na dávce statinů (pozn. testováno v rozmezí 0-50 μM simvastatinu a lovastatinu). Simvastatin a lovastatin snížily také aktivitu H-Ras sestupných signálních molekul v MCF10A buňkách. Aktivita Raf, MEK, ERK klesala v závislosti na koncentraci simvastatinu a lovastatinu. K detekci signálních molekul byla použita metody western blot (Kang a kol., 2009).

Na buněčné linii U266 lovastatin indukuje (po dvou dnech inkubace) přesun membránově vázaného Ras do cytosolu (koncentrace lovastatinu 10 a 30 μM). Ras byl analyzován metodou western blot (van de Donk a kol., 2002).

Na základě našich výsledků z Ras GTPase Chemi ELISA můžeme konstatovat, že testované statiny (simvastatin, pravastatin, lovastatin a atorvastatin) snižují aktivitu Ras GTPázy na buněčné linii A431 vystavené EGF. Přítomnost EGF v experimentu je důležitá, protože spouští ERK kaskádu a umožní hodnotit vliv statinů na fosforylaci proteinu Ras. Logický je i efekt inhibitorů EGFR, které působí na receptor ERK kaskády, jež spouští Ras protein i celou kaskádu.

Teoretický terapeutický potenciál statinů spočívá také v možné kombinované léčbě s cytostatiky. Kombinace lovastatinu a gefitinibu efektivně snižuje aktivitu Ras a fosforylaci Raf, ERK1/2 a EGFR na buněčné linii NSCLC s K-Ras mutací. Lovastatin pomáhá překonat rezistenci buněk na gefitinib zásahem do aktivity K-Ras proteinu, jehož mutace je s rezistencí spojována (Park a kol., 2010).

7 Závěr

Pomocí metody PathDetect[®] Elk1 trans-Reporting System jsme testovali vliv vybraných statinů na aktivitu transkripčního faktoru Elk1 na buněčné linii A431. Na základě výsledků můžeme konstatovat, že statiny negativně zasahují do aktivity Elk1 transkripčního faktoru. Pokusy byly navrženy v intervalech 14, 22, 40 hodin. Ze statinů nejvíce inhibovaly aktivitu Elk1 simvastatin a lovastatin. Tato skutečnost souvisí patrně s povahou jejich molekuly, neboť byly použity ve formě proléčiva. Sledovali jsme také vliv koncentrační závislosti statinů na aktivitu Elk1. Potvrdili jsme závislost zvyšující se koncentrace některých statinů na snižující se aktivitu Elk1. Pouze u pravastatinu jsme neprokázali jednoznačný efekt na aktivitu transkripčního faktoru Elk1.

S využitím metody Ras GTPase Chemi ELISA jsme zjistili, že statiny potlačují aktivitu enzymu Ras v buněčné linii A431.

Účinek statinů na buněčnou aktivitu jsme testovali využitím metody CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. Nízký signál, který se dá reprodukovat jako snížená buněčná aktivita či cytotoxicita testovaných látek byla zaznamenána u statinů (simvastatinu, pravastatinu, atorvastatinu) po 36 hodinovém „treatmentu“ buněk linie A431.

Zvýšená aktivita ERK signální kaskády je popisována v řadě nádorových buněčných linií. Statiny zásahem do biosyntézy steroidních látek zasahují do aktivity signálních proteinů ERK signální kaskády. Popsali jsme efekt statinů na úrovni enzymu Ras a transkripčního faktoru Elk1 na buněčné linii A431. Výsledky mohou podpořit význam statinů jako potenciálních cytostatik.

8 Literatura

A431 [online]. Dostupné z: <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=A431> (březen 2011)

A431 cell line human [online]. Dostupné z:

http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=85090402|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC (duben 2011)

Adam Z., Pour L., Vorlíček J., Hájek R., Koptíková J., Šmardová J., Cílená léčba v onkologii, *Remedia*, 2005, roč. 15, č. 4-5, s. 390-404

Ali B. R., Nouvel I., Leung K. F., Hume A. N., Seabra M. C., A novel statin-mediated “prenylation block-and-release” assay provides insight into membrane targeting mechanisms of small GTPase, *Biochem Biophys Res Commun.*, 2010, roč. 397, č. 1, s. 34-41

Bicinchoninic Acid Kit [online]. Dostupné z:

<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/proteomics/protein-quantitation/bicinchoninic-acid-kit.html> (duben 2011)

CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) [online]. Dostupné z:

http://www.promega.com/catalog/catalogproducts.aspx?categoryname=productleaf_649&ckt=1 (duben 2011)

Felgner P. L., Gadek T. R., Holm M., Roman R., Chan H. W., Wenz M., Northrop J. P., Ringold G. M., Danielsen M., Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1987, roč. 84, č. 21, s. 7413-7

Graaf M. R., Beiderbeck A. B., Egberts A. C., Richel D. J., Guchelaar H. J., The risk of cancer in users of statins, *J Clin Oncol.*, 2004, roč. 22, č. 12, s. 2388-2394

Hartl J., Doležal M., Krinková J., Miletín M., Opletalová V., *Farmaceutická chemie III.*, 1. vydání, Praha: Karolinum, 2006. s.117

Herrero-Martin G., López-Rivas A., Statins activate a mitochondria-operated pathway of apoptosis in breast tumor cells by a mechanism regulated by ErbB2 and dependent on the prenylation of proteins, *FEBS Lett.*, 2008, roč. 582, č. 17, s. 2589-2594

Iressa [online]. Dostupné z: http://www.astrazeneca.cz/onkologie/IressaSPC_2010.pdf (březen 2011)

Kang S., Kim E. S., Moon A., Simvastatin and lovastatin inhibit breast cell invasion induced by H-Ras, *Oncol Rep.*, 2009, roč. 21, č. 5, s. 1317-22

Min L., He B., Hui L., Mitogen-activated protein kinases in hepatocellular carcinoma development, *Semin Cancor Biol.*, 2011, roč. 21, č. 1, s. 10-20

Morgan M. A., Sebil T., Aydilek E., Peest D., Ganser A., Reuter C. W., Combining prenylation inhibitors causes synergistic cytotoxicity, apoptosis and disruption of RAS-to-MAP kinase signalling in multiple myeloma cells, *Br J Haematol.*, 2005, roč. 130, č. 6, s. 912-925

Park I. H., Kim J. Y., Jung J. I., Han J. Y., Lovastatin overcomes gefitinib resistance in human non-small cell lung cancer cells with K-Ras mutations, *Invest New Drugs.*, 2010, roč. 28, č. 6, s. 791-9

Ras GTPase Chemi ELISA Kit [online]. Dostupné z: <http://www.activemotif.com/documents/104.pdf> (duben 2011)

PathDetect Trans-Reporting Systems [online]. Dostupné z: <http://www.genomics.agilent.com/CollectionSubpage.aspx?PageType=Product&SubPageType=ProductDetail&PageID=1359> (duben 2011)

Souhrn údajů o přípravku [online]. Dostupné z:

www.sukl.cz/download/spc/SPC90173.doc (březen 2011)

www.sukl.cz/download/spc/SPC9332.pdf (březen 2011)

www.sukl.cz/download/spc/SPC113454.doc (březen 2011)

www.pfizer.cz/files/spc/pfizer/Sortis/Sortis-SPC.pdf (březen 2011)

Špinarová L., Vítovec J., Statiny a srdeční transplantace, *Remedia*, 2005, roč. 15, č. 2, s. 154-157

Tarceva [online]. Dostupné z:

http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000618/WC500033989.pdf (březen 2011)

The ERK Signal Transduction Pathway [online]. Dostupné z:

http://www.rndsystems.com/mini_review_detail_objectname_MR04_ERKSignalTransduction.aspx (únor 2011)

TransFectin Lipid Reagent [online]. Dostupné z:

http://www3.bio-rad.com/B2B/BioRad/product/br_category.jsp?BV_SessionID=@@@@0736058395.1301662751@@@&BV_EngineID=ccccfadfdejhhdcfngcfkmdhkkdfm.0&divName=Life+Science+Research&loggedIn=false&serviceLevel=Lit+Request&lang=English&csel=CZ&catLevel=6&catOID=-28743&isPA=false&categoryPath=%2fCatalogs%2fLife+Science+Research%2fGene+Transfer%2fProducts%2fLipid+Transfection%2fTransFectin+Lipid+Reagent (duben 2011)

Vaklavas C., Chatzizisis Y. S., Tsimberidou A. M., Common cardiovascular medications in cancer therapeutics, *Pharmacol Ther.*, 2011, roč. 130, č. 2, s. 177-190

van de Donk N. W., Kamphuis M. M., Lokhorst H. M., Bloem A. C., The cholesterol lowering drug lovastatin induces cell death in myeloma plasma cells, *Leukemia.*, 2002, roč. 16, č. 7, s. 1362-71.

Walker K., Olson M. F., Targeting Ras a Rho GTPases as opportunities for cancer therapeutics, *Curr Opin Genet Dev.*, 2005, roč. 15, č. 10, s. 62-68

Wojtkowiak J. W., Gibbs R. A., Mattingly R. R., Working together: Farnesyl transferase inhibitors and statins block protein prenylation, *Mol Cell Pharmacol.*, 2009, roč. 1, č. 1, s. 1-6

Zwick E., Hackel P. O., Prenzel N., Ullrich A., The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems, *Trends Pharmacol Sci.*, 1999, roč. 20, č. 10, s. 408-412

Seznam obrázků

Obr. 1. Chemická struktura statinů

<http://www.pharmaceutical-technology.com/projects/merck/merck5.html> (březen 2011)

Obr. 2. Farmakofor statinů

<https://secure.pharmacytimes.com/lessons/images/200411-04/20041104f1.gif> (březen 2011)

Obr. 3. Přeměna 3-hydroxy-3-metylglutaryl-CoA na mevalonát

<http://www.dentistry.leeds.ac.uk/biochem/MBWeb/mb2/part1/cholesterol.htm> (upraveno, březen 2011)

Obr. 4. Srovnání HMG-CoA s farmakoforem lovastatinu

<http://genomebiology.com/2004/5/11/248/figure/F3?highres=y> (březen 2011)

Obr. 5. Úsek ERK kaskády od EGFR k Raf

http://www.rndsystems.com/mini_review_detail_objectname_MR04_ERKSignalTransduction.aspx (únor 2011)

Obr. 6. Úsek ERK kaskády od Raf k ERK

http://www.rndsystems.com/mini_review_detail_objectname_MR04_ERKSignalTransduction.aspx (únor 2011)

Obr. 7. Prenylace Ras

http://www.nature.com/nrc/journal/v3/n1/box/nrc969_BX1.html (březen 2011)

Obr. 8. Gene reporter assay

http://theravalues.com/english/services/ana_reporter.html (upraveno, duben 2011)

Obr. 9. Popis redukce MTS na barevný formazan

<http://www.promega.com/tbs/tb245/tb245.pdf> (upraveno, duben 2011)

Obr. 10. PathDetect[®] Elk1 trans-Reporting System na buněčné linii A431 s vybranými

látkami po 14 hodinách

Obr. 11. PathDetect[®] Elk1 trans-Reporting System na buněčné linii A431 s vybranými látkami po 22 hodinách

Obr. 12. PathDetect[®] Elk1 trans-Reporting System na buněčné linii A431 s vybranými látkami po 40 hodinách

Obr. 13. PathDetect[®] Elk1 trans-Reporting System na buněčné linii A431 s koncentračními řadami statinů po 38 hodinách

Obr. 14. CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay na buněčné linii A431 s vybranými látkami po 22 hodinách

Obr. 15. CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay na buněčné linii A431 s vybranými látkami po 36 hodinách

Obr. 16. Ras GTPase Chemi ELISA na buněčné linii A431 s vybranými látkami po 24 hodinách

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Tomáš Smutný
Školitel: Doc. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.
Název diplomové práce: Vliv statinů na Ras/Raf/ERK signální kaskádu v modelové linii A431

ERK signální kaskáda hraje důležitou roli v řadě buněčných funkcí např. buněčné proliferaci, diferenciaci a přežití. Její nepřiměřená aktivace je často přítomna u lidských nádorů. Signální kaskáda se skládá z mnoha proteinů, ale v popředí zájmu jsou zejména zástupci podrodiny Ras (zvláště H-Ras nebo K-Ras). Ras jsou GTPázy, které jsou podstatně zahrnuty v onkogenesi mnoha lidských nádorů. Klíčovou úlohu ve funkci Ras představuje jejich posttranslační modifikace lipidy (prenylace). Kovalentní vazba isoprenoidového zbytku k Ras podporuje jeho připojení k plasmatické membráně a umožňuje jeho funkci. Isoprenoidy vznikají během syntézy cholesterolu jako jeho prekurzory. Inhibice prenylace vede k inaktivaci Ras a ERK signální kaskády a potlačuje nekontrolovatelné buněčné dělení tam, kde je přítomna aktivační mutace Ras. Statiny, hypolipidemika, inhibitory enzymu HMG-CoA reduktázy, inhibují syntézu mevalonátu nezbytného pro tvorbu isoprenoidů.

V této práci jsme testovali, zda statiny (simvastatin, pravastatin, lovastatin atorvastatin) inhibují syntézu produktů pro prenylací a následně potlačují aktivitu Ras a ERK signální kaskádu. Pro tento účel jsme využili ELISA assay a gene reporter assay. Pokusy byly provedeny na modelové buněčné linii A431 s velkým počtem receptorů epidermálního růstového faktoru. Přidání epidermálního růstového faktoru k buňkám A431 spouští ERK signální kaskádu a umožní studovat látky, které by mohly ovlivnit tuto kaskádu. Zjistili jsme, že statiny snižují aktivitu Ras v A431 buňkách a také snižují aktivitu transkripčního faktoru Elk1, který je zahrnut v ERK signální kaskádě. Dále jsme prostřednictvím CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay pozorovali vliv statinů na buněčnou aktivitu.

Výsledky by mohly podpořit terapeutický potenciál statinů u některých nádorů.

ABSTRACT

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Pharmacology and Toxikology

Candidate: Tomáš Smutný
Supervisor: Doc. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.
Title of diploma thesis: The effect of statins on the ERK signal transduction cascade in model cell line A431

The ERK pathway is the signal transduction cascade, which plays an important role in different cellular functions e.g. cellular proliferation, differentiation, and survival. Its inappropriate activation is often presented in human cancers. The pathway consists of the many proteins, but the interest concentrates especially on members of the Ras subfamily (particularly H-Ras or K-Ras). Ras proteins are GTPases, which are significantly included in the oncogenesis of many human cancers. The key role in the Ras proteins function represents their posttranslation modifications with the lipid. The covalent binding of prenyl moiety to Ras protein facilitates its attachment to the plasmatic membrane, which allows its function. The prenyl groups are formed during the synthesis of the cholesterol as its precursors. The inhibition of the prenylation results in Ras proteins inactivation of the ERK signal transduction cascade and suppression of uncontrolled cell division where the activating mutations of Ras proteins are presented. Statins hypolipidemic drugs an inhibitors of the enzyme HMG-CoA reductase, inhibit synthesis of the mevalonate necessary for formation the prenyl groups.

In the study, we tested whether statins (simvastatin, pravastatin, lovastatin and atorvastatin) inhibit prenyl groups synthesis and thus suppress Ras GTPase activity and ERK cascade activation. For the purpose we used ELISA assay and gene reporter assay on A431 cells which are model cell line with high levels expression of the epidermal growth factor receptor (EGFR). The addition epidermal growth factor to A431 cells triggers the ERK signal transduction cascade to make it possible to study compounds that may affect the cascade. We found that statins decrease activity of Ras proteins GTPase activity in A431 cells and also reduce function of Elk1 transcription factor, which is a downstream transcription factor activated by the ERK signal transduction cascade. We also used CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay to study effect of statins on the cell activity.

These finding could suppose therapeutic potential of statins in some tumors.