UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE

Bakalářská práce

Mechanismus protinádorového účinku seskviterpenických laktonů.

Mechanism of anti-cancer activity induced by sesquiterpene lactones.

František Filandr

Vedoucí práce : *RNDr. Petr Novák, Ph.D.*

Konzultant: *Mgr. Pavel Talacko*

PRAHA, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Petra Nováka Ph.D. a konzultanta Mgr. Pavla Talacka a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

Místo a datum: …..…….…… …..……

František Filandr

Poděkování:

Na úvod bych chtěl poděkovat svému konzultantovi Pavlu Talackovi za trpělivost a odbornou asistenci, jak při experimentální práci, tak při psaní. Také bych chtěl poděkovat vedoucímu práce Pavlu Novákovi za rady při kompozici a za připomínky k výsledné podobě práce. V neposlední řadě patří můj dík rodičům za jejich všeobecnou podporu a mé přítelkyni Růženě Liškové, za její trpělivost a morální podporu při dlouhých hodinách psaní.

Abstrakt:

Jedním ze způsobů, jak zamezit nádorovému bujení je způsobit diferenciaci, apoptosu, nebo nekrózu nádorových buněk. Bylo zjištěno, že skupina chemických látek, které indukují apoptosu a inhibují proliferaci u leukemických buněk, jsou laktony seskviterpenů, mezi které patří látka cnicin, nacházející se v rostlině *Cnicus benedictus*, užívaná (užívá se) mimo jiné jako hořký tonik v alkoholických nápojích. Mechanismus, jakým se tak děje není zatím znám, ale nedávno popsaná Hippo signalizační dráha se zdá být jedním z cílů těchto látek. Centrální kinasa této dráhy je protein MST1/2 a v této práci je popsána jeho aktivace cnicinem za odštěpení aktivní N-terminální domény. Dále je sledován vliv cnicinu na onkoprotein C-MYC, jeden z hlavních deregulovaných pro-proliferačních proteinů u leukemických buněk, jehož množství v buňce se vlivem cnicinu snižuje. Navíc pomocí kvantitativní PCR bylo zjištěno, že vlivem cnicinu dochází k významnému snížení exprese anti-apoptotických proteinů *BCL2*, MCL1 a onkogenu *cMYC*.

Abstract:

One way to stop tumor growth in organism is to induce differentiation, apoptosis or necrosis of tumor cells. A class of chemicals known to induce apoptosis and inhibit proliferation in leukemia cells are sesquiterpene lactones. One of these lactones is cnicin, a bitter tonic used in liqueurs, found in the plant *Cnicus benedictus*. The mechanism of this inhibition, is not fully understood but certain signaling pathways are suspected, mainly the recently discovered Hippo signaling pathway which controls the organ size and apoptosis in mammalian cells. The core kinase of this signaling pathway is MST1/2 protein and its activation by sesquiterpene lactone cnicin resulting in cleavage of its active N–terminal domain is observed in this work. Also, the effect of cnicin on down-regulating main oncoprotein deregulated in leukemia cells C-MYC is studied. In addition the results of q-PCR also show significant down-regulation of anti-apoptotic *BCL2* and *MCL1* genes and *cMYC* oncogene.

(In Czech)

Obsah:

Seznam zkratek: 6
1. Teoretický úvod 9
1.1. Rakovina 9
1.1.1. Rysy nádorového bujení a jeho fáze 9
1.1.2. Vybrané onkogeny a onkoproteiny a jejich funkce 10
1.1.2.1. Transkripční faktory 10
1.1.2.2. Proteiny měnící strukturu chromatinu 14
1.1.2.3. Růstové faktory a jejich receptory 15
1.1.2.4. Signalizační proteiny 17
1.2. Změny v buněčné signalizaci rakovinných buněk 17
1.2.1. MAPK/ERK 17
1.2.1.1. Ras/Raf/MEK/ERK a JNK/p38 18
1.2.2. PI3K/Akt 22
1.2.3. Hippo 23
1.3. Apoptosa 25
1.3.1. Signální dráhy vedoucí k apoptose 26
1.3.1.1. Vnější dráha 26
1.3.1.2. Vnitřní dráha 27
1.3.1.3. Perforin/Granzym dráha 30
1.4. Cnicin 31
2. Materiál a metody 32
2.1. Seznam přístrojů a chemikálií 32
2.1.1. Chemikálie 32
2.1.2. Materiál 32
2.1.3. Přístroje 33
2.2. Kultivace buněk 34
2.3. Zjištění efektivní dávky léčiva 34
2.4. Izolace a kvantifikace proteinů 34
2.5. Elektroforéza, elektropřenos (Western Blot) a imunodetekce 35
2.6. Izolace a kvantifikace RNA 36
2.7. Reverzní transkripce 36
2.8. Kvantitativní PCR 36
3. Cíl práce 38
4. Výsledky 39
4.1. Vliv cnicinu na viabilitu leukemických buněk 39
4.2. Vliv cnicinu na aktivaci MST1 40
4.2.1. Vliv cnicinu na C-MYC onkoprotein 41

4.2.2. DDX3 42
4.3. Vliv cnicinu na expresi vybraných genů 43
5. Diskuse 44
6. Závěr 46
6 Citovaná literatura 47

Seznam zkratek:

ABL1	protein kinasa, účastnící se regulace proliferace buněk (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1)
AIF	protein spouštějící kondenzaci chromatinu a fragmentaci DNA při apoptose nezávislé na caspasách (apoptosis inducing factor)
AKT	serin/threonin protein kinasa, hrající úlohu při apoptose
AP-1	transkripční faktor (activator protein 1)
Apo2L	ligand TNF receptoru, spouštějící apoptosu
Apo3L	ligand TNF receptoru, spouštějící apoptosu
ATF	transkripční faktor (activating transcription factor) se schopností acetylovat histony
BCL-2	rodina proteinů, regulují propustnost vnější mitochondriální membrány
BCL-XL, BAD, BAX, BID, BIK, BIM, BLK, MCL1, MCL2	proteiny z rodiny BCL-2
CD95, APO-1	jiné názvy pro „receptor smrti“ FAS
CDK	Cyklin-dependentní kinasy – proteiny regulující buněčný cyklus
C-MYC	transkripční faktor podporující proliferaci
c-Raf	protoonkogen, signalizační protein účastnící se regulace proliferace a apoptosy
CSF-1	růstový faktor (colony stimulating factor)
DISC	proteinový **„**komplex smrti“ (Death-Inducing Signalling Complex)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DR3	jeden z TNF „receptorů smrti“
DR4	jeden z TNF „receptorů smrti“
EGF	mitogen stimulující buněčné dělení (epidermal growth factor)
EGFR	receptor pro EGF
ERK	skupina signalizačních kinas, účastnící se signalizace v rámci MAPK dráhy
FAK	tyrosinová kinasa, regulující adhezi a pohyb buněk (jiný název: PTK2 – protein kinase 2)
FAS	„receptor smrti“ z TNFR rodiny proteinů
FASL	„ligand smrti“ způsobující apoptosu
FLT1	gen kódující VEGFR
Fos	proteinová rodina, tvořící v kombinaci s proteiny JUN transkripční faktory AP-1
FOX	rodina transkripčních faktorů, ovlivňujících proliferaci, buněčný cyklus a metabolismus („forkhead box“ proteiny)
FoxO	skupina proteinů z rodiny FOX, podporující proliferaci buněk
Grb2	adaptorový protein, účastnící se signalizace EGFR (
HAT	protein acetylující histony a podporující transkripční aktivitu lokusu (histone acetyl transferase)
HDAC	protein deacetylující histon (histone deacetylase)
HGF	růstový faktor podporující proliferaci u epiteliálních a endoteliálních buněk, a helatocytů (Hepatocyte growth factor)
HtrA2/Omi	serinová peptidasa, nacházející se v mitochondriích a štěpící během apoptosy protein IAP
IAP	rodina proteinů inhibující apoptosu (Inhibitor of Apoptosis)
IGF	růstový faktor (insulin-like growth factor)

IGFR receptor pro IGF

IL-1 interleukin – 1, cytokin

INO80 protein remodelující chromatin

IP3 signalizační molekula v PI3K dráze

ISWI protein remodelující chromatin z rodiny SWI/SNF

IκB protein inhibující funkci NF-κB

JNK C-Jun NH_2-terminální kinasa, signální kinasa

JUN rodina proteinů, tvořící spolu s protein z rodiny Fos transkripční faktory AP-1

LATS1/2 kinasy, součást signalizační kaskády Hippo signalizační dráhy

LDH enzym laktát dehydrogenasa

Maf transkripční faktor

MAPK mitogeny aktivovaná protein kinasa, rodina signalizačních proteinů

MEK pro-apoptotická protein kinasa, aktivující MAPK

MKK protein kinasa, hrající roli v MAPK buněčné signalizaci

MOS serin/threonin kinasa kódovaná genem *MOS*

mRNA mediátorová ribonukleová kyselina

MST1/2 centrální efektorové kinasy Hippo signalizační dráhy

mTOR serin/threonin kinasa, regulující apoptosu a proliferaci, patřící do roiny PI3K proteinů (mammalian target of rapamycin)

NF-κB/REL skupina signalizačních proteinů a transkripčních faktorů zodpovědná za reakci buňky na cytokiny, stres a za imunitní odpověď

NOS rodina proteinů katalyzující produkci oxidu dusnatého (Nitric oxide synthases)

NuRD/Mi-2 proteinový komplex, remodelující chromatin se schopností acetylovat histony

p38 protein kinasy, aktivované stresem, či cytokiny a regulující buněčnou proliferaci a apoptosu

PAK2 serin/threonin protein kinasa, hrající úlohu při apoptose

PALS1 protein účastnící se tvorby mezibuněčných spojení a regulující buněčnou diferenciaci

PATJ protein účastnící se tvorby mezibuněčných spojení a regulující buněčnou diferenciaci

PDGF růstový faktor produkovaný krevními destičkami (platelet-derived growth factor)

PI3K skupina proteinů, zpracovávající extracelulární signály a fosforylující inositolový kruh (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase)

PIM-2 serin/threonin kinasa, hrající roli při proliferaci, apoptose a diferenciaci buněk

PLC hydrolytický enzym, napomáhající tvorbě IP3

RAF1 gen, kódující protoonkogen c-Raf

Ras protoonkogen, signalizační protein účastnící se regulace proliferace a apoptosy

RasGAP protein, deaktivující signalizační protein Ras (Ras GTPase activating protein)

RNA ribonukleová kyselina

SAV1 regulační protein Hippo signalizační dráhy

SCRIB membránový protein, účastnící se regulace buněčné diferenciace a pohybu buňky

SET onkoproteiny s mnoha funkcemi, jehož nadměrná exprese byla nalezena u mnoha typů rakoviny

SH2 doména proteinů, vázající se na fosforylovaný tyrosin (src-homologní doména)

SMAC/DIABLO pro-apoptotický protein, nacházející se na mitochondriální membráně a aktivovaný

	caspasami, inhibující proteiny IAP
SMAD	skupina signalizačních proteinů, které vede signály z TGF receptorů
SOS	skupina genů, kódující proteiny účastnící se buněčné signalizace v dráze Ras/Raf/MEK/ERK (Son of Sevenless)
Src	tyrosin kinasa, jejíž zvýšená aktivita je spojena s rakovinou
SWI/SNF	rodina proteinů, se schopností remodelovat chromatin (SWItch/Sucrose NonFermentable)
TAZ	transkripční koaktivátor v Hippo signalizační dráze
TEAD	transkripční faktor, spolupracující s YAP proteinem
TGF	cytokiny regulující buněčné dělení (transforming growth factor)
TNFR	rodina receptorů molekuly TNF
TNF-α	cytokin regulující imunitní odpověď a apoptosu buněk (tumor necrosis factor)
UV	ultrafialové záření
VEGF	růstový faktor (vascular endothelial growth factor)
VEGFR	receptor pro VEGF
YAP1	transkripční koaktivátor a onkoprotein (Yes-associated protein)

1. Teoretický úvod

1.1. Rakovina

1.1.1. Rysy nádorového bujení a jeho fáze

Nádorové bujení je stav, kdy se buňky v těle vlivem poškození genetické informace uložené ve formě DNA, a to nejčastěji genů pro transkripční faktory či kontrolní mechanismy buněčného cyklu, začnou nekontrolovatelně dělit a ignorovat signály, kterými jsou buněčné cykly zdravých buněk přirozeně regulovány. Vznikající nádorová tkáň se rozrůstá do okolní tkáně, čímž může poškodit životně důležité orgány. Jediná genetická změna však většinou nepostačuje pro vyvolání maligního nádoru. Většina důkazů ukazuje, že v rakovinných buňkách dochází k vícestupňovému procesu se změnami v několika onkogenech, tumor-supresorových genech a genech kódujících miRNA najednou [1].

Poškození DNA v buňce může nastat jak vlivy fyzikálními, tak chemickými. Hlavním fyzikálním vlivem, je vystavení molekuly DNA UV záření, kdy se poškození projevuje tvorbou dimerních bází, například cyklobutan-pyrimidinových dimerů (CPD) [2]. Chemické vlivy zahrnují interakci DNA s mutagenními látkami. Takovéto genotoxické látky, například polycyklické aromatické uhlovodíky mohou tvořit kovalentní vazby s bázemi v DNA, takzvané DNA adukty [3]. Další změny v DNA se mohou projevit jako delece, nebo translokace části chromosomů. Onkogeny se tak mohou translokovat do transkripčně vysoce aktivních lokusů, což má za následek zvýšení jejich exprese. Exprese tumor supresoru je naopak snižována delecemi [1].

Chyby v DNA jsou většinou odstraněny některým z mnoha mechanismů, které jsou v buňce za opravu genetické informace zodpovědné. Nedojde-li však k opravě, chyba se natrvalo implementuje do DNA (fixace mutace). Pokud má tato buňka selekční výhodu proti ostatním buňkám v tkáni, stává se buňkou iniciovanou. Po iniciaci následuje dlouhé (řádově roky) období promoce, kdy jsou iniciované buňky dále podporovány v proliferaci dalšími mutacemi. Progrese je finální fáze, kdy dojde k takové akumulaci chyb v regulaci buněčného cyklu a metabolismu buněk, která vyústí v úplnou deregulaci buněčného cyklu a transformaci buněk na maligní formu. Nádor se poté vyznačuje agresivním šířením do okolí na úkor okolních buněk (invaze) a šířením krevním řečištěm do jiných tkání (metastáze).

Nádory taktéž obsahují širokou škálu klonů, které vznikají z první iniciované buňky rozdílnými mutacemi v progresní fázi. Nádor se proto nemusí chovat jednotně například v reakci na chemoterapii čí radioterapii, což značně ztěžuje léčbu.

1.1.2. Vybrané onkogeny a onkoproteiny a jejich funkce

Onkogeny nejčastěji kódují proteiny, které kontrolují buněčnou proliferaci, apoptosu, nebo obojí. Mohou být aktivovány strukturními změnami, které jsou výsledkem mutací, translokacemi či amplifikacemi genu. Tyto změny mohou být změnami iniciačními, nebo může jít o kumulativní změny v progresní fázi rakoviny. Produkty onkogenů mohou být zařazeny do šesti širších skupin. Může jít o: transkripční faktory, proteiny měnící strukturu chromatinu (chromatin remodeler), růstové faktory, receptory růstových faktorů, proteiny signalizačních drah a regulátory apoptosy [1].

1.1.2.1. Transkripční faktory

Funkce transkripčních faktorů spočívá v ovlivnění míry exprese určitého genu na úrovni transkripce, přičemž míru exprese většinou zvyšují. Ke své funkci často vyžadují interakci s jinými proteiny, příkladem může být transkripční protein Fos, který po dimerizaci s jiným transkripčním proteinem Jun vytvoří finální transkripční faktor AP-1, zvyšující míru exprese několika genů, kontrolujících buněčné dělení. Nejčastější způsob jejich nadměrné aktivace, která může být jednou z příčin rakovinného bujení, je jejich translokace. Funkce transkripčních faktorů může být inhibována na úrovni jeho interakce s koaktivátorem či korepresorem, nebo na úrovni jejich finální interakce a vazby na molekulu DNA [4].

NF-κB/REL

Jedna z hlavních skupin transkripčních faktorů je NF-κB/REL rodina proteinů. Sestává z proteinů p50, p65, c-rel, relB, a p52, které tvoří homo- a heterodimery [4]. Všechny proteiny z této rodiny mají strukturně konzervovanou N-terminální homologní doménu, která je zodpovědná za dimerizaci a vazbu na DNA. V nestimulované buňce jsou proteiny NF-κB udržovány v cytoplazmě interakcí s inhibitory IκB. Fosforylace a degradace proteinů IκB je reakcí na přítomné cytokiny jako například IL-1 a TNF-α, endotoxiny, viry, UV záření, a také růstové faktory a způsobí translokaci proteinů NF-κB do jádra, kde se váží do regulačních sekvencí promotorů, či enhancerů cílových genů, kterými jsou geny pro cytokiny, chemokiny, proteiny pro adhezi buněk, iNOS, regulační proteiny buněčného cyklu a anti-apoptotické proteiny. Buňky se zvýšenou expresí NF-κB vykazují resistenci k chemoterapii a radioterapii potlačováním apoptotických stimulů zvýšením exprese anti-apoptotických genů, například c-IAPI inhibující caspasu 3 a caspasu 7, nebo BCL-xL. Bylo dokázáno, že inhibice NF-κB způsobuje větší apoptotickou reakci při radioterapii [5].

AP-1

Další důležitá skupina transkripčních faktorů, je rodina proteinů AP-1 (Activator Protein-1). Jde o dimerní komplexy, skládající se kombinací dvou z několika různých členů proteinových rodin JUN, FOS, ATF a MAF (tabulka 1, str. 9). Regulace AP-1 spočívá v regulaci exprese podjednotek, ze kterých se skládá a regulace stability jejich mRNA. Analýza jejich funkce na myších ukázala, že každá podjednotka tvořící proteiny AP-1 má specifickou funkci během embryogeneze a organogeneze. Podjednotky c-Fos, c-Jun a FosB, které obsahují transaktivační domény mají schopnost sami transformovat buňky v kultuře a pokud je jejich exprese nadměrně zvýšená, způsobují nádorové bujení, jako například podjednotka c-Jun, která při nadměrné expresi způsobuje jaterní nádory. Naopak podjednotky, které nemají transformační schopnost, mohou tumorogenezi potlačovat [4].

Název genu	Buněčný proces
JunB	**Diferenciace fibroblastů, keratinocytů, granulocytů, T buněk a buněk kostí** Stimulace a inhibice proliferace Podpora angiogeneze
JunD	**Diferenciace T buněk** Stimulace a inhibice proliferace Inhibice apoptosy
Jun	**Diferenciace fibroblastů, keratinocytů, granulocytů a buněk kostí** Stimulace proliferace Stimulace a inhibice apoptosy Podpora invaze nádorových buněk
Fos	**Diferenciace buněk kostí** Stimulace proliferace Stimulace a inhibice apoptosy Podpora invaze nádorových buněk
Fra1	**Diferenciace buněk kostí** Stimulace apoptosy Podpora angiogeneze Podpora invaze nádorových buněk
Fos B	Stimulace proliferace

*Tabulka 1: Funkce **podjednotek** proteinů AP-1. (Upraveno podle* [4]*.)*

Role AP-1 v kontrole buněčné proliferace byla odvozena od pozorování, že jejich aktivita a exprese se během buněčného cyklu charakteristicky mění. Zatímco c-Jun podporuje proliferaci aktivací transkripce pozitivních regulátorů progrese buněčného cyklu, JunB a JunD jsou naopak spíše negativními regulátory proliferace.

V závislosti na podmínkách v buňce a podjednotkách, ze kterých jsou AP-1 složené, mohou indukovat apoptosu například zvýšením exprese Fas ligandu, který indukuje apoptosu pomocí Fas receptoru (kapitola 1.3.1.1), nebo naopak potlačovat apoptosu pozitivní regulací anti-apoptotických genů.

STAT

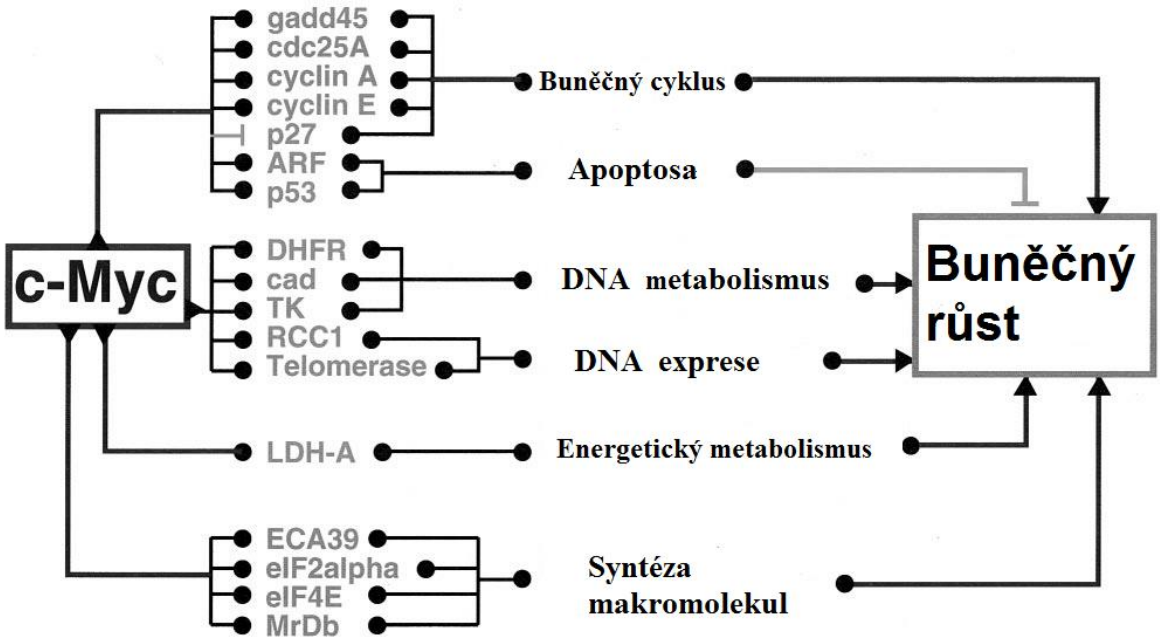
Proteinová rodina STAT (signal transducers and activators of transcription) je skupina transkripčních faktorů, aktivovaných mnoha signálními drahami, jež jsou často aktivní v rakovinných buňkách. Jsou zodpovědné za buněčnou odezvu na cytokiny, a růstové faktory, přes receptory EGF, HGF a PDGF, které mají na vnitřní straně membrány tyrosin kinasovou doménu.

Aktivace proteinů STAT spočívá ve fosforylaci neaktivní formy proteinu, který se nachází volně v cytoplazmě a nastává po navázání cytokinů, nebo růstových faktorů na jejich receptory na povrchu buňky. Fosforylovaný STAT vytváří dimery, které translokují do jádra a váží se na specifická místa (STAT-specific DNA-response elements) cílových genů na molekule DNA. Zatím bylo identifikováno sedm členů rodiny STAT a to STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b a STAT6. Tyto proteiny mají různé biologické funkce, včetně vlivu na diferenciaci buněk, jejich proliferaci, vývoj a apoptosu. Delecí jednotlivých genů STAT byly určeny jejich funkce. Delece STAT2 u myší je spojena s embryonální letalitou, z čehož lze usuzovat na důležitou roli těchto proteinů při embryonálním vývoji. Myši s vypnutým genem STAT1 byly náchylnější k virové a bakteriální infekci. Vyřazený gen STAT5 měl za následek defekty ve specifických tkáních, například v mléčné žláze.

Proteiny STAT regulují geny důležité pro proliferaci a apoptosu. Regulují anti-apoptotické geny z rodiny BCL-2, a to především BCL-X_L a MCL1, jejichž exprese je ovlivněna proteiny STAT3 a STAT5. Inhibice STAT3 signalizace vedla ke snížení exprese BCL-X_L a větší reakci na apoptosu způsobenou FAS signalizační dráhou (kapitola 1.3.1.1). Inhibice STAT3 i STAT5 proteinu u nádorových buněk vede ke snížení exprese MCL1 a k indukci apoptosy. STAT5 také reguluje transkripci cyklinů D1/D2 a jeho nadměrná aktivace vede k tumorogenezi deregulací komplexů D/CDK4-6, které kontrolují přechod buňky z G1 fáze do S-fáze buněčného cyklu.

MYC

Transkripční faktor C-MYC je obecný transkripční regulátor, které se může vázat až na 10% - 15% lidského genomu [6]. C-MYC silně stimuluje buněčnou proliferaci, ale zároveň reguluje apoptosu, senescenci a diferenciaci buněk a jeho zvýšená aktivita je zaznamenána u téměř všech lidských nádorových tkání. Jeho funkce nespočívá pouze v aktivaci genů, ale i v jejich inhibici. V dimeru s proteinem MAX, který se tvoří po fosforylaci C-MYC proteinu Pak2 kinázou, se váže na specifické sekvence 5'-CACGTG-3' (nazývané E box), které se nacházejí v regulační oblasti genů zodpovědných za buněčný růst, proliferaci a metabolismus buněk a aktivuje jejich expresi (obrázek 1) [6].



Obrázek 1: Geny, jejichž exprese je ovlivněná transkripčním faktorem C-MYC (upraveno podle [6]*).*

Bylo zjištěno, že myší buňky s rekombinačně eliminovaným genem c-*myc* mají prodloužený generační čas a analýza jednotlivých fází ukázala, že zatímco S-fáze zůstává časově stejná, k prodloužení dochází v G_1 a G_2 fázi. Spolu s faktem, že velikost buňky byla ve všech částech cyklu vzhledem k buňkám s aktivním *c-myc* nezměněná se zdá, že c-*myc* hraje důležitou roli v biosyntetických a metabolických drahách, ovlivňujících buněčný růst.

Jedna z funcí C-MYC, která při jeho deregulované expresi v nádorových buňkách podporuje růst a přežití nádoru se zdá být spuštění, či podpora Warburgova efektu [7].

Tento jev, ke kterému dochází v některých nádorových buňkách jako přizpůsobení se hypoxickému prostředí při nedostatečném zásobení krví, ale často se projevující i při dostatku kyslíku se vyznačuje zvýšením efektivity příjmu glukosy do buněk a jejím anaerobním metabolismem za produkce laktátu, místo aerobního, ve kterém je paradoxně možné získat mnohem více ATP [8]. Indukce Warburgova efektu je připisována několika onkogenům a tumor-supresorovým genům. Onkogen AKT je spojován se zvýšením aktivity glukosových transportérů na povrchu buňky a aktivací hexokinasy 2, což má za následek fosforylaci a zachycení intracelulární glukosy a právě MYC zvyšuje expresi téměř všech glykolytických proteinů. Jako cíl jeho regulace byl rozpoznán také gen *LDH-A*, který se podílí na normální anaerobní glykolýze a je často deregulován u nádorových buněk [8].

1.1.2.2. Proteiny měnící strukturu chromatinu

Forma a stupeň kompaktnosti chromatinu hraje důležitou roli při regulaci exprese a replikace DNA. Enzymy, které mění strukturu chromatinu (chromatin remodeler), jsou velké komplexy, vyvinuté v buňkách ke sbalení a rozbalení genomu a jsou to ATP-dependentní enzymy, které rozbalují, skládají a pohybují s nukleosomy. Tyto změny na struktuře chromatinu buď odhalí úseky DNA, nebo způsobí jejich těsnější navinutí na histony. Vzhledem k tomu, že jen odhalená DNA je schopna transkripce a replikace, určují tyto změny „epigenetický kód“ a tedy účinně regulují expresi genů v daných oblastech DNA. Deregulace struktury chromatinu může vést k nadměrné aktivaci onkogenů, či inhibici tumor-supresorových genů. Dosud jsou známy čtyři skupiny proteinů měnících strukturu chromatinu: SWI/SNF, ISWI, INO80 a NuRD/Mi-2 [9]. Přesto že tyto skupiny sdílejí mnoho podobností, jejich funkce jsou odlišné a nepřekrývají se.

Jako onkogeny mohou fungovat i enzymy, které post-translačně modifikují histony. Acetylace N-konce histonu v chromatinu má obecně za následek vyšší transkripční aktivitu acetylovaného lokusu. Enzymy HAT, které histony acetylují tedy mohou zvyšovat expresi onkogenů tím, že acetylují histony, na kterých se nacházejí. Tímto dojde ke zvýšení jejich transkripční aktivity a vyšší míra acetylace histonů byla skutečně detekována u mnoha nádorů. Podobně mohou fungovat enzymy HDAC, které naopak histony v chromatinu deacetylují, čímž snižují transkripční aktivitu a pokud histon obsahuje tumor-supresorové geny, může taktéž dojít k podpoře nádorového bujení [10].

1.1.2.3. Růstové faktory a jejich receptory

Růstové faktory jsou polypeptidy, které stimulují buněčnou proliferaci vazbou na specifické receptory na povrchu buňky. Některé (např. IGF, nebo VEGF) mohou regulovat i diferenciaci, či apoptosu buněk. Růstové faktory difundují od buněk, kde jsou tvořeny, mezibuněčným prostorem a působí většinou lokálně, na rozdíl od hormonů endokrinního systému, které jsou transportovány krví a působí na celý organismus. Tyto růstové faktory byly nalezeny prakticky ve všech tkáních a některé (CSF-1, interleukin 2) stimulují pouze několik typů buněk, a jiné (somatomedin C, EGF) stimulují širokou škálu buněčných typů, ať už buňky epiteliální, či buňky mezenchymatické [11]. Většina buněk vyžaduje ke své proliferaci více faktorů najednou. U nádorových buněk často dochází ke snížení závislosti, nebo úplné nezávislosti na růstových faktorech. Může se tak stát vlastní zvýšenou syntézou růstového faktoru v buňce, syntézou pozměněného receptoru daného růstového faktoru, nebo změnou v následné buněčné signalizaci, která odstraní potřebu růstového faktoru k vyvolání signálu.

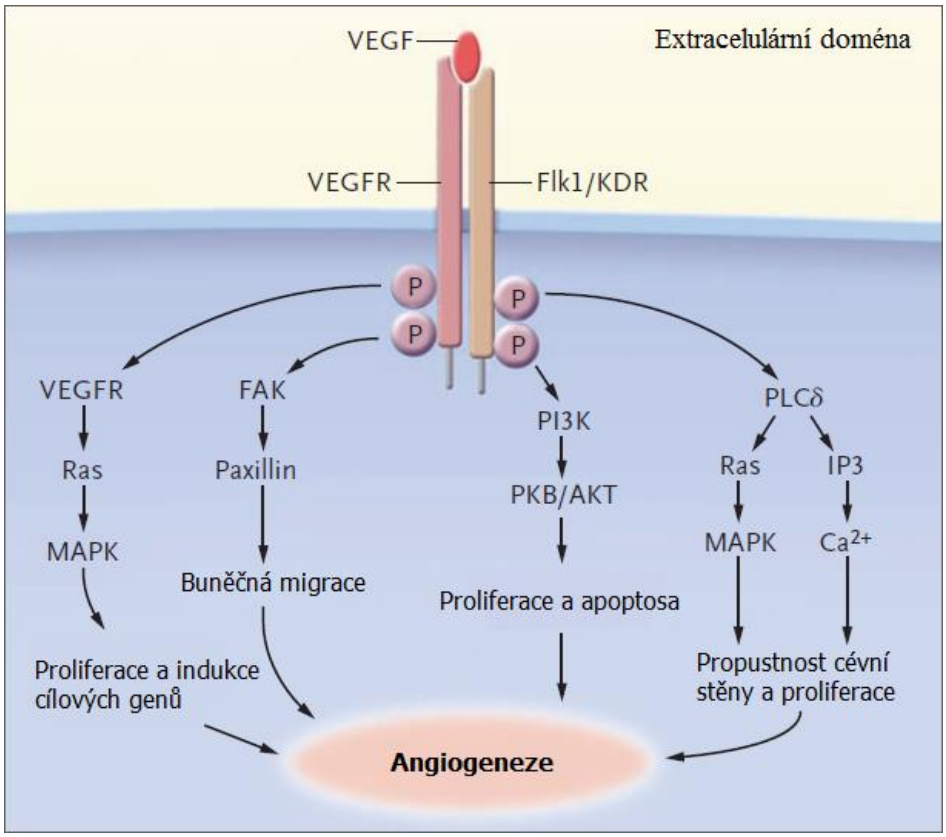
EGF

EGF je růstový faktor, skládající se z jednoho 6 kDa polypeptidového řetězce. RNA kódující tento růstový faktor byla nalezena ve velkém množství tkání. Jeho mitogenní aktivita je potencována insulinem a působí v synergii s faktorem PDGF [11].

Receptor pro EGF (EGFR) se stejně jako samotný faktor nachází v mnoha typech buněk. Delece domény vázající růstový faktor u tohoto receptoru má za následek neustálou aktivaci receptoru i v nepřítomnosti růstového faktoru a byla nalezena u mnoha typů nádorů. Aktivovaný receptor fosforyluje tyrosiny na intracelulární doméně receptoru, což má za následek vazbu různých signalizačních proteinů se SRC doménou. Jejich následná aktivace dereguluje odpovídající signalizační dráhy a může vést k nadměrné proliferaci, či inhibici apoptosy [1].

VEGF

VEGF je protein, regulující kontrolní mechanismy genové transkripce závislé na hypoxii a jeho hlavní funkcí je stimulace angiogeneze. VEGF stimuluje angiogenezi také v široké škále nádorů a tím podporuje jejich růst a metastazování, přičemž již byla vyvinuta chemoterapeutika, inhibující funkci receptorů pro VEGF (bevacizumab, imatinib) [1]. Receptory pro VEGF se skládají ze tří tyrosin-kinas a to VEGFR1 (Flt1), VEGFR2 (Flk1/KDR) a VEGFR3 (Flt4). Funkce celého receptoru VEGF a signalizační dráhy, které ovlivňuje, jsou znázorněny na obrázku (obrázek 2, str. 14).



Obrázek 2: Funkce signalizačních drah, které ovlivňuje růstový faktor VEGF (upraveno podle [1]*).*

PDGF

Příkladem neregulované aktivace růstových faktorů může být růstový faktor PDGF (platelet-derived growth factor) skládající se z α (14-18 kDa) a β (16 kDa) řetězce, který je vylučován z krevních destiček během koagulace a může podporovat proliferaci různých typů buněk a stimulovat například fibroblasty k rychlému dělení a hojení ran. PDGF je jako mitogen velmi účinný a u některých typů buněk stačí vliv samotného PDGF k vyvolání replikace DNA a buněčného dělení. Nadměrná exprese PDGF v buňkách způsobuje transformaci fibroblastů, obsahujících PDGF receptory, ale neovlivňuje fibroblasty, které tyto receptory nemají [1].

IGF

Růstové faktory IGF, mají jak lokální, tak hormonální a systémový účinek a určitá koncentrace jich cirkuluje po organismu krevním řečištěm [12]. V krvi se váží na specifický nosič IGFBP-3 a zvýšené koncentrace IGF nebo IGFBP-3 byly zaznamenány u některých typů rakoviny. Rodina proteinů IGF zahrnuje IGF-I (somatomedin C), IGF-II (somatomedin A) a jejich receptory IGF-IR a IGF-IIR. Každý z těchto růstových faktorů má vlastní preferovaný receptor, přičemž ale za vysokých koncentrací faktoru se mohou vázat k oběma.

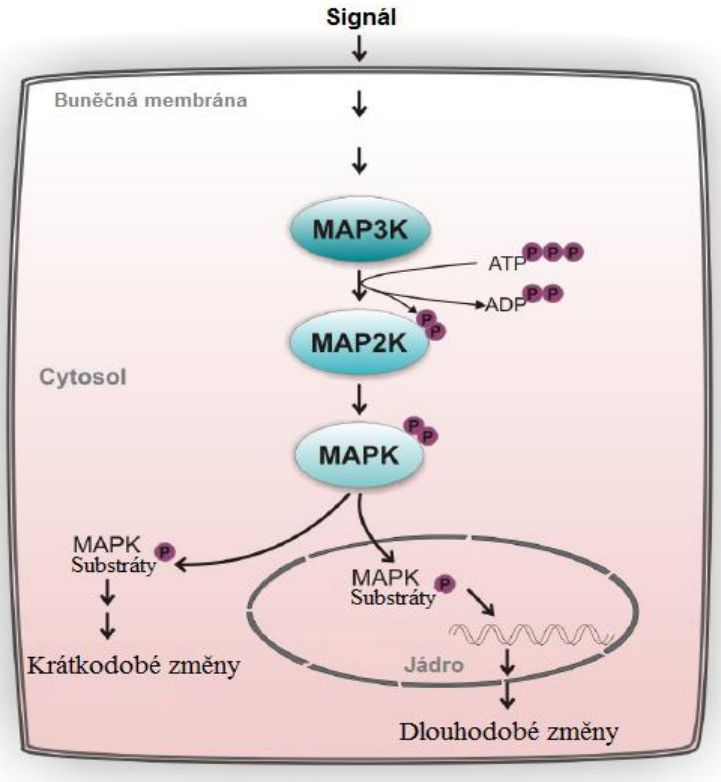
1.1.2.4. Signalizační proteiny

Mnoho onkogenů kóduje molekuly, které jsou zodpovědné za přenos signálu z receptoru na efektory. Hlavní skupiny jsou „nereceptorové“ protein kinasy a proteiny vázající GTP. Nereceptorové kinasy zahrnují tyrosin kinasy, jako např. ABL1, nebo SRC, a serin-threonin kinasy jako např. AKT, RAF1 nebo MOS. Tyto proteiny se nacházejí nejčastěji v cytoplazmě, nebo v jádře a mohou se stát iniciátory nádorového bujení, pokud nesou mutaci, která způsobuje jejich nadměrnou aktivaci. Následné signalizační kaskády mohou zvyšovat proliferaci buňky, nebo inhibovat apoptotické dráhy [1].

1.2. Změny v buněčné signalizaci rakovinných buněk

1.2.1. MAPK/ERK

Tato signalizační kinasová kaskáda, je systém přes který jsou na intracelulární efektory, zodpovědné za regulaci proliferace, diferenciace a apoptosu buněk, vedeny extracelulární signály převážně mitogenních růstových faktorů.



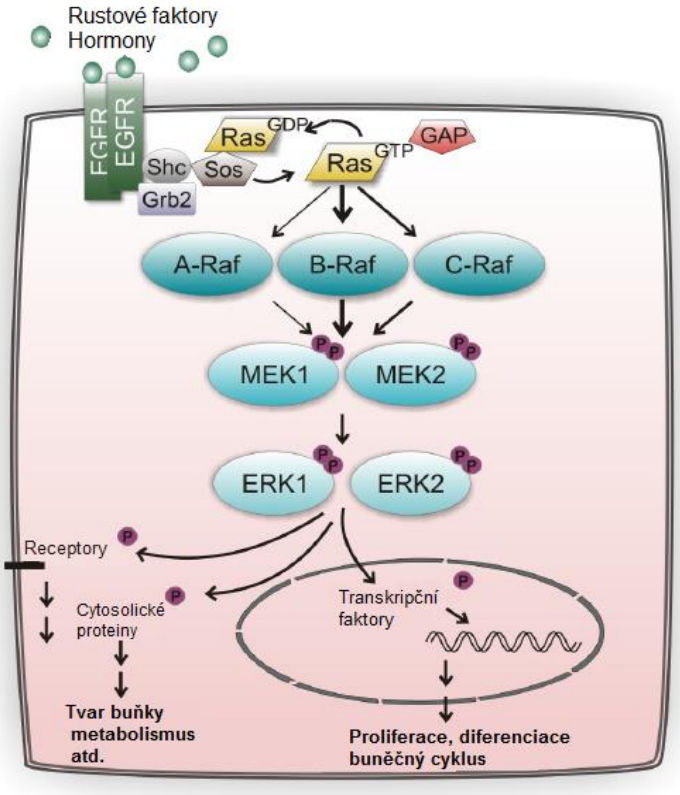
Obrázek 3: Schéma MAPK signalizační dráhy (upraveno podle [13]*).*

Jde o třístupňovou kaskádu, kde vstupní bod tvoří protein MAP3K, následně fosforylující MAP2K, který nakonec fosforyluje konečný článek MAPK. Aktivované kinasy MAPK mají velké množství membránových, cytoplasmatických a cytoskeletálních substrátů, jejichž fosforylace způsobuje krátkodobé změny ve tvaru buňky, nebo jejím metabolismu. Aktivovaná MAPK může také translokovat do jádra, stimulovat transkripci a způsobovat tak v buňce dlouhodobější změny (obrázek 3, str. 16) [13].

Dnes jsou známy čtyři různé MAPK kaskády, které byly pojmenovány podle jednotlivých komponent a to ERK, JNK, p38 a ERK5/BMK [13].

1.2.1.1. Ras/Raf/MEK/ERK a JNK/p38

Extracelulární signály, které spouštějí signalizační dráhu ERK, jsou především růstové faktory (EGF). Protein Ras aktivují receptory růstových faktorů (EGFR) na cytoplasmatické membráně za pomoci proteinu SOS, jehož funkce je odstranění molekuly GDP z proteinu Ras. Na místo GDP se může následně navázat GTP, čímž dojde k aktivaci proteinu. Aktivovaný Ras poté fosforyluje MAP3K protein Raf. Ten signál předává MAP2K proteinu MEK, který nakonec fosforyluje a tím aktivuje protein ERK.



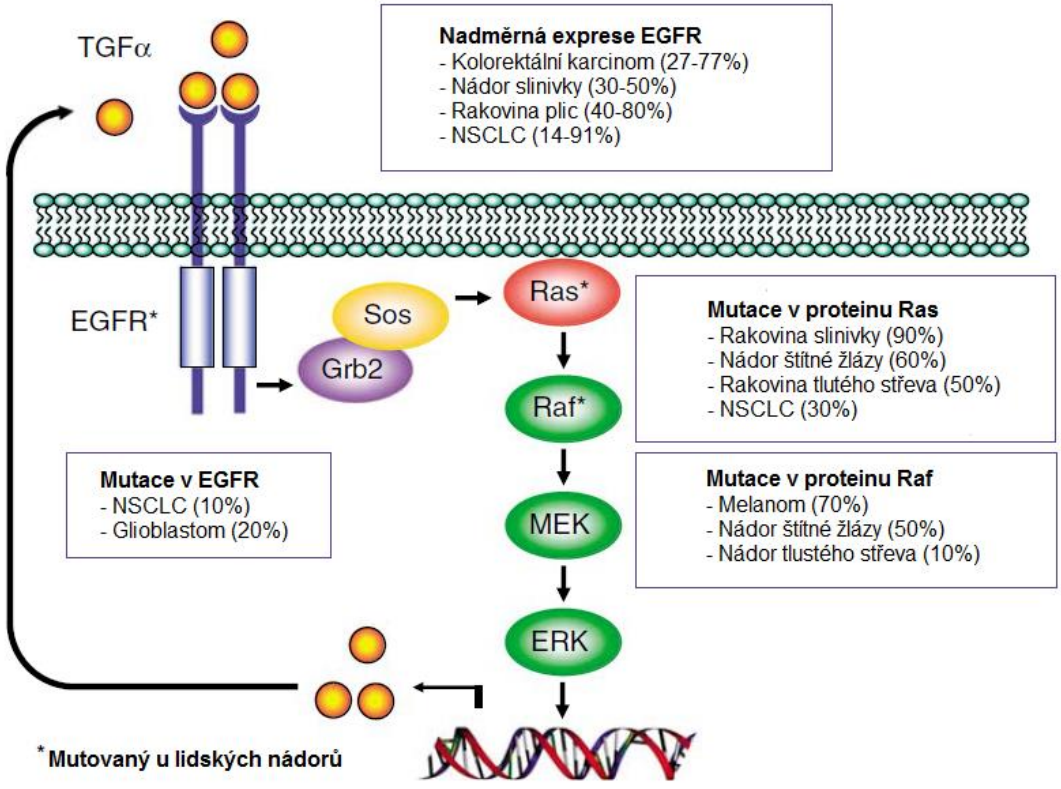
Obrázek 4: Schéma ERK signalizační dráhy (upraveno podle [13]*).*

Proteiny Raf jsou trojího typu a to A, B a C a mohou tvořit dimery s větší aktivitou, přičemž heterodimery B-Raf a C-Raf mají největší vliv na MEK kinasovou aktivitu [13].

Existují dvě isoformy proteinu MEK a to MEK1 a MEK2 (také se schopností tvořit dimery), stejně jako proteiny ERK, které existují v isoformách 1 a 2. Protein ERK má rozsáhlou škálu efektorů, jejichž aktivace v různých kombinacích může ovlivnit většinu ze základních buněčných funkcí (obrázek 4). Přenos signálu je uskutečňován za pomoci proteinového „lešení“, které směřuje proteiny do určitého buněčného kompartmentu, nebo organely [13].

Protože má tato signalizační dráha tolik možných efektorů, musí být striktně regulována. Defosforylace aktivujících zbytků na proteinech Raf, MEK a ERK způsobí inhibici jejich kinasové aktivity a ukončení signalizace.

Existuje také několik zpětných vazeb, které inhibují konstantní aktivaci signální dráhy i bez defosforylace jejích komponent. Jednou z nich je funkce konečného proteinu ERK, který fosforylací inhibuje funkci proteinů SOS, C-Raf a MEK. Chyby v této signalizační dráze jsou spojovány s mnoha typy rakoviny a společným prvkem deregulace této dráhy je její konstantní aktivace mutací nejčastěji proteinů Ras, Raf nebo receptoru EGFR (obrázek 5).



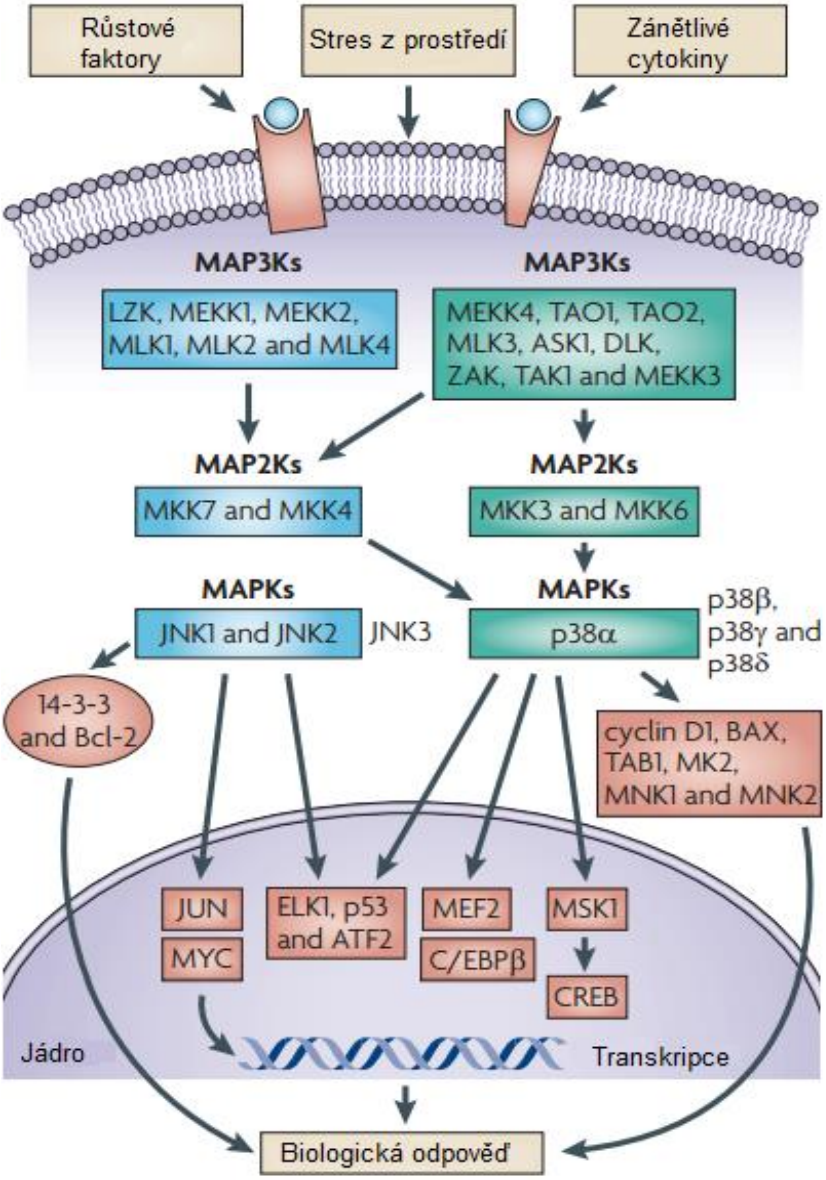
Obrázek 5: Schéma proteinů ras/raf/MEK/ERK signalizační dráhy, které mohou podléhat aktivujícím mutacím s jejich procentuálním zastoupením u různých druhů nádorů. Dále je naznačeno schéma zpětnovazebné smyčky, kdy nadměrná aktivace ERK způsobuje zvýšenou produkci růstových faktorů TGFα, které znovu aktivují ERK signalizaci, což může vyústit v transformaci buněk s některou z aktivujících mutací (upraveno podle [14]*).*

Protein Ras je nejčastěji mutovaný onkogen, se 33% výskytem konstitutivně aktivované formy u lidských nádorů. Jeho aktivaci způsobí navázání GTP. Aktivující mutace spočívají ve snížení GTPasové aktivity proteinu Ras, a v resistenci vůči funkci proteinu RasGAP, který GTP skupinu z proteinu Ras u zdravé buňky odstraňuje. Delší existencí proteinu Ras s navázaným GTP dochází k prodloužení doby signalizace a nadměrné expresi výsledných produktů dráhy ERK.

Mutace proteinů Raf vedou hlavně ke zvýšení jejich kinasové aktivity a k vyšší míře fosforylace proteinu MEK. Nejčastější mutace u B-Raf je záměna valinu za glutamát v části proteinu tvořící smyčku bohatou na glycin. Byla nalezena interakce mezi touto smyčkou a aktivačním segmentem, který udržuje B-Raf inaktivní. Tato záměna, nebo fosforylace v tomto segmentu inhibující interakci rozruší, čímž nadměrně aktivují B-Raf [14].

Proteiny JNK reprezentují podskupinu proteinů MAPK, které jsou aktivovány převážně cytokiny a stresem z okolního prostředí (pH, osmotický stres, teplota, radiace) [15]. Hlavní cíl JNK signalizace je aktivace AP-1 transkripčních faktorů, ovlivňujících diferenciaci, proliferaci a apoptosu buněk. Jmenovitě jde o transkripční faktory c-Jun, JunB, JunD, ATF2, Fos a Myc. Zatímco krátkodobá aktivace JNK podporuje proliferaci a inhibuje apoptosu, dlouhodobá aktivace spouští apoptosu za pomoci TNFα [16]. Snížení exprese JNK také vedlo ke snížení míry proliferace a zastavení růstu nádoru u myší, i lidských buněk, snížením exprese onkogenu MYC a zvýšením exprese CDK inhibitoru p21.

Protože jsou transkripční faktory c-Jun a Myc nezbytné pro vývoj některých typů rakoviny (kapitola 1.1.2.1), jsou JNK potenciální onkoproteiny (obrázek 6, str. 19). Geny, kódující proteiny JNK jsou Jnk1, Jnk2 a Jnk3, který je u člověka exprimován ve větším množství jen v mozku, srdci a testes. Tyto geny podléhají po transkripci alternativnímu sestřihu, při kterém se vytvářejí různé funkční isoformy proteinů JNK. Možnosti splicingu existují kvůli dvěma možným exonům, které se nacházejí přímo v kinasové doméně a výsledné isoformy mají proto jinou substrátovou specifitu (c-Jun je fosforylován proteinem JNK1, zatímco ATF2 fosforyluje převážně protein JNK2). Za aktivaci proteinů JNK jsou zodpovědné kinasy MKK4 a MKK7, které jsou také exprimovány jako isoformy kvůli alternativnímu splicingu. MKK7 je primárně aktivován cytokiny (TNF a IL-1), zatímco MKK4 je aktivovaný environmentálním stresem. Na pokusech s nervovými buňkami, bylo dokázáno, že aktivace apoptosy proteinem JNK byla potlačena aktivací ERK signalizační dráhy [15].



Obrázek 6: Přehled proteinů signalizační dráhy vedoucí k aktivaci JNK/p38 a jejich cíle (upraveno podle [16]*).*

Proteiny p38 existují v podobách α, β, γ a δ. Hlavní úlohu hraje protein p38α, který je aktivován v imunitních buňkách zejména zánětlivými cytokiny (IL-1) a environmentálním stresem. Je aktivován MAP2K kinasami MKK3, MKK4 a MKK6. Protein p38 fosforyluje transkripční faktory ATF2, Mac a MEF2 a jeho funkcí je regulace exprese cytokinů. Je tedy částečně zodpovědný za imunitní odpověď [17]. Z toho důvodu může také hrát roli v autoimunitních onemocněních.

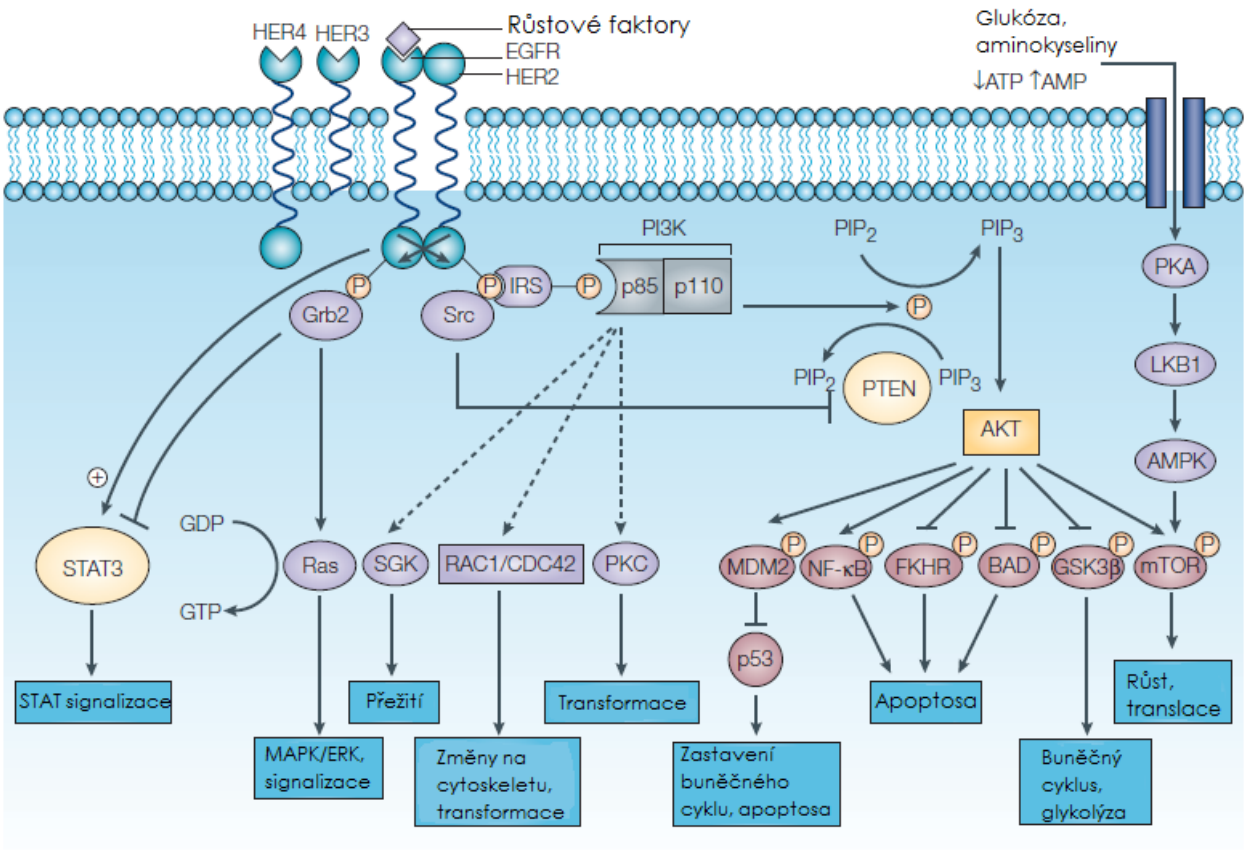
1.2.2. PI3K/Akt

PI3K/Akt/mTOR je signální dráha regulující metabolismus, proliferaci, angiogenezi a apoptosu, reagující na signály cytokinových receptorů, receptorů spřažených s G-proteiny a B a T-buněčných receptorů. Bylo zjištěno, že mnoho komponent PI3K signalizační dráhy bývá v lidských nádorových buňkách pozměněno [18]. Fosfatidylinositol-3 kinasy (PI3K) představují rodinu kinas, schopnou fosforylovat 3'-OH skupinu na inositolovém kruhu v inositolových fosfolipidech a vytvářet tak druhého posla fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát a fosfatidylinositol-3,4-bisfosfát (obrázek 7). Aktivace tyrosin kinasového receptoru na plazmatické membráně růstovým faktorem IGF1 má za následek vazbu PI3K přes její SH2 doménu v regulační podjednotce a produkci $PI(3,4,5)P_3$ a $PI(3,4)P_2$ na vnitřní straně plazmatické membrány. S těmito fosfolipidy interaguje protein Akt (protein kinasa B), který translokuje k plazmatické membráně, kde je fosforylován a aktivován proteiny PDK1 a PDK2, které se tam nacházejí konstitutivně aktivované.

Obrázek 7: Molekula fosfatidylinositolu, červeně jsou vyznačené volné hydroxylové skupiny, podléhající fosforylaci.

Savčí buňky exprimují tři příbuzné isoformy proteinu Akt a to Akt1 (PKBa), Akt2 (PKBb) a Akt3 (PKBg). Akt1 je produkován ve vysokém množství ve všech tkáních, zatímco Akt2 se nachází jen v tkáni citlivé na insulin (játra, kosterní svalstvo) a ve velkém množství je exprimován při diferenciaci buněk. Akt3 je exprimován ve velké míře v mozku a testes a jeho exprese je pouze na nízké úrovni ve svalech a jiných orgánech. Všechny isoformy jsou aktivovány proteinem PDK1 stejným způsobem, ale bylo zjištěno, že nadměrná exprese Akt1 nevede k nádorovému bujení, na rozdíl od nadměrné exprese Akt2 a Akt3. Experimenty s delecí jednoho z genů pro Akt ukázaly schopnost ostatních nahradit jeho funkci a u myších buněk nebyla po deleci pozorována téměř žádná fenotypová změna [19]. Akt je také evolučně konzervovaný protein, experimenty na *Drosophila melanogaster* dokazují konzervovanou funkci Akt při apoptose a regulaci tumorogeneze u embryonálních buněk. V pozdějším stádiu organismu již vykazuje pouze funkci regulace velikosti buňky a neovlivňuje apoptosu.

Aktivovaný protein Akt je již efektor, který aktivuje biologickou odpověď buňky, například transport glukosy, glykolýzu, syntézu glykogenu, zvětšení buňky, pokročení buněčném cyklu a inhibici apoptosy [19] *(obrázek 8)*. Jedním z identifikovaných přímých cílů proteinu Akt je protein BAD, který inhibuje apoptosu blokací pro-apoptotických proteinů z rodiny BCL-2, nebo FoxO transkripční faktory, jejichž funkci Akt inhibuje, a které jsou zodpovědné za expresi BCL-2 proteinů. (kapitola 1.3.1.2).



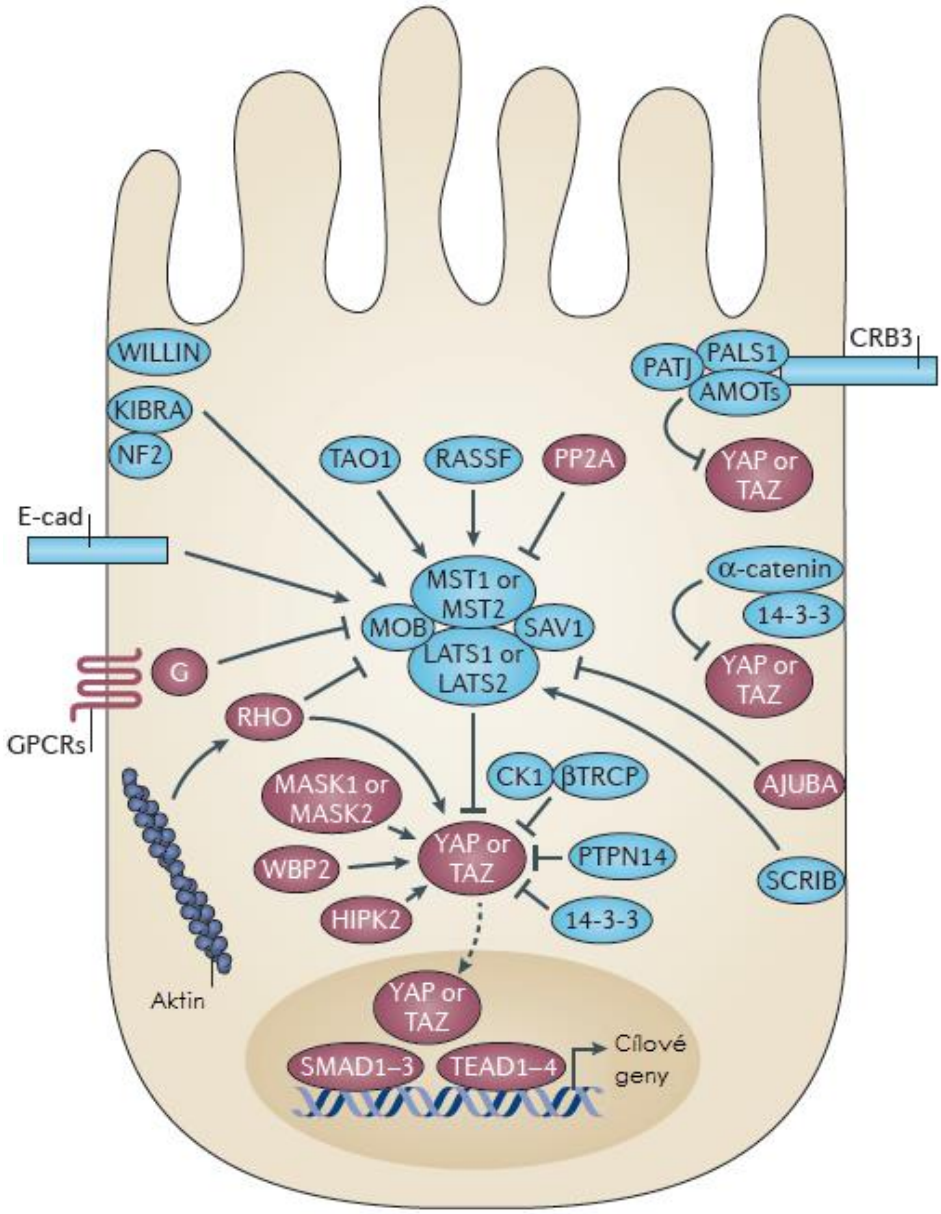
Obrázek 8: Schéma signalizační dráhy PI3K/Akt a dalších signalizačních drah reagujících na receptory růstových faktorů (upraveno podle [20]*).*

Akt kinasa také fosforylačně aktivuje protein kinasu mTOR (mammalian Target Of Rapamycine) jehož aktivita je regulována, růstovými faktory, nebo cytokiny.

1.2.3. Hippo

Hippo signalizační dráha (jiným názvem: Salvador-Warts-Hippo) je evolučně konzervovaný signalizační systém, regulující proliferaci, buněčný cyklus a apoptosu buněk. Její fyziologickou funkcí je regulace velikosti orgánů.

Deregulace této dráhy vede k indukci tumorogeneze a je přítomna u široké škály lidských nádorů. Hippo signalizační dráha sestává z velké skupiny proteinů (více než 35) a centrum této dráhy tvoří u savců serin/threoninová kinasa MST1/2, která fosforyluje a aktivuje následnou protein kinasu LATS1/2 *(obrázek 9)*. Ta dále spolupracuje s adaptorovými proteiny SAV1, MOB1A a MOB1B. Konečný cíl této signalizační dráhy jsou homologní onkoproteiny a transkripční koaktivátory YAP a TAZ. Fosforylace YAP a TAZ inhibuje jejich aktivitu vazbou na protein 14-3-3 a způsobuje jejich akumulaci v cytoplasmě, kde dojde k jejich degradaci [21].



Obrázek 9: Přehled proteinů účastnících se Hippo signalizace. Modře jsou označené tumor-supresorové proteiny, zatímco červeně jsou označené potenciální onkoproteiny (upraveno podle [21]*).*

Proteiny YAP a TAZ podporují růst tkání regulací transkripčních faktorů TEAD a SMAD. Inhibice funkce YAP a TAZ může být také docíleno bez aktivace kinas MST1 a MST2, a to například aktivací přímo LATS1 a LATS2 proteiny reagujícími na adhezi a mezibuněčný kontakt (SCRIB, E-cadherin), nebo tvorbou fyzických komplexů s jinými proteiny (PATJ, PALS1, α-catenin), které jim neumožní proniknout do jádra. Mutace v částech této signalizační dráhy, které vedou k nadměrné aktivaci YAP nebo TAZ způsobují nadměrnou buněčnou proliferaci různých typů tkání, a necitlivost na apoptotické signály. Bylo zjištěno, že nadměrná exprese proteinu YAP blokuje apoptosu vyvolanou TNF a FAS-ligandem (kapitola 1.3.1.1).

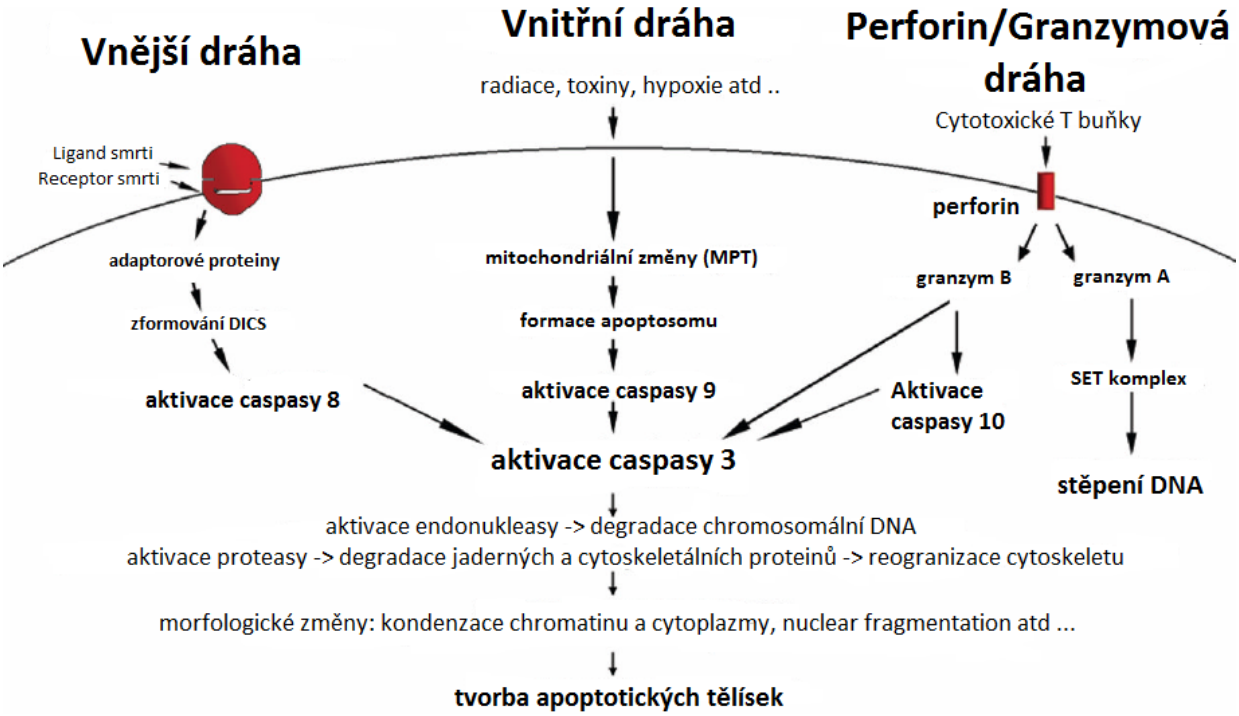
1.3. Apoptosa

Apoptosa, neboli programovaná buněčná smrt je důležitý biochemický děj, vyskytující se v mnohobuněčných organismech, zodpovědný za regulaci správného vývoje tkání a orgánů, správného vývoje a funkce imunitního systému a za ochranu organismu před buňkami s poškozenou regulací buněčného cyklu. Jde o děj, vyžadující na rozdíl od nekrózy energii a enzymatický aparát (cysteinové proteasy – caspasy) a mající specifické morfologické a biochemické znaky [22]. Může být spuštěna stimulem zvenčí (např. FasL, radiace, chemoterapeutikum), nebo nepřítomností stimulu.

Hlavními morfologickými znaky jsou v raných stádiích apoptosy zmenšení buněk a kondenzace chromatinu (zvané pyknosa). Zmenšení buněk doprovází zahuštění cytoplasmy a organel. Následuje rozdělení buňky na malé fragmenty zvané apoptotické tělíska. Integrita organel v těchto tělískách je zachována, tělíska jsou fagocytována, degradována makrofágy a parenchymatickými buňkami. Důležitým prvkem apoptosy je fakt, že nedochází k zánětlivým reakcím, protože nedojde ke kontaktu cytoplazmy buňky s mezibuněčným prostorem, naopak dojde k rychlé fagocytóze apoptotických tělísek. Fagocytóza je urychlena specifickými látkami na povrchu cytoplazmatické membrány těchto tělísek, jako je například fosfatidylserin, který se v neapoptotické buňce nachází na vnitřní straně cytoplazmatické membrány a po spuštění apoptosy se dostává na stranu vnější. Další molekuly, které fagocytující buňky rozeznávají, jsou Annexin I a calreticulin.

1.3.1. Signální dráhy vedoucí k apoptose

Existují tři základní signální dráhy spouštějící apoptosu. První z nich je *vnější dráha*, která spočívá v navázání specifického „ligandu smrti“ na „receptor smrti“. Druhou je *vnitřní*, neboli mitochondriální dráha a třetí je perforin/granzymová dráha, kterou spouštějí T buňky. Souhrn těchto tří cest je znázorněn na *obrázku 10*. Všechny dráhy se setkávají na finálním efektorovém proteinu, kterými jsou caspasa 3, caspasa 6 a caspasa 7, jejichž aktivace rozštěpením způsobí fragmentaci DNA, degradaci cytoskeletu a jaderných proteinů a zformování apoptotických tělísek. Caspasy jsou exprimovány ve formě neaktivních proenzymů. Ve většině buněk má aktivace jedné zpravidla za následek aktivaci dalších [22].

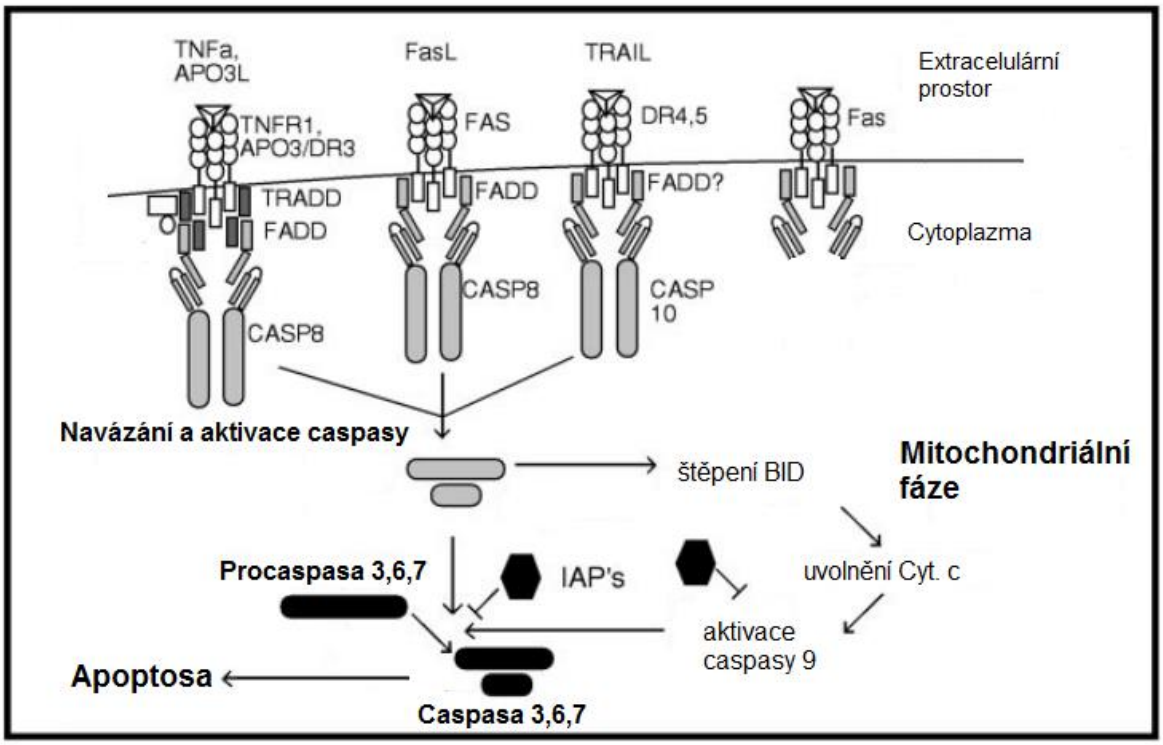


Obrázek 10: Schéma tří drah spuštění apoptosy (upraveno podle [22]*).*

1.3.1.1. Vnější dráha

Vnější signalizační dráha iniciující apoptosu využívá specifické transmembránové receptory z rodiny TNF receptorů a jejich ligandy, které přenášejí signál z povrchu buňky na intracelulární signální dráhy. Mezi tyto ligandy a receptory patří FasL/FasR, TNFα/TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 a Apo2L/DR5.

Po navázání ligandu na Fas receptor dojde k trimerizaci proteinu Fas a na vnitřní straně cytoplasmatické membrány se naváží adaptorové proteiny a to FADD (Fas-associating protein with death domain – protein asociující s Fas obsahující doménu smrti) v případě Fas receptoru a TRADD (TNF-associating protein with death domain – protein asociující s TNF obsahující doménu smrti) v případě TNF receptoru. Doména zodpovědná za vazbu cytoplasmatických signalizačních proteinů je homologní u Fas i TNFR1 a jde o zmíněnou 68 aminokyselin dlouhou „doménu smrti“ (DD – death domain) [23]. FADD poté asociuje s procaspasou 8 přes doménu DED (death efektor domain), která se nachází na N-konci FADD, a na dvou místech na procaspase 8. Dochází k dimerizaci procaspasy 8 a tvoří se proteinový komplex DISC (death-inducing signalling complex), přičemž dochází k autokatalytické aktivaci procaspasy 8 za vzniku caspasy 8. Následuje štěpení proteinu BID, uvolnění cytochromu c z mitochondrie a spuštění celého apoptotického děje aktivací finálních caspas 3, 6 a 7 (obrázek 11) [22].



Obrázek 11: Schéma fungování vnější apoptotické dráhy (upraveno podle [23]*).*

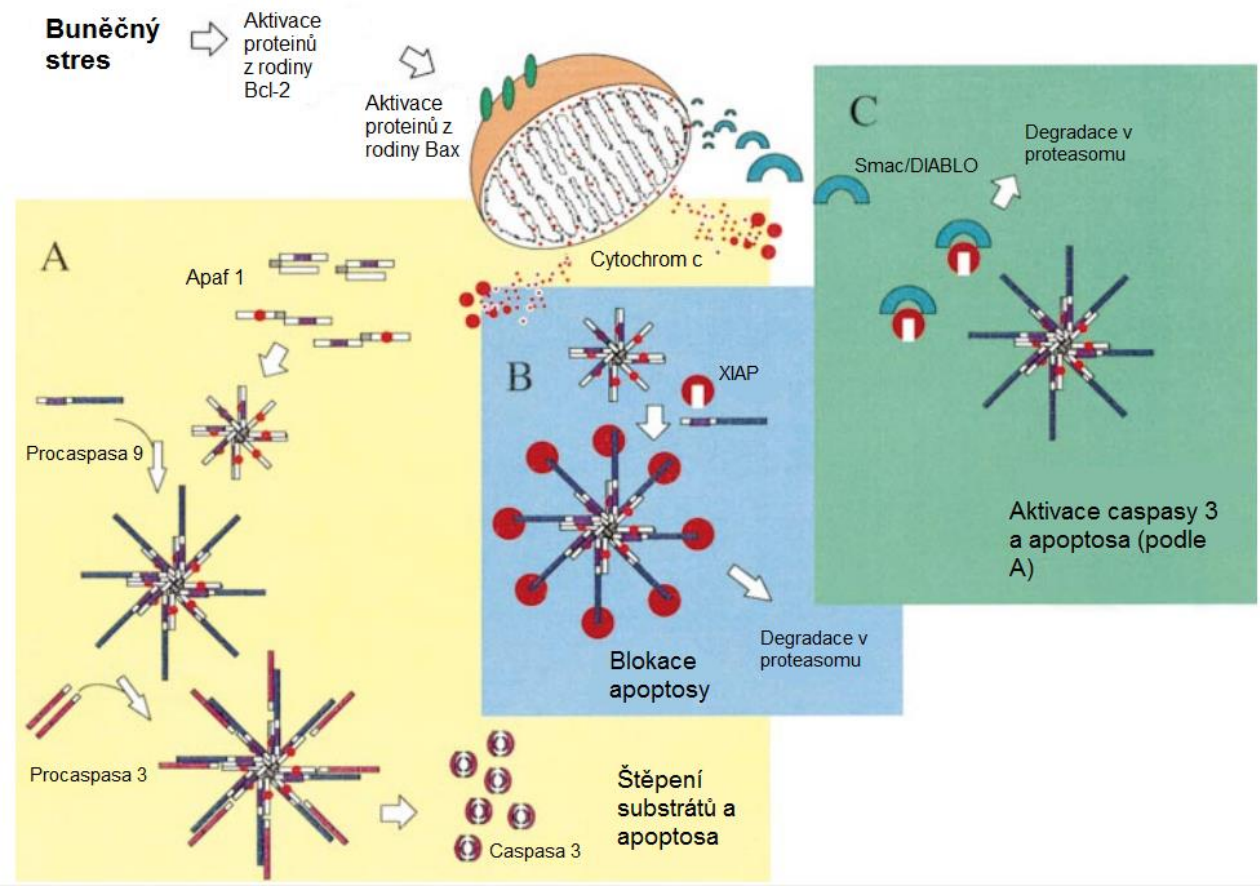
1.3.1.2. Vnitřní dráha

Vnitřní dráha zahrnuje širokou škálu nereceptorových stimulů, které produkují intracelulární signály, které působí přímo na jejich cíle uvnitř buňky a jsou mitochondriálního původu [22]. Signály mohou vzniknout absencí růstového faktoru, hormonů, nebo cytokinů, která může vést k nedostatečné inhibici pro-apoptotických signálů v buňce, a následnému spuštění

apoptosy. Další pro-apoptotické stimuly zahrnují radiaci, toxiny, hypoxii, hypertermii, ROS (reactive oxygen species – reaktivní formy kyslíku), nebo virovou infekci.

Všechny tyto stimuly způsobují nejprve aktivaci pro-apoptotických proteinů z rodiny Bcl-2 a poté aktivaci proteinů z rodiny Bax, lokalizovaných na mitochondriální membráně, či v cytoplazmě. Aktivace proteinů Bax vede k jejich oligomerizaci a průniku do mitochondriální membrány. Tento děj má následek ztrátu potenciálu mitochondriální membrány a uvolnění dvou skupin pro-apoptotických proteinů z mezimembránového prostoru mitochondrie do cytoplazmy [24].

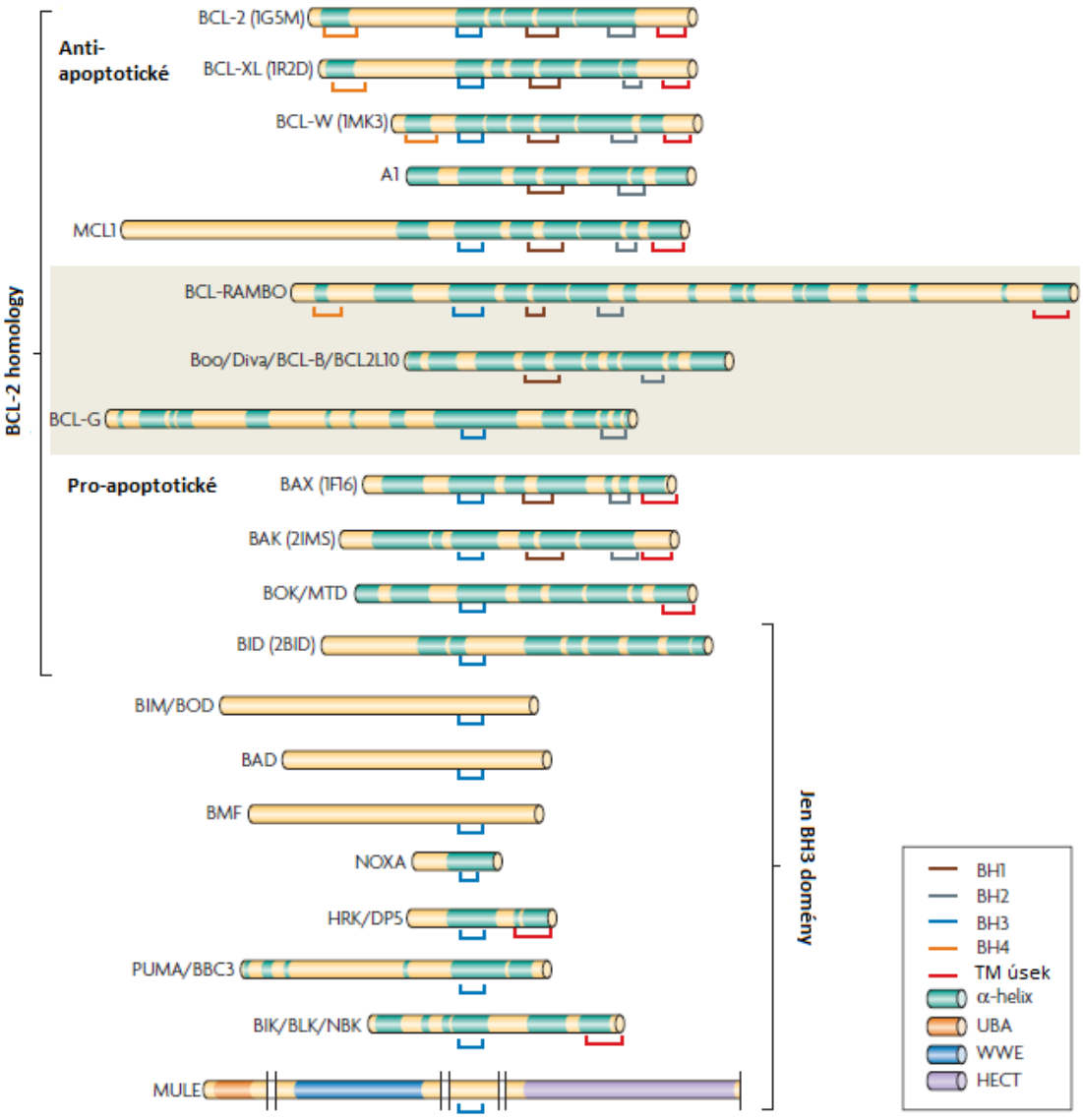
První skupina obsahuje proteiny cytochrom c, Smac/DIABLO a serinovou proteasu HtrA2/Omi. Cytochrom c v cytoplazmě váže a aktivuje Apaf-1, u kterého dojde k oligomerizaci a vytváří se tak apoptosom. Ten následně váže a aktivuje iniciační procaspasu 9, která štěpením aktivuje efektorovou caspasu 3. Proteiny Smac/DIABLO a HtrA2/Omi inhibují proteiny z rodiny IAP, potlačující apoptosu (obrázek 12).



Obrázek 12: Vnitřní dráha apoptosy. Znázorněno je neblokované spuštění apoptosy uvolněním cytochromu c z mitochondrie (A), blokace cytoplazmatickým proteinem XIAP z rodiny IAP proteinů (B), a inaktivace XIAP proteinem Smac/DIABLO (C). Upraveno podle [24].

Druhá skupina pro-apoptotických proteinů zahrnuje AIF, endonukleasu G a CAD. Tato skupina proteinů se uvolňuje z mitochondrie až relativně pozdě, když už je buňka odsouzena k apoptose. AIF translokuje do jádra kde způsobuje štěpení DNA na 50-300 kb fragmenty a kondenzaci chromatinu („stage I“).

Endonukleasa G také translokuje do jádra a dále fragmentuje DNA na oligonukleotidy. Oba tyto proteiny nejsou závislé na caspasách. Další protein vyloučený z mitochondrie je CAD, který po translokaci do jádra a aktivaci caspasy 3 vede k další fragmentaci DNA a větší kondenzaci chromatinu („stage II“).



Obrázek 13: Přehled proteinů z rodiny BCL-2. Zeleně vyznačené úseky jsou předpokládané α-helixy, červeně vyznačené jsou předpokládané transmembránové domény. BH domény jsou zodpovědné za interakce s dalšími proteiny. Proteiny v šedém poli nejsou dosud řádně prozkoumány a nemohou být proto zařazeny na základě jejich apoptotické funkce (upraveno podle [25]*).*

Proteiny z rodiny Bcl-2 mají na svědomí kontrolu a regulaci mitochondriální apoptosy. Ovlivňují permeabilitu mitochondriální membrány a mohou být jak pro-apoptotické, tak anti-apoptotické. Mají schopnost zastavit apoptosu a anulovat pro-apoptotický signál, nebo ho podpořit *(přehled na obrázku 13, str. 29)*. Některé z těchto proteinů jsou ukotvené C-terminální doménou na mitochondriální membráně [26].

Příkladem pro-apoptotické funkce může být protein Bad, který se nachází fosforylovaný ukotvený na fosfoserin vázajícím proteinu 14-3-3. Ve chvíli, kdy je Bad nefosforylovaný, translokuje k mitochondrii, otevře mitochondriální póry a uvolní cytochrom c. O jeho fosforylaci se stará například protein Akt, aktivovaný v PI3K signalizační dráze růstovými faktory [27]. Také může dimerizovat s anti-apoptotickými proteiny Bcl-Xl, nebo Bcl-2 a tím inhibovat jejich funkci. Další pro-apoptotický protein je Puma, jehož nadměrná exprese vede ke zvýšené expresi proteinu BAX, který následně translokuje do jádra a uvolňuje cytochrom c. Protein Noxa má taktéž pro-apoptotické účinky a to interakcí s anti-apoptotickými členy rodiny Bcl-2 na mitochondriální membráně, což mý za následek aktivaci caspasy 9.

Puma i Noxa jsou proteiny, jejichž exprese je indukovaná proteinem p53, a mohou tak být reakcí na poškození DNA genotoxickými látkami, UV zářením nebo onkogenní mutací. Mutace v genu pro protein p53, který reguluje kromě apoptosy i zastavení buněčného cyklu a opravu DNA, je velmi častá u lidských nádorů [28].

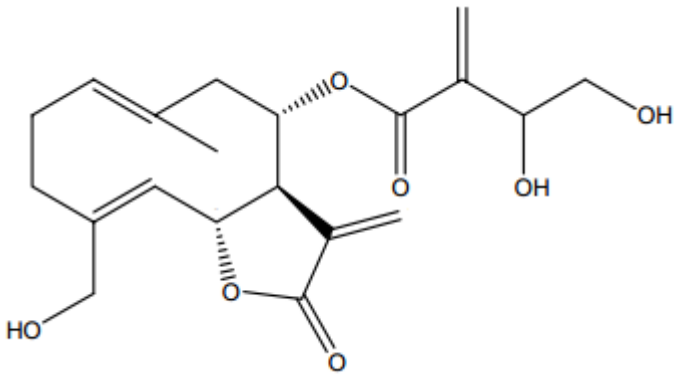
1.3.1.3. Perforin/Granzym dráha

Cytotoxické T lymfocyty a NK buňky jsou schopné zabíjet cílové buňky přes vnější apoptotickou signalizační dráhu a FasL/FasR interakci. Jsou ale schopné zabíjet i nádorové buňky a buňky s virovou infekcí s částečně zablokovanými apoptotickými drahami sekrecí transmembránového proteinu perforinu, který na cílové buňce vytvoří póry, kterými se z T lymfocytů do buňky dostanou granule obsahující jako nejdůležitější složku serinové proteasy granzym A a granzym B [22]. Granzym B je schopný štěpit proteiny na aspartátovém zbytku a katalyzovat tak přeměnu procaspasy 10 na caspasu 10 a štěpit anti-apoptotické faktory jako je například ICAD. Může také štěpit protein Bid a indukovat tak uvolnění cytochromu c z mitochondrií, nebo rovnou štěpením aktivovat efektorovou caspasu 3, což má za následek indukci apoptosy. Tímto způsobem může T lymfocyt působit i na buňky, které mohou mít nefunkční přirozené regulační signalizační dráhy.

Proteasa Granzym A může aktivovat jadernou DNAsu NM23-HI, které je normálně inhibována proteinem SET udržujícím také strukturu chromatinu tím, že protein SET naštěpí. Výsledkem je apoptotická degradace DNA, a kondenzace chromatinu.

1.4. Cnicin

Cnicin je seskviterpenový lakton se substituovanou kyselinou akrylovou napojenou esterovou vazbou *(obrázek 14)*, vykazující antibakteriální, mykotoxický, fytotoxický, protizánětlivý a protinádorový efekt. Bylo dokázáno, že blokuje proliferaci a indukuje apoptosu u buněk mnohačetného myelomu a že působí specificky proti hematomaligním buňkám [29]. Je znám již od roku 1837 a je to hlavní hořká látka hojně zastoupená v listech rostliny *Cnicus benedictus* a trichomech *Centaurea maculosa.* Obě rostliny patří do čeledi Asteraceae [30]. Cnicin je využíván jako hořký tonik v alkoholických nápojích a má hodnotu hořkosti 1500. Hořkost cnicinu stimuluje aktivitu trávicího ústrojí, produkci slin a žlučových šťáv.



Obrázek 14: Struktura cnicinu (upraveno podle [30]*).*

Jedním z několika probádaných molekulárních účinků cnicinu je jeho schopnost inhibovat Pim-2 kinasu, což je signalizační protein významně se podílející na stabilizaci *cMYC* onkogenu a přispívající tak k proliferaci nádorových buněk, u kterých je C-MYC nadměrně exprimován [29].

2. Materiál a metody

2.1. Seznam přístrojů a chemikálií

2.1.1. Chemikálie

- PBS pufr 10x (phosphate buffered saline) *Active Motif, USA*
- Tris pufr *Roth, Německo*
- TWEEN® 20 *Sigma-Aldrich, Švýcarsko*
- Odtučněné sušené mléko (Blotting grade Blocker) *Bio-Rad, USA*
- DMSO (dimethylsulfoxid) *Roth, Německo*
- SDS (dodecylsulfát sodný) *Roth, Německo*
- TEMED (tetramethylethylendiamin) *Sigma-Aldrich, USA*
- Akrylamid 30% - Acrylamide/Bis solution 29:1 *Bio-Rad, USA*
- Inhibitory fosfatas *Acitve Motif, USA*
- Inhibitory proteas *Life Tehchnologies, USA*
- 2-merkaptoethanol *Sigma-Aldrich, USA*
- Peroxodisíran amonný *Sigma-Aldrich, USA*
- Cnicin *PhytoLab, Německo*
- Peroxid vodíku 30% *Sigma-Aldrich, USA*
- Glycerol *Sigma-Aldrich, USA*
- Glycin *Roth, Německo*
- Kyselina kumarová *Sigma-Aldrich, USA*
- Luminol *Sigma-Aldrich, USA*
- Bromfenolová modř *Sigma-Aldrich, USA*

2.1.2. Materiál

- Nitrocelulosová membrána NT *Maine Manufacturing, USA*
- Primery: *P0, cMYC, MCL1, BCL2, NOXA* *Metabion, Německo*
- Primární protilátky: C-MYC Rabbit IgG *Cell Signaling, USA*
  Mst1 Rabbit IgG *Cell Signaling, USA*
  DDX3 Rabbit IgG *Abcam, UK*
  Aktin Goat IgG *Santa Cruz Biotechnology, USA*
- Sekundární protilátka: Goat anti-Rabbit IgG HRP *Santa Cruz Biotechnology, USA*

- Komerční kit na stanovení efektivní dávky léčiva:
  CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Array Promega, USA
- Komerční kit na izolaci RNA:
  Aurum™ Total RNA Mini Kit *Bio-Rad, USA*
- Komerční kit na reverzní transkripci a qPCR:
  ProtoScript® *Taq* *New England Laboratories*
- Reakční směs pro qPCR:
  SsoFast EvaGreen® Supermix *Bio-Rad, USA*
- Komerční kit na stanovení proteinů:
  Pierce® BCA Protein Assay Kit *Thermo Scientific, USA*
- Kultivační médium:
  Bio Whittaker™ RPMI 1640 with L-Glutamine *Lonza, Švýcarsko*
- Standard pro elektroforézu: Precision Plus Protein Standards *Bio-Rad, USA*

2.1.3. Přístroje

- PCR: MyCycler *Bio-Rad, USA*
- Kvantitativní-PCR: C1000 Touch Thermal Cycler *Bio-Rad, USA*
  CFX96™ Real-Time system *Bio-Rad, USA*
- Vortex V-1 plus *BioSan, Lotyšsko*
- Pipetovací nástavec Pippeting Aid *Gilson, USA*
- Centrifuga PK110 s výkyvným rotorem *ALC, USA*
- Centrifuga 5424R *Eppendorf, Německo*
- Aparatura na SDS elektroforézu: Mini-Protean® Tetra System *Bio-Rad, USA*
- Aparatura na přenos proteinů: Trans-Blot, Semi-dry *Bio-Rad, USA*
- Kamera na chemiluminiscenční detekci ChemiDoc™ MP *Bio-Rad, USA*
- Spektrofotometr Synergy HT *BioTek, USA*
- Laminární box MSC 12 *Jouan, Francie*
- Tkáňový inkubátor IGO 150 Cell Life *Jouan, Francie*

2.2. Kultivace buněk

Práce byla prováděna s buňkami Jurkat, patřícími do T buněčné leukemické linie, které byly kultivovány v inkubátoru při 37° C a atmosféře 5% oxidu uhličitého a procházely pasážováním vždy po dosažení koncentrace 1 000 000 buněk/ml. Veškerá práce s buňkami byla prováděna v laminárním boxu a v temperovaném RPMI médiu obsahujícím 1% směs penicilinu a streptomycinu a 10% fetální hovězí sérum. Příprava buněk pro experiment začínala spočtením buněk ze zásobní lahve na Bürkerově komůrce, a připravením roztoků o koncentraci 750 000 buněk/ml (100 000 buněk/ml pro stanovení efektivní dávky léčiva), Tento roztok byl rozdělen do lahví a inkubován přes noc. Druhý den byl k buňkám přidáván roztok cnicinu v DMSO požadované koncentrace a ke kontrole stejný objem čistého DMSO.

2.3. Zjištění efektivní dávky léčiva

Efektivní dávka léčiva (EC50) byla měřena pomocí komerčního kitu CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Array. Tato metoda spočívá v inkubaci roztoku buněk s tetrazoliovou sloučeninou MTS, která je v živých buňkách redukována pomocí NADH a NADPH dependentních dehydrogenas na barevný formazan. Míra koncentrace formazanu a z toho plynoucí absorbance při 490 nm je lineárně úměrná počtu živých a proliferujících buněk [31]. Roztok buněk o koncentraci 100 000 buněk/ml byl v jamkách mikrotitrační destičky v duplikátu ošetřen cnicinem na koncentraci 0 – 10 µM a byla vytvořena negativní kontrola, kdy byl cnicin o stejném množství přidáván do média bez buněk. Po 23 hodinové inkubaci v 37° C byl do jamek přidán roztok činidla CellTiter, přičemž byl roztok další hodinu inkubován při stejných podmínkách. Po inkubaci byla stanovena absorbance při 490 nm.

2.4. Izolace a kvantifikace proteinů

Roztok buněk byl centrifugován (400 × g, 4 minuty) a peleta byla promyta 1 ml PBS pufru. Peleta byla resuspendována v PBS pufru a znovu centrifugována (400 × g, 4 minuty). Následně byla resuspendována v roztoku fosfatasových inhibitorů v PBS a centrifugován (400 × g, 4 minuty). Buňky byly následně lyzovány pomocí RIPA pufru (Radio Immuno Precipitation Assay: 50mM Tris HCl (pH 8), 150mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% deoxycholát sodný, 0,1% SDS) s proteasovými inhibitory. Lyzáty byly ponechány 30 minut na ledu, průběžně promíchávány a poté odstředěny (14000 × g, 10 minut). Supernatant byl odebrán do mikrozkumavek a zamražen na -70° C.

Kvantifikace proteinů byla prováděna komerčním kitem Pierce® BCA Protein Assay Kit, obsahujícím jako základní složky $CuSO_4$ a kyselinu bicinchoninovou (BCA). Principem této metody je redukce Cu^{2+} iontů peptidovými vazbami proteinů na Cu^{+}, které jsou v alkalickém prostředí chelatovány kyselinou bicinchoninovou za tvorby barevného komplexu. Absorbance tohoto komplexu při 562 nm je lineárně úměrná koncentraci peptidových vazeb v lyzátu [32]. Lyzát byl 10 × ředěn a po použití činidla byla měřena absorbance při 562 nm. Hodnoty absorbance byly porovnány s absorbancí standardních roztoků.

2.5. Elektroforéza, elektropřenos (Western Blot) a imunodetekce

Byla využívána gelová SDS elektroforéza s 10% dělícím a 5% zaostřovacím polyakrylamidovým gelem v provedení podle Leammliho [33]. Bylo nanášeno 40 µg proteinu na jamku a ke vzorku byl přidáván 4x koncentrovaný vzorkový pufr (1 M Tris pH 6,8, SDS, glycerol, bromfenolová modř, merkaptoethanol, voda). Před nanesením na gel proběhla inkubace vzorků se vzorkovým pufrem při 95° C po dobu 5 minut. Elektroforéza byla spouštěna na 90 V (délka gelu byla 8 cm) po dobu 10 minut na zaostření a následně 140 V po dobu 40 minut pro dělení. Po dokončení elektroforézy byl gel s proteiny vyjmut a použit pro elektropřenos

Proteiny byly přenášeny z gelu na nitrocelulózovou membránu metodou Western Blot, (dále jen „přenos“) v přenosovém pufru (25 mM Tris, 192mM glycin, 20% v/v methanol). Elektropřenos probíhal v chlazené místnosti po dobu 10 minut při 10 V a následně 40 minut při 15 V (plocha membrány byla 40 cm^2).

Po dokončení elektropřenosu byly membrány blokovány v blokovacím roztoku (5% roztok sušeného odtučněného mléka v TBS-T pufru: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% v/v Tween 20, pH 7,6) po dobu 40 minut. Zablokované membrány byly inkubovány v roztoku primární protilátky (5% odtučněné mléko) vážící se na zkoumaný protein a inkubovány při 4° C přes noc. Druhý den byly membrány promyty 3 × 10 minut TTBS pufrem, a následně inkubovány v roztoku sekundární protilátky (1% odtučněné mléko) s navázanou křenovou peroxidasou po dobu 45 minut. Membrány byly po inkubaci promyty 3 × 5 minut TBS-T pufrem. Dále byl připraven substrát pro chemiluminiscenční detekci a to roztok luminolu (0,1 M Tris pufr pH 8,8, 0,45 $mg \cdot ml^{-1}$ luminolu a 0,065 $mg \cdot ml^{-1}$ kyseliny kumarové) a roztok peroxidu vodíku (0,1 M Tris pufr, 0,018% H_2O_2). Přítomnost zkoumaného proteinu byla na membráně detekována pomocí chemiluminiscenční kamery ChemiDoc (BioRad).

2.6. Izolace a kvantifikace RNA

Izolace RNA byla prováděna komerčním kitem Aurum™ Total RNA Mini Kit, který obsahuje reagencie na lyzi buněk, inaktivaci RNAs a izolaci RNA. Princip spočívá v zachycení RNA ze vzorku na mikrokolonách při centrifugaci lyzátu buněk. Po zachycení je RNA eluována elučním roztokem. Jde tedy o variantu afinitní chromatografie. Pro zamezení kontaminace vzorku RNAsami byla práce prováděna s pipetovacími špičkami s dvojitým filtrem. Izolovaná RNA byla zamražena na -70 °C.

RNA byla kvantifikována spektrofotometricky měřením absorbance při 260 nm, přičemž byl zjišťován také poměr absorbance při 260 a 280 nm a poměr absorbance při 260 a 230 nm. Poměr absorbance 260/280 vyjadřuje míru kontaminace vzorku proteiny, zatímco poměr absorbance 260/230 vyjadřuje kontaminace vzorku nízkomolekulárními látkami. RNA je čistá, pokud jsou poměry větší než 1.8.

2.7. Reverzní transkripce

Reverzní transkripce byla prováděna komerčním kitem ProtoScript® *Taq*. K RNA byl přidán roztok primeru oligo-dT a dNTP. Tato směs byla následně zahřáta na 70 °C pro navázání oligo-dT primerů na RNA. V druhém kroku byla ke směsi přidána reverzní transkriptasa spolu s inhibitory RNAs a směs byla inkubována 1 hodinu při 42 °C. Po transkripci byl enzym deaktivován inkubací 5 minut při 80 °C a cDNA mohla být použita ke kvantitativní PCR.

2.8. Kvantitativní PCR

Kvantitativní PCR je varianta PCR, při které se sleduje množství amplifikované DNA v reálném čase (Real-Time PCR) tak, že je v reakční směsi přítomné fluorescenční barvivo vážící se na dvouvlákennou DNA za vyzařování fluorescence. Míra exprese genů v buňkách ošetřených cnicinem byla vyjádřena relativně vůči expresi stejných genů u buněk neošetřených cnicinem (kontrola). Měření bylo prováděno pro každý gen i kontrolu v triplikátu a data byla zpracována metodou dvojitého rozdílu $2^{-\Delta\Delta C_T}$ [34]. Tato metoda je založena na porovnávání C_T, což je počet cyklů, za které fluorescence barviva dosáhne mezní hodnoty (threshold). Výpočet probíhá podle rovnice:

$$\Delta\Delta C_{T\,(genu)} = (C_{T,\,genu} - C_{T,referenčního\ genu}) - (C_{T,kontroly\ genu} - C_{T,\,kontroly\ referenčního\ genu})$$

Jako referenční gen byl použit *P0* – gen kódující ribosomální protein P0, jehož množství by v buňce nemělo být cnicinem ovlivněno. Procentuální míra exprese se spočte dosazením$\Delta\Delta C_T$ genu do vzorce $2^{-\Delta\Delta C_T} \cdot 100\%$.

Příklad výpočtu:

Referenční gen *P0* : $C_{T,K}$ (kontrola) = 17,94

$C_{T,C}$ (cnicin) = 18,06

Gen *cMYC:* $C_{T,K}$ (kontrola) = 24,17

$C_{T,C}$ (cnicin) = 26,84

$$\Delta\Delta C_{T,C} = (C_{T,C(cMYC)} - C_{T,C(P0)}) - (C_{T,K(cMYC)} - C_{T,K(P0)})$$

$$\Delta\Delta C_{T,C} = (26,84 - 18,06) - (24,17 - 17,94)$$

$$\Delta\Delta C_{T,C} = 2,55$$

$$2^{-2,55} \cdot 100\% = 17,08\ \%$$

Data byla zpracována v programu Bio-Rad CFX Manager.

Reakční směs se skládala z komerční směsi SsoFast EvaGreen® Supermix (Bio-Rad), cDNA vytvořené reversní transkripcí a primerů pro sledované geny. Komerční směs obsahovala DNA polymerasu, dNTP, ionty Mg^{2+} a fluorescenční barvivo EvaGreen. Reakce probíhala na 96 jamkové mikrotitrační destičce překryté folií pro zamezení odpařování vzorku při vyšších teplotách PCR cyklu.

Cykly kvantitativní PCR:

1) 1× 30 s, 95 °C

2) 40× 5 s, 95 °C; 20 s, 60 °C

3) zvyšování teploty z 65 °C na 95 °C po 0,5 °C za 10 s - měření křivky tání DNA

Použité primery:

cMYC: forward: TCGGATTCTCTGCTCTCCTC
reverse: TCGGTTGTTGCTGATCTGTC

NOXA: forward: TGTAGTTGGCATCTCCGCGC
reverse: CTCGACTTCCAGCTCTGCTG

BCL2: forward: GATAACGGAGGCTGGGATGC
reverse: TCAAACAGAGGCCGCATGCT

MCL1: forward: GGACAAAACGGGACTGGCTA
reverse: CCAAACCAGCTCCTACTCCA

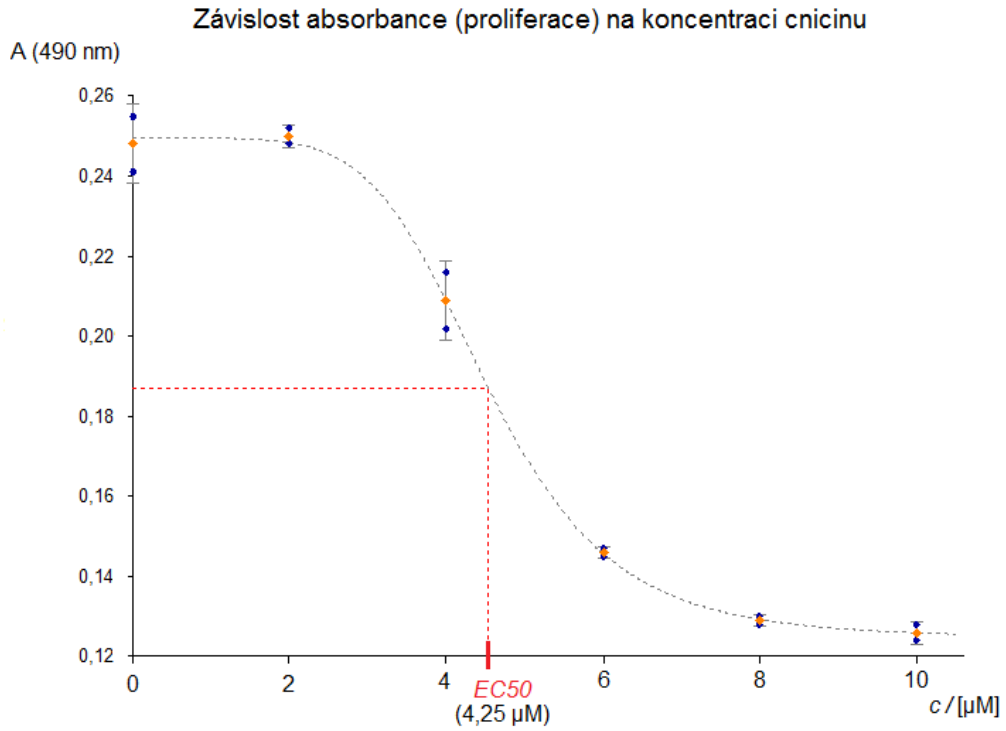
3. Cíl práce

Cílem této práce je ověřit protinádorové účinky seskviterpenového laktonu cnicinu a odhalit mechanismus, jakým u cílových buněk inhibuje proliferaci a indukuje apoptosu. Byl zkoumán vliv cnicinu na onkogen *cMYC*, pro-apoptotický gen *NOXA*, anti-apoptotické geny *MCL1* a *BCL2* a Hippo signalizační dráhu představovanou MST1/2 kinasou. Také byl zkoumán vliv cnicinu na protein DDX3.

4. Výsledky

4.1. Vliv cnicinu na viabilitu leukemických buněk

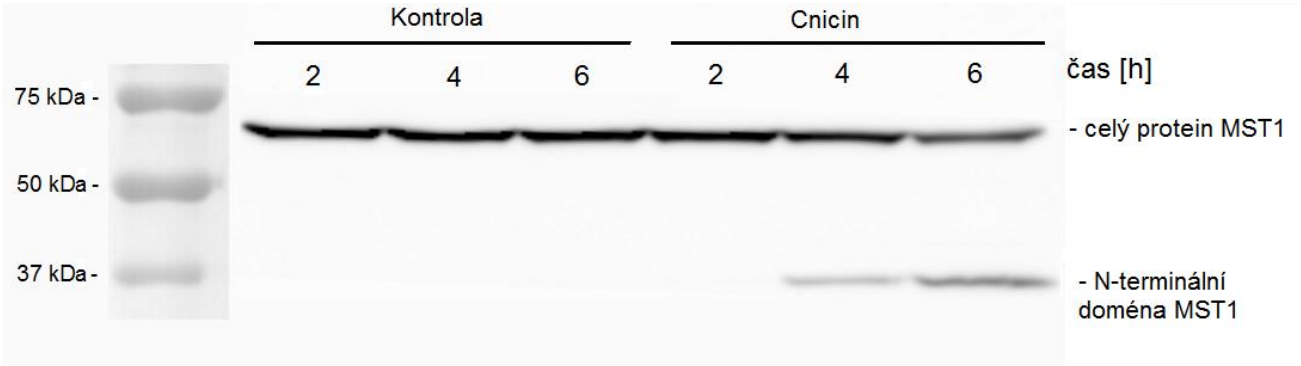
Na závislosti absorbance roztoku buněk s činidlem Cell Titer na koncentraci cnicinu *(obrázek 15)* je vidět prudké snížení viability při koncentracích cnicinu 4 µM a větší. Střední hodnota mezi absorbancí naměřenou u roztoku buněk bez cnicinu a absorbancí roztoku buněk s 10 µM cnicinem odpovídá koncentraci EC50, což je koncentrace cnicinu, která sníží viabilitu buněk o 50%. Pokus byl prováděn v biologickém duplikátu a hodnota pro EC50 je 4,33 µM (± 0,15).



Obrázek 15: Reprezentativní obrázek vlivu cnicinu na viabilitu buněk. Experiment byl prováděn v duplikátu (modré body).

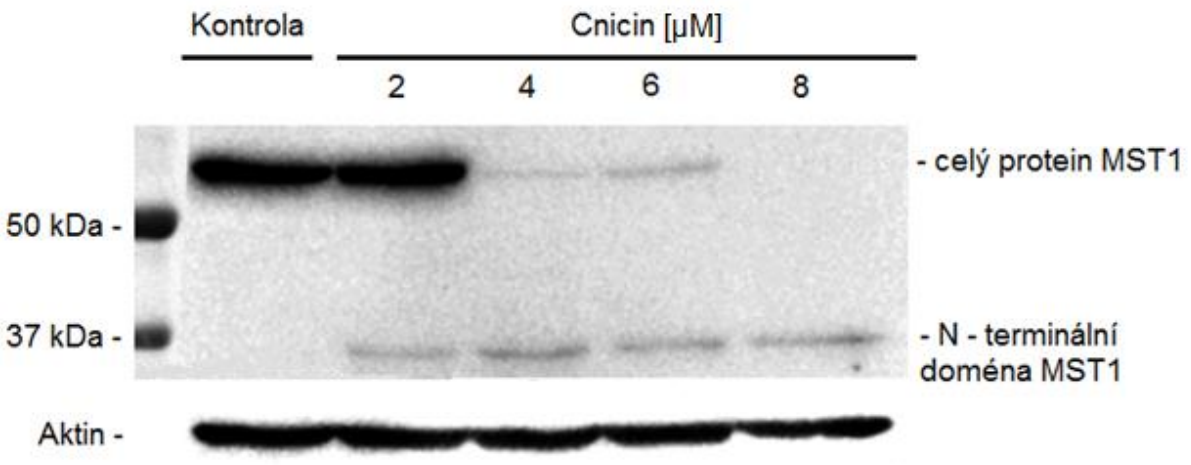
4.2. Vliv cnicinu na aktivaci MST1

Aktivace proteinu MST1 spočívá v odštěpení 36 kDa katalytické podjednotky. K buňkám byl přidán cnicin o koncentraci 15 µM a byly inkubovány různou dobu od dvou do šesti hodin *(obrázek 16)*. Došlo k aktivaci MST1 u buněk vystavených cnicinu po dobu 4 a 6 hodin. Cnicin tedy aktivuje Hippo signalizační dráhu.



Obrázek 16: Imunodetekce proteinu MST1 v buněčných lyzátech.

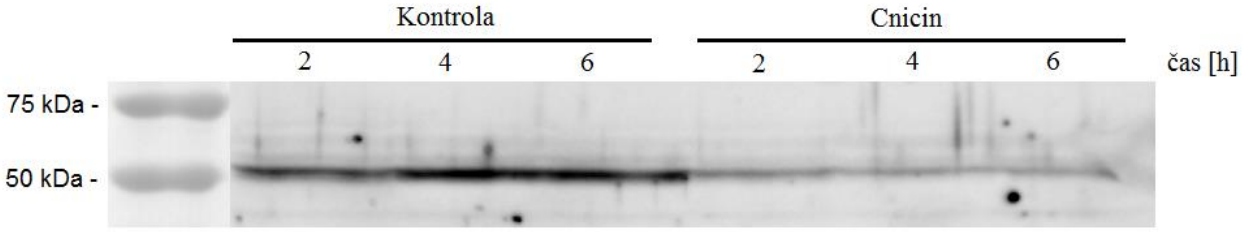
Dále byla zkoumána aktivace MST1 kinasy různou koncentrací cnicinu při 24 hodinové inkubaci *(obrázek 17)*. U všech koncentrací cnicinu dochází k aktivaci MST1 kinasy a u koncentrací vyšších dochází ke snížení hladiny neštěpeného MST1 a zůstává jen aktivní N – terminální doména. Pro kontrolu konstantní nanášky byla použita detekce hladiny aktinu.



Obrázek 17: Imunodetekce proteinu MST1 v buněčných lyzátech

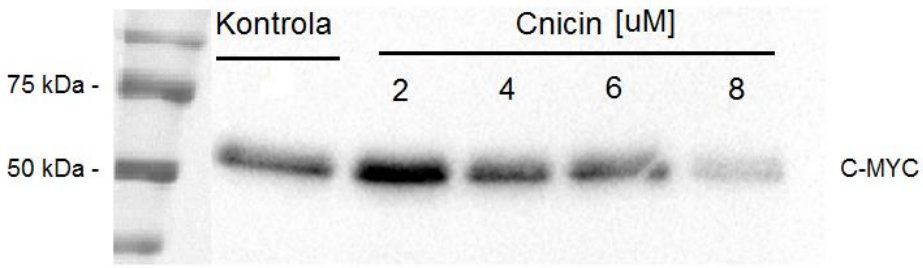
4.2.1. Vliv cnicinu na C-MYC onkoprotein

K buňkám byl přidán cnicin o koncentraci 15 µM a byly inkubovány různou dobu od dvou do šesti hodin *(obrázek 18)*. Z obrázku je patrné, že vlivem cnicinu se již po dvouhodinové inkubaci snižuje množství C-MYC v buňkách. Po více než čtyřech hodinách inkubace se již množství C-MYC nemění.



Obrázek 18: Imunodetekce proteinu C-MYC v buněčných lyzátech.

Dále byl sledován vliv různé koncentrace cnicinu na C-MYC. Buňky byly s různou koncentrací cnicinu inkubovány po dobu 24 hodin *(obrázek 19)*. Bylo zjištěno, že proteinu C-MYC v buňce s narůstající koncentrací ubývá, nejviditelněji při koncentraci 8 µM.

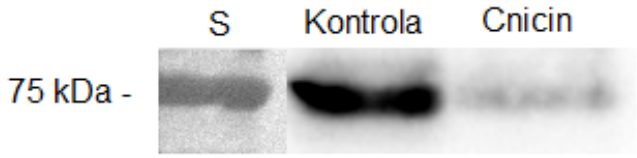


Obrázek 19: Imunodetekce proteinu C-MYC v buněčných lyzátech. Po 24 hodinové inkubaci.

4.2.2. DDX3

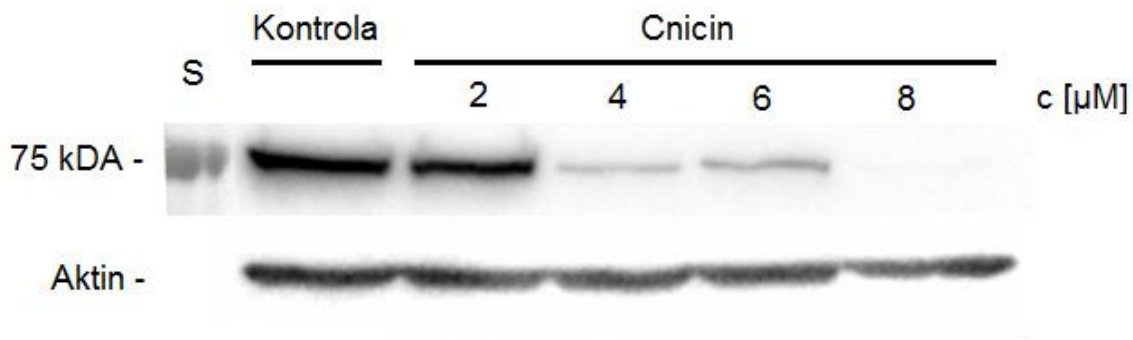
Protein DDX3 je RNA helikasa, ovlivňující proliferaci, apoptosu a diferenciaci. Přesné mechanismy jeho funkce nejsou známy. V dřívějších experimentech bylo zjištěno, že cnicin protein DDX3 ovlivňuje.

Buňky ošetřené 15 µM cnicinem po dobu 6 hodin vykazují snížené množství proteinu DDX3 *(obrázek 20)*.



Obrázek 20: Imunodetekce proteinu DDX3 v buněčných lyzátech po 6-ti hodinách inkubace. S – standard.

Množství proteinu DDX3 v buňkách ošetřených 2, 4, 6 a 8 µM cnicinem po dobu 24 hodin *(obrázek 21)* se snižuje a je nepřímo úměrné koncentraci cnicinu. Konstantní nanáška byla ověřena aktinem, jehož množství cnicin neovlivňuje.

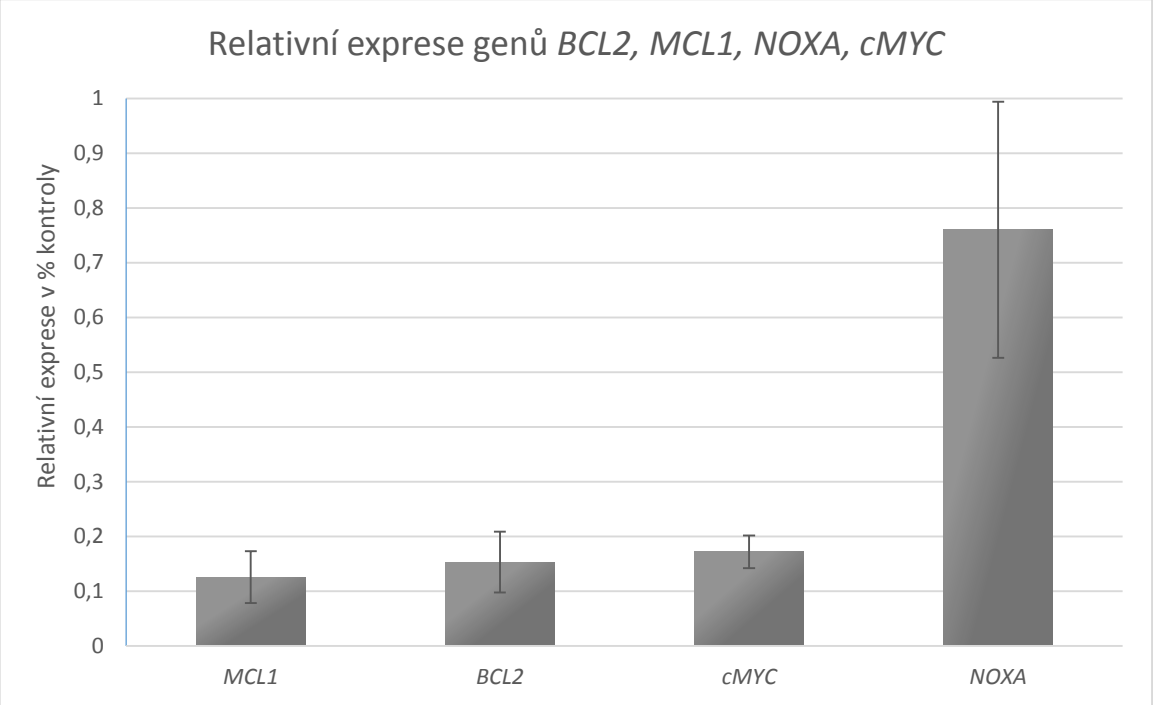


Obrázek 21: Imunodetekce proteinu DDX3 v buněčných lyzátech po 24 hodinách inkubace. S – standard

4.3. Vliv cnicinu na expresi vybraných genů

Pomocí kvantitativní PCR byly sledovány pro-apoptotický gen *NOXA,* anti-apoptotické geny *BCL2* a *MCL1* a onkogen c*MYC (obrázek 22)*.

U buněk ošetřených 15 μM cnicinem po dobu 6 hodin byly zjištěny velké poklesy exprese genů *MCL1, BCL2* a *cMYC*, zatímco jen menší pokles u pro-apoptotického genu *NOXA.* Jako referenční byl použit gen pro ribosomální podjednotku *P0*.



Obrázek 22: Relativní exprese genů vůči kontrole bez cnicinu. Jako referenční byl použit gen pro ribosomální podjednotku P0.

5. Diskuse

Při léčbě nádorových onemocnění mají jistě své místo i přírodní látky. Seskviterpenový lakton Cnicin, pocházející z rostliny *Cnicus benedictus* dokáže snižovat viabilitu leukemických buněk už při mikromolárních koncentracích, což bylo dokázáno při měření jeho EC50 *(obrázek 15)*. Způsob, jakým cnicin potlačuje viabilitu nádorových buněk, naznačují výsledky imunodetekce onkoproteinu C-MYC, který je jedním z hlavních deregulovaných onkoproteinů v leukemických buňkách a podporuje jejich proliferaci a glykolytický metabolismus. Buňky ošetřené cnicinem vykazují snížené množství tohoto onkoproteinu již po dvou hodinách inkubace. Toto snížení by mohlo být dáno inhibicí Pim-2 kinasy, která brání degradaci tohoto proteinu fosforylací [35], přičemž již byla dokázána inhibice této kinasy přímo cnicinem [29]. Při sledování hladiny mRNA pro C-MYC u buněk ošetřených cnicinem bylo ale detekováno také významné snížení jeho exprese. To naznačuje, že cnicin reguluje onkoprotein C-MYC jak na úrovni exprese, tak na úrovni stability již hotového proteinu, což vysvětluje razantní pokles množství C-MYC již po dvou hodinách inkubace.

Cnicin také způsoboval odštěpení 36 kDa velké aktivní podjednotky proteinu MST1 *(obrázky 16 a 17)*, čímž aktivoval Hippo signalizační dráhu. U Drosophily je jedním z cílů této signalizační dráhy transkripční koaktivátor Yorkie, jehož homologem je u savců transkripční koaktivátor YAP, a jeho cílem je právě onkogen c*MYC*. Byla popsána zpětnovazebná regulační smyčka, kdy aktivace Hippo signalizace u Drosophily vedla k fosforylaci proteinu Yorkie, jeho zadržení v cytoplazmě a následný pokles exprese genu *MYC* [36]. Aktivace Hippo signalizační dráhy cnicinem by mohla snižovat aktivitu transkripčního faktoru YAP a snižovat tak expresi genu *cMYC*.

V předchozích proteomických studiích, které byly v naší laboratoři provedeny s cílem studia protinádorového účinku cnicinu, byl jako jeden z proteinu, jehož množství je významně sníženo v přítomnosti cnicinu, nalezen také protein DDX3. Proto byl vliv cnicinu na jeho hladinu dále ověřován pomoci imunodetekce. DDX3 je RNA helikasa, hrající roli při transkripci, sestřihu RNA, transportu RNA a translaci. Přesná funkce tohoto proteinu není prozkoumána, ale v nedávné době bylo odhaleno, že funguje mimo jiné jako regulátor proteinu CK1 (kasein kinasa 1) a může tak ovlivňovat β-cateninovou signalizaci, která je důležitá pro regulaci růstu a diferenciace buněk. [37].

Bylo také zjištěno, že mutovaná forma DDX3 spolu s mutovaným β-cateninem zvyšuje viabilitu buněk meduloblastomu [38]. Imunodetekce potvrdila, že cnicin množství proteinu DDX3 v buňce snižuje *(obrázek 20 a 21)*.

Cnicin také způsobil změny v míře exprese pro- a anti-apoptotických genů. Byl zaznamenán velký pokles exprese genů kódujících anti-apoptotické proteiny *BCL2* a *MCL1*, u kterých byla exprese vlivem cnicinu snížena na méně než 20% oproti buňkám kontroly *(obrázek 22)*. Exprese pro-apoptotického genu *NOXA* byla také snížena, ale *v* mnohem menší míře než u genů anti-apoptotických. Další protinádorový efekt cnicinu tedy může být podpoření apoptosy narušením rovnováhy pro- a anti-apoptotických faktorů.

6. Závěr

Protinádorové účinky seskviterpenového laktonu cnicinu zahrnují snížení hladiny C-MYC onkoproteinu, nejspíše aktivací tumorsupresorové Hippo signalizační dráhy, a eliminaci anti-apoptotických proteinů *BCL2* a *MCL1*. Cnicin také snižuje množství proteinu DDX3, čímž může být vzhledem k jeho interakci s β-cateninovou signalizací snížena viabilita buněk.

1 Citovaná literatura

[1] M. Carlo a M. Croce, „Oncogenes and Cancer," *The New England Journal of Medicine,* č. 358, pp. 502-511, 2008.

[2] R. Sinha a D.-P. Häder, „UV-induced DNA damage and repair: a review," *Photochem. Photobiol. Sci.,,* č. 1, p. 225–236, 2002.

[3] M. C. Poirier, „Chemical-induced DNA Damage and Human Cancer Risk," *Discovery Medicine,* sv. 14, č. 77, pp. 283-288, 2012.

[4] T. A. Libermann a L. F. Zerbini, „Targeting Transcription Factors for Cancer Gene Therapy," *Current Gene Therapy,* č. 6, pp. 17-33, 2006.

[5] X. Dolcet, D. Llobet a J. Pallares, „NF-kB in development and progression of human cancer," *Virchows Archiv,* č. 446, pp. 475-482, 2005.

[6] C. V. Dang, „c-Myc Target Genes Involved in Cell Growth, Apoptosis, and Metabolism," *Molecular and Cellular Biology,* sv. 19, č. 1, pp. 1-11, 1999.

[7] I. Uribesalgo, S. A. Benitah a L. Di Croce, „From oncogene to tumor suppressor," *Cell Cycle,* sv. 11, č. 9, pp. 1757-1764, 2012.

[8] J.-w. Kim a C. V. Dang, „Cancer's Molecular Sweet Tooth and the Warburg Effect," *Cancer Research,* č. 66, pp. 8927-8930, 2006.

[9] R. Kumar a S. S. Nair, „Chromatin Remodeling in Cancer: A Gateway To Regulate Gene," *Molecular Oncology,* č. 6, p. 611–619, 2012.

[10] C. R. Clapier a B. R. Cairns, „The Biology of Chromatin Remodeling Complexes," *The Annual Review of Biochemistry,* č. 78, p. 273–304, 2009.

[11] A. S. Goustin, E. B. Leof, G. D. Shipley a M. H. L., „Growth Factors and Cancer," *Cancer Research,* č. 46, pp. 1015 - 1029, 1986.

[12] A. G. Renehan, M. Zwahlen, C. Minder a S. O'Dwyer, „Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer," *THE LANCET,* sv. 363, č. 1346 - 1353.

[13] T. Niault a M. Baccarini, „Targets of Raf in tumorigenesis," *Carcinogenesis,* č. 7, pp. 1165-74, 2010.

[14] P. Roberts a C. Der, „Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade forthe treatment of cancer," *Onkogene,* sv. 26, pp. 3291-3310, 2007.

[15] R. J. Davis, „Signal Transduction by the JNK Group of MAP Kinases," *The Cell,* sv. 103, pp. 239-252, 2000.

[16] E. F. Wagner a Á. R. Nebreda, „Signal integration by JNK and," *Nature Reviews Cancer,* sv. 9, pp. 537-549, 2009.

[17] G. L. Johnson a R. Lapadat, „Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases," *Science,* sv. 298, pp. 1911-1934, 2002.

[18] J. A. F. Vara, E. Casado a J. de Castro, „PI3K/Akt signalling pathway and cancer," *Cancer Threatment Reviews,* sv. 30, pp. 193-204, 2004.

[19] T. Franke, „PI3K/Akt: getting it right matters," *Onkogene,* sv. 27, p. 6473–6488, 2008.

[20] B. T. Hennessy, D. L. Smith, P. T. Ram, Y. Lu a G. B. Mills, „Exploiting The PI3K/AKT Pathway For Cancer Drug Discovery," *Nature,* sv. 4, pp. 988-1004, 2005.

[21] K. F. Harvey, X. Zhang a D. M. Thomas, „The Hippo pathway and human cancer," *Nature,* sv. 13, pp. 246-257, 2013.

[22] S. Elmore, „Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death," *Toxicologic Pathology,* sv. 4, č. 35, pp. 495-516, 2007.

[23] I. Budihardjo, H. Oliver a L. Michael, „Biochemical Pathways Of Caspase Activation

During Apoptosis,“ *Annu. Rev. Cell Dev. Biol,* sv. 15, pp. 269-290, 1999.

[24] D. R. Green, „Apoptotic Pathways: Paper Wraps Stone Blunts Scissors,“ *Cell,* sv. 102, pp. 1-4, 2000.

[25] R. J. Youle a A. Strasser, „The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death,“ *Nature,* sv. 9, pp. 47-59, 2008.

[26] G. Dewson a R. M. Kluck, „Bcl-2 family-regulated apoptosis in health and disease,“ *Cell Health and Cytoskeleton,* č. 2, pp. 9-22, 2010.

[27] Y. Li, G. I. Tennekoon, M. Birnbaum a M. A. Marchionni, „Neuregulin Signaling through a PI3K/Akt/Bad Pathway in Schwann Cell Survival,“ *Molecular and Cellular Neuroscience,* sv. 17, č. 4, p. 761–767, 2001.

[28] R. W. Johnstone a A. A. Ruefli, „Apoptosis: A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy,“ *The Cell,* sv. 108, pp. 153-164, 2002.

[29] K. Jöhrer, M. Obkircher a D. Neureiter, „Antimyeloma activity of the sesquiterpene lactone cnicin: impact on Pim-2 kinase as a novel therapeutic target,“ *Journal of Molecular Medicine,* č. 90, pp. 681-693, 2012.

[30] V. Teševic, S. Milosavljevic a V. Vajs, „Quantitative analysis of sesquiterpene lactone cnicin in seven Centaurea species wild-growing in Serbia and Montenegro using 1H-NMR spectroscopy,“ *Journal of the Serbian Chemical Society,* sv. 12, č. 72, pp. 1275-1280, 2007.

[31] D. Dunigan, S. Waters a T. Owen, „Aqueous soluble tetrazolium/formazan MTS as an indicator of NADH- and NADPH-dependent dehydrogenase activity.,“ *Biotechniques,* sv. 19, pp. 640-649, 1995.

[32] P. Smith, K. R.I. a H. G.T., „Measurement of protein using bicinchoninic acid,“ *Analytical Biochemistry,* sv. 1, č. 150, pp. 76-85, 1985.

[33] U. Laemmli, „Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4,“ *Nature,* č. 227, pp. 680 - 685, 1970.

[34] K. J. Livak a T. D. Schmittgen, „Analysis of Relative Gene ExpressionUsing Real-Time Quantitative PCR and the 2^(-ddCT) Method,“ *Methods,* č. 25, pp. 402-408, 2001.

[35] Y. Zhang, Z. Wang a X. Li, „Pim kinase-dependent inhibition of c-Myc degradation,“ *Oncogene,* č. 35, pp. 4809-4819, 2008.

[36] R. M. Neto-Silva, S. de Beco a L. A. Johnston, „Evidence for a growth stabilizing regulatory feedback mechanism between Myc and Yorkie, the Drosophila homolog of Yap,“ *Developmental Cell,* sv. 4, č. 19, pp. 507-520, 2010.

[37] C. M. Cruciat, C. Dolde a R. E. A. de Groot, „RNA Helicase DDX3 Is a Regulatory Subunit of Casein Kinase 1 in Wnt–B-Catenin Signaling,“ *Science,* č. 339, pp. 1436-1440, 2013.

[38] T. J. Pugh, S. D. Weeraratne a T. C. Archer, „Medulloblastoma exome sequencing uncovers subtype-specific somatic mutations,“ *Nature ,* sv. 488, pp. 106-110, 2012.

[39] C.-H. Chao a C.-M. Chen, „DDX3, a DEAD Box RNA Helicase with Tumor Growth–Suppressive Property and Transcriptional Regulation Activity of thep21waf1/cip1 Promoter, Is a Candidate Tumor Suppressor,“ *Cancer Research,* č. 66, pp. 6579-6588, 2006.

[40] K. Jöhrer, M. Obkircher, D. Neureiter, J. Parteli a C. Zelle-Rieser, „Antimyeloma activity of the sesquiterpene lactone cnicin:impact on Pim-2 kinase as a novel therapeutic target,“ *Journal of Molecular Medicine,* č. 90, pp. 681-693, 2012.

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