

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Klára Pospíšilová

Inhibitory eukaryotního translačního iniciačního faktoru eIF4E1
Inhibitors of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E1

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Martin Pospíšek, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 5. 2018

Podpis

Poděkování

Ráda bych upřímně poděkovala svému školiteli RNDr. Martinu Pospíškovi, Ph.D. za cenné rady, vstřícnost a trpělivost při vedení práce.

Abstrakt

Syntéza proteinů je jedním z nejdůležitějších procesů, které v buňce probíhají. Proto v buňce existují nejrůznější mechanismy, které ji regulují. Pokud tato regulace selže, může dojít k rozvoji závažných patologií. Příkladem je abnormální nárůst produkce eukaryotního translačního iniciačního faktoru 4E1, ke kterému dochází v některých typech nádorů, mezi něž patří například spinocelulární karcinom hlavy a krku, kolorektální karcinom, cervikální karcinom nebo karcinom plic. Zvýšená dostupnost faktoru 4E1 umožňuje, aby v transformovaných buňkách probíhala intenzivnější translace. Expres jednotlivých proteinů ovšem není navýšena stejnou měrou. Mnohem významnější vliv má nárůst hladiny faktoru 4E1 na proteiny onkogenní. Nádorové transformaci způsobené chybnou regulací faktoru 4E1 lze zabránit aplikací látek, které aktivitu faktoru 4E1 utlumují. Předmětem této práce je shrnutí poznatků o inhibitech faktoru 4E1.

Klíčová slova: eIF4E1, inhibitor, translace, iniciace, rakovina

Abstract

Protein synthesis is one of the most important processes that take place in a cell. Thus there are various mechanisms in a cell that regulate it. If that regulation fails it may lead to serious pathologies. An example of this is an abnormal increase in the production of eukaryotic translation initiation factor 4E1 which occurs in some types of cancer including head and neck squamous cell carcinoma, colorectal cancer, cervical cancer or lung cancer. Enhanced availability of factor 4E1 enables transformed cells to undertake a more intense translation. The expression of individual proteins is not increased to the same extent though. The enhancement in the level of factor 4E1 has a more significant effect on oncogenic proteins. Malignant transformation caused by an incorrect regulation of factor 4E1 can be precluded by an application of compounds that impair the activity of factor 4E1. A summarization of 4E1 inhibitors is the subject of this work.

Keywords: eIF4E1, inhibitor, translation, initiation, cancer

Obsah

| | |
|--|------|
| Abecední seznam zkratk..... | VIII |
| 1 Úvod..... | 1 |
| 2 Inhibice syntézy eIF4E1..... | 3 |
| 2.1 Komplementární oligonukleotidy | 3 |
| 2.1.1 Testování komplementárních oligonukleotidů na zvířecích modelech | 4 |
| 2.1.2 Klinické testy s komplementárními oligonukleotidy..... | 4 |
| 2.2 siRNA a shRNA cílící na mRNA proti eIF4E1 | 5 |
| 2.2.1 Kombinace siRNA a shRNA proti mRNA pro eIF4E1 s dalšími látkami | 6 |
| 2.2.2 Využití siRNA a shRNA proti mRNA pro eIF4E1 ve výzkumu..... | 7 |
| 2.3 Oligonukleotid indukující tvorbu G-kvartetů..... | 7 |
| 3 Inhibice vazby 5' čepičky mRNA..... | 9 |
| 3.1 Analogy methylguanosinové čepičky..... | 9 |
| 3.1.1 Modifikace analogů čepičky ovlivňující afinitu k eIF4E1 | 9 |
| 3.1.2 Použití analogů čepičky <i>in vivo</i> | 10 |
| 3.2 4Ei-1 | 12 |
| 3.2.1 Mechanismus působení 4Ei-1..... | 12 |
| 3.2.2 Použití 4Ei-1 <i>in vivo</i> | 13 |
| 3.3 Ribavirin..... | 14 |
| 3.3.1 Vliv ribavirinu na buněčné procesy..... | 14 |
| 3.3.2 Účinky ribavirinu v kombinaci s dalšími látkami..... | 15 |
| 3.3.3 Testování ribavirinu na zvířecích modelech | 15 |
| 3.3.4 Klinické testy s ribavirinem..... | 16 |
| 3.3.5 Využití ribavirinu ve výzkumu..... | 17 |
| 4 Inhibice interakce eIF4E1 s eIF4GI..... | 18 |
| 4.1 4EGI-1..... | 18 |
| 4.1.1 Mechanismus působení 4EGI-1 | 18 |
| 4.1.2 Vliv 4EGI-1 na buněčné procesy..... | 19 |
| 4.1.3 Testování účinků 4EGI-1 v živých modelech..... | 21 |
| 4.1.4 Chemické modifikace 4EGI-1 | 21 |

| | | |
|-------|---------------------------------|----|
| 4.1.5 | Další využití 4EGI-1 | 22 |
| 4.2 | 4E1RCat..... | 23 |
| 4.2.1 | 4E2RCat..... | 24 |
| 4.2.2 | Použití 4E1RCat a 4E2RCat..... | 25 |
| 4.3 | Ouabain..... | 25 |
| 4.4 | Perillový alkohol | 25 |
| 5 | Další inhibitory eIF4E1 | 27 |
| 5.1 | RNA aptamery | 27 |
| 5.2 | DNA aptamery..... | 27 |
| 6 | Srovnání inhibitorů eIF4E1..... | 28 |
| 7 | Závěr..... | 30 |
| | Seznam použité literatury | 31 |

Abecední seznam zkratk

| | |
|---------------|--|
| 4E-BP1 | eIF4E1 vazebný protein 1 |
| 4E1RCat | inhibitor interakce eIF4E1 s eIF4GI |
| 4E2RCat | inhibitor interakce eIF4E1 s eIF4GI |
| 4EGI-1 | inhibitor interakce eIF4E1 s eIF4GI |
| 4Ei-1 | inhibitor interakce eIF4E1 s čepičkou mRNA |
| 5-FU | fluorouracil |
| ABT-737 | inhibitor Bcl-2 |
| ADK | adenosin kináza |
| Akt | protein kináza B |
| AML | akutní myeloidní leukémie |
| Arg | arginin |
| ATF-4 | aktivační transkripční faktor 4 |
| ATP | adenosin trifosfát |
| Bak | Bcl-2 homologní antagonist/zabiják |
| Bax | protein X asociovaný s Bcl-2 |
| BCL2A1 | protein A1 příbuzný Bcl-2 |
| BCL2L1 | protein 1 podobný Bcl-2 |
| BHK-21 | buněčná linie odvozená od ledvinných buněk křeččích mlád'at |
| c-FLIP | buněčný inhibiční protein podobný FLICE |
| CHOP | protein homologní k proteinu vázajícímu CCAAT-enhancer |
| (h)DcpS | (lidský) scavengerový protein dekapující mRNA |
| DMS | dimethyl sulfát |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| DR5 | receptor smrti 5 |
| Drp-1 | protein 1 příbuzný dynaminu |
| eIF2 α | α podjednotka eukaryotního translačního iniciačního faktoru 2 |
| eIF4A | eukaryotní translační iniciační faktor 4A |
| eIF4E1 | eukaryotní translační iniciační faktor 4E1 |
| eIF4F | eukaryotní translační iniciační faktor 4F |
| eIF4GI | eukaryotní translační iniciační faktor 4GI |
| EMCV | virus encefalomyokarditidy |
| ER | endoplasmatické retikulum |
| EVT | extravilózní trofoblast |
| EZH2 | homologní protein 2 zesilovače zeste |

| | |
|----------------------|--|
| FGF-2 | fibroblastový růstový faktor 2 |
| Fis-1 | protein mitochondriálního štěpení 1 |
| Gli1 | onkogen asociovaný s gliomy 1 |
| Glu | kyselina glutamová |
| GRP-78 | 78 kDa protein regulovaný glukózou |
| GT1-1 | buněčná linie myších hypothalamových buněk |
| HEK-293 | buněčná linie lidských embryonálních ledvinných buněk |
| HeLa | buněčná linie odvozená od buněk karcinomu děložního čípku |
| HIF-1 α | faktor 1 α indukibilní hypoxií |
| Hint1 | nukleotid vazebný protein 1 s histidinovými triádami |
| HNE1 | buněčná linie nazofaryngeálního karcinomu |
| Hsp27 | protein teplotního šoku 27 |
| HSV-1 | herpes simplex virus 1 |
| IC ₅₀ | poloviční maximální inhibiční koncentrace |
| IFN- α | interferon α |
| IRES | vnitřní místo pro vstup ribozomu |
| ISIS 183750 | komplementární oligonukleotid cílící na mRNA pro eIF4E1 |
| ISIS eIF4E Rx | komplementární oligonukleotid cílící na mRNA pro eIF4E1 |
| LRRK2 | kináza 2 opakovaní bohatých na leucin |
| LY2275796 | komplementární oligonukleotid cílící na mRNA pro eIF4E1 |
| LY294002 | inhibitor fosfatidylinositol-3-kinázy |
| Lys | lysin |
| m ⁷ GMP | 7-methylguanosenmonofosfát |
| m ⁷ GpppG | 7-methylguanosen-5'-trifosfát-5'-guanosen |
| m ⁷ GTP | 7-methylguanosen trifosfát |
| MAPK | mitogenem aktivované proteinkinázy |
| Mcl-1 | protein 1 indukované diferenciaci buněk myeloidní leukémie |
| Mfn-1 | mitofusin-1 |
| MG132 | inhibitor proteazomu |
| MK-2206 | inhibitor Akt |
| MMP-9 | matrixová metaloproteináza 9 |
| Mnk | kinázy intaragující s mitogenem aktivovanými proteinkinázami |
| mRNA | mediátorová RNA |
| mTOR | mechanický cíl rapamycinu |
| mTORC1 | komplex 1 kinázy mTOR |
| Noxa | forbol-12-myristát-13-acetátem indukovaný protein 1 |

| | |
|-------------------|---|
| obr. | obrázek |
| ON1 | oligonukleotid 1 |
| ON2 | oligonukleotid 2 |
| Opa-1 | mitochondriální GTPáza podobná dynaminu |
| PABP | poly(A) vazebný protein |
| PARP | poly(ADP-ribóza) polymeráza |
| PERK | kináza endoplasmatického retikula podobná RNA protein kináze |
| PI3K | fosfatidylinositol-3-kináza |
| PP242 | inhibitor mTOR |
| PrP ^C | prionová bílkovina |
| PrP ^{Sc} | infekční prionová bílkovina |
| Puma | modulátor apoptózy navýšený vlivem p53 |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| ROS | reaktivní sloučeniny kyslíku |
| RRL | lyzát z králičích retikulocytů |
| RSV | respirační syncytiální virus |
| S6K1 | kináza 1 ribozomálního proteinu S6 |
| ScGT1-1 | buněčná linie myších hypothalamových buněk infikovaných PrP ^{Sc} |
| Ser | serin |
| shRNA | malá vlásenková RNA |
| siRNA | malá interferující RNA |
| SN-38 | metabolit irinotecanu |
| SUMO-2 | malý modifikátor podobný ubiquitinu |
| SV | Sindbis virus |
| TGF- β 1 | transformující růstový faktor β 1 |
| Thr | threonin |
| TRAIL | apoptózu indukující ligand příbuzný tumor nekrotizujícímu faktoru |
| TRAP1 | protein 1 asociovaný s receptorem tumor nekrotizujícího faktoru |
| tRNA | transferová RNA |
| Trp | tryptofan |
| UGT1A | UDP glukuronidyltransferáza podrodiny 1A |
| UPR | odpověď na přítomnost nesložených proteinů |
| UTR | netranslatovaná oblast |
| VEGF | vaskulární endoteliální růstový faktor |
| VSV | virus vezikulární stomatitidy |
| VacV | virus vakcínie |

1 Úvod

Eukaryotní translační iniciační faktor 4E1 (eIF4E1) je protein klíčový pro správné zahájení translace. Jeho funkce spočívá v rozpoznání 5' konce mRNA, tedy místa, ze kterého začíná skenování mRNA. eIF4E1 se na 5' konec mRNA váže díky své schopnosti interagovat s methylguanosi- novou čepičkou, specifickou strukturou, kterou má na svém 5' konci každá eukaryotní mRNA. Po asociaci eIF4E1 s čepičkou se skládá proteinový komplex eIF4F, kterého je eIF4E1 součástí a který dále sestává z RNA helikázy eIF4A a z eIF4GI, proteinu tvořícího lešení pro eIF4E1 a eIF4A. Kromě eIF4E1 a eIF4A se na eIF4GI váže i PABP, protein asociující s 3' koncem mRNA, čímž je umožněno zacyklení mRNA. Následně celý komplex asociuje s 43S preiniciačním komplexem sestávajícím mimo jiné z malé ribozomální podjednotky a ternárního komplexu obsahujícího iniciační methionyl-tRNA a dochází ke skenování vlákna mRNA a hledání iniciačního kodónu^{1,2}.

Preference eIF4E1 pro různé mRNA ovšem není stejná a účinnost translace jednotlivých mRNA se proto liší. Lépe jsou překládány mRNA s krátkou 5' netranslatovanou oblastí (5'UTR) bez výrazné sekundární struktury. Tyto mRNA jsou někdy označovány jako nezávislé na eIF4E1, neboť hladina eIF4E1 v buňce nemá na míru jejich translace velký vliv. Jde zejména o mRNA pro proteiny, které je nutné stabilně exprimovat ve všech fázích života buňky, například β -aktin. Naopak mRNA s dlouhým a strukturovaným 5'UTR jsou translatovány tím účinněji, čím více je v buňce dostupného eIF4E1. Jsou proto nazývány mRNA závislé na eIF4E1. Do této skupiny patří hlavně růstové a antiapoptotické faktory, mnohé z těchto proteinů jsou označovány jako onkogenní. Příkladem je c-Myc, cykliny, VEGH, nebo survivin³.

Za normálních okolností je abundance eIF4E1 v savčí buňce nejnižší ze všech translačních iniciačních faktorů a jeho aktivita je regulována řadou mechanismů. Nejznámějšími represory funkce eIF4E1 jsou 4E vazebné proteiny (4E-BPs), zejména 4E-BP1. Tyto proteiny se na eIF4E1 váží do podobné oblasti jako eIF4GI, čímž vazebné místo pro eIF4GI blokuje a zabraňuje tak skládání komplexu eIF4F. Aktivita 4E-BP1 je regulována Ser/Thr kinázou mTOR v komplexu mTORC1, jehož je 4E-BP1 přímým substrátem. mTORC1 ve své aktivované formě 4E-BP1 fosforyluje a způsobuje tak jeho disociaci z eIF4E1. Tím se eIF4E1 uvolní pro interakci s eIF4GI. Komplex mTORC1 sám je aktivován signalizací kinázy Akt. Dalším způsobem regulace aktivity eIF4E1 je jeho fosforylace na Ser209, která je zajišťována Mnk kinázami. Ty jsou regulovány MAPK signální dráhou. Fosforylace eIF4E1 usnadňuje translaci některých onkogenních mRNA⁴.

Přes obsáhlou regulaci je ovšem v některých typech nádorových buněk hladina eIF4E1 zvýšená. Mezi tyto druhy rakoviny patří leukémie, lymfomy, spinocelulární karcinom hlavy a krku, kolorektální karcinom, cervikální karcinom, karcinom prsu, prostaty, plic nebo močového měchýře. Důvodem zvýšené hladiny eIF4E1 může být chybná regulace jeho aktivity, duplikace genu

pro eIF4E1 nebo zvýšení stability jeho mRNA. Nárůst exprese eIF4E1 vede k nadměrné produkci proteinů závislých na eIF4E1 a způsobuje transformaci buněk. Zvýšená hladina eIF4E1 navíc často bývá spojena s horší prognózou onemocnění, s rezistencí a s vyšší pravděpodobností relapsu. Faktor 4E1 je proto považován za onkogen a jsou hojně studovány látky a mechanismy, které jeho aktivitu snižují^{5,6}.

Cílem této práce je:

podat přehled inhibitorů eIF4E1 a shrnout současné poznatky o jejich působení v buňkách a živých organismech. Dále si práce klade za cíl porovnat potenciál jednotlivých přístupů s ohledem na možné využití v léčbě onkologických onemocnění. Tato práce se zaměřuje pouze na inhibitory cílící přímo na eIF4E1 a s výjimkou oligonukleotidů pouze na inhibitory nízkomolekulární.

2 Inhibice syntézy eIF4E1

Jedním ze způsobů, jak lze omezit zvýšenou aktivitu eIF4E1 v transformovaných buňkách, je snížit jeho expresi. Teoreticky toho lze dosáhnout v několika různých krocích tohoto procesu, v praxi se ale nejčastěji využívá metod, které buď zablokují mRNA pro translaci, nebo usnadňují její degradaci. V obou případech se sníží množství dostupné mRNA pro syntézu proteinu a v důsledku i hladina proteinu samotného.

2.1 Komplementární oligonukleotidy

Komplementární oligonukleotidy jsou krátká vlákna RNA schopná tvořit s buněčnou mRNA na základě vzájemné komplementarity dvouvláknovou strukturu. Tvorba takového komplexu znesnadňuje rozpoznání a čtení mRNA translačním aparátem. Dvouvláknová RNA je navíc v buňce rozpoznávána jako cizorodá molekula a následně proto bývá degradována mechanismem RNA interference.

To, že vede aplikace oligonukleotidů komplementárních k mRNA pro eIF4E1 ke snížení hladiny eIF4E1 v buňce, bylo zdokumentováno pro HeLa buňky^{7,8}, buňky karcinomu hlavy a krku⁹, buňky adenokarcinomu tlustého střeva¹⁰, buňky nemalobuněčného karcinomu plic⁸, buňky karcinomu prostaty¹¹ a buňky mezoteliomu¹². Spolu s abundancí eIF4E1 poklesla působením komplementárních oligonukleotidů cílících na mRNA pro eIF4E1 i exprese proteinů s mRNA závislou na eIF4E1, konkrétně VEGF^{8,9}, cyklinu D1⁸ a c-Myc^{8,11}. Naopak hladina β -aktinu nebyla přítomností komplementárních oligonukleotidů proti eIF4E1 v buňkách výrazně ovlivněna^{8,12}. I proto nemělo na netransformované buněčné linie vnesení komplementárních oligonukleotidů proti mRNA pro eIF4E1 velký vliv¹². Mezi další důsledky poklesu hladiny eIF4E1 patří zpomalení dělení buněk^{7,9}, zvýšení kontaktní inhibice⁹, menší invazivita buněk¹⁰ a větší náchylnost buněk k apoptóze^{8,11,12}.

Kromě vlivu samostatné aplikace komplementárních oligonukleotidů cílených na mRNA pro eIF4E1 bylo sledováno i jejich působení na buňky v součinnosti s dalšími chemoterapeutiky. Ukázalo se, že kombinace komplementárních oligonukleotidů proti mRNA pro eIF4E1 s gemcitabinem nebo pemetrexedem snižuje životaschopnost buněk mezoteliomu více, než o kolik ji dokáže snížit vnesení samotných komplementárních oligonukleotidů¹². Aplikace komplementárních oligonukleotidů cílených na mRNA pro eIF4E1 také zvýšila u buněk nemalobuněčného karcinomu plic účinek erlotinibu, vůči kterému byla použita buněčná linie rezistentní¹³. Podobně vedlo snížení hladiny eIF4E1 s využitím komplementárních oligonukleotidů u buněk karcinomu prsu rezistentních k tamoxifenu ke zvýšení citlivosti buněk vůči tomuto chemoterapeutiku¹⁴.

2.1.1 Testování komplementárních oligonukleotidů na zvířecích modelech

Kromě lidských buněčných linií byly pro testování účinků komplementárních oligonukleotidů cílených na mRNA pro eIF4E1 použity i myší modely. Do jedné skupiny myší byly implantovány krysí embryonální fibroblasty s uměle zvýšenou expresí eIF4E1 a do druhé skupiny myší byly implantovány stejné buňky, které ale byly navíc transfekovány oligonukleotidy komplementárními k mRNA pro eIF4E1. Buňky s vnesenými komplementárními oligonukleotidy měly stejně jako při testování na buněčných liniích sníženou hladinu eIF4E1 a tvořily v myších výrazně menší a méně invazivní tumory se sníženou metastatickou aktivitou. Po čase byly ovšem z těchto tumorů zpětně vyzolovány buňky, které vykazovaly zvýšenou expresi eIF4E1 oproti netransformovaným buňkám a u kterých se obnovila schopnost metastazovat¹⁵. Naopak lidské buňky karcinomu hlavy a krku, které byly nejdříve transfekovány oligonukleotidy komplementárními k mRNA pro eIF4E1 a poté implantovány do myšího modelu, nevytvořily v myších žádný tumor ani po 40 dnech⁹. Komplementární oligonukleotidy cílící na eIF4E1 byly také podávány nitrožilně myším se štěpem lidských buněk karcinomu prsu. Během dvou měsíců se u těchto myší znatelně zmenšila velikost tumorů, přičemž na myších nebyly pozorovány žádné vedlejší účinky. Škodlivé působení nebylo pozorováno ani při podávání komplementárních oligonukleotidů proti eIF4E1 zdravým myším⁸.

2.1.2 Klinické testy s komplementárními oligonukleotidy

Vzhledem k dobrým výsledkům studií provedených na buněčných liniích a myších modelech byly provedeny i dvě klinické studie na pacientech s různými typy rakoviny.

V první studii fáze I (NCT00903708*) byl onkologickým pacientům podáván komplementární oligonukleotid proti mRNA pro eIF4E1 nazvaný LY2275796. U většiny pacientů v této studii buď nebyly pozorovány žádné vedlejší příznaky léčby, nebo jejich úroveň dosahovala pouze stupně 1/2 na pětibodové škále. Celkově nebyl pozorován žádný vedlejší účinek stupně 4 nebo 5. Biopsie ukázaly, že došlo v buňkách tumoru u většiny pacientů ke snížení množství mRNA pro eIF4E1 i proteinu samotného. Přesto ale nebylo u pacientů zaznamenáno zmenšení velikosti tumorů ani jiná odpověď na léčbu. Autoři studie proto navrhují použít komplementární oligonukleotidy v kombinaci s některým chemoterapeutikem, případně se zaměřit cíleně na pacienty s typem rakoviny charakteristickým vysokou hladinou eIF4E1¹⁶.

Druhá klinická studie (NCT01675128*) testovala společné působení oligonukleotidu komplementárního k mRNA pro eIF4E1 nazvaného ISIS 183750 a irinotecanu u pacientů s kolorektálním karcinomem. V preklinických studiích na buněčných liniích došlo po aplikaci ISIS 183750 ke snížení hladiny mRNA kódující eIF4E1 a k utlumení proliferace buněk. Taktéž byl pozorován aditivní účinek ISIS 183750 a SN-38, metabolitu irinotecanu. U pacientů vedlo podání ISIS 183750

* identifikační kód klinické studie v databázi ClinicalTrials.gov

k poklesu hladiny mRNA pro eIF4E1 v periferní krvi i v biopsii tumoru a byla i potvrzena přítomnost ISIS 183750 v rakovinných buňkách. Nebyl ovšem zaznamenán žádný výraznější vliv této léčby na průběh onemocnění, pouze u necelé poloviny pacientů došlo ke stabilizaci onemocnění. Užívání ISIS 183750 s irinotecanem bylo také spojeno s chronickými mírnými vedlejšími účinky, zejména únavou, a u třetiny pacientů se vyskytla neutropenie úrovně 3 nebo 4. Testy proto dále nepokračují¹⁷.

V současnosti by mělo být dokončeno testování fáze I/II pro komplementární oligonukleotid proti mRNA pro eIF4E1 nazvaný ISIS eIF4E Rx. V jedné studii měl být podáván v kombinaci s docetaxelem a prednizonem pacientům s rakovinou prostaty (NCT01234025*), ve druhé měl být aplikován v kombinaci s carboplatinou a paclitaxelem u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic (NCT01234038*). Výsledky ani jedné studie ovšem nejsou k dispozici.

Skupina komplementárních oligonukleotidů cílících na snížení exprese eIF4E1 je chráněna patentem (WO2005028628†).

2.2 siRNA a shRNA cílí na mRNA proti eIF4E1

Další metodou, která v buňce umožňuje snížit hladinu mRNA pro určitý protein, je vnesení malých interferujících RNA (siRNA) nebo malé vlásenkové RNA (shRNA). Oba způsoby využívají RNA interference. V případě siRNA se jedná o dvojici krátkých navzájem komplementárních vláken RNA, z nichž jedno nese sekvenci shodnou s buněčnou mRNA. Toto vlákno je v buňce degradováno a druhé vlákno je následně použito pro vyhledávání a degradaci komplementárních mRNA. Podobný mechanismus účinku má i shRNA, pouze se v tomto případě jedná o jediné vlákno RNA, které ovšem na základě vzájemné komplementarity svých částí vytváří vlásenku připomínající dvouvláknovou strukturu.

Vnesení siRNA nebo shRNA proti mRNA pro eIF4E1 do buněk vedla u všech testovaných buněčných linií ke snížení exprese eIF4E1. Konkrétně se jedná o buňky endometriálního^{18,19}, endocervikálního²⁰ a renálního karcinomu²¹, myxoidního liposarkomu²², mnohočetného myelomu²³, karcinomu prsu^{24–26}, spinocelulárního karcinomu hlavy a krku²⁷, nemalobuněčného karcinomu plic²⁸, adenokarcinomu plic a adenokarcinomu prostaty²⁶, melanomové²⁹ a retinoblastomové buňky³⁰. U HeLa buněk, buněk kolorektálního karcinomu a buněk adenokarcinomu plic byla pozorována snížená hladina nejen proteinu eIF4E1, ale i odpovídající mRNA^{31,32}. Pokles zaznamenala u buněk renálního karcinomu i fosforylovaná varianta eIF4E1²¹. Naopak množství ostatních translačních iniciačních faktorů se v buňkách po vnesení siRNA proti mRNA pro eIF4E1 nezměnilo^{31,33,34}. U tří linií buněk karcinomu prsu bylo ovšem zároveň se snížením hladiny eIF4E1

* identifikační kód klinické studie v databázi ClinicalTrials.gov

† číslo patentu v databázi Světové organizace duševního vlastnictví

pozorováno i snížení exprese 4E-BP1. Na fosforylaci Akt neměla v buňkách karcinomu prsu transfekce siRNA proti mRNA pro eIF4E1 žádný vliv²⁴.

V HeLa buňkách a buňkách karcinomu prsu vedlo vnesení siRNA proti mRNA pro eIF4E1 do buněk ke zmenšení poměru polyzomů k monozomům a u polyzomů navíc k navýšení podílu těch lehkých^{24,33}. To dokazuje potlačení translace v těchto buňkách. Snížena byla v řadě buněčných linií po transfekci siRNA proti mRNA pro eIF4E1 také exprese cyklinu D1^{23,24,27,28,30,31,35,36}. Tento protein hraje roli v přechodu buňky z G1 do S fáze buněčného cyklu, pokles jeho množství se proto podílel na zastavení buněčného cyklu mezi těmito fázemi. Patrná je tato skutečnost na zvýšeném procentu buněk v G1 fázi a naopak sníženém procentu buněk v S fázi po vnesení siRNA proti mRNA pro eIF4E1 v porovnání s kontrolou^{19,24,25,27,32,37}. Pokles zaznamenala po transfekci buněk siRNA nebo shRNA proti mRNA pro eIF4E1 i exprese c-Myc^{23,28,30,38} a VEGF^{22,27,30}, v důsledku čehož došlo k potlačení angiogeneze²².

Kromě toho byla v buňkách po aplikaci siRNA nebo shRNA proti mRNA pro eIF4E1 snížená hladina Bcl-X_L²⁴ a Bcl-2^{24,25}. Naopak exprese Bax se zvýšila²⁵. V jedné buněčné linii nemalobuněčného karcinomu plic a dvou liniích endometriálního karcinomu byl nalezen i produkt štěpení PARP^{19,28}. Všechny tyto změny značí probíhající apoptózu, není proto překvapivé, že byla u buněk po snížení exprese eIF4E1 pomocí siRNA nebo shRNA zaznamenána zvýšená frekvence buněčné smrti v porovnání s kontrolami^{19–21,23,25–27,30–32,34,39,40}. Na netransformované buňky měla transfekce siRNA proti mRNA pro eIF4E1 výrazně menší cytotoxický účinek²⁶.

Mezi další změny pozorované v buňkách po vnesení siRNA nebo shRNA proti mRNA pro eIF4E1 patří zpomalení jejich proliferace^{18,19,21,22,24,25,28–30,40,41} a snížení jejich migrace a invazivity^{19–21,25,28,29,32,39}. Snížení hladiny eIF4E1 pomocí siRNA také potlačuje epiteliálně-mezenchymální tranzici indukovanou cytokinem TGF- β ⁴².

2.2.1 Kombinace siRNA a shRNA proti mRNA pro eIF4E1 s dalšími látkami

Transfekce siRNA proti mRNA pro eIF4E1 senzitivizuje buňky karcinomu prsu k cisplatině, docetaxelu, paclitaxelu a adriamycinu²⁵ a retinoblastomové buňky ke carboplatině³⁰. U buněk spinocelulárního karcinomu hlavy a krku byl pozorován aditivní účinek siRNA proti mRNA pro eIF4E1 s cisplatinou na tvorbu kolonií, i když na přežití buněk jejich kombinace aditivní efekt neměla²⁷. Buňky spinocelulárního karcinomu jazyka jsou aplikací siRNA proti mRNA pro eIF4E1 senzitivizovány k paclitaxelu⁴⁰. Snížením hladiny eIF4E1 pomocí siRNA se také zvyšuje účinek erlotinibu na rezistentní buňky nemalobuněčného karcinomu plic²⁸. Podobně zvyšuje transfekce shRNA proti mRNA pro eIF4E1 citlivost rezistentních buněk endometriálního karcinomu vůči cisplatině¹⁹. Snížení exprese eIF4E1 pomocí siRNA podporuje také působení 5-FU a IFN- α na buňky renálního karcinomu²¹. Pro buňky karcinomu močového měchýře mělo lepší účinky společné působení siRNA proti mRNA pro eIF4E1 a proti mRNA pro S6K1, než zacílení pouze

na mRNA pro jeden z proteinů^{20,39}. Ukázalo se také, že vnesení siRNA proti mRNA pro eIF4E1 do buněk karcinomu prsu, adenokarcinomu plic a adenokarcinomu prostaty zvyšuje účinek radioterapie na tyto buňky²⁶.

Není bez zajímavosti, že suprese eIF4E1 v myších pomocí shRNA chrání před alopecií v důsledku chemoterapie. Kromě toho siRNA proti mRNA pro eIF4E1 částečně chrání netransformované buňky před cytotoxickými účinky paclitaxelu, vinorelbinu a nocodazolu³⁷.

2.2.2 Využití siRNA a shRNA proti mRNA pro eIF4E1 ve výzkumu

Snížení exprese eIF4E1 v buňkách pomocí siRNA bylo použito k výzkumu vazby mezi translací závislou na čepičce a translací závislou na IRES. Oproti původní představě, že eIF4E1 nemá na translaci závislou na IRES žádný vliv, se zjistilo, že buňky transfekované siRNA proti mRNA pro eIF4E1 a zároveň infikované EMCV translatují virovou mRNA mnohem intenzivněji, produkují více virového infekčního potomstva v kratším čase a je na nich dříve zřetelný cytopatický účinek viru. Důvodem je zřejmě větší dostupnost ostatních iniciačních faktorů a ribozomů, které jsou jinak vázány v komplexu s eIF4E1 a mRNA s čepičkou³³.

Využití našly siRNA proti mRNA pro eIF4E1 i ve výzkumu vlivu translačních iniciačních faktorů na tvorbu stresových granulí. Tento výzkum ovšem ukázal, že eIF4E1 na indukci stresových granulí významný vliv nemá⁴³.

Hladina eIF4E1 je zvýšená nejen v transformovaných buňkách, ale i v placentárních cytotrofoblastech a v nediferencovaných buňkách extravilózního trofoblastu (EVT). Deplece eIF4E1 pomocí siRNA v placentárních explantech indukuje diferenciaci buněk EVT a zvyšuje také jejich motilitu. Naopak transfekce lidských placentárních trofoblastů pomocí siRNA proti eIF4E1 způsobila stejně jako v rakovinných buňkách pokles hladiny eIF4E1 a v důsledku i pokles cyklinu D1, c-Myc a VEGF. Proliferace byla utlumena a více buněk procházelo buněčnou smrtí. Stejně jako u transformovaných buněk došlo také k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi a ke snížení migrace a invazivity buněk³⁶.

2.3 Oligonukleotid indukující tvorbu G-kvartetů

Zajímavým způsobem, jak lze zabránit translaci určité mRNA, je navodit v ní vznik stabilní sekundární struktury, která brání nasednutí ribozomů nebo následnému čtení mRNA. Takovou strukturou může být G-kvartet, struktura tvořená čtyřmi guaniny stabilizovanými do tvaru čtverce. mRNA pro eIF4E1 takovou strukturu samovolně netvoří, lze ji v ní ovšem indukovat asociací s DNA oligonukleotidem s vhodně navrženou sekvencí bohatou na guanin.

Pro experiment byly navrženy dva oligonukleotidy (ON1 a ON2). Oba oligonukleotidy obsahovaly sekvenci komplementární k části mRNA pro eIF4E1 a zajišťující specifické zacílení

oligonukleotidu. Vazba ON1 byla cílena na 5'UTR mRNA pro eIF4E1, zatímco ON2 obsahoval sekvenci komplementární ke kódující oblasti mRNA. Kromě toho nesly oba oligonukleotidy sekvenci, která v mRNA pro eIF4E1 po asociaci indukovala tvorbu G-kvartetu. Kvůli ochraně před exonukleázami při použití v buňkách nesly koncové nukleotidy obou DNA oligonukleotidů fosforothioátovou modifikaci. Hybridizace RNA s DNA oligonukleotidy za tvorby G-kvartetu byla potvrzena *in vitro* elektroforeticky a enzymaticky, kdy bylo využito skutečnosti, že G-kvartet stabilizovaný draselnými ionty není methylován DMS a štěpen RNázou T1.

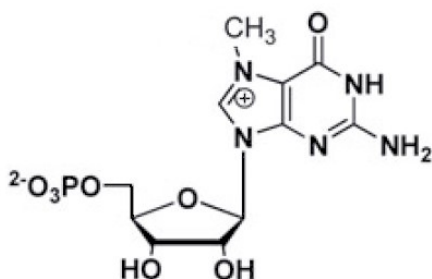
V HeLa buňkách došlo po vnesení ON1 k inhibici translace závislé na čepičce a v důsledku toho ke snížení proliferace buněk. Naopak kontrolní oligonukleotidy, které také nesly sekvenci komplementární k mRNA pro eIF4E1, postrádaly ovšem sekvenci indukující vznik G-kvartetů, nepůsobily v buňkách žádné viditelné změny. Lze tedy vyloučit možnost, že by v tomto případě k inhibici translace došlo mechanismem RNA interference. Hladina mRNA pro eIF4E1 zůstala po vnesení ON2 stejná, použití ON1 ovšem způsobilo dokonce její zvýšení. Důvodem může být skutečnost, že ON1 mRNA pro eIF4E1 stabilizuje a tím chrání před degradací. Rozdíl mezi oligonukleotidy byl patrný i v míře potlačení translace, kde měl významně lepší výsledek ON2⁴⁴.

3 Inhibice vazby 5' čepičky mRNA

Účinné utlumení proteosyntézy je možné i při zachování zvýšené hladiny eIF4E1 v transformovaných buňkách, pokud se zabrání funkci eIF4E1 v iniciaci translace. Tou nejdůležitější je rozpoznání 7-methylguanosu připojeného k prvnímu nukleotidu mRNA 5'-5' trifosfátovým můstkem. Tato struktura se nazývá methylguanosinová čepička a je přítomna na 5' konci každé eukaryotní buněčné mRNA.

3.1 Analogy methylguanosinové čepičky

Již před řadou let se zjistilo, že je eIF4E1 schopen rozpoznat i volný 7-methylguanosinmonofosfát (m^7GMP) (obr.1) nepřipojený k žádné mRNA. Tato interakce navíc není jednoznačně specifická a eIF4E1 je tak schopen asociovat i s deriváty m^7GMP nesoucími různé chemické modifikace. Afinita k eIF4E1 se v závislosti na konkrétní modifikaci analogu čepičky liší a lze takto dokonce připravit látku se silnější vazbou k eIF4E1 než má sama čepička⁴⁵.



Obrázek 1: Chemická struktura 7-methylguanosinmonofosfátu. Převzato a upraveno podle Jia *et al.*, 2012

3.1.1 Modifikace analogů čepičky ovlivňující afinitu k eIF4E1

K vazbě čepičky nebo jejího analogu k eIF4E1 je zásadní kladný náboj na guaninu způsobený methylací na N7⁴⁷⁻⁵⁰. Planární aromatický systém guaninu je při vazbě 7-methylguanosintri-fosfátu (m^7GTP) k eIF4E1 vsunut do úzké hydrofobní štěrbině mezi Trp56 a Trp102, které jsou taktéž planární a aromatické. Ve štěrbině je guanin stabilizován kationtovými π interakcemi, které jsou umožněny právě substitucí na N7⁵¹⁻⁵⁴. V případě, že je kladný náboj na guaninu odstraněn, afinita k eIF4E1 i inhibiční koncentrace se až o několik řádů zhorší^{47,49,50,55}. Asi dvojnásobné zvýšení inhibiční koncentrace působí i substituce N7 guaninu alkylovou skupinou větší než methyl, neboť v takovém případě dochází ke sterickému bránění^{48,55,56}. Arylové substituce na N7 guaninu naopak afinitu k eIF4E1 zvyšují. Tento efekt je patrný zejména v případě monofosfátů, u kterých

je inhibiční koncentrace snížena téměř 3,4x^{48,56,57}. Vazbu většího substituentu v tomto případě umožňuje konformační změna eIF4E1, při které se Trp102 otočí o 180°⁵¹. Arylové substituenty na N7 guanosinu pak zřejmě interagují s lipofilní šterbinou, která přiléhá k vazebnému místu pro čepičku. Tuto interakci lze ještě posílit dalšími modifikacemi arylů, příkladem může být Cl-fenoxyethylový derivát GMP, který má poloviční maximální inhibiční koncentraci (IC₅₀) měřenou *in vitro* v lyzátu z králíčních retikulocytů (RRL) rovnou 1, 9 μM⁵⁸.

Ke stabilizaci vazby čepičky k eIF4E1 dále přispívají vodíkové můstky tvořené mezi O6 guaninu a aminoskupinou Trp102, další vodíkové můstky pak tvoří Glu103 s N1 a s N2 guaninu^{49,51,52}. Přesto je na N2 guaninu tolerována monosubstituce methylem nebo ethylem^{49,56,57}.

Skupinou nejvýznamnější pro stabilizaci interakce čepičky s eIF4E1 jsou zbytky kyseliny fosforečné tvořící přes molekuly vody síť vodíkových můstků s aminokyselinovými zbytky eIF4E1⁴⁹. V případě nahrazení jednoho hydroxyly na α-fosfátu v GMP methylem nebo vodíkem, tedy skupinami, které nefungují jako dobrý akceptor vodíkové vazby, se schopnost inhibice výrazně snížila^{45,59}. Substituce aminoskupinou, která jako akceptor funguje výborně, naopak schopnost vázat eIF4E1 neovlivnila⁵⁹. Prodloužením fosfátového řetězce se IC₅₀ s každým dalším fosfátem snižuje, více než s počtem fosfátů to ovšem zřejmě souvisí s hodnotou aniontového náboje^{49,50,56,57,60}. Naopak nukleosidové analogy se k eIF4E1 neváží vůbec⁵⁵.

Na rozdíl od guaninu a fosfátů nehraje ribózová skupina velkou roli ve stabilizaci vazby k eIF4E1, neboť je umístěna až u okraje vazebného místa a její 2' a 3' hydroxylové skupiny míří směrem do okolního prostředí^{49,52}. Ribóza zřejmě primárně funguje jako nosič, který drží guanin a fosfáty ve vhodné vzájemné poloze. Při nahrazení ribózy arabinózou nebo deoxyribózou byla pozorována změna vaznosti vzniklého analogu čepičky v důsledku změny jeho konformace⁴⁵. Jiná studie ovšem rozdíl ve vaznosti mezi analogem s ribózou a analogem s deoxyribózou nepozorovala⁵⁵. Výrazně negativní efekt na afinitu k eIF4E1 má otevření ribózového cyklu^{45,57,59}. Při zachování správné výsledné konformace lze ovšem ribózu nahradit jinou skupinou, například fenylem vázaným v 8' pozici a nesoucím zbytek kyseliny fosforité⁵⁸.

Při hledání analogů čepičky se většinou vychází z m⁷GMP, m⁷GTP, případně m⁷GpppG, jako základ lze ovšem použít i jinou molekulu s podobnými vlastnostmi, například benzimidazol. Afinita sloučenin odvozených od benzimidazolu k eIF4E1 je ovšem nižší než v případě látek odvozených od m⁷GMP⁵⁷.

3.1.2 Použití analogů čepičky *in vivo*

Ačkoli bylo nalezeno mnoho analogů čepičky, které mají při testování *in vitro* velmi dobrou schopnost inhibovat translaci, při jejich použití *in vivo* vyvstávají dva základní problémy. Prvním z nich je doprava látky do buňky, druhým je zajištění její rezistence vůči buněčným nukleázám.

Z těch je nejvýznamnější enzym DcpS, který štěpí m⁷GTP a jeho analogy mezi α a β fosfátem a uvolňuje tak m⁷GMP⁶¹.

Jedním z řešení, jak lze zvýšit stabilitu analogu čepičky, je nahradit kyslík na některém z fosfátů sírou. Jako rezistentní vůči štěpení lidským DcpS (hDcpS) se ukázaly být analogy se substituovaným γ fosfátem v případě dinukleotidů a α fosfátem v případě mononukleotidů^{62,63}. Lepšími inhibitory jsou mononukleotidy, u aktivnějšího z diastereoizomerů byla IC₅₀ stanovena na 0,56 μM. Absolutní konfigurace diastereoizomerů nebyla určena⁶³.

Alternativou k fosforothioátovým analogům jsou boranofosfátové analogy, u nichž je kyslík na jednom z fosfátů nahrazen boranem. Tato substituce zvyšuje ve všech případech schopnost inhibice proteosyntézy v porovnání s m⁷GpppG a v případě substituce β fosfátu u obou diastereoizomerů a u substituce γ fosfátu pro S_p diastereoizomer i rezistenci vůči hDcpS. Oproti fosforothioátům ovšem tyto analogy v obou vlastnostech dosáhly slabě horších výsledků⁶⁴.

Rezistenci k hDcpS může v případě dinukleotidtrifosfátů zajistit i nahrazení kyslíku spojujícího atomy β a γ fosforu methylenovou skupinou. V případě analogů čepičky s methylovaným O3' měla stejný účinek překvapivě i substituce mezi α a β fosfátem⁶⁵. U dinukleotidtetrafosfátů stabilitu způsobuje nahrazení kyslíku mezi γ a δ fosfátem a dokonce i mezi β a γ fosfátem, kde to podle autorů může být způsobeno sterickými důvody⁶⁶. Srovnatelnou odolnost vůči DcpS a schopnost inhibice mají i analogy s imidofosfátovou skupinou mezi β a γ fosfátem u dinukleotidtrifosfátů a mezi γ a δ fosfátem u dinukleotidtetrafosfátů⁶⁷.

V porovnání s analogy čepičky s methylenovou nebo imidofosfátovou skupinou mají dichloromethylenbisfosfonátové analogy čepičky výrazně nižší IC₅₀ měřenou v RRL *in vitro*. Pro analog čepičky s dichloromethylenovou skupinou mezi β a γ fosfátem a s methylovanou 2'OH skupinou byla hodnota IC₅₀ naměřena jako 0,95 μM. Tato látka je také rezistentní vůči hydrolyze hDcpS⁶⁸.

Jak již bylo zmíněno, druhým problémem s použitím analogů čepičky *in vivo* je jejich doprava do buňky. Fosfátový řetězec totiž udílí molekule záporný náboj, kvůli kterému látka neprochází samovolně přes membránu. Řešením je tudíž buď modifikace analogu čepičky vedoucí k oslabení jeho náboje, nebo použití vektoru⁶¹.

V prvním případě byla hledána modifikace, která by vykompenzovala zkrácení fosfátového řetězce na monofosfát. Touto modifikací se ukázala být substituce na N2 triazolem, který je dále substituován benzenem. Vzniklá dinukleotidová molekula má IC₅₀ rovnou 0,8 μM a slabší záporný náboj, její prostupnost přes membránu ovšem testována nebyla⁶⁹.

Zbytky kyseliny fosforečné mohou být i zcela nahrazeny H-fosfonátem. Ve schopnosti inhibovat translaci nebyl mezi výchozím monofosfátem a jeho H-fosfonátovým analogem pozorován téměř žádný rozdíl. Prostupnost přes membránu ovšem opět testována nebyla⁵⁵.

K nahrazení fosfátu fosfonátem došlo i v dalším případě, kdy byl navíc kladný náboj na guaninu eliminován substitucí N9 dusíku za uhlík, na C8 byl připojen 4-fenylfosfonát a na N7

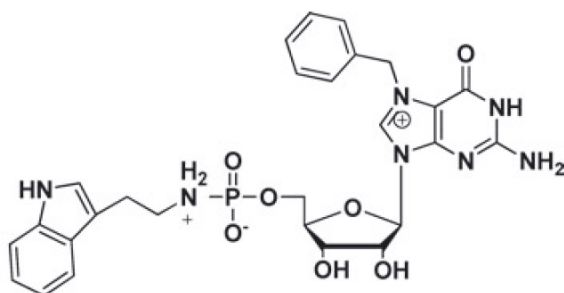
pro zvýšení afinity k eIF4E1 Cl-fenoxyethylová skupina. Ribóza úplně chyběla. Připravená látka ovšem sice byla velmi dobrým inhibitorem translace *in vitro* ($IC_{50} = 2, 5 \mu M$), její prostupnost membránou ovšem zůstala špatná⁵⁸.

Skupina analogů čepičky s různými modifikacemi ve fosfátovém řetězci zvyšujícími afinitu k eIF4E1 a stabilitu molekuly byla patentována (WO2017066781†)

Kvůli problémům s prostupností přes membránu se jako lepší možnost pro dopravu látky do buněk jeví využití vektoru. Dobré výsledky poskytla studie, ve které byl analog čepičky společně s doxorubicinem do myšního modelu s hepatocelulárním karcinomem dopraven pomocí adenovirového dodekahedronu. Kombinace analogu čepičky a doxorubicinu způsobila inhibici růstu tumoru u myši o 40 %, což je více, než kolik způsobila u kontrol kterákoli z obou látek samostatně. Byl pozorován i pokles hladiny eIF4E1 v myších, jakým způsobem ji analog čepičky snížil se ovšem neví. Vedlejší účinky nebyly na zvířatech pozorovány⁷⁰.

3.2 4Ei-1

Látka nazývaná 4Ei-1 je ve skutečnosti nukleosid fosforamidát odvozený od 7-benzyl GMP (obr. 2), lze ji tedy také řadit mezi analogy čepičky. Modifikace fosfátového řetězce byla u 4Ei-1 zavedena pro zlepšení prostupnosti látky do buňky a zvýšení její stability. Spolu s 4Ei-1 byly připraveny ještě dvě látky lišící se skupinou připojenou přes NH k fosfátu. Pro 4Ei-2 to byl D-fenylalanin, pro 4Ei-3 D-alanin⁷¹.



Obrázek 2: Chemická struktura 4Ei-1. Převzato z Jia *et al.*, 2012

3.2.1 Mechanismus působení 4Ei-1

4Ei-1 dobře samovolně vstupuje do buňky. Při inkubaci buněčné suspenze s 4Ei-1 lze už po 5 minutách detekovat v buňkách aktivní látku, v průběhu času se pak její hladina postupně zvyšuje. Vzhledem k rozdílům v účinnosti vstupu 4Ei-1 do buněk různých tkání se zdá, že by v tomto procesu mohl hrát roli některý z membránových přenašečů⁷².

† číslo patentu v databázi Světové organizace duševního vlastnictví

Po průniku do buňky je 4Ei-1 metabolizován na 7-benzyl GMP. To bylo potvrzeno sledováním koncentrace 4Ei-1 a 7-benzyl GMP v RRL a v embryích *Danio rerio*. V obou prostředích byl zřetelný postupný úbytek hladiny 4Ei-1 a zároveň nárůst koncentrace 7-benzyl GMP v čase. Naopak v tepelně inaktivovaném buněčném lyzátu k této přeměně nedošlo. Jako enzym zodpovědný za proces přeměny se označuje Hint1, jehož homolog se vyskytuje i v RRL a v embryích *D. rerio*. Metabolizace 4Ei-1 by vysvětlila i rozdíl v disociační konstantě a inhibiční koncentraci látky. Spočtená disociační konstanta 4Ei-1 je totiž o 4 řády vyšší než disociační konstanta čepičky a téměř 40x vyšší než disociační konstanta 7-benzyl GMP. Zdálo by se tedy, že 4Ei-1 nebude dobrým inhibitorem. Inhibiční koncentrace 4Ei-1 měřená v RRL ovšem byla srovnatelná s IC_{50} 7-benzyl GMP. Pro 4Ei-2 a 4Ei-3 vyšly hodnoty disociační konstanty ještě vyšší než pro 4Ei-1 a ani pro Hint1 zřejmě nejsou tak dobrým substrátem⁷¹.

Samotný mechanismus inhibice proteosyntézy je stejný jako u jiných analogů čepičky, tedy kompetice s čepičkou mRNA o vazebné místo na eIF4E1. Zároveň byl ovšem po přidání 4Ei-1 do buněk pozorován pokles hladiny eIF4E1. Když byl zároveň s 4Ei-1 přidán do buněk i inhibitor proteazomu MG132, hladina eIF4E1 výrazně neklesala. Zřejmě tedy 4Ei-1 zároveň usnadňuje proteazomální degradaci eIF4E1 a tím dále přispívá k utlumení translace⁷².

3.2.2 Použití 4Ei-1 *in vivo*

Efekt působení 4Ei-1 *in vivo* byl testován na embryích *D. rerio*, do kterých byl vpraven mikroinjekčně. V tomto modelu došlo k atenuaci translace závislé na čepičce o 30 % bez toho, že by byly zaznamenány nějaké vedlejší toxické účinky⁷¹. Pozorováno bylo také potlačení tvorby kolonií u lidských mezoteliomových buněčných linií. Míra inhibice zde závisela na koncentraci látky a na konkrétní buněčné linii⁷³.

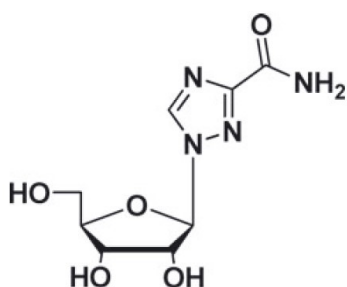
4Ei-1 také dobře spolupůsobí s gemcitabinem. To bylo testováno na několika buněčných liniích plicních a prsních nádorových buněk. Ve všech případech byla tvorba kolonií nejsilněji inhibována kombinací obou látek⁷². Stejný efekt byl pozorován i pro spolupůsobení 4Ei-1 s pemetrexedem v mezoteliomových buňkách⁷³.

Poslední z dosud testovaných efektů je vliv 4Ei-1 na epiteliálně-mezenchymální tranzici (EMT), což je proces přirozeně probíhající v gastrulaci a při hojení ran, uplatňuje se ovšem i v karcinogenezi. V embryích *D. rerio*, ve kterých tento proces probíhal, došlo po injekci 4Ei-1 k úplnému zastavení EMT⁷¹. Podobný efekt byl pozorován i u plicních epiteliálních buněk inkubovaných s TGF- β 1. TGF- β 1 u buněk vyvolal EMT, když byly ale buňky zároveň inkubovány i s 4Ei-1, k tomuto procesu u nich nedošlo⁷⁴.

3.3 Ribavirin

Ribavirin je známé antivirotikum působící proti některým RNA i DNA virům. Využívá se zejména k léčbě chronické žloutenky typu C, v poslední době se ovšem zjišťuje, že by mohl najít nové využití i v léčbě některých druhů rakoviny.

Chemicky se jedná o analog guanosinu (obr. 3), což ribavirinu umožňuje kompetovat s methylguanosinovou čepičkou mRNA o vazebné místo na eIF4E1⁷⁵⁻⁷⁷. Způsob interakce ribavirinu s eIF4E1 je analogický interakci m⁷GTP s eIF4E1, neboť vazba obou ligandů indukuje na eIF4E1 velmi podobné konformační změny^{75,77}. Afinity ribavirinu k eIF4E1 je ovšem silně závislá na konkrétních podmínkách v reakci^{76,77}. Příkladem může být skutečnost, že se ribavirin k eIF4E1 váže výrazně ochotněji při nízkých koncentracích eIF4E1⁷⁷. Rozdílné podmínky v reakci jsou také zřejmě důvodem toho, že dvě skupiny vazbu ribavirinu k eIF4E1 vůbec nepozorovaly^{78,79}.



Obrázek 3: Chemická struktura ribavirinu. Převzato z Jia *et al.*, 2012

3.3.1 Vliv ribavirinu na buněčné procesy

Po aplikaci ribavirinu byla v buňkách detekována snížená hladina c-Myc^{21,23,30,80,81} a cyklinu D1^{21,23,30,41,42,75,80,82}. Exprese eIF4E1 působením ribavirinu ovlivněna nebyla^{42,75,81,83-85}, snížilo se ovšem množství eIF4E1 fosforylovaného na Ser209^{21,30,40,42,80,83-85}. Také fosforylace Akt na Ser473 a tedy aktivita tohoto proteinu byla ve většině buněk působením ribavirinu snížena^{41,80,82,83,86}. Našly se ovšem i studie, které žádnou významnou změnu ve fosforylaci Akt v důsledku přidání ribavirinu do buněk nepozorovaly^{84,87}.

Po navázání ribavirinu na eIF4E1 byla pozorována častější interakce eIF4E1 s 4E-BP1 a naopak méně častá asociace eIF4E1 s eIF4G1⁸³. Aplikace ribavirinu také vedla k navýšení podílu eIF4E1 přítomného v cytoplazmě a ke zmenšení podílu eIF4E1 přítomného v jádře^{75,86}. Transport eIF4E1 do jádra totiž zajišťuje importin-8, který dokáže asociovat pouze s volným eIF4E1 bez navázané čepičky mRNA či ribavirinu⁸⁸.

Na rozdíl od cyklinu D1, jehož hladina v buňkách působením ribavirinu poklesla, se exprese p21 po inkubaci buněk s ribavirinem zvýšila⁸⁵. V důsledku obou těchto změn bylo po aplikaci ribavirinu pozorováno zastavení buněčného cyklu ve fázi G1/G0^{75,84,85,89}. Ribavirin také

v transformovaných buňkách indukuje programovanou buněčnou smrt^{26,30,40,82-85,90,91}. To je spojeno s poklesem exprese Mcl-1⁸³. Zvýšená hladina aktivované kaspázy-9 a kaspázy-8 ukazuje, že může být v buňkách po aplikaci ribavirinu spuštěna apoptóza vnější i vnitřní cestou⁹¹. Vnitřní cestu aktivace apoptózy zřejmě ribavirin indukuje aktivací stresu endoplasmatického retikula (ER), neboť byla v buňkách inkubovaných s ribavirinem detekována zvýšená UPR signalizace²³. Zjistilo se také, že jelikož bývají transformované buňky částečně chráněny před stresem ER zvýšenou expresí proteinu TRAP1, více na působení ribavirinu odpovídají buňky, které mají TRAP1 umlčený⁹².

Mezi další účinky ribavirinu v buňce patří utlumení exprese methyltransferázy histonů EZH2^{84,85,93}. Kromě toho vedla aplikace ribavirinu u buněk ke zhoršení jejich schopnosti migrace^{21,30,42,84,90,94}. Také invazivita buněk se působením ribavirinu snížila^{42,85}. S tím souvisí pozorovaný pokles syntézy MMP-9 v buňkách inkubovaných s ribavirinem^{42,91}. Inhibiční vliv měl ribavirin i na schopnost buněk adherovat k povrchu^{84,85}. Potlačena byla také angiogeneze³⁰.

3.3.2 Účinky ribavirinu v kombinaci s dalšími látkami

Při testování na buněčných liniích byla pozorována synergie ribavirinu s řadou dalších látek. Kombinace ribavirinu s cytarabinem nebo idarubicinem měla výraznější inhibiční vliv na tvorbu kolonií leukemických buněk než aplikace samotného ribavirinu. Ještě větší redukce proliferace pak nastala po inkubaci leukemických buněk se všemi těmito třemi látkami dohromady. Synergie byla u leukemických buněk pozorována také pro společné působení ribavirinu se sorafenibem nebo azacytidinem⁸¹. Aditivní účinek má ribavirin i s bortezomibem v buňkách mnohočetného myelomu²³, imatinibem v leukemických buňkách⁸³, doxorubicinem v buňkách hepatocelulárního karcinomu⁸⁰, paclitaxelem v buňkách spinocelulárního karcinomu jazyka⁴⁰ nebo carboplatinou v buňkách retinoblastomu³⁰. Kromě toho ribavirin senzitivizuje leukemické buňky k fludarabinu⁸⁶. Silnější efekt než při působení samotného ribavirinu byl pozorován u buněk renálního karcinomu i pro kombinaci ribavirinu s IFN- α ^{21,90} nebo 5-FU²¹. Ribavirin také zvýšil citlivost buněk adenokarcinomu prsu a glioblastomu k radioterapii^{26,84}. Ještě lépe pak působila radiotherapie na glioblastomové buňky při aplikaci ribavirinu společně s temozolomidem⁸⁴. Aditivní efekt ribavirinu s radioterapií je zřejmě založen na zabránění repulaci přeživším buňkám⁹⁵.

3.3.3 Testování ribavirinu na zvířecích modelech

Účinky ribavirinu byly studovány také v několika studiích na myších s implantovanými lidskými buňkami spinocelulárního karcinomu hypofaryngu⁷⁵, karcinomu prsu⁴², cervikálního karcinomu⁹¹, hepatocelulárního karcinomu⁸⁰, renálního karcinomu²¹, retinoblastomu³⁰, spinocelulárního karcinomu jazyka⁴⁰, gliosarkomu⁸⁴ nebo atypického teratoidního rhabdoidního

tumoru⁸⁵. Působení ribavirinu u myši s implantovaným tumorem výrazně prodloužilo dobu jejich dožití^{42,84,85} a zpomalilo zvětšování tumoru^{40,42,75,80,85,91}. Myši, kterým byl podáván ribavirin, neubývaly na váze a nejevily ani žádné další viditelné známky vedlejších účinků^{40,42,75,80}. V jednom případě bylo ale pozorováno vytvoření rezistence tumoru na ribavirin⁴². Zvětšování tumoru u myši potlačila i kombinace ribavirinu s 5-FU nebo IFN- α ²¹. Také podávání ribavirinu společně s carboplatinou³⁰, doxorubicinem⁸⁰ nebo paclitaxelem⁴⁰ mělo na velikost tumoru u myši redukční účinek, a to výraznější než při podání ribavirinu samotného. Stejně jako u buněčných linií zvýšila kombinace ribavirinu s temozolomidem účinek radioterapie i u myši⁸⁴. Ani při podávání ribavirinu společně s carboplatinou, paclitaxelem, 5-FU a IFN- α nebyly pozorovány žádné výrazné vedlejší účinky^{21,30,40}.

3.3.4 Klinické testy s ribavirinem

V tuto chvíli bylo provedeno několik klinických studií testujících ribavirin jako potenciální léčivo onkologických onemocnění a další studie právě probíhají.

První studie fáze II (NCT00559091*) sledovala účinky ribavirinu u pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML). Na buněčné úrovni způsobilo u většiny pacientů podávání ribavirinu zvýšení podílu eIF4E1 přítomného v cytoplasmě, pokles exprese cyklinu D1 a snížení fosforylace Akt. Průběh onemocnění se u většiny pacientů zlepšil nebo alespoň stabilizoval, u dvou pacientů z jedenácti ovšem stále docházelo k progresi onemocnění⁹⁶. Po čase se také u všech pacientů, kteří na léčbu zprvu odpovídali, vyvinula na ribavirin rezistence a došlo k relapsu^{97,98}.

Mechanismy rezistence na ribavirin byly v této souvislosti popsány dva. První spočívá ve snížení exprese adenosin kinázy (ADK), což vede k usnadnění exportu ribavirinu ven z buňky. Druhý a častější typ rezistence byl spojen s nárůstem hladiny Gli1 a v důsledku toho s glukuronidací ribavirinu některým z enzymů rodiny UGT1A. Glukurodinace pak zabraňuje ribavirinu v interakci s eIF4E1. Pro senzitivizaci takto rezistentních buněk k ribavirinu lze použít vismodegib⁹⁸. Kombinace ribavirinu s vismodegibem nebo decitabinem případně oběma při léčbě AML je v současnosti testována klinickou studií fáze II (NCT02073838*). Kombinace ribavirinu, inhibitoru Gli1 nebo signalizace vedoucí ke Gli1 a dalšího chemoterapeutika pro léčbu rakoviny je i patentována (W02013037043[†]).

Další studie fáze I/II (NCT01056523*) se opět zaměřila na pacienty s AML, tentokrát byl ovšem probandům ribavirin podáván společně s cytarabinem. Ten zřejmě brání vstřebávání ribavirinu, neboť byly naměřené koncentrace ribavirinu v plasmě pacientů při stejných dávkách léčiva nižší, než když byl v předchozí studii ribavirin podáván samostatně. Přesto došlo přibližně

* identifikační kód klinické studie v databázi ClinicalTrials.gov

† číslo patentu v databázi Světové organizace duševního vlastnictví

u poloviny pacientů ke zlepšení průběhu onemocnění nebo alespoň k jeho stabilizaci. I v tomto případě byla ale u některých pacientů snižená exprese ADK nebo zvýšená hladina Gli1⁹⁷.

Retrospektivní sledování deseti pacientů s refrakterním lymfomem, kteří podstoupili transplantaci kostní dřeně a zároveň v krátkém čase předtím nebo potom užívali ribavirin na léčbu RSV, ukázalo, že došlo u těchto pacientů ve velmi vysokém procentu případů ke kompletní remisi, kterou dávají autoři do souvislosti s užíváním ribavirinu. Jednoznačná souvislost ovšem zatím potvrzena nebyla⁹⁹.

Kromě toho v tuto chvíli běží klinické testy fáze I/II aplikace decitabinu s ribavirinem nebo rapamycinem u pacientů s AML (NCT02109744*). Další současná studie se věnuje účinkům ribavirinu u pacientů se spinocelulárním karcinomem kořene jazyka nebo mandlí (NCT01268579*). Proběhly i klinické testy fáze I/II léčby ribavirinem u pacientů s metastatickým karcinomem prsu, tato studie však byla předčasně ukončena z důvodu začátku nové podobné studie (NCT01056757*).

3.3.5 Využití ribavirinu ve výzkumu

Ribavirin inhibuje proliferaci buněk a indukuje apoptózu nejen v transformovaných buňkách, ale i v buňkách placentárních. Na rozdíl od inhibice migrace rakovinných buněk ovšem ribavirin motilitu trofoblastů zvyšuje³⁶. Tyto změny pravděpodobně souvisí se zvýšenou expresí Hsp27 po inkubaci placentárních buněk s ribavirinem¹⁰⁰.

* identifikační kód klinické studie v databázi ClinicalTrials.gov

4 Inhibice interakce eIF4E1 s eIF4GI

Největší skupinu inhibitorů tvoří látky blokující asociaci eIF4E1 s eIF4GI. V takovém případě sice eIF4E1 může vázat mRNA čepičku, nemůže se ale složit komplex eIF4F a k iniciaci translace nedochází.

4.1 4EGI-1

Látka nazvaná 4EGI-1 byla nalezena prošetřováním rozsáhlého souboru molekul, u kterých byla testována schopnost vytěsnit peptid odvozený od eIF4GI z vazby s fluorescenčně značeným eIF4E1 s cílem najít vhodný inhibitor této interakce. Ve vodném roztoku má 4EGI-1 dvě izoformy, mezi nimiž volně přechází a z nichž jedna váže eIF4E1 preferenčně. Tato vazba je specifická a reverzibilní¹⁰¹. 4EGI-1 je součástí patentu zahrnujícího knihovnu molekul inhibujících translaci a metodu měření inhibice translace (WO2006078942[†]) a patentu zahrnujícího skupinu látek inhibujících iniciaci translace (WO2014124412[†]).

4.1.1 Mechanismus působení 4EGI-1

Původní představa o tom, jak 4EGI-1 inhibuje proteosyntézu, byla taková, že se molekula váže do stejného místa na eIF4E1 jako eIF4GI a o toto místo s ním kompetuje. Modelování struktury eIF4E1 s navázaným 4EGI-1 ovšem ukázalo, že je oblast vazby 4EGI-1 od vazebného místa eIF4GI ve skutečnosti dosti vzdálena a mechanismus inhibice je alosterický. Fenylová skupina 4EGI-1 interaguje s hydrofobní štěrbinou na povrchu eIF4E1, což vede k prodloužení α_1 -helixu o jednu otáčku. V důsledku toho dochází na eIF4E1 k dalším konformačním přestavbám, které zabraňují asociaci eIF4E1 s eIF4GI¹⁰². Samotné místo vazby eIF4GI ovšem zůstává konformačními změnami neovlivněno a mechanismus inhibice zřejmě spočívá v oddálení jeho dvou částí od sebe¹⁰³.

eIF4GI je působením 4EGI-1 celý vytěsněn z vazby s eIF4E1, naopak 4E-BP1 se může k eIF4E1 vázat a dokonce je tato asociace v přítomnosti 4EGI-1 častější¹⁰¹. Důvodem je pravděpodobně to, že 4E-BP1 a eIF4GI sdílí vazebné místo na eIF4E1 a když 4EGI-1 zabráni vazbě eIF4GI, umožní se vazba 4E-BP1. Současná vazba 4E-BP1 a 4EGI-1 k eIF4E1 je totiž možná i přesto, že interakce eIF4E1 s 4E-BP1 zabraňuje protažení α_1 -helixu a konformačním změnám indukovaným vazbou 4EGI-1 k volnému eIF4E1⁵⁴.

[†] číslo patentu v databázi Světové organizace duševního vlastnictví

4.1.2 Vliv 4EGI-1 na buněčné procesy

To, že výše popsaný mechanismus inhibice translace platí i uvnitř buněk, bylo potvrzeno na řadě lidských rakovinných buněčných linií. Snížení asociace eIF4E1 s eIF4GI a skládání komplexu eIF4F bylo pozorováno u leukemických buněk^{101,104,105}, buněk nemalobuněčného karcinomu plic³⁵, kolorektálního karcinomu¹⁰⁶, buněk myelomových¹⁰⁷, gliomových^{108,109} i mezoteliomových^{110,111}. Abundance translačních iniciačních faktorů v těchto buňkách zůstala nezměněna^{105,108,109,112}. Stejná zůstala u většiny buněčných linií i hladina fosforylovaného eIF4E1^{108,109}. U nazofaryngeálních buněk linie HNE1 byl ovšem pozorován jeho úbytek¹¹³. Rozdílné výsledky mělo také pozorování míry fosforylace 4E-BP1. Pro lidské melanomové, nazofaryngeální a mezoteliální buňky byl pozorován úbytek fosforylovaného 4E-BP1^{110,113,114}, zatímco u buněk leukemických a gliomových se hladina nezměnila^{104,108,109}. Tento rozdíl ovšem může souviset s vlastnostmi jednotlivých buněčných linií. Kromě toho bylo v buňkách po působení 4EGI-1 nalezeno méně polyzomů a více volných ribozomů, což dále potvrzuje utlumení proteosyntézy^{43,104,110,114}. Snížená byla také exprese c-Myc^{101,105,107,109,110,114–116}, cyklinu D1^{35,105,109,114,115} a survivinu^{107,109,114}, zatímco hladina β -aktinu zůstala nezměněna^{101,110,114}.

Kromě translace závislé na čepičce dovede při vyšších koncentracích 4EGI-1 inhibovat *in vitro* v RRL i translaci závislou na IRES^{101,117}. Syntéza virových proteinů byla po aplikaci 4EGI-1 potlačena i v křeččích fibroblastech linie BHK-21 infikovaných SV, VSV a EMCV¹¹⁷.

4EGI-1 však nemá vliv jen na syntézu proteinů, ale způsobuje dále v buňce stres ER a v jeho důsledku indukci apoptózy. V lidských gliomových buňkách došlo po působení 4EGI-1 ke zvětšování ER a tvoření vakuol od něj odvozených. Také se z něj uvolňovalo více vápníku, v čemž hrála roli zvýšená hladina proteinu GRP-78 v těchto buňkách, neboť umlčení GRP-78 pomocí siRNA vedlo k menšímu vylévání vápníku z ER do cytoplasmy. Kromě toho se po inhibici GRP-78 snížila exprese proapoptotického transkripčního faktoru CHOP¹⁰⁹. Ten byl v buňkách karcinomu plic a chronické lymfocytární leukémie inkubovaných s 4EGI-1 exprimován ve zvýšené míře^{35,104,109}. Vyšší byla v těchto buňkách po aplikaci 4EGI-1 i hladina proteinu ATF-4^{35,104,107} a fosforylovaných proteinů eIF2 α a PERK^{35,109}. Všechny tyto proteiny, CHOP, ATF-4, fosforylovaný eIF2 α i fosforylovaný PERK, ukazují na stres ER. Existují ovšem i studie, které změnu v množství fosforylovaného eIF2 α nepozorovaly¹¹². Vzhledem k tomu, že eIF2 α ve své fosforylované formě také působí jako inhibitor translace, vedlo by zvýšení jeho hladiny vlivem 4EGI-1 k atenuaci translace dvěma mechanismy.

Vliv má 4EGI-1 i na dynamiku a morfologii mitochondrií. Jejich biogeneze sice ovlivněna nebyla, působením 4EGI-1 se ale mitochondrie zvětšily a mitochondriální síť se rozpadla na menší útvary. To souvisí s expresí proteinů hrajících roli v mitochondriální dynamice. Exprese Opa-1 a Mfn-1, proteinů účastnících se ve fúzi mitochondrií, se snížila, naopak exprese proteinů Fis-1 a Drp-1 účastnících se v rozpadu mitochondrií byla zvýšena¹⁰⁸. Kromě toho došlo vlivem 4EGI-1

k inhibici mitochondriální syntézy ATP¹⁰⁹, inhibici mitochondriálního komplexu I a výrazně se zvýšila produkce ROS¹⁰⁸. Zrušil se také membránový potenciál^{108,109} a cytochrom c byl uvolněn z mitochondrií ven¹⁰⁸.

Výše zmíněné děje ukazují na indukci apoptózy mitochondriální cestou a toto tvrzení potvrzují i další pozorování. V řadě buněčných linií byla po inkubaci s 4EGI-1 zvýšená hladina Bax^{107,109}, Bak¹⁰⁹, Noxa^{104,107} nebo Puma¹⁰⁷, u T-buněk linie Jurkat byla pozorována fragmentace DNA a jádra¹⁰¹ a v neposlední řadě byly v řadě buněčných linií po působení 4EGI-1 detekovány produkty štěpení PARP^{35,107,110,113}, kaspázy 3^{107,109,112} a kaspázy 9^{107,109,112,113}. Naopak Bcl-X_L byl v buňkách po aplikaci 4EGI-1 exprimován ve snížené míře^{101,105,107} a redukována byla i exprese Mcl-1¹⁰⁷. Také hladina c-FLIP byla v důsledku jeho zvýšené ubiquitinylace a následné proteazomální degradace v přítomnosti 4EGI-1 snížena³⁵. U buněk chronické lymfocytární leukémie byla vlivem 4EGI-1 pozorována utlumená exprese BCL2A1 a BCL2L1, na čemž se podílela inhibice proteosyntézy a indukce stresu ER společně¹⁰⁴. Indukci apoptózy působením 4EGI-1 brání zvýšená hladina TRAP1 v buňkách, naopak umlčení TRAP1 efekt 4EGI-1 stupňuje⁹². Také zvýšená exprese SUMO-2 částečně chrání před apoptózou indukovanou 4EGI-1¹⁰⁶. Netransformované buňky jsou na působení 4EGI-1 oproti buňkám rakovinným výrazně méně citlivé^{101,105,107,110,112}.

Není bez zajímavosti, že 4EGI-1 v buňkách prostřednictvím proteinu CHOP způsobuje zvýšení syntézy DR5, který v případě vazby ligandu TRAIL spouští extracelulárně indukovanou apoptózu^{35,113}. Kombinace 4EGI-1 a TRAIL se proto v indukci apoptózy u buněk nemalobuněčného karcinomu plic ukázala být aditivní³⁵.

Další efekt, který 4EGI-1 v buňce má, je inhibice mTORC1, což vede k vyšší aktivitě 4E-BP1. Inhibice proteosyntézy tedy probíhá dvěma způsoby, blokadou interakce eIF4E1 s eIF4G1 přímo vlivem 4EGI-1 a dále vlivem 4E-BP1. Zároveň však inhibice mTORC1 vede k fosforylaci Akt a v důsledku k částečnému zvrácení inhibičního působení 4EGI-1. Výrazně lepší výsledek má proto kombinované použití 4EGI-1 s MK-2206, inhibitorem Akt. Aditivní účinek lze pozorovat i při aplikaci 4EGI-1 v kombinaci s LY294002, inhibitorem PI3K kinázy, a PP242, inhibitorem mTOR kinázy. Oba proteiny se totiž účastní signalizace vedoucí k fosforylaci Akt. Mechanismus, kterým 4EGI-1 potlačuje působení mTORC1, je zatím neznámý⁸⁷.

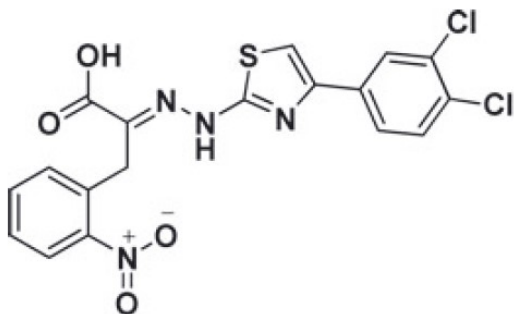
Kromě výše zmíněných inhibitorů má 4EGI-1 synergický účinek také s ABT-737, inhibitorem Bcl-2¹⁰⁴. Spolupůsobí také s everolimem¹⁰⁵ a senzitivizuje buňky k působení gemcitabinu a pemetrexedu¹¹⁰. U buněk nemalobuněčného karcinomu a adenokarcinomu plic rezistentních k erlotinibu 4EGI-1 částečně obnovuje jejich vnímavost k tomuto chemoterapeutiku^{13,28}. Také pro buňky endometriálního adenokarcinomu rezistentní k cisplatině byla pozorována senzitivizace po inkubaci s 4EGI-1¹⁹. Ve spojení se salinomycinem bylo pro dvě buněčné linie myxoidního liposarkomu pozorováno synergické chování. Naproti tomu společné působení s doxorubicinem u stejných buněk nevyvolalo výraznou změnu a s axitinibem bylo působení antagonistické²².

Buňky nazofaryngeálního karcinomu 4EGI-1 senzitivizuje k radioterapii¹¹³. S virem spalniček používaným k léčbě maligního mezoteliomu má ovšem účinek antagonistický¹¹⁸.

4.1.3 Testování účinků 4EGI-1 v živých modelech

Účinky 4EGI-1 v živých modelech byly testovány zejména na myších. Když bylo 4EGI-1 podáváno zdravým myším intraperitoneální injekcí, nebyly zaznamenány žádné viditelné vedlejší účinky^{109,114} a bylo pozorováno velmi rychlé vstřebávání látky¹¹⁴. Aplikace 4EGI-1 myším se štěpem lidských buněk karcinomu prsu vedla k výraznému omezení zvětšování tumoru a k inhibici angiogeneze^{114,115}. Zvětšování tumoru bylo výrazně omezeno i při podávání 4EGI-1 myším se štěpem lidských melanomových buněk¹¹⁴ a se štěpem lidských gliomových buněk¹⁰⁹. Při následné analýze byla v tumorových buňkách pozorována snížená asociace eIF4E1 s eIF4G1 a snížená exprese proteinů účastnících se v buněčné proliferaci^{114,115}. Z důvodu omezené rozpustnosti 4EGI-1 ve vodě ovšem nemohla být stanovena maximální tolerovaná dávka¹¹⁴.

Naopak embrya *Danio rerio* 4EGI-1 vůbec netolerovala. I v poměrně nízkých množstvích bylo pro ně 4EGI-1 teratogenní a ve vyšších dávkách dokonce letální¹¹⁹. Nežádoucí účinky měla aplikace 4EGI-1 také na dospělce *Drosophila melanogaster*¹²⁰.



Obrázek 4: Chemická struktura 4EGI-1. Převzato z Jia *et al.*, 2012

4.1.4 Chemické modifikace 4EGI-1

Jak bylo zmíněno výše, 4EGI-1 existuje ve dvou izomerních formách, mezi kterými ve vodném roztoku volně přechází¹⁰¹. To, spolu s jeho omezenou rozpustností ve vodě¹¹⁴, komplikuje použití 4EGI-1 jako léku. Z tohoto důvodu byly testovány různé chemické modifikace 4EGI-1, které by jeho vlastnosti mohly vylepšit.

Ukázalo se, že jako minimální základ je nezbytný benzylový, karboxylový skupina, hydrazonová funkce, thiazolový kruh a fenyllová skupina (obr. 4). U benzylové skupiny je navíc tolerováno odstranění methylenového uhlíku¹²¹. Naopak nahrazení dusíku v imino skupině uhlíkem vede ke ztrátě funkčnosti 4EGI-1¹⁰¹. Monosubstituce na benzylové ani na fenyllové nepřinesly výrazné zlepšení vlastností 4EGI-1. Po disubstituci benzylové nitroskupinou v pozici *meta* a aminoskupinou

v pozici *para* ovšem došlo k trojnásobnému snížení IC_{50} měřené *in vitro* v RRL. Vzniklá molekula také snížila asociaci eIF4E1 s eIF4GI v buňkách a utlumila translaci mRNA závislých na eIF4E1 bez vlivu na překlad mRNA nezávislých na eIF4E1¹²¹.

Mírné zlepšení aktivity 4EGI-1 přineslo také spojení hydrazonového dusíku s benzylem do pětičlenného kruhu, což zabránilo izomerizaci molekuly. V kombinaci se substitucí chlorů na fenylu hydroxylovou skupinou v pozici 4 nebo methoxy skupinou v pozici 3 dokonce vznikly analogy 4EGI-1 s IC_{50} více než čtyřikrát nižší než (Z)-4EGI-1. Analog s methoxy skupinou v pozici 3 účinně zabránil asociaci eIF4E1 s eIF4GI a způsobil inhibici proliferace lidských melanomových buněk s IC_{50} rovnou 4, 40 μM ¹²².

Snížení IC_{50} lze dosáhnout také spojením thiazolu a fenylu za vzniku šestičlenného kruhu. Výsledná tricyklická molekula je téměř planární a velmi rigidní. Pouhým zacyklením 4EGI-1 se sníží IC_{50} *in vitro* o polovinu, nahrazením chlorů na fenylu methoxy skupinami vede k poklesu IC_{50} až na čtvrtinu. Na proliferaci buněk měl ale výrazně lepší účinek analog vzniklý pouhým zacyklením molekuly, případně analog, ve kterém byl jeden ze spojovacích uhlíků nahrazen kyslíkem. IC_{50} těchto analogů při použití na buňky karcinomu prsu a melanomové buňky se pohybovala mezi 3, 1 a 5, 2 μM ¹²³.

Skupina analogů 4EGI-1, ve kterých byla hydrazonová funkce nahrazena benzenovým jádrem, byla i patentována (WO2013041468[†]). Při *in vitro* testování afinity k eIF4E1 a výpočtech IC_{50} měla řada z těchto molekul velmi nízkou IC_{50} pohybující se v jednotkách μM . Jeden z patentovaných analogů ovšem podrobila testování i jiná skupina, která nepozorovala žádnou inhibici translace závislé na čepičce a při inkubaci s rakovinnými buňkami žádný vliv na životnost buněk. Sami autoři této studie nabízí vysvětlení, že je rozdílný výsledek nejspíše způsoben povahou testů. Autoři patentu totiž měřili schopnost vázat eIF4E1 na základě fluorescenčních signálů a IC_{50} dočetli s pomocí softwaru. Látky ale mohly vázat eIF4E1 i bez toho, aby měly výrazný vliv na průběh proteosyntézy¹²⁴.

4.1.5 Další využití 4EGI-1

Použití 4EGI-1 je vzhledem k jeho širokému spektru účinků širší než jen na inhibici proteosyntézy transformovaných buněk. K účinné inhibici translace závislé na čepičce dochází působením 4EGI-1 také *in vitro* v mozkové tkáni^{125,126} a *in vivo* v krysím mozku¹²⁵. V důsledku toho dochází k inhibici syntézy proteinů spojených s pozdní fází dlouhodobé potenciace paměti¹²⁶ a u zvířat lze po podání látky pozorovat zhoršení formování dlouhodobé paměti¹²⁵. Na její rekonsolidaci naopak látka žádný vliv nemá^{125,127} a ovlivněna není ani síla paměti¹²⁷.

[†] číslo patentu v databázi Světové organizace duševního vlastnictví

4EGI-1 také zabránil vyvinutí hyperalgezie u myši po injekci 2-aminotetralinu, pokud byly obě látky podány společně¹²⁸.

Chybná regulace translace a zvýšená dostupnost eIF4E1 pro translaci hraje roli i u poruch autistického spektra, byly proto provedeny i studie testující vliv 4EGI-1 na toto onemocnění. Jako modely byly použity buď myši se zvýšenou expresí eIF4E1, nebo s umlčeným genem pro protein 4E-BP2. V obou případech byla v jejich mozku zvýšená hladina eIF4E1 asociovaného s eIF4GI. Působením 4EGI-1 se míra asociace eIF4E1 s eIF4GI snížila na úroveň zdravých jedinců^{129,130}. Vyrovnal se také poměr excitačních a inhibičních potenciálů¹³⁰. V míře asociace eIF4E1 a 4E-BP1 nebyl u myši se zvýšenou expresí eIF4E1 pozorován rozdíl¹²⁹. Podávání 4EGI-1 autistickým myším pak zlepšilo jejich sociální chování na úroveň srovnatelnou se zdravými myši, zatímco podávání 4EGI-1 zdravým myším nezpůsobilo žádné viditelné vedlejší účinky^{129,130}. Také u myši se syndromem fragilního X chromozomu došlo vlivem 4EGI-1 ke zlepšení jejich chování a na morfologické úrovni k poklesu hustoty dendritických trnů na úroveň zdravých jedinců. Na zdravé myši neměla ani v jednom případě aplikace 4EGI-1 viditelný účinek¹³¹.

Jedna studie byla také věnována roli 4EGI-1 v léčbě Parkinsonovy choroby. U octomilek *Drosophila melanogaster* s mutací v genu pro protein LRRK2 způsobující Parkinsonovu chorobu vedlo podávání 4EGI-1 k částečnému zlepšení jejich pohybových schopností a ke zpomalení ubývání dopaminových neuronů. U kontrol ovšem aplikace 4EGI-1 lokomoci naopak zhoršila. Počet dopaminových neuronů se vlivem 4EGI-1 u octomilek nezměnil¹²⁰.

Není bez zajímavosti, že inkubace ScGT1-1 buněk s 4EGI-1 způsobila částečné snížení množství PrP^{Sc} v těchto buňkách. Hladina PrP^C ve zdravých GT1-1 buňkách přitom nebyla působením 4EGI-1 nijak ovlivněna¹³².

Kromě toho se zjistilo, že 4EGI-1 dokáže inhibovat infekci lidských kožních fibroblastů virem HSV-1 v závislosti na koncentraci. Lepších výsledků bylo dosaženo, když byly buňky inkubovány s 4EGI-1 už před infekcí, k výraznému potlačení virové syntézy proteinů došlo ale i v případě přidání 4EGI-1 až 4 hodiny po infekci. 4EGI-1 dále potlačuje i spontánní a indukovanou reaktivaci HSV-1, v obou případech nebyly v buňkách inkubovaných s 4EGI-1 detekovány žádné virové proteiny, antigeny, ani virové částice v kultuře. Podobných, i když ne tak dobrých výsledků, bylo dosaženo i s virem VacV¹¹².

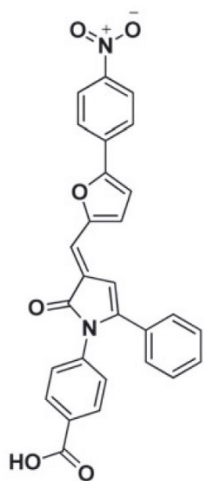
4.2 4E1RCat

Podobné vlastnosti jako 4EGI-1 má další molekula zabraňující asociaci eIF4E1 s eIF4GI, 4E1RCat. Nalezena byla opět prošetřováním velkého souboru molekul, u kterých byla testována schopnost vázat eIF4E1 a inhibovat na čepičce závislou translaci *in vitro*. Dalším požadavkem ale tentokrát bylo, aby látka na rozdíl od 4EGI-1 nezvyšovala asociaci 4E-BP1 a eIF4E1. Tuto interakci

podle pozorování 4E1RCat opravdu blokuje, stejně jako vazbu eIF4E1 a eIF4GI. eIF4GI je v tomto případě volný v celé délce¹³³. Translace závislá na čepičce byla *in vitro* výrazně potlačena^{133,134}, zatímco translace závislá na IRES byla silnější¹³³. IC₅₀ pro 4E1RCat byla udána přibližně jako 4 μM. K potlačení proteosyntézy došlo po aplikaci 4E1RCat i v živých buňkách^{14,133,134}. V důsledku toho poklesla hladina proteinů s mRNA závislou na eIF4E1, například Mcl-1^{133,135}. 4E1RCat bylo i chemicky modifikováno za účelem zlepšení jeho schopností, žádná z nových molekul se ovšem neukázala být lepší¹³³.

V živých modelech představovaných myši s lymfomem rezistentním k doxorubicinu nevedlo podávání samotného 4E1RCat k žádnému zlepšení. V kombinaci s doxorubicinem ovšem došlo k prodloužení remise. 4E1RCat tedy zřejmě tyto lymfomy k doxorubicinu senzitivizuje¹³³. Také buňky rezistentní k tamoxifenu se ukázaly být citlivé vůči působení 4E1RCat, i když žádný aditivní efekt při použití obou látek společně pozorován nebyl¹⁴.

Skutečnost, že 4E1RCat snižuje kromě vazby eIF4E1 a eIF4GI i interakci 4E-BP1 s eIF4E1, vedla původně k představě, že 4E1RCat přímo blokuje vazebné místo eIF4GI a 4E-BP1 na eIF4E1¹³³. Rozřešení mechanismu vazby 4EGI-1 k eIF4E1 ovšem ukázalo i možnost, že by se 4E1RCat mohlo na eIF4E1 vázat v jiné oblasti a inhibovat translaci alostericky¹⁰². Chemicky jsou si obě molekuly, 4EGI-1 i 4E1RCat, velmi podobné (obr. 5) a vazba do stejného místa na eIF4E1 by tedy nebyla překvapením. Rozdíl ve vaznosti 4E-BP1 může být způsoben jen odlišnými konformačními posuny na eIF4E1 po navázání obou látek. Přesný mechanismus vazby 4E1RCat k eIF4E1 tedy stále zůstává předmětem dalšího bádání.



Obrázek 5: Chemická struktura 4E1RCat. Převzato z Jia *et al.*, 2012

4.2.1 4E2RCat

Kromě 4E1RCat byla nalezena i další podobná molekula pojmenovaná 4E2RCat. 4E2RCat také brání asociaci eIF4E1 a peptidu odvozeného od eIF4GI i eIF4GII i asociaci eIF4E1 s 4E-BP1. Dokonce bylo pozorováno i rozrušení již složených komplexů eIF4F působením 4E2RCat. *In vitro*

inhibuje 4E2RCat translaci závislou na čepičce, a to v závislosti na použité koncentraci. IC_{50} pro 4E2RCat činí 13,5 μM . Translace závislá na IRES je při nižších koncentracích 4E2RCat lehce zvýšena, při velmi vysokých koncentracích je ovšem utlumena i ta. Proteosyntéza byla po aplikaci 4E2RCat atenuována také v buňkách linie L-132¹³⁶.

4.2.2 Použití 4E1RCat a 4E2RCat

Zjistilo se, že obě látky inhibují replikaci lidských koronaviřů v buňkách v závislosti na čase a koncentraci. V přítomnosti 4E2RCat nebyly detekovány žádné infekční viry vně buněk a intracelulárně bylo jejich množství významně sníženo. Stejný i když ne tak výrazný vliv mělo i působení 4E1RCat. Obě látky také snížily produkci virového S proteinu buňkami. Naopak syntéza poliovirových proteinů nebyla působením 4E2RCat nijak ovlivněna, což dále potvrzuje působení látky v sestavování komplexu eIF4F¹³⁶.

Kromě toho chrání předchozí inkubace lidských imortalizovaných fibroblastů s 4E1RCat nebo 4E2RCat před negativními účinky paclitaxelu, vinorelbinu a nocodazolu. K signifikantnějšímu efektu je ovšem nutné, aby bylo chemoterapeutikum podáno později, neboť při současném podání je ochrana příliš malá³⁷.

4.3 Ouabain

V nedávné době se zjistilo, že jako inhibitor eIF4E1 působí i srdeční glykosid ouabain. Jeho schopnost inhibovat translaci byla testována na umělém bicistronním konstruktu obsahujícím transkript s IRES sekvencí a transkript s čepičkou. V přítomnosti ouabainu podíl produktu syntetizovaného z transkriptu s čepičkou výrazně poklesl oproti kontrole, translace závislá na čepičce je tedy ouabainem účinně inhibována. Interakce ouabainu s eIF4E1 byla potvrzena metodou fluorescenční titrace. Ouabain při ní dovedl vytěsnit z vazby s eIF4E1 peptid odvozený od eIF4GI, mechanismus účinku ouabainu tedy zřejmě spočívá v blokaci interakce eIF4E1 s eIF4GI.

Stejně jako ostatní inhibitory snižuje ouabain v buňkách expresi cyklinu D1, zatímco na syntézu β -aktinu nemá aplikace ouabainu žádný vliv. Pokles hladiny byl pozorován po inkubaci buněk s ouabainem také pro HIF-1 α , hladina mRNA pro HIF-1 α přitom zůstala nezměněna. Rozdíl nezaznamenala ani fosforylace 4E-BP1 a mTOR¹³⁷.

4.4 Perillový alkohol

Perillový alkohol patřící mezi terpeny je hojně studován z hlediska rostlinného metabolismu. Jedna studie se ale zaměřila i na vliv perillového alkoholu na interakci eIF4E1 s eIF4GI.

Inkubace buněčných linií karcinomu prostaty s perillovým alkoholem vedla ke snížení celkového množství eIF4GI asociujícího s eIF4E1 bez ovlivnění hladiny eIF4E1. Důvodem může být buď blokáce jejich vazby, nebo snížení množství dostupného eIF4E1, například vazbou s 4E-BP1. Snížená úroveň fosforylace 4E-BP1 na Ser65, která umožňuje interakci s eIF4E1, byla po inkubaci buněk s perillovým alkoholem opravdu pozorována, a to u dvou buněčných linií karcinomu prostaty a jedné linie lidských epiteliálních buněk. Naopak změna ve fosforylaci 4E-BP1 na Thr37 se pro jednotlivé buněčné linie lišila, toto místo ovšem na vazbu k eIF4E1 nemá vliv. Také úroveň fosforylace Akt se po aplikaci perillového alkoholu pro jednotlivé buněčné linie lišila. Přímý účinek perillového alkoholu na translaci ovšem zatím potvrzen nebyl¹³⁸.

5 Další inhibitory eIF4E1

Poslední skupinu látek tvoří inhibitory, které nelze zařadit podle místa jejich působení, neboť se mohou vázat do různých oblastí na eIF4E1. Konkrétně se jedná o aptamery, tedy RNA nebo DNA oligonukleotidy navrženy tak, aby specificky interagovaly s konkrétním proteinem.

5.1 RNA aptamery

Při hledání vhodných aptamerů byla testována schopnost vázat eIF4E1 u velkého množství RNA oligonukleotidů o náhodné sekvenci. Vybrány byly dva aptamery, které se vázaly na lidský eIF4E1 a zároveň neměly afinitu k některému z kontrolních proteinů. Mutacemi některých aminokyselin na eIF4E1 se ukázalo, že jsou pro vazbu aptameru 1 k eIF4E1 esenciální Arg112 a Lys206, aminokyseliny interagující se třetím fosfátem čepičky. Naopak mutaci v Arg107, který je pro vazbu čepičky k eIF4E1 nezbytný, aptamer 1 toleroval. Oba aptamery také dovedly vytěsnit čepičku z vazby s eIF4E1. Z těchto údajů lze usoudit, že aptamer interaguje s vazebným místem pro čepičku, mechanismus vazby ale není zcela totožný. Naopak vazba 4E-BP1 k eIF4E1 nijak ovlivněna nebyla. Také fosforylace eIF4E1 na Ser209 vazbu aptameru 1 k proteinu neovlivňuje. To, že vazba aptameru vede k inhibici na čepičce závislé translaci, bylo potvrzeno *in vitro* v RRL¹³⁹.

5.2 DNA aptamery

Stejný mechanismus účinku jako RNA aptamery mají i DNA aptamery, které mají navíc výhodu vyšší stability. Aptamerů interagujících s eIF4E1 bylo nalezeno sedm, u všech byla následně otestována schopnost inhibovat translaci. V extraktu hmyzích buněk atenuovaly translaci tři DNA aptamery v závislosti na koncentraci, v lyzátu králičích buněk utlumilo proteosyntézu pět aptamerů. Hladina mRNA přítomných v buněčném extraktu zůstala po přidání aptameru stejná. Místo, kam se aptamery na eIF4E1 váží, nebylo zkoumáno, pouze u dvou z nich bylo pozorováno bránění vazbě analogu čepičky a zřejmě tedy interagují s jeho vazebným místem. V lidských buňkách linie HEK-293 dovedlo snížit životnost buněk v závislosti na koncentraci pět DNA aptamerů. Dva z nich byly testovány i na HeLa buňkách, kde měly stejný účinek. Pozitivní vliv na funkčnost aptamerů měla ligace dvou aptamerů k sobě, naopak fosforylace aptamerů na jejich aktivitu žádný efekt neměla¹⁴⁰.

Soubor DNA i RNA aptamerů inhibujících eIF4E1 byl patentován (WO2016028223[†]).

[†] číslo patentu v databázi Světové organizace duševního vlastnictví

6 Srovnání inhibitorů eIF4E1

Pro ověření skutečnosti, že výše zmíněné látky opravdu inhibují aktivitu eIF4E1, bylo použito různých ukazatelů. V případě komplementárních oligonukleotidů, siRNA a shRNA cílených na mRNA pro eIF4E1 byla testována a potvrzena jejich schopnost snížit množství eIF4E1 v buňce. V důsledku utlumené exprese eIF4E1 poklesla v buňkách i hladina proteinů s mRNA závislou na eIF4E1. Syntéza proteinů s mRNA závislou na eIF4E1 byla atenuována i vlivem ribavirinu, 4EGI-1 a ouabainu. U řady látek byla také inhibována translace závislá na čepičce. Mezi tyto látky patří oligonukleotid indukující vznik G-kvartetů, analogy čepičky, 4Ei-1, 4E1RCat, 4E2RCat, ouabain, RNA aptamery a DNA aptamery. Po aplikaci ribavirinu, 4EGI-1, 4E1RCat, 4E2RCat a ouabainu bylo v buňkách detekováno menší množství složeného komplexu eIF4F.

Všechny tyto skutečnosti ukazují na utlumení aktivity eIF4E1. V případě komplementárních oligonukleotidů, siRNA, ribavirinu a 4EGI-1 byla inhibice eIF4E1 zaznamenána opakovaně na různých buněčných liniích a lze ji tedy považovat za ověřenou. Analogy čepičky byly také rozsáhle studovány, v naprosté většině případů to ale bylo pouze *in vitro* v RRL. Buněčný lyzát je specifické prostředí, které v mnohém funguje odlišně od živých systémů, poznatky získané v něm proto nelze zobecnit. Ostatním látkám se věnovaly jen jednotky studií a výsledky proto není možné považovat jednoznačně za platné. V případě perillového alkoholu navíc nebyl přímý vliv na translaci vůbec testován a pouze se na něj usuzuje na základě jeho pozorované schopnosti utlumit interakci eIF4E1 s eIF4G1.

Vliv inhibitorů na další procesy v buňce není prozkoumán u všech látek do stejné míry. Nejvíce znalostí je k dispozici o siRNA cílené na mRNA pro eIF4E1, ribavirinu a 4EGI-1. I u těchto látek však existují sporné body. Jedná se například o rozdíly v úrovni fosforylace Akt působením ribavirinu u různých buněčných linií. Rozdílné výsledky byly publikovány také o fosforylaci eIF4E1 a 4E-BP1 po aplikaci 4EGI-1. Vzhledem k tomu, že úroveň fosforylace Akt, eIF4E1 i 4E-BP1 významně ovlivňuje míru probíhající translace v buňce, a tedy může podpořit nebo naopak zvrátit přímý vliv inhibitoru, bylo by vhodné zaměřit se na důvod těchto rozdílů detailněji. U ostatních inhibitorů toho většinou víme poměrně málo nebo vůbec nic, i u nich by proto bylo vhodné prostudovat jejich působení na buňku hlouběji.

Původním záměrem při zkoumání inhibitorů eIF4E1 bylo najít látky, které by bylo možné využít k léčbě těch druhů rakoviny, u nichž je zvýšená hladina eIF4E1. Použití zde popsaných látek v léčbě onkologických pacientů ovšem naráží na řadu problémů.

Jedním z nich je nenulový náboj některých inhibitorů, konkrétně komplementárních oligonukleotidů, siRNA, shRNA, analogů čepičky a aptamerů. Tato skutečnost komplikuje jejich dopravu do živých buněk, neboť je nutné využít vhodný vektor, případně molekulu chemicky

modifikovat. Problémem může být také limitovaná rozpustnost některých látek ve vodě nebo příliš nízká aktivita látky.

Do klinických testů se tak dostaly jen komplementární oligonukleotidy a ribavirin. V případě komplementárních oligonukleotidů ovšem studie nevedly k významnému zlepšení zdravotního stavu pacientů, a to i přesto, že byly komplementární oligonukleotidy úspěšně dopraveny do nádorových buněk a jejich vlivem došlo v těchto buňkách ke snížení hladiny eIF4E1. Přesný důvod neúspěchu léčby znám není. Kromě dvou nedokončených studií se už další klinické testy s komplementárními oligonukleotidy nekonaly. V současnosti je tak jedinou látkou v klinických testech ribavirin.

Ani použití ribavirinu ovšem nezůstává bez problémů. Předně je zdokumentován vznik rezistence spojený s relapsem onemocnění. Vznik rezistence je ovšem obecný problém léčby cílené specificky na jeden protein a mělo by být možné ho částečně obejít kombinací ribavirinu s dalším chemoterapeutikem. Druhým problémem s využitím ribavirinu může být jeho chemická povaha analogu guanosinu. Ribavirin díky tomu může kromě translace závislé na čepičce teoreticky inhibovat i další procesy, kterých se v buňce guanosin účastní. Díky schopnosti mimikovat guanosin je koneckonců schopen bránit virové infekci. Proto je důležité detailní prostudování účinků ribavirinu v buňce, a to nejen v souvislosti se syntézou proteinů.

I když je cesta inhibitorů eIF4E1 k onkologickým pacientům ještě dlouhá a je dokonce možné, že se žádný z inhibitorů eIF4E1 k léčbě rakoviny používat nebude, nebylo jejich hledání marnou snahou. Díky výzkumu těchto látek se prohloubily naše znalosti o nádorových buňkách, procesech v nich a vlivu translačních iniciačních faktorů a jejich abundance na další děje v buňce. Další poznatky tohoto směru lze potom s využitím inhibitorů eIF4E1 získat i v budoucnu.

7 Závěr

Tato práce podává přehled látek a přístupů, které různými mechanismy inhibují aktivitu eIF4E1, a shrnuje poznatky o jejich fungování v buňkách a v živých organismech. Množství známých informací se pro jednotlivé inhibitory velmi liší. Zatímco u komplementárních oligonukleotidů, siRNA, ribavirinu a 4EGI-1 byla opakovaně a na různých buněčných liniích potvrzena jejich schopnost inhibovat aktivitu eIF4E1 a víme i poměrně hodně o jejich vlivu na procesy v buňce, u ostatních látek už často na původní studie další nenavázaly a poznatky o nich jsou proto neověřené a kusé.

Obecně ovšem bylo potvrzeno, že inhibice eIF4E1 vede v transformovaných buňkách k poklesu exprese onkogenních proteinů, k potlačení morfologických a fyziologických změn spojených s nádorovou transformací buňky a k vyšší frekvenci programované buněčné smrti. Na netransformované buňky přitom inhibitory eIF4E1 cytotoxický účinek při stejných koncentracích nemají.

Použití inhibitorů eIF4E1 v léčbě nádorových onemocnění přesto čelí problémům s jejich dopravou do buněk, omezenou rozpustností některých látek, snadným vznikem rezistence na léčbu nebo nízkou aktivitou látky. Proto se zatím podařilo do klinických testů dovést pouze dvě látky, komplementární oligonukleotidy a ribavirin.

Seznam použité literatury

* značí sekundární zdroj

1. * Hinnebusch, A. G. & Lorsch, J. R. The mechanism of eukaryotic translation initiation - new insights and challenges. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, 1–25 (2012).
2. * Hinnebusch, A. G. The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annu. Rev. Biochem.* **83**, 779–812 (2014).
3. * De Benedetti, A. & Graff, J. R. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* **23**, 3189–3199 (2004).
4. * Bhat, M. *et al.* Targeting the translation machinery in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 261–278 (2015).
5. * Culjkovic, B. & Borden, K. L. Understanding and targeting the eukaryotic translation initiation factor eIF4E in head and neck cancer. *J. Oncol.* **2009**, 1–12 (2009).
6. * Chu, J. *et al.* Translation initiation factors: Reprogramming protein synthesis in cancer. *Trends Cell Biol.* **26**, 918–933 (2016).
7. De Benedetti, A. *et al.* Expression of antisense RNA against initiation factor eIF-4E mRNA in HeLa cells results in lengthened cell division times, diminished translation rates, and reduced levels of both eIF-4E and the p220 component of eIF-4F. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5435–45 (1991).
8. Graff, J. R. *et al.* Therapeutic suppression of translation initiation factor eIF4E expression reduces tumor growth without toxicity. *J. Clin. Invest.* **117**, 2638–2648 (2007).
9. DeFatta, R. *et al.* Antisense RNA to eIF4E suppresses oncogenic properties of a head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Laryngoscope* **110**, 928–933 (2000).
10. Yang, Y. J. *et al.* Contribution of eIF-4E inhibition to the expression and activity of heparanase in human colon adenocarcinoma cell line: LS-174T. *World J. Gastroenterol.* **9**, 1707–1712 (2003).
11. Graff, J. R. *et al.* eIF4E activation is commonly elevated in advanced human prostate cancers and significantly related to reduced patient survival. *Cancer Res.* **69**, 3866–3873 (2009).
12. Jacobson, B. A. *et al.* Targeting eukaryotic translation in mesothelioma cells with an eIF4E-specific antisense oligonucleotide. *PLoS One* **8**, 1–11 (2013).
13. Patel, M. R. *et al.* Resistance to EGFR-TKI can be mediated through multiple signaling pathways converging upon cap-dependent translation in EGFR-wild type NSCLC. *J. Thorac. Oncol.* **8**, 1142–1147 (2013).
14. Fagan, D. H. *et al.* Acquired tamoxifen resistance in MCF-7 breast cancer cells requires hyperactivation of eIF4F-mediated translation. *Horm. Cancer* **8**, 219–229 (2017).

15. Graff, J. R. *et al.* Reduction of translation initiation factor 4E decreases the malignancy of ras-transformed cloned rat embryo fibroblasts. *Int. J. Cancer* **60**, 255–63 (1995).
16. Hong, D. S. *et al.* A phase 1 dose-escalation, pharmacokinetic, and pharmacodynamic evaluation of eIF-4E antisense oligonucleotide LY2275796 in patients with advanced cancer. *Clin. Cancer Res.* **17**, 6582–6591 (2011).
17. Duffy, A. G. *et al.* Modulation of tumor eIF4E by antisense inhibition: A phase I/II translational clinical trial of ISIS 183750—an antisense oligonucleotide against eIF4E—in combination with irinotecan in solid tumors and irinotecan-refractory colorectal cancer. *Int. J. Cancer* **139**, 1648–1657 (2016).
18. Choi, C. H. *et al.* Direct inhibition of eIF4E reduced cell growth in endometrial adenocarcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **137**, 463–469 (2011).
19. Wan, J. *et al.* Knockdown of eIF4E suppresses cell proliferation, invasion and enhances cisplatin cytotoxicity in human ovarian cancer cells. *Int. J. Oncol.* **47**, 2217–2225 (2015).
20. Chi, B. H. *et al.* P70S6K and eIF4E dual inhibition is essential to control bladder tumor growth and progression in orthotopic mouse non-muscle invasive bladder tumor model. *J. Korean Med. Sci.* **30**, 308–316 (2015).
21. Cao, J. *et al.* Inhibition of eIF4E cooperates with chemotherapy and immunotherapy in renal cell carcinoma. *Clin. Transl. Oncol.* (2017). doi:10.1007/s12094-017-1786-z
22. Kerr, L. T. *et al.* Axitinib has antiangiogenic and antitumorogenic activity in myxoid liposarcoma. *Sarcoma* **2016**, (2016).
23. Zismanov, V. *et al.* Multiple myeloma proteostasis can be targeted via translation initiation factor eIF4E. *Int. J. Oncol.* **46**, 860–870 (2015).
24. Soni, A. *et al.* eIF4E knockdown decreases breast cancer cell growth without activating Akt signaling. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 1782–1788 (2008).
25. Zhou, F. F. *et al.* Knockdown of eIF4E suppresses cell growth and migration, enhances chemosensitivity and correlates with increase in Bax/Bcl-2 ratio in triple-negative breast cancer cells. *Med. Oncol.* **28**, 1302–1307 (2011).
26. Hayman, T. J. *et al.* Translation initiation factor eIF4E is a target for tumor cell radiosensitization. *Cancer Res.* **72**, 2362–2372 (2012).
27. Oridate, N. *et al.* Growth inhibition of head and neck squamous carcinoma cells by small interfering RNAs targeting eIF4E or cyclin D1 alone or combined with cisplatin. *Cancer Biol. Ther.* **4**, 318–323 (2005).
28. Li, Y. *et al.* Elevated expression of eukaryotic translation initiation factor 4E is associated with proliferation, invasion and acquired resistance to erlotinib in lung cancer. *Cancer Biol. Ther.* **13**, 272–280 (2012).
29. Joyce, C. E. *et al.* Differential regulation of the melanoma proteome by eIF4A1 and eIF4E.

- Cancer Res.* **77**, 613–622 (2017).
30. Wang, G. *et al.* Targeting eIF4E inhibits growth, survival and angiogenesis in retinoblastoma and enhances efficacy of chemotherapy. *Biomed. Pharmacother.* **96**, 750–756 (2017).
 31. Othumpangat, S. *et al.* Eukaryotic translation initiation factor 4E is a cellular target for toxicity and death due to exposure to cadmium chloride. *J. Biol. Chem.* **280**, 25162–25169 (2005).
 32. Chen, B. *et al.* Knockdown of eukaryotic translation initiation factor 4E suppresses cell growth and invasion, and induces apoptosis and cell cycle arrest in a human lung adenocarcinoma cell line. *Mol. Med. Rep.* **12**, 7971–7978 (2015).
 33. Svitkin, Y. V *et al.* Eukaryotic translation initiation factor 4E availability controls the switch between cap-dependent and internal ribosomal entry site-mediated translation. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 10556–10565 (2005).
 34. Othumpangat, S. *et al.* Sodium arsenite-induced inhibition of eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) results in cytotoxicity and cell death. *Mol. Cell. Biochem.* **279**, 123–131 (2005).
 35. Fan, S. *et al.* The eIF4E/eIF4G interaction inhibitor 4EGI-1 augments TRAIL-mediated apoptosis through c-FLIP down-regulation and DR5 induction independent of inhibition of cap-dependent protein translation. *Neoplasia* **12**, 346–356 (2010).
 36. Kitroser, E. *et al.* The involvement of eukaryotic translation initiation factor 4E in extravillous trophoblast cell function. *Placenta* **33**, 717–724 (2012).
 37. Nasr, Z. *et al.* Suppression of eukaryotic initiation factor 4E prevents chemotherapy-induced alopecia. *BMC Pharmacol. Toxicol.* **14**, 1 (2013).
 38. Lin, C. J. *et al.* c-Myc and eIF4F are components of a feedforward loop that links transcription and translation. *Cancer Res.* **68**, 5326–5334 (2008).
 39. Kyou Kwon, J. *et al.* Dual inhibition by S6K1 and Elf4E is essential for controlling cellular growth and invasion in bladder cancer. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **32**, 51.e27-51.e35 (2014).
 40. Dai, D. *et al.* Inhibition of mTOR/eIF4E by anti-viral drug ribavirin effectively enhances the effects of paclitaxel in oral tongue squamous cell carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **482**, 1259–1264 (2017).
 41. Pettersson, F. *et al.* Ribavirin treatment effects on breast cancers overexpressing eIF4E, a biomarker with prognostic specificity for luminal B-type breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **17**, 2874–2884 (2011).
 42. Pettersson, F. *et al.* Genetic and pharmacologic inhibition of eIF4E reduces breast cancer cell migration, invasion, and metastasis. *Cancer Res.* **75**, 1102–1112 (2015).

43. Mokas, S. *et al.* Uncoupling stress granule assembly and translation initiation inhibition. *Mol. Biol. Cell* **20**, 2673–2683 (2009).
44. Bhattacharyya, D. *et al.* Rationally induced RNA:DNA G-quadruplex structures elicit an anticancer effect by inhibiting endogenous eIF4E expression. *Biochemistry* **53**, 5461–5470 (2014).
45. Darzynkiewicz, E. *et al.* Chemical synthesis and characterization of 7-methylguanosine cap analogues. *Biochemistry* **24**, 1701–1707 (1985).
46. * Jia, Y. *et al.* Cap-dependent translation initiation factor eIF4E: an emerging anticancer drug target. *Med. Res. Rev.* **32**, 786–814 (2012).
47. Adams, B. L. *et al.* The effect of ‘cap’ analogs on reovirus mRNA binding to wheat germ ribosomes. *J. Biol. Chem.* **253**, 2589–2595 (1978).
48. Darzynkiewicz, E. *et al.* Inhibition of eukaryotic translation by nucleoside 5'-monophosphate analogues of mRNA 5'-cap: Changes in N7 substituent affect analogue activity. *Biochemistry* **28**, 4771–4778 (1989).
49. Niedzwiecka, A. *et al.* Biophysical studies of eIF4E cap-binding protein: Recognition of mRNA 5' cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins. *J. Mol. Biol.* **319**, 615–635 (2002).
50. Sasavage, N. L. *et al.* Specific inhibition of capped mRNA translation in vitro by m7G5pppp5G and m7G5pppp5 - m7G. *Nucleic Acids Res.* **6**, 3613–3624 (1979).
51. Brown, C. J. *et al.* Crystallographic and mass spectrometric characterisation of eIF4E with N7-alkylated cap derivatives. *J. Mol. Biol.* **372**, 7–15 (2007).
52. Marcotrigiano, J. *et al.* Cocystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell* **89**, 951–961 (1997).
53. Matsuo, H. *et al.* Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 717–724 (1997).
54. Sekiyama, N. *et al.* Molecular mechanism of the dual activity of 4EGI-1: Dissociating eIF4G from eIF4E but stabilizing the binding of unphosphorylated 4E-BP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E4036-45 (2015).
55. Ghosh, P. *et al.* Synthesis and evaluation of potential inhibitors of eIF4E cap binding to 7-methyl GTP. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **15**, 2177–2180 (2005).
56. Grudzien, E. *et al.* Novel cap analogs for in vitro synthesis of mRNAs with high translational efficiency. *RNA* **10**, 1479–1487 (2004).
57. Cai, A. *et al.* Quantitative assessment of mRNA cap analogues as inhibitors of in vitro translation. *Biochemistry* **38**, 8538–8547 (1999).
58. Chen, X. *et al.* Structure-guided design, synthesis, and evaluation of guanine-derived inhibitors of the eIF4E mRNA-cap interaction. *J. Med. Chem.* **55**, 3837–3851 (2012).

59. Darzynkiewicz, E. *et al.* Inhibition of eukaryotic translation by analogues of messenger RNA 5'-cap: Chemical and biological consequences of 5'-phosphate modifications of 7-methylguanosine 5'-monophosphate. *Biochemistry* **26**, 4372–4380 (1987).
60. Jemielity, J. *et al.* Novel 'anti-reverse' cap analogs with superior translational properties. *RNA* **9**, 1108–1122 (2003).
61. * Ziemniak, M. *et al.* Potential therapeutic applications of RNA cap analogs. *Future Med. Chem.* **5**, 1141–1172 (2013).
62. Kowalska, J. *et al.* Synthesis and characterization of mRNA cap analogs containing phosphorothioate substitutions that bind tightly to eIF4E and are resistant to the decapping pyrophosphatase DcpS. *Rna* **14**, 1119–1131 (2008).
63. Kowalska, J. *et al.* Phosphorothioate analogs of m7GTP are enzymatically stable inhibitors of cap-dependent translation. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **19**, 1921–1925 (2009).
64. Kowalska, J. *et al.* Synthesis, properties, and biological activity of boranophosphate analogs of the mRNA cap: versatile tools for manipulation of therapeutically relevant cap-dependent processes. *Nucleic Acids Res.* **42**, 10245–10264 (2014).
65. Kalek, M. *et al.* Enzymatically stable 5' mRNA cap analogs: Synthesis and binding studies with human DcpS decapping enzyme. *Bioorganic Med. Chem.* **14**, 3223–3230 (2006).
66. Rydzik, A. M. *et al.* Synthetic dinucleotide mRNA cap analogs with tetraphosphate 5',5' bridge containing methylenebis(phosphonate) modification. *Org. Biomol. Chem.* **7**, 4763–4776 (2009).
67. Rydzik, A. M. *et al.* Synthesis and properties of mRNA cap analogs containing imidodiphosphate moiety - Fairly mimicking natural cap structure, yet resistant to enzymatic hydrolysis. *Bioorganic Med. Chem.* **20**, 1699–1710 (2012).
68. Rydzik, A. M. *et al.* mRNA cap analogues substituted in the tetraphosphate chain with CX2: identification of O-to-CCl2 as the first bridging modification that confers resistance to decapping without impairing translation. *Nucleic Acids Res.* **45**, 8661–8675 (2017).
69. Piecyk, K. *et al.* Triazole-containing monophosphate mRNA cap analogs as effective translation inhibitors. *Rna* **20**, 1539–1547 (2014).
70. Zochowska, M. *et al.* Virus-like particle-mediated intracellular delivery of mRNA cap analog with in vivo activity against hepatocellular carcinoma. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **11**, 67–76 (2015).
71. Ghosh, B. *et al.* Non-toxic chemical interdiction of the epithelial-to-mesenchymal transition by targeting cap-dependent translation. *ACS Chem. Biol.* **4**, 367–377 (2009).
72. Li, S. *et al.* Treatment of breast and lung cancer cells with a N-7 benzyl guanosine monophosphate tryptamine phosphoramidate pronucleotide (4Ei-1) results in chemosensitization to gemcitabine and induced eIF4E proteasomal degradation. *Mol.*

- Pharm.* **10**, 523–531 (2013).
73. Chen, E. Z. *et al.* Small-molecule inhibition of oncogenic eukaryotic protein translation in mesothelioma cells. *Invest. New Drugs* **32**, 598–603 (2014).
 74. Smith, K. A. *et al.* Transforming growth factor- β 1 induced epithelial mesenchymal transition is blocked by a chemical antagonist of translation factor eIF4E. *Sci. Rep.* **5**, 18233 (2015).
 75. Kentsis, A. *et al.* Ribavirin suppresses eIF4E-mediated oncogenic transformation by physical mimicry of the 7-methyl guanosine mRNA cap. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 18105–18110 (2004).
 76. Kentsis, A. *et al.* Further evidence that ribavirin interacts with eIF4E. *Rna* **11**, 1762–1766 (2005).
 77. Volpon, L. *et al.* Conformational changes induced in the eukaryotic translation initiation factor eIF4E by a clinically relevant inhibitor, ribavirin triphosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **434**, 614–619 (2013).
 78. Yan, Y. *et al.* Ribavirin is not a functional mimic of the 7-methyl guanosine mRNA cap. *RNA* **11**, 1238–1244 (2005).
 79. Westman, B. *et al.* The antiviral drug ribavirin does not mimic the 7-methylguanosine moiety of the mRNA cap structure in vitro. *RNA* **11**, 1505–13 (2005).
 80. Tan, J. *et al.* Ribavirin augments doxorubicin's efficacy in human hepatocellular carcinoma through inhibiting doxorubicin-induced eIF4E activation. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* e22007 (2017). doi:10.1002/jbt.22007
 81. Culjkovic-Kraljacic, B. *et al.* Inhibition of eIF4E with ribavirin cooperates with common chemotherapies in primary acute myeloid leukemia specimens. *Leukemia* **25**, 1197–1200 (2011).
 82. Tan, K., Culjkovic, B. *et al.* Ribavirin targets eIF4E dependent Akt survival signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **375**, 341–345 (2008).
 83. Shi, F. *et al.* Ribavirin inhibits the activity of mtor/eif4e, ERK/Mnk1/eIF4E signaling pathway and synergizes with tyrosine kinase inhibitor imatinib to impair Bcr-Abl mediated proliferation and apoptosis in Ph+ leukemia. *PLoS One* **10**, 1–16 (2015).
 84. Volpin, F. *et al.* Use of an anti-viral drug, Ribavirin, as an anti-glioblastoma therapeutic. *Oncogene* **36**, 3037–3047 (2017).
 85. Casaos, J. *et al.* Ribavirin as a potential therapeutic for atypical teratoid/rhabdoid tumors. *Oncotarget* **9**, 8054–8067 (2018).
 86. Martinez-Marignac, V. *et al.* Pharmacological targeting of eIF4E in primary CLL lymphocytes. *Blood Cancer J.* **3**, e146 (2013).
 87. Wang, H. *et al.* The synergistic inhibition of breast cancer proliferation by combined

- treatment with 4EGI-1 and MK2206. *Cell Cycle* **14**, 232–242 (2015).
88. Volpon, L. *et al.* Importin 8 mediates m⁷G cap-sensitive nuclear import of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 5263–5268 (2016).
 89. Ogino, A. *et al.* Efficacy of ribavirin against malignant glioma cell lines. *Oncol. Lett.* **8**, 2469–2474 (2014).
 90. Teng, L. *et al.* Anti-tumor effect of ribavirin in combination with interferon- α on renal cell carcinoma cell lines in vitro. *Cancer Cell Int.* **14**, 63 (2014).
 91. Sharma, S. *et al.* Repositioning of anti-viral drugs as therapy for cervical cancer. *Pharmacol. Reports* **68**, 983–989 (2016).
 92. Matassa, D. S. *et al.* Translational control in the stress adaptive response of cancer cells: a novel role for the heat shock protein TRAP1. *Cell Death Dis.* **4**, e851 (2013).
 93. De La Cruz-Hernandez, E. *et al.* Ribavirin as a tri-targeted antitumor repositioned drug. *Oncol. Rep.* **33**, 2384–2392 (2015).
 94. Attar-Schneider, O. *et al.* Migration and epithelial-to-mesenchymal transition of lung cancer can be targeted via translation initiation factors eIF4E and eIF4G1. *Lab. Investig.* **96**, 1004–1015 (2016).
 95. Yu, Y. *et al.* eIF4E-phosphorylation-mediated Sox2 upregulation promotes pancreatic tumor cell repopulation after irradiation. *Cancer Lett.* **375**, 31–38 (2016).
 96. Assouline, S. *et al.* Molecular targeting of the oncogene eIF4E in acute myeloid leukemia (AML): a proof-of-principle clinical trial with ribavirin. *Blood* **114**, 257–260 (2009).
 97. Assouline, S. *et al.* A phase I trial of ribavirin and low-dose cytarabine for the treatment of relapsed and refractory acute myeloid leukemia with elevated eIF4E. *Haematologica* **100**, e7–e9 (2015).
 98. Zahreddine, H. A. *et al.* The sonic hedgehog factor Gli1 imparts drug resistance through inducible glucuronidation. *Nature* **511**, 90–93 (2015).
 99. Rutherford, S. C. *et al.* The eIF4E inhibitor ribavirin as a potential antilymphoma therapeutic: early clinical data. *Leuk. Lymphoma* **59**, 256–258 (2018).
 100. Sadeh-Mestechkin, D. *et al.* The effect of heat shock protein 27 on extravillous trophoblast differentiation and on eukaryotic translation initiation factor 4E expression. *Mol. Hum. Reprod.* **20**, 422–432 (2014).
 101. Moerke, N. J. *et al.* Small-molecule inhibition of the interaction between the translation initiation factors eIF4E and eIF4G. *Cell* **128**, 257–267 (2007).
 102. Papadopoulos, E. *et al.* Structure of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E in complex with 4EGI-1 reveals an allosteric mechanism for dissociating eIF4G. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, E3187–E3195 (2014).
 103. Salvi, N. *et al.* The role of dynamics and allostery in the inhibition of the eIF4E/eIF4G

- translation initiation factor complex. *Angew. Chemie Int. Ed.* **55**, 7176–7179 (2016).
104. Willimott, S. *et al.* Cap-translation inhibitor, 4EGI-1, restores sensitivity to ABT-737 apoptosis through cap-dependent and -independent mechanisms in chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Cancer Res.* **19**, 3212–3223 (2013).
 105. Tamburini, J. *et al.* Protein synthesis is resistant to rapamycin and constitutes a promising therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Blood* **114**, 1618–1627 (2009).
 106. Chen, L. Z. *et al.* SUMO-2 promotes mRNA translation by enhancing interaction between eIF4E and eIF4G. *PLoS One* **9**, 1–10 (2014).
 107. Descamps, G. *et al.* The cap-translation inhibitor 4EGI-1 induces apoptosis in multiple myeloma through Noxa induction. *Br. J. Cancer* **106**, 1660–1667 (2012).
 108. Yang, X. *et al.* The cap-translation inhibitor 4EGI-1 induces mitochondrial dysfunction via regulation of mitochondrial dynamic proteins in human glioma U251 cells. *Neurochem. Int.* **90**, 98–106 (2015).
 109. Wu, M. *et al.* Anti-cancer effect of cap-translation inhibitor 4EGI-1 in human glioma U87 cells: involvement of mitochondrial dysfunction and ER stress. *Cell. Physiol. Biochem.* **40**, 1013–1028 (2016).
 110. De, A. *et al.* 4EGI-1 represses cap-dependent translation and regulates genome-wide translation in malignant pleural mesothelioma. *Invest. New Drugs* 1–13 (2017). doi:10.1007/s10637-017-0535-z
 111. Sato, A. *et al.* Cytotoxicity induced by a redox-silent analog of tocotrienol in human mesothelioma H2452 cell line via suppression of cap-dependent protein translation. *Anticancer Res.* **36**, 1527–33 (2016).
 112. McMahon, R. *et al.* Noncytotoxic inhibition of viral infection through eIF4F-independent suppression of translation by 4EGI-1. *J. Virol.* **85**, 853–864 (2011).
 113. Wang, W. *et al.* 4EGI-1 induces apoptosis and enhances radiotherapy sensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells via DR5 induction on 4E-BP1 dephosphorylation. *Oncotarget* **7**, 21728–21741 (2016).
 114. Chen, L. *et al.* Tumor suppression by small molecule inhibitors of translation initiation. *Oncotarget* **3**, 869–881 (2012).
 115. Yi, T. *et al.* 4EGI-1 targets breast cancer stem cells by selective inhibition of translation that persists in CSC maintenance, proliferation and metastasis. *Oncotarget* **5**, 6028–37 (2014).
 116. Attar-Schneider, O. *et al.* Targeting eIF4G translation initiation factor affords an attractive therapeutic strategy in multiple myeloma. *Cell. Signal.* **26**, 1878–1887 (2014).
 117. Redondo, N. *et al.* Translation of viral mRNAs that do not require eIF4E is blocked by the inhibitor 4EGI-1. *Virology* **444**, 171–180 (2013).
 118. Jacobson, B. A. *et al.* Cap-dependent translational control of oncolytic measles virus in

- malignant mesothelioma. *Oncotarget* **8**, 63096–63109 (2017).
119. Pruvot, B. *et al.* Leukemic cell xenograft in zebrafish embryo for investigating drug efficacy. *Haematologica* **96**, 612–616 (2011).
 120. Martin, I. *et al.* Abberant protein synthesis in G2019S LRRK2 Drosophila parkinson disease-related phenotypes. *Fly (Austin)*. **8**, 165–169 (2014).
 121. Takroui, K. *et al.* Structure-activity relationship study of 4EGI-1, small molecule eIF4E/eIF4G protein-protein interaction inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **77**, 361–377 (2014).
 122. Yefidoff-Freedman, R. *et al.* 3-substituted indazoles as configurationally locked 4EGI-1 mimetic and inhibitors of eIF4E/eIF4G interaction. *ChemBioChem* **15**, 595–611 (2014).
 123. Mahalingam, P. *et al.* Synthesis of rigidified eIF4E/eIF4G inhibitor-1 (4EGI-1) mimetic and their in vitro characterization as inhibitors of protein-protein interaction. *J. Med. Chem.* **57**, 5094–5111 (2014).
 124. Basmadjian, C. *et al.* Revision of the synthesis and pharmacological activity of a reported translation inhibitor. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **15**, 1305–1307 (2015).
 125. Hoeffler, C. A. *et al.* Inhibition of the interactions between eukaryotic initiation factors 4E and 4G impairs long-term associative memory consolidation but not reconsolidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 3383–3388 (2011).
 126. Hoeffler, C. A. *et al.* Multiple components of eIF4F are required for protein synthesis-dependent hippocampal long-term potentiation. *J. Neurophysiol.* **109**, 68–76 (2013).
 127. Huynh, T. N. *et al.* Requirement of mammalian target of rapamycin complex 1 downstream effectors in cued fear memory reconsolidation and its persistence. *J. Neurosci.* **34**, 9034–9039 (2014).
 128. Tillu, D. V. *et al.* Protease activated receptor 2 (PAR2) activation is sufficient to induce the transition to a chronic pain state. *Pain* **156**, 859–867 (2015).
 129. Santini, E. *et al.* Exaggerated translation causes synaptic and behavioral aberrations associated with autism. *Nature* **493**, 411–415 (2013).
 130. Gkogkas, C. G. *et al.* Autism-related deficits via dysregulated eIF4E-dependent translational control. *Nature* **493**, 371–377 (2013).
 131. Santini, E. *et al.* Reducing eIF4E-eIF4G interactions restores the balance between protein synthesis and actin dynamics in fragile X syndrome model mice. *Sci. Signal.* **10**, 41–46 (2017).
 132. Allard, E. K. *et al.* Prion formation correlates with activation of translation-regulating protein 4E-BP and neuronal transcription factor Elk1. *Neurobiol. Dis.* **58**, 116–122 (2013).
 133. Cencic, R. *et al.* Reversing chemoresistance by small molecule inhibition of the translation initiation complex eIF4F. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 1046–1051 (2011).
 134. Shuda, M. *et al.* CDK1 substitutes for mTOR kinase to activate mitotic cap-dependent

- protein translation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 5875–5882 (2015).
135. Arnold, N. *et al.* Regulation of cardiac expression of the diabetic marker microRNA miR-29. *PLoS One* **9**, (2014).
 136. Cencic, R. *et al.* Blocking eIF4E-eIF4G interaction as a strategy to impair coronavirus replication. *J. Virol.* **85**, 6381–6389 (2011).
 137. Cao, J. *et al.* Cap-dependent translation initiation factor, eIF4E, is the target for Ouabain-mediated inhibition of HIF-1 α . *Biochem. Pharmacol.* **89**, 20–30 (2014).
 138. Peffley, D. M. *et al.* Perillyl alcohol and genistein differentially regulate PKB/Akt and 4E-BP1 phosphorylation as well as eIF4E/eIF4G interactions in human tumor cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **465**, 266–273 (2007).
 139. Mochizuki, K. *et al.* High affinity RNA for mammalian initiation factor 4E interferes with mRNA-cap binding and inhibits translation. *Rna* **11**, 77–89 (2005).
 140. Guo, W. M. *et al.* Identification and characterization of an eIF4e DNA aptamer that inhibits proliferation with high throughput sequencing. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **3**, e217 (2014).