

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 06: Zdravotnictví

**Kináza Chk1 jako potenciální terapeutický
cíl v buňkách maligního melanomu**

Karolina Kubová

Brno, 2019

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 06: Zdravotnictví

**Kináza Chk1 jako potenciální terapeutický
cíl v buňkách maligního melanomu**

**Chk1 kinase as a potential therapeutic
target in malignant melanoma**

Autor: Karolina Kubová
Škola: Gymnázium Brno-Řečkovice, příspěvková organizace
Terezy Novákové 2, 621 00 Brno
Kraj: Jihomoravský kraj
Konzultanti: Mgr. Stjepan Uldrijan, CSc.
RNDr. Kateřina Cibulková

Brno, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne 29. 1. 2019

podpis:



Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala Mgr. Stjepanu Uldrijanovi, CSc., svému externímu konzultantovi, za vedení mé práce, obětavou pomoc, ochotu a čas, který mi věnoval, a své školní konzultantce RNDr. Kateřině Cibulkové za cenné rady a připomínky. Velké díky patří také celému týmu Laboratoře nádorové biologie Biologického ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně za přátelský přístup a pomoc v těžkých chvílích, doc. Mgr. Kamilu Paruchovi, Ph.D. (Ústav chemie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity) za poskytnutí inhibitorů kinázy Chk1 a RNDr. Bořivoji Vojtěškovi, DrSc. (Masarykův onkologický ústav v Brně) za poskytnutí primárních protilátek.

Tato práce byla vypracována za finanční podpory JMK.

Anotace

Ve své práci jsem se zabývala možným využitím nových inhibitorů kinázy Chk1 v protinádorové terapii maligního melanomu. Kináza Chk1 je důležitá při regulaci buněčného cyklu a opravě poškozené DNA. Když dojde k poškození genetické informace, tato kináza se účastní zastavení cyklu. Je-li kináza Chk1 inhibována, buněčný cyklus i přes poškození DNA pokračuje, nedojde k její opravě a poškození se kumuluje. To může v některých případech vést až k buněčné smrti. Existují studie, které se již dříve věnovaly potenciálnímu uplatnění inhibitorů Chk1 při léčbě některých druhů nádorů. Mým úkolem bylo ověřit cytotoxicitu nízkomolekulárních inhibitorů Chk1 SCH900776 a MU380 na buněčných liniích maligního melanomu. Účinnost těchto látek byla prokázána nejen samostatně, ale i v kombinaci s některými protinádorovými chemoterapeutiky a inhibitory vybraných signálních drah ovlivňujících růst nádorových buněk.

Klíčová slova

Checkpoint kináza 1 / Chk1; nízkomolekulární inhibitory; SCH900776; MU380; maligní melanom; cytotoxicita

Annotation

This thesis focuses on testing the anti-cancer potential of new inhibitors of the Chk1 kinase in malignant melanoma. The Chk1 kinase plays an essential role in the regulation of cell cycle and DNA repair. When genetic information is damaged, this kinase participates in inhibiting the cell cycle. If we inhibit the Chk1 kinase, the cell cycle will progress despite the damaged DNA, preventing efficient DNA repair and leading to the accumulation of DNA damage and in some cases also to cell death. Several recent studies tested the use of Chk1 inhibitors as treatments for various types of cancer. The main aim of this thesis was to determine the cytotoxicity of small-molecule Chk1 inhibitors SCH900776 and MU380 in human malignant melanoma cell lines. These agents were active not only individually but also in combination with clinically used anti-cancer chemotherapeutics and inhibitors of selected signaling pathways regulating cancer cell proliferation.

Keywords

Checkpoint kinase 1 / Chk1; small-molecule inhibitors; SCH900776; MU380; malignant melanoma; cytotoxicity

Seznam zkratek

APS	peroxodisíran amonný
ARAF	proteinkináza A-Raf
ATM	ataxia-telangiectasia mutated protein
ATP	adenosintrifosfát
ATR	ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein
BRAF	proteinkináza B-Raf
BSA	hovězí sérový albumin
Cdc25	cell division cycle 25
CDK	cyklin-dependentní kináza
cDNA	komplementární DNA
CNS	centrální nervová soustava
CRAF	proteinkináza C-Raf
DMSO	dimethylsulfoxyl
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECL	roztok pro posílení chemiluminiscence
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ERK	kináza regulovaná extracelulárním signálem
HRAS	harvey RAS
Chk1	checkpoint kináza 1
Chk2	checkpoint kináza 2
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KRAS	kirsten RAS
LAR	čínidlo pro luciferázový test
MAPK	mitogeny aktivovaná proteinová kináza
MEK	mitogeny aktivovaná proteinová kináza kináza
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
NK	přirozený zabíječ
NRAS	neuroblastoma RAS

PBS	fosfátový pufr
PCNA	proliferační jaderný antigen
PI	propidium jodid
PP2A	protein fosfatáza 2A
PVDF	polyvinylidenfluorid
RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma
RAS	rat sarcoma
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RTK	receptorová tyrosin kináza
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza
Ser	serin
TBS	pufr s obsahem Tris
TEMED	tetramethylethylendiamin
Tris	2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
γ -H2AX	histon H2AX fosforylovaný na Ser139

Obsah

Úvod	12
Cíle práce	13
1 Teorie	14
1.1 Nádorová onemocnění	14
1.1.1 Klasifikace nádorů	14
1.1.2 Mutace	14
1.1.3 Charakteristické znaky nádorových buněk	15
1.1.4 Buněčný cyklus	17
1.1.5 Vznik metastází	18
1.2 Maligní melanom	18
1.2.1 Původ	19
1.2.2 Metastáze	19
1.2.3 Aktivace signální dráhy RAS-RAF-MEK-ERK	19
1.2.4 Léčba	21
1.2.5 Maligní melanom v České republice	22
1.3 Kináza Chk1	23
1.3.1 Chk1 v buněčném cyklu	23

1.3.2	Chk1 a léčba nádorových onemocnění	25
1.3.3	Inhibitory Chk1	25
2	Použité metody a materiál	27
2.1	Buněčné linie	27
2.2	Složení roztoků	28
2.3	Testované látky	29
2.4	Kultivace buněčných linií	30
2.5	Stanovení životaschopnosti buněk průtokovou cytometrií	30
2.6	Analýza množství proteinů Westernovým přenosem	31
2.6.1	Příprava buněčných lyzátů	31
2.6.2	Polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)	31
2.6.3	Westernový přenos (Semi-Dry Blotting)	32
2.6.4	Vizualizace proteinů na membráně	32
2.6.5	Použité primární protilátky	33
2.7	Stanovení metabolické aktivity buněk (MTT test)	33
2.8	Stanovení transkripční aktivity proteinu p53	34
2.8.1	Měření aktivity luciferázy	34
2.8.2	Stanovení koncentrace proteinů	35
2.9	Statistická analýza	35

3	Výsledky	36
4	Diskuze	50
5	Závěr	53
	Použitá literatura a zdroje	54
	Seznam obrázků	59
	Seznam tabulek	60

Úvod

V současné době patří nádorová onemocnění k nejčastějším příčinám úmrtí v lidské populaci. Nádory různých tkání postihují všechny národy, rasy i věkové skupiny. Pravděpodobnost výskytu zhoubných nádorů však s věkem roste. Ve většině případů se totiž jedná o onemocnění vyvolané kumulací genetických změn v buňce v průběhu řady let. Nicméně, má se za to, že vývoj nádorových onemocnění můžeme alespoň do určité míry potlačit zdravým životním stylem a vyváženou stravou. Maligní melanom patří mezi nejagresivnější zhoubné nádory. V současné době lze spolehlivě vyléčit pouze časná stádia tohoto onemocnění.

Výzkumu v oblasti protinádorové terapie se věnuje velká pozornost i nemalé finanční prostředky. Existuje nespočet potenciálních léčebných přístupů s rozmanitými mechanismy účinku. V posledních desetiletích se v rámci tzv. cílené terapie hojně zkoumají účinky inhibitorů proteinových kináz. Jednou z nich je také kináza Chk1, která hraje důležitou roli v regulaci buněčného cyklu. Zprostředkovává zastavení cyklu v případě poškození DNA, zejména při replikaci, a podílí se na mechanismech vedoucích k opravě poškození. Nejvíce studovaným inhibitorem kinázy Chk1 je v dnešní době látka SCH900776, jež se momentálně nachází ve fázi klinického testování. V této práci jsem na buňkách maligního melanomu porovnávala účinky tohoto inhibitoru s příbuznou látkou MU380, jež byla vyvinuta týmem doc. Kamila Parucha z Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně.

Cíle práce

Cíle mé Středoškolské odborné činnosti jsou:

- porovnat účinnost inhibitorů kinázy Chk1 SCH900776 a MU380 vůči buněčným liniím maligního melanomu
- ověřit účinnost inhibitorů kinázy Chk1 v kombinaci s cytostatiky cílícími na replikaci DNA
- ověřit účinnost inhibitorů kinázy Chk1 v kombinaci s inhibitory vybraných buněčných signálních drah

1 Teorie

1.1 Nádorová onemocnění

Jedná se o skupinu mnoha různých onemocnění, která se projevují tvorbou nádorů (lat. *tumor*, řec. *onkos*) v různých tkáních organismu. Mezi nejčastěji postihované tkáně patří plíce, prostata a prsa. Nádory vznikají v případě, že dojde k mutacím kritických genů. Tyto mutace mohou poškodit biochemické pochody a vést k neregulované proliferaci buněk. Bez fungující regulace se nádorové buňky dělí nekontrolovaně, rostou jedna přes druhou a tvoří nádor. Vznik nádorů může být ovlivněn prostředím, ve kterém člověk žije, chemickým znečištěním ovzduší, příliš tučnou stravou s nedostatkem vlákniny, kouřením nebo přehnaným vystavováním se slunečnímu záření. Nádorové buňky se od těch zdravých liší řadou vlastností, např. změnami cytoskeletu, zvýšenou produkcí některých bílkovin nebo syntézou abnormálních proteinů, změnami genetické informace, často také aneuploidii. [1]

1.1.1 Klasifikace nádorů

Nádory se dělí na dvě základní skupiny – maligní a benigní. Je-li tumor maligní, postižené buňky migrují, šíří se po celém těle a napadají i ostatní tkáně. V nich pak mohou tvořit sekundární nádory, tzv. metastáze (z řečtiny „změna stavu“). Pokud není nefyziologické množení doprovázeno dalšími změnami a po vyčerpání proliferačního potenciálu ustane, jedná se o benigní, ohraničené, nádory. Jejich buňky okolní tkáně nenapadají. [1, 2]

1.1.2 Mutace

V 80. letech minulého století vědci zjistili, že nádorové buňky nemívají jen jediný defekt v genetické informaci. Proto, aby se buňka stala nádorovou, je potřeba genetických

defektů více. Byly popsány dvě velké skupiny genů, jejichž mutací dochází k nádorové transformaci – protoonkogeny a nádorové supresorové geny. Gen je dědičná jednotka se specifickou biologickou funkcí, která se nachází v určitém místě chromozomu. [1] Protoonkogeny jsou geny, které zajišťují produkci proteinů podílejících se na přežívání a množení buněk. Je-li protoonkogen mutován, stane se z něj onkogen. Ten je trvale aktivní a nádor se tak neustále rozrůstá. Nádorové supresorové geny mají naopak za úkol kontrolovat a v případě potřeby také omezovat růst buněk. Jsou-li mutované, nezvládají buněčné dělení a růst nádoru potlačovat. [3]

1.1.3 Charakteristické znaky nádorových buněk

Existuje několik charakteristických znaků, jimiž se buňky maligního tumoru odlišují od buněk nenádorových. Ty nejdůležitější byly poprvé shrnuty v článku „Hallmarks of cancer“ Douglase Hanahana a Roberta Weinberga, který byl v lednu 2000 vydán v časopise Cell. [4]

1. Soběstačnost v signalizacích stimulujících dělení a růst. Existuje několik cest, kterými toho mohou nádorové buňky dosáhnout. Může dojít ke změnám v množství extracelulárních faktorů, jež nabádají buňku k dělení, nebo ke zvýšení citlivosti buněk k těmto faktorům. V některých případech je dokonce sama buňka schopna vytvářet signály, na které pak též sama odpovídá. Další možností je nadměrná tvorba nebo pozměněná aktivita intracelulárních proteinů, které mají na proliferaci vliv. [4]

2. Abnormální necitlivost k signálům inhibujícím růst. V normálních tkáních jsou signály podporující růst a signály potlačující dělení v rovnováze. Když se buňka stane nádorovou, nedokáže již na signály inhibující růst správně reagovat, což přispívá k nekontrolovanému dělení. [4]

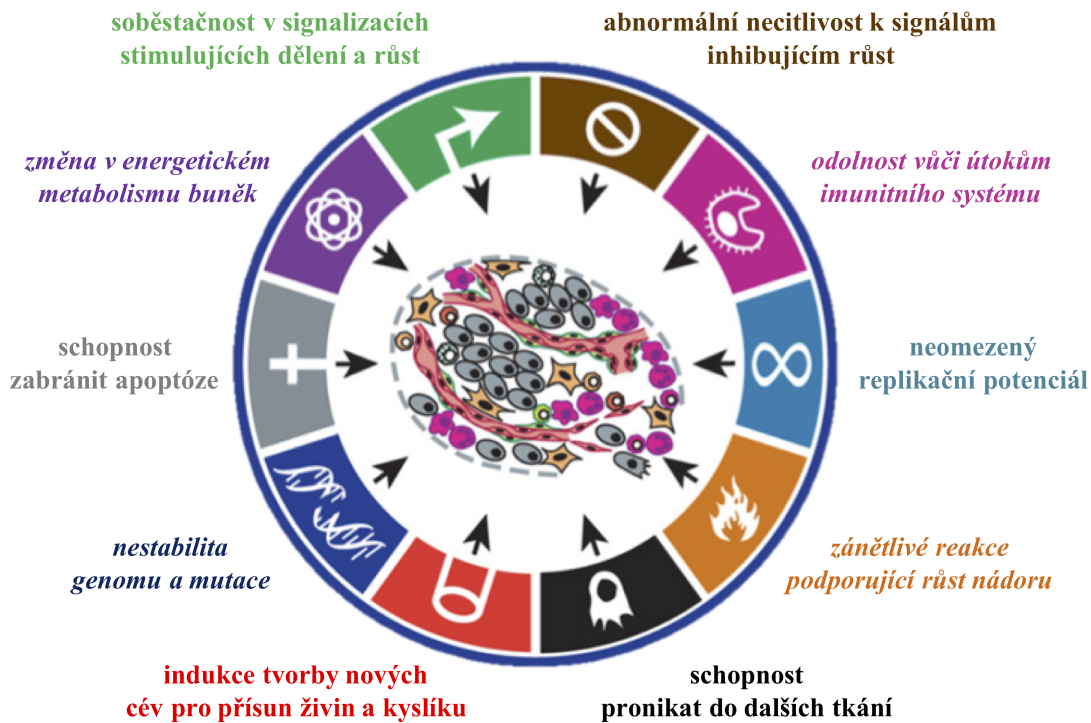
3. Schopnost zabránit apoptóze. Buňky zdravých tkání mají schopnost programované buněčné smrti, apoptózy. Ta nastává v případě, že je buňka nějakým způsobem poškozena. Zabraňuje se tak mimo jiné předávání chybné genetické informace.

Esenciální úlohu hraje nádorový supresorový protein p53 odesílající poškozené buňky na autodestrukční dráhu. U nádorových buněk tento protein obvykle nefunguje a autodestrukční dráha je zablokována. Proto se i poškozená buňka nesoucí mutace může dělit stále dál. Dceřiné buňky pak kumulují další mutace, jež mohou napomoci nádorové transformaci. [4]

4. Neomezený replikační potenciál. Zdravé lidské somatické buňky mají omezený maximální počet dělení. Konce chromozomů jsou chráněny telomerami, mnohokrát se opakujícími krátkými sekvencemi nukleotidů. Při každém buněčném dělení se telomery zkrátí. Dojde-li k výraznému zkrácení, buňka se již dále nemůže dělit. Tomuto zkracování může zabránit enzym telomeráza, což je ribonukleoproteinový komplex, který ztracené nukleotidy znovu přidává. U běžných somatických buněk je činnost tohoto enzymu potlačena, v zárodečných a kmenových buňkách naopak zvýšena. Vysoká aktivita telomerázy se objevuje také v nádorových buňkách, což jim napomáhá stát se nesmrtelnými. [4]

5. Indukce tvorby nových cév pro přísun živin a kyslíku. Už i velmi malé nádory si musí zabezpečit přísun živin a kyslíku, bez nichž nemohou dále růst. Ve chvíli, kdy začnou mezi nádorové buňky prorůstat krevní vlásečnice, tumor potřebné živiny získává. Signály inhibující růst cév jsou v nádorových tkáních potlačeny, signály podporující růst cév naopak výrazně zvýšeny. [4]

6. Schopnost pronikat do dalších tkání. Nádorové buňky získávají možnost rozšířit se pomocí krevního nebo lymfatického řečiště i do vzdálených částí organismu. Důsledkem může být vznik mnoha sekundárních nádorů, které se velmi obtížně kontrolují a odstraňují. Často postihují životně důležité orgány, a proto jsou metastáze nejčastějším důvodem úmrtí pacienta postiženého rakovinou. [4]



Obrázek 1: Charakteristické znaky nádorových buněk dle Douglase Hanahana a Roberta Weinberga. Kurzívou jsou vyznačeny vlastnosti, které byly přidány až v roce 2011 v článku „Hallmarks of cancer: The Next Generation“. [5], převzato a upraveno

1.1.4 Buněčný cyklus

Jedním ze znaků nádorové buňky je neregulovaný růst. Místo toho, aby buňky rostly organizovaně v souvislých vrstvách, rostou zcela neřízeně přes sebe a tvoří neorganizovanou masu. Toto chování je způsobené neschopností reagovat na signály, které regulují a pozastavují buněčné dělení. Děj, během kterého se mateřská buňka rozdělí na dvě dceřiné, se nazývá buněčný cyklus. Ten lze rozčlenit do čtyř fází – G_1 , S, G_2 , mitóza. [1]

První tři fáze jsou souhrnně označovány jako interfáze. V G_1 buňka roste a syntetizuje látky potřebné pro následující kroky. Dále pokračuje do S fáze, kde dochází k replikaci jaderné DNA. Poslední částí interfáze je G_2 , v níž se buňka připravuje na rozdělení genetického materiálu, zkopírovaného během S fáze, do dceřiných buněk. Po interfázi následuje mitóza, jež se dělí na M fázi a cytokinezi. Cytokineze je konečné rozdělení dceřiných buněk od sebe. [6] Na několika místech buněčného cyklu se vyskytují kontrolní

body, kde je zhodnocen stav buňky, prověřen průběh předcházejících procesů a zkontrolován stav DNA. Nádorové buňky často ztrácí schopnost zastavit cyklus v případě poškození DNA, neboť kontrolní body jsou mutované. [1]

Důležitou roli v buněčném cyklu mají regulační proteiny, nazývané cykliny, a enzymy, tzv. cyklin-dependentní kinázy (zkráceně CDK). Komplexy těchto bílkovin povolují pokračování cyklu. Po aktivaci CDK navázáním cyklinu dojde k fosforylaci cílových proteinů. Některé fosfatázy naopak zajišťují defosforylaci těchto cílových proteinů a tím inhibici buněčného cyklu. Existují také inhibiční proteiny, které mohou cyklus zastavit. Jedná se např. o produkty nádorových supresorových genů *p21*, *p15*, *p16*. Dojde-li k mutaci genů pro tyto proteiny, CDK zůstávají více aktivní, což může vést k nadměrné buněčné proliferaci. [2]

1.1.5 Vznik metastází

Aby se tumor mohl invazivně šířit, musí se snížit mezibuněčná adheze (přilnavost), čehož buňka docílí změnou charakteru tzv. adhezních molekul nacházejících se na povrchové buněčné membráně. Buňka se pak odpoutá ze svazku s ostatními buňkami a může proniknout do krevního nebo lymfatického řečiště. Tomuto ději se říká intravazace. V jiném místě v těle pak následuje opačný děj, tzv. extravazace, kdy buňka přilne ke stěně cévy a pronikne do tkáně, kde později vznikne metastáze. Nádorová buňka však může být kdykoliv zničena imunitním systémem, zejména působením NK buněk (z angl. *natural killer*), makrofágů, T-lymfocytů. [2]

1.2 Maligní melanom

Maligní melanom je zhoubný nádor, který vzniká přeměnou melanocytů, jejichž hlavní funkcí je tvorba melaninu (melanogeneze). Lze jej rozdělit na dvě skupiny. První jsou melanomy vznikající z epidermálního typu melanocytů (kožní a slizniční), které tvoří přibližně 96 % všech melanomů. Méně časté jsou melanomy vznikající z jiných typů

melanocytů (uveální melanomy a primární melanomy CNS), které se vyskytují pouze ve 4 %. [2, 7]

1.2.1 Původ

Přibližně jedna třetina melanomů vzniká z různých typů kožních névů. Pigmentový névus je nezhoubná kožní léze, která se vytvoří přemnožením melanocytů nebo změnou v jejich struktuře a chování. Důsledkem je odlišný růst, pigmentace a hustota buněk. Vzhledově se jedná o ohraničené útvary tmavšího zbarvení. Lidé s vysokým počtem névů na těle ovšem nejsou více ohroženi. Zhruba ve dvou třetinách případů totiž melanom vzniká přímo ze zdravého melanocyty. Hlavní příčinou tohoto nádorového onemocnění je zřejmě nadměrné opalování a vystavování se ultrafialovému záření. [7]

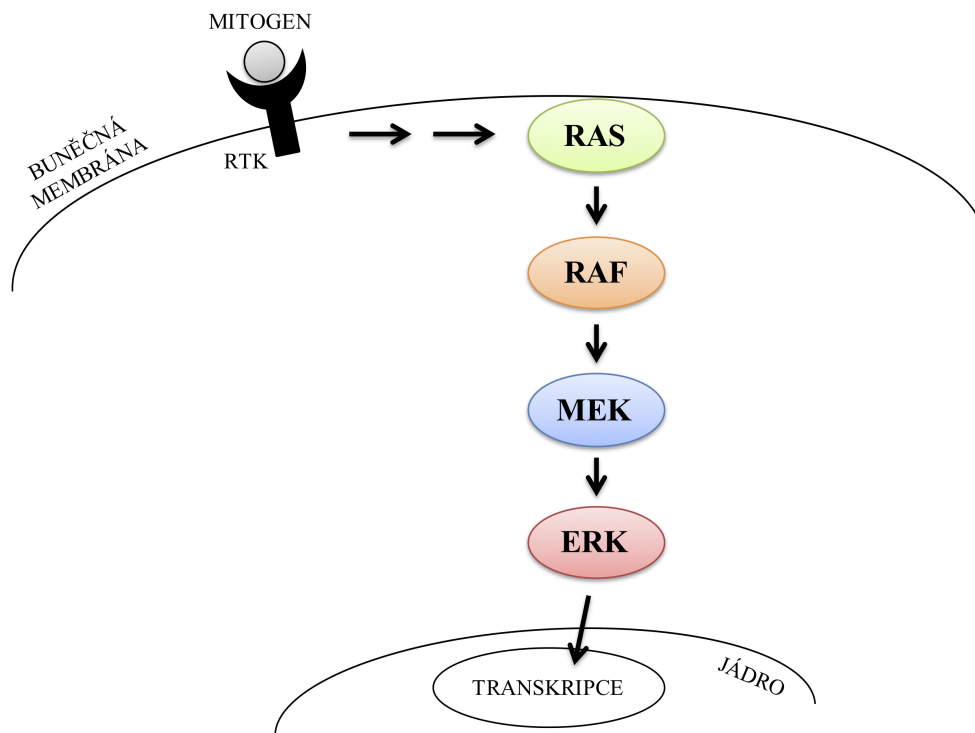
1.2.2 Metastáze

Melanom má schopnost tvořit metastáze lymfatickou i hematogenní cestou. Je však velmi obtížné předpovídat budoucí šíření. U některých pacientů se recidiva objeví do roka od chirurgického odstranění primárního ložiska, u jiných až desítky let poté. Co ovlivňuje dobu do vzniku prvních metastáz, je tloušťka tumoru. V případě tenkého melanomu je malá pravděpodobnost metastazování. Pokud k tomu dojde, tak v odstupu 10–20 let. U poloviny tlustých melanomů (tj. více než 4 mm) se metastáze objeví během prvního roku po operaci. [7]

1.2.3 Aktivace signální dráhy RAS-RAF-MEK-ERK

V buňce se nachází řada signálních drah, z nichž každá je zodpovědná za určitý děj. [3] Na konci této posloupnosti často bývá terminální kináza, která aktivuje proteiny, jež mají vliv na transkripci genů v jádře. Proteiny vyprodukované těmito geny poté ovlivňují konkrétní procesy v buňce. Mezi nejdůležitější dráhy řídící dělení buněk patří sig-

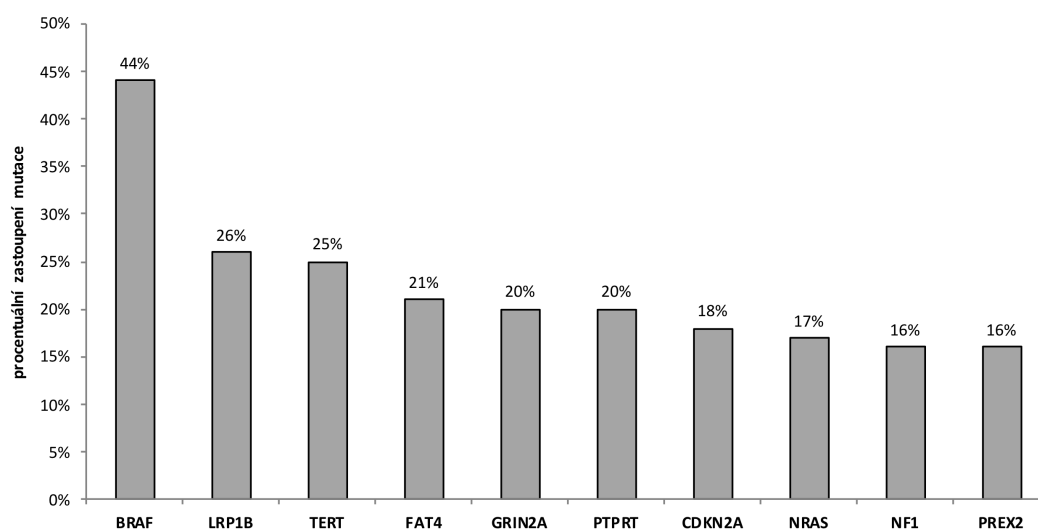
nální cesty mitogenem aktivovaných proteinových kináz (MAPK). [2] Typickými představiteli signálních cest rodiny MAPK jsou dráhy kináz ERK (z angl. *Extracellular signal-regulated kinase*), JNK (z angl. *c-Jun N-terminal kinase*) a p38. [8]



Obrázek 2: Přenos signálu do jádra buňky prostřednictvím signální dráhy ERK. [autor]

Signální dráha RAS-RAF-MEK-ERK (dále jen dráha ERK) je jednou z nejčastěji mutovaných signálních drah v lidských nádorech včetně maligního melanomu. [2] V prvním kroku této kaskády dojde díky navázání mitogenu k aktivaci některé z receptorových tyrosin kináz (RTK) v cytoplazmatické membráně. [9] Díky vazbě mitogenu se v membráně spojí dvě receptorové molekuly a vznikne enzymaticky aktivní dimer. Následuje spuštění intracelulární kaskády. RTK nepřímo aktivuje protein RAS, který je lokalizován na vnitřní straně cytoplazmatické membrány. RAS může prostřednictvím určitých proteinů aktivovat několik různých signálních drah. U popisované dráhy ERK se jedná o protein RAF. Kináza RAF poté aktivuje kinázu MEK, která má vliv na terminální kinázu ERK. Mutací některého genu kódujícího protein účastnící se této kaskády může dojít k nadměrné aktivaci kinázy ERK a ke stimulaci růstu nádoru. [8]

Rodina genů *RAS*, kódujících proteiny RAS, se dělí na geny *HRAS*, *KRAS* a *NRAS*. Právě mutace genu *NRAS* je u melanomu velmi častá. Dle výzkumů se vyskytuje přibližně ve 20 % případů. Také rodina genů *RAF* se dále dělí, jedná se o geny *ARAF*, *BRAF* a *CRAF*. Mutace genu *BRAF* byla prokázána téměř u 50 % melanomů. Nejčastější je mutace BRAF V600E, při které se kinázová aktivita zvýší téměř pětsetkrát. Samotná mutace BRAF podporuje proliferaci buněk melanomu. Je-li v buňce zároveň ztracena funkce genu pro nádorový supresor p53, může dojít k vývoji invazivního onemocnění. [2]



Obrázek 3: Procentuální zastoupení desíti nejčastěji mutovaných genů v buňkách maligního melanomu. [10], převzato a upraveno

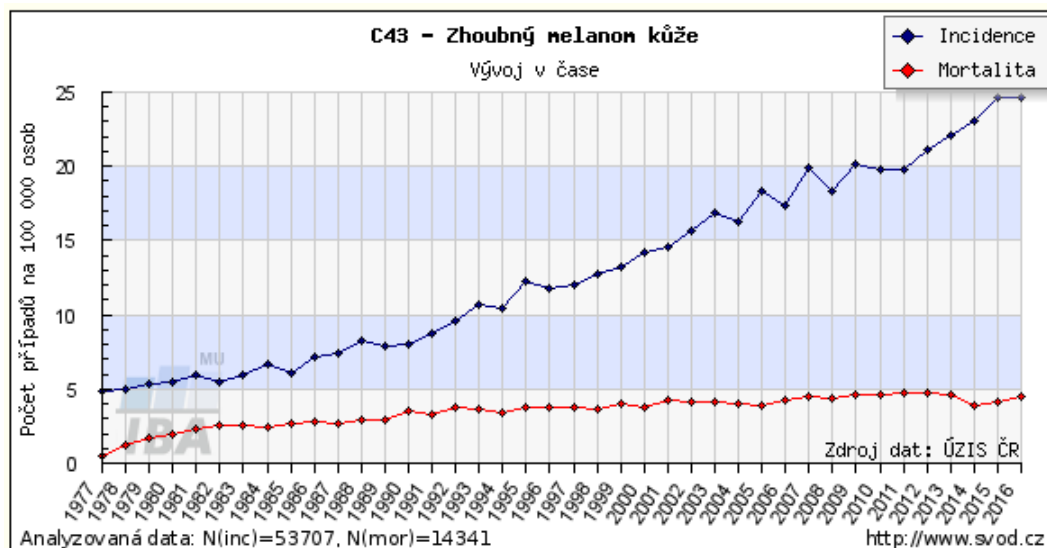
1.2.4 Léčba

U pacientů se při léčbě různých druhů zhoubných nádorů kromě chirurgického odstranění nejčastěji používá radioterapie nebo chemoterapie. [11] Maligní melanom je však velmi odolným onkologickým onemocněním, a je tedy vůči těmto metodám poměrně dost rezistentní. Jako nejúčinnější metoda léčby pacientů bez metastáz pořád přetrvává chirurgické odstranění nádoru. Jsou-li metastáze již přítomny, jsou chemoterapie, radioterapie i chirurgie ve většině případů neúčinné. [12] Prodloužení doby přežití nemocného lze dosáhnout kombinací chirurgického zákroku se systémovou ad-

juvantní terapií (nejčastěji chemoterapie, imunoterapie, chemoimunoterapie), která by měla zabránit dalšímu rozšiřování metastáz. [13] Druhů imunoterapie existuje mnoho. V dnešní době je nejslibnější léčbou aplikace monoklonálních protilátek (ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab) inhibujících imunitní kontrolní body a podávání terapeutických vakcín. [14] Cílené terapie inhibující signální kaskádu MAPK ERK se využívá zejména v nádorech s mutací BRAF V600E. Užívají se především nízkomolekulární léčiva dabrafenib a vemurafenib. Naproti tomu imunoterapii lze použít v případě jakékoliv mutace libovolného genu. [15]

1.2.5 Maligní melanom v České republice

Dle Národního onkologického registru, jehož správcem je Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR (<http://www.uzis.cz>), se v ČR v roce 2011 vyskytlo 2044 případů zhoubného melanomu a 433 tzv. melanoma in situ (časný záchyt onemocnění). V tomto roce se jednalo o deváté nejčastěji diagnostikované onkologické onemocnění v ČR. [16]



Obrázek 4: Graf zobrazuje časový vývoj hrubé incidence (počet nových případů na 100 000 osob) a hrubé mortality (počet úmrtí na diagnózu na 100 000 osob) pro zhoubný melanom kůže v celé populaci mezi lety 1977 a 2016. [17]

1.3 Kináza Chk1

Checkpoint kináza 1 (dále jen Chk1), enzym ze skupiny proteinových kináz (dále jen kinázy), je serin-threonin kináza kódovaná genem *CHK1*. Kinázy mají za úkol transportovat fosfátovou skupinu adenosintrifosfátu (ATP) na aminokyseliny proteinů. Fosforylaci dochází, mimo jiné, k aktivaci či inhibici daného proteinu. V lidském genomu se nachází přes 500 kináz. Souhrnně se tato část genetické informace člověka označuje jako kinom. [18]

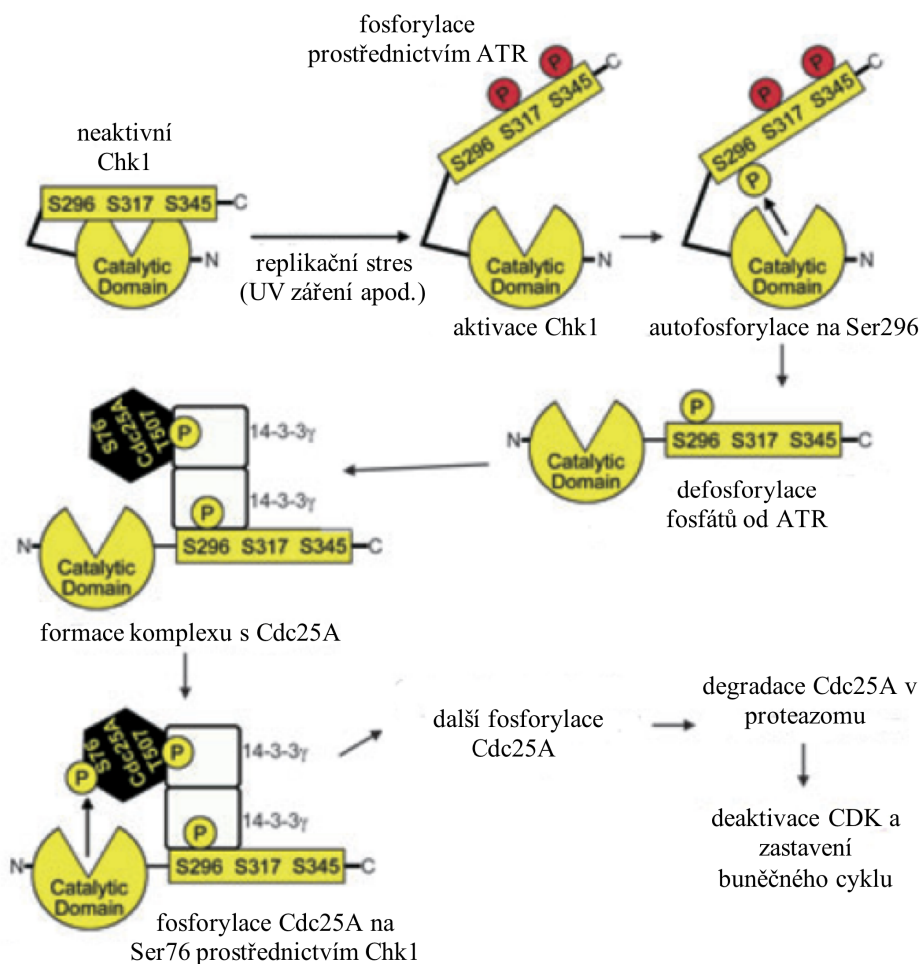
Kináza Chk1 má hned několik zásadních funkcí. Jedná se především o řízení buněčného cyklu, buněčné smrti a oprav DNA, dále o remodelaci chromatinu, změny spotřeby energie, vývoj replikační vidlice, opravu signálních drah nebo o kontrolu mitotického vřetenka v anafázi a segregace chromozomů. [19]

Hladina Chk1 není po celou dobu buněčného cyklu stejná. Vysoká je od S do M fáze, ve zbytku pak velmi nízká. Jedná se o hlavní regulační kinázu kontrolních bodů S a G₂ fáze. [20]

1.3.1 Chk1 v buněčném cyklu

Bylo zjištěno, že Chk1 je esenciální v regulaci buněčného cyklu nejen při poškození DNA, ale i při kontrole replikace DNA. Není-li genetická informace v pořádku, Chk1 je součástí signální dráhy, která zabrání pokračování cyklu. Poškozenou DNA zaregistruje kináza ATR, která fosforyluje Chk1. Po fosforylaci Chk1 na Ser317 (pouze podpůrná funkce) a Ser345 (esenciální pro aktivaci Chk1) dochází k autofosforylaci na Ser296 a aktivaci Chk1. Vzápětí protein fosfatáza 2A (PP2A) defosforyluje Ser317 a Ser345. Poté Chk1 fosforyluje protein s funkcí fosfatázy z rodiny Cdc25 (z angl. *cell division cycle 25*), čímž se podpoří jeho degradace v proteazomu. Proteiny Cdc25 odstraňují inhibiční fosfátové skupiny z aktivních míst CDK a tím umožňují jejich aktivaci. V případě Cdc25A je jedná o CDK2. Kvůli nefunkčnosti komplexů cyklin A/CDK2 a cyklin E/CDK2 po degradaci Cdc25A se replikace DNA zastaví v kontrolním bodě v S fázi.

Degradace Cdc25C vyřadí z funkce CDK1 a s ní související komplex cyklin B/CDK1. V této situaci skončí buněčný cyklus v kontrolním bodě G₂/M, tedy těsně před vstupem do mitózy. Jakmile je DNA opravena a CDK1 aktivována, není již Chk1 zapotřebí. Proto je protein Chk1 transportován ven z buněčného jádra. [21]



Obrázek 5: Mechanismus aktivace kinázy Chk1 a zastavení buněčného cyklu v S fázi. [21], převzato a upraveno

Za normálních podmínek zabezpečuje kináza Chk1 pomocí výše popsané kaskády prodloužení určitých fází cyklu. Buňka tak má dostatek času na opravu poškozené DNA. Snížená aktivita Chk1 vede k akumulaci poškození DNA a následně k buněčné smrti. Je-li však rozsah poškození malý, může dojít jen ke kumulaci mutací a urychlení vývoje nádoru. [19]

1.3.2 Chk1 a léčba nádorových onemocnění

Bylo zjištěno, že inhibici kinázy Chk1 lze použít při léčbě nádorových onemocnění. Využívá se jejího synergického působení s genotoxickými látkami, zejména chemoterapeutiky ovlivňujícími replikaci DNA. Genotoxické látky naruší DNA tumorové buňky natolik, že buňka zemře. Jejich koncentrace však nemůže být příliš vysoká, jelikož by došlo také k poškození zdravých buněk organismu. Nádorové buňky se někdy dokáží bránit chemoterapii či radioterapii zvýšením hladiny kinázy Chk1. Když je Chk1 vyřazena, nedojde k zastavení buněčného cyklu a k opravě DNA a následuje buněčná smrt. Výhodou je, že inhibice Chk1 nepoškodí nenádorové buňky. Existuje totiž ještě jeden kontrolní bod, který mohou, na rozdíl od rakovinných buněk, využít – G_1/S . Pro tento bod je důležitá funkce proteinu p53. U většiny nádorových buněk je však vyřazen z provozu, a proto je nefunkční i příslušný kontrolní bod. [22] Velkou výhodou při léčbě nádoru touto cestou je, že kináza Chk1 není nahraditelná příbuznou kinázou Chk2. Je-li Chk1 vyřazena, nemá za ni nádorová buňka žádnou náhradu. [19]

1.3.3 Inhibitory Chk1

Prvním popsaným inhibitorem této kinázy byl kofein. Později se zjistilo, že se jedná o neselektivní inhibitor mající vliv také na kinázy ATM a ATR. [23]

Inhibitor UCN-01 byl jako první zařazen do klinického testování na lidech. Je relativně stabilní v krevní plazmě, ale má velmi nízkou selektivitu, jež je zodpovědná za velkou toxicitu. Výrazně nižší toxicitu vykazoval v testech inhibitor kináz Chk1 a Chk2 AZD7762. [24] Obě tyto látky však mají slabý efekt a vedlejší účinky, takže se při léčbě nepoužívají. [11]

Druhá generace inhibitorů Chk1 je efektivnější, především v kombinaci s léky poškozujícími DNA (např. cytarabinem a gemcitabinem). [11] Inhibitor PF00477736 je podávaný v malých dávkách a dokáže při poměrně nízké koncentraci omezit také funkci kinázy Chk2. Vysoce selektivní inhibitor Chk1 LY2603618 velmi dobře funguje na liniích s mu-

tovaným p53. Na buňky s mutací tohoto proteinu působí také CHIR-124, který je ale strukturně naprosto odlišný od ostatních dosud známých inhibitorů. [24]

Nízkomolekulární sloučenina SCH900776 inhibuje esenciální autofosforylaci Ser296 kinázy Chk1. Ukázalo se, že nejlepší výsledky podává v kombinaci s antimetabolity hydroxyureou (osteosarkom, karcinom prsu), cytarabinem (akutní myeloidní leukémie) a gemcitabinem (různé typy nádorů). [25, 26] Momentálně se nachází ve druhé fázi klinických testů. [27]

MU380 je varianta předcházejícího inhibitoru nedávno vytvořená na Masarykově univerzitě v Brně. Jedná se o selektivní a velmi účinnou látku zvyšující citlivost nádorových buněk různých buněčných linií na hydroxyureu či gemcitabin až desetkrát. Vyrůstající citlivost u zdravých buněk zaznamenána nebyla. MU380 obsahuje netradiční N-trifluoromethylovou skupinu, díky které nepodléhá oxidativní demethylaci, a tím pádem je stabilnější a účinnější než SCH900776, u něhož po demethylaci dochází k nežádoucím účinkům a ke snížení selektivity. [27]

2 Použité metody a materiál

2.1 Buněčné linie

Při experimentech jsem používala následující buněčné linie:

A375 – epitel, adherentní, z maligního melanomu 54leté ženy; získáno z European Collection of Animal Cell Cultures (Salisbury, Velká Británie)

A375-p53-luc – buněčná linie A375 stabilně transfekovaná luciferázovým reportérovým konstruktem pGL4.38[luc2P/p53 RE/Hygro] (získán od firmy Promega) pro stanovení transkripční aktivity proteinu p53; linie byla připravena v Laboratoři nádorové biologie Biologického ústavu LF MU

Mel-Juso – epitel, adherentní, z primárního nádoru melanomu 58leté ženy; získáno z German Collection of Microorganism and Cell Cultures (Braunschweig, Německo)

G361 – epitel, adherentní, z maligního melanomu 31letého muže bílé pleti, získáno z European Collection of Animal Cell Cultures (Salisbury, Velká Británie)

COLO-800 – fibroblast, adherentní, z podkožního uzlíku melanomu 14letého chlapce; získáno z German Collection of Microorganism and Cell Cultures (Braunschweig, Německo)

2.2 Složení roztoků

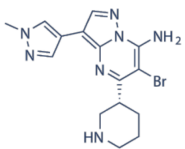
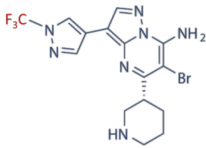
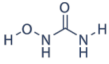
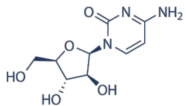
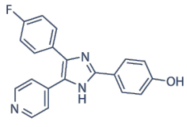
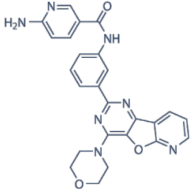
Při experimentech jsem používala tyto roztoky:

1× PBS		TBS-Tween		2× nanášecí pufr		
NaCl	8 g	2M Tris-HCl (pH = 7,4)	10 ml	1M Tris-HCl (pH = 6,8)	6,25 ml	
KCl	0,2 g	NaCl (100 mM)	11,79 g	10% SDS	20 ml	
Na ₂ HPO ₄	2,31 g	TWEEN (0,05%)	1 ml	b-merkптоethanol	5 ml	
KH ₂ PO ₄	0,158 g	H ₂ O	2 l	glycerolu	1 ml	
H ₂ O	1 000 ml			bromophenol blue	1 mg	
				H ₂ O	17,75 ml	
10% separační gel (2 kusy)			5% zaostřovací gel (2 kusy)			
	H ₂ O	2,7 ml		H ₂ O	2,8 ml	
	1M Tris-HCl (pH = 8,8)	2,8 ml		1M Tris-HCl (pH = 6,8)	469 μl	
	10% SDS	75 μl		10% SDS	37,5 μl	
	10% APS	20 μl		10% APS	18,75 μl	
	TEMED	5 μl		TEMED	3,75 μl	
	40% akrylamid	1,88 ml		40% akrylamid	469,4 μl	
10× elektroforetický pufr		1× elektroforetický pufr		1× přenosový pufr		
	glycin	144,2 g	10× elektrofor. pufr	100 ml	10× elektrofor. pufr	100 ml
	1M Tris-HCl	30,3 g	10% SDS	10 ml	methanol	200 ml
	H ₂ O	1 000 ml	H ₂ O	890 ml	H ₂ O	700 ml
roztok pro ECL (1 : 1)						
roztok A			roztok B			
	EDTA	100 μl		EDTA	100 μl	
	kyselina parakumarová	450 μl		perboritan sodný	0,123 g	
	luminol	0,2 g		octan sodný (pH = 5)	100 ml	
	1M Tris-HCl (pH = 9,4)	100 ml				
	4-jodofenylboritá kyselina	1 ml				

Tabulka 1: Složení používaných roztoků. [autor]

2.3 Testované látky

V experimentech jsem testovala následující chemické látky:

CHEMIKÁLIE	CHARAKTERISTIKA	CHEMICKÁ STRUKTURA
SCH900776 (MK-8776)	<p>inhibitor Chk1</p> <p>zdroj: doc. Mgr. Kamil Paruch, Ph.D., MU, Brno</p> <p>ředěno v DMSO</p> <p>použité koncentrace: 0,25 / 0,5 / 0,75 / 1 / 1,5 / 2 μM</p>	
MU380	<p>inhibitor Chk1</p> <p>zdroj: doc. Mgr. Kamil Paruch, Ph.D., MU, Brno</p> <p>ředěno v DMSO</p> <p>použité koncentrace: 0,125 / 0,25 / 0,5 / 0,75 / 1 μM</p>	
Hydroxyurea	<p>inhibitor syntézy DNA</p> <p>zdroj: Sigma-Aldrich (H8627)</p> <p>ředěno ve vodě</p> <p>použité koncentrace: 50 / 100 μM</p>	
Cytarabin	<p>inhibitor syntézy DNA</p> <p>zdroj: Sigma-Aldrich (C1768)</p> <p>ředěno ve vodě</p> <p>použité koncentrace: 0,1 / 0,2 μM</p>	
SB202190	<p>inhibitor α a β izoformy MAPK p38</p> <p>zdroj: Selleckchem (S1077)</p> <p>ředěno v DMSO</p> <p>použité koncentrace: 5 / 10 / 15 μM</p>	
YM201636	<p>inhibitor kinázy PIKfyve</p> <p>zdroj: Selleckchem (S1219)</p> <p>ředěno v DMSO</p> <p>použité koncentrace: 1 / 2 / 3 μM</p>	

Tabulka 2: Charakteristika používaných chemikálií. [autor]

2.4 Kultivace buněčných linií

Buněčné kultury jsem kultivovala v médiu RPMI-1640, do kterého bylo přidáno 10 % fetálního hovězího séra, 2 mM L-glutaminu, 100 µg/ml streptomycinu a 100 IU/ml penicilinu. Kultivace probíhala ve sterilním prostředí inkubátoru za stálé teploty 37 °C, vysoké vzdušné vlhkosti a 5% obsahu CO₂. Podle rychlosti růstu linie jsem buňky 2× až 3× týdně pasážovala. Nejprve jsem odsála staré médium a buňky promyla v roztoku 1× PBS (z angl. *phosphate buffered saline*). Poté jsem buňky pomocí roztoku Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich) uvolnila z povrchu misky. Po 3–5 min jsem Trypsin-EDTA inaktivovala dodáním čerstvého kultivačního média. Část buněčné suspenze jsem přidala do nového média v kultivační misce.

2.5 Stanovení životaschopnosti buněk průtokovou cytometrií

Průtoková cytometrie je metoda umožňující zjištění fyzikálně-chemických vlastností jednotlivých buněk v populaci. K analýze jsem používala červené fluorescenční barvivo propidium jodid (PI). Pouze u odumřelých buněk proniká PI přes porušenou membránu do jádra, kde se naváže na DNA. Každá buňka suspenze projde laserovým paprskem a podle intenzity fluorescence je populace rozdělena na živé a mrtvé buňky.

Buněčnou suspenzi jsem v objemu 1 ml na jamku nasadila ve sterilním boxu na 12jamkovou kultivační destičku v koncentraci 1,2–1,5 × 10⁴ buněk/ml. Buňky byly 24 h kultivovány za běžných podmínek v inkubátoru. Poté jsem použité médium odsála a přidala čerstvé médium s testovanými látkami. Po 48 h jsem médium s plovoucími buňkami přepipetovala do jednotlivých zkumavek a zbylé buňky v jamkách promyla roztokem 1× PBS. Poté jsem je uvolnila z povrchu roztokem Trypsin-EDTA a suspenzi přidala do příslušných zkumavek s médiem, které jsem přemístila na led. Zkumavky jsem centrifugovala (5 min, 1 200 otáček/min), supernatant odsála a k peletu buněk přidala 400 µl studeného roztoku 1× PBS. Těsně před měřením jsem do každé zkumavky přidala 1 µl PI (1 mg/ml, Sigma-Aldrich). K analýze jsem používala průtokový cytometr

Attune Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems) s emisní vlnovou délkou 620 nm, data byla následně zpracována pomocí Attune NxT Flow Cytometer Software. V každém zkoumaném vzorku bylo analyzováno minimálně 10 000 buněk.

2.6 Analýza množství proteinů Westernovým přenosem

Pro určení množství určitých proteinů v buňkách jsem zhotovila buněčné lyzáty. Pomocí elektroforézy jsem v gelech rozdělila proteiny obsažené v lyzátech dle velikosti. Westernovým přenosem jsem následně detekované proteiny z gelů přenesla na PVDF membrány a detekovala je použitím primárních a sekundárních protilátek.

2.6.1 Příprava buněčných lyzátů

Ve sterilním boxu jsem buněčnou suspenzi o koncentraci $1,5\text{--}2 \times 10^4$ buněk/ml nasadila v objemu 1 ml na jamku na 12jamkovou kultivační destičku. Po 24 h kultivace za běžných podmínek v inkubátoru jsem z jamek odsála staré médium a napipetovala nové s testovanými látkami. Za dalších 24 h jsem médium s plovoucími buňkami přenesla do nachystaných zkumavek, buňky přisedlé na dně jamek dvakrát promyla v $1 \times$ PBS a roztok přidala do příslušných zkumavek, které jsem poté centrifugovala (5 min, 1 200 otáček/min). Supernatant jsem odsála. Buňky zbylé v jamkách jsem zlyzovala napipetováním 80–100 μ l $2 \times$ nanášecího pufru. Lyzáty jsem přidala do zkumavek s buněčným peletem. Takto zhotovené vzorky jsem 10 min inkubovala při 95 °C.

2.6.2 Polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

Pro polyakrylamidovou gelovou elektroforézu jsem dle pokynů výrobce sestavila aparaturu Hoefer Small Mighty SE250. Nejprve jsem do ní nalila roztok pro separační gel o 10% koncentraci akrylamidu a zalila 1 ml 70% ethanolu. Po 30–40 min gel zpolymerizoval. Odsála jsem ethanol a nanasla roztok pro 5% zaostřovací gel. Do něj jsem rychle

zasunula hřebínek s 10 jamkami a nechala gel 15–20 min polymerizovat. Poté jsem aparaturu s gely připevnila do elektroforetické vany a zalila 1× elektroforetickým pufrem. Vyjmula jsem hřebínek. Do první jamky jsem nanesla 1 μ l proteinového markeru molekulové hmotnosti (Fermentas International Inc.) naředěného ve 12 μ l 2× nanášecího pufru, do zbylých jamek 13 μ l povařených vzorků. Aparaturu jsem zapojila do zdroje napětí. Pro začátek jsem napětí nastavila na hodnotu 60 V. Jakmile proteiny markeru prošly zaostřovacím gelem, začala jsem napětí postupně zvyšovat až na 120 V. Elektroforézu jsem ukončila ve chvíli vhodného rozmístění proteinů v gelu dle relativní molekulové hmotnosti detekovaných proteinů.

2.6.3 Westernový přenos (Semi-Dry Blotting)

Po skončení elektroforézy jsem gel vyjmula z aparatury. Spolu s filtračními papíry a s PVDF membránou předem aktivovanou v methanolu jsem gel ponořila do vychlazeného roztoku 1× přenosového pufru. Poté jsem jednotlivé vrstvy kladla do aparatury pro přenos (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer cell; BioRad) v následujícím pořadí: filtrační papír, membrána, gel, druhý filtrační papír. Aby byl zajištěn správný přenos proteinů z gelu na membránu, vytlačila jsem všechny vzniklé bublinky. Aparaturu jsem přiklopila víkem, zapojila do elektrického zdroje a nastavila konstantní proud. Pro dva gely se jednalo o 0,2 A na 1 h 30 min.

2.6.4 Vizualizace proteinů na membráně

PVDF membránu s proteiny jsem na třepačce blokovala v roztoku 5% odtučněného sušeného mléka v TBS-Tween (dále jen 5% mléko) po dobu 1 h při pokojové teplotě. Poté jsem membránu rozřezala dle velikostí detekovaných proteinů. Na každou část membrány jsem aplikovala příslušnou primární protilátku (viz tabulka 3) naředěnou dle pokynů výrobce v 5% mléce nebo v 1% BSA v TBS-Tween. Protilátky jsem nechala působit přes noc při teplotě 4 °C. Ráno jsem membrány promyla třikrát po 10 min v TBS-Tween. Následující hodinu jsem je inkubovala při pokojové teplotě se sekundární

protilátkou značenou křenovou peroxidázou naředěnou v poměru 1:3 500 v 5% mléce (donkey anti-mouse IgG-HRP: sc-2314, Santa Cruz Biotechnology). Poté jsem membrány opět třikrát 10 min promývala v TBS-Tween. Nakonec jsem na ně nanasla roztok pro ECL (z angl. *enhanced chemiluminescence*) a signál detekovala v G:Box Chemi XRQ (Syngene). Při každém pokusu byl jako kontrola množství proteinů ve vzorku detekován protein PCNA.

2.6.5 Použité primární protilátky

Název	Detekovaný protein	Velikost proteinu	Původ	Ředění	Zdroj
PC10	PCNA	36 kDa	Myší monoklonální protilátka (supernatant z tkáňové kultury)	mléko 1 : 50	RNDr. Bořivoj Vojtěšek, DrSc., MOÚ v Brně
DO-1	p53	53 kDa	Myší monoklonální protilátka (supernatant z tkáňové kultury)	mléko 1 : 50	RNDr. Bořivoj Vojtěšek, DrSc., MOÚ v Brně
Purified anti-H2A.X Phospho (Ser139)	γ -H2AX	15 kDa	Myší monoklonální protilátka	1% BSA 1 : 1 000	BioLegend (č. 613402)

Tabulka 3: Charakteristika používaných primárních protilátek. [autor]

2.7 Stanovení metabolické aktivity buněk (MTT test)

Jedná se o jednoduchou reakci používanou na měření cytotoxicity chemických látek a proliferace nebo viability buněk. K buňkám se přidá žlutý roztok MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid). Pouze živé buňky ho metabolizují ve svých mitochondriích a přemění na fialové krystalky formazanu, který je pomocí DMSO (dimethylsulfoxyl) rozpuštěn a uvolněn z buněk. Poté je při 570 nm měřena absorbance.

Buněčnou suspenzi jsem v objemu 200 μ l na jamku ve sterilním boxu nasadila na 96jamkovou kultivační destičku v koncentraci 10^4 buněk/jamku. Buňky byly 24 h kultivovány za běžných podmínek v inkubátoru. Poté jsem médium odsála a přidala čerstvé s testovanými látkami. Po 48 h jsem k buňkám do každé jamky napipetovala 20 μ l MTT

(5 mg/ml, Sigma-Aldrich) a nechala je opět inkubovat. Po 4 h jsem odsála médium, přidala 200 μ l DMSO a vše promíchala, aby se krystalky rozpustily. Na přístroji VersaMax Microplate Reader (Molecular Devices) jsem změřila absorbanční hodnoty.

2.8 Stanovení transkripční aktivity proteinu p53

Měření se skládá ze dvou částí – stanovení luciferázové aktivity a určení koncentrace proteinů. Výsledná aktivita p53 se vypočítá jako podíl těchto hodnot.

2.8.1 Měření aktivity luciferázy

Tato metoda je určena pro kvantifikaci luciferázy typu firefly. Při bioluminiscenční reakci, kdy se za účasti luciferázy oxiduje luciferin, vzniká světelný signál.

Suspenzi buněk A375-p53-luc o koncentraci 7×10^4 buněk/ml jsem sterilně nasadila na 24jamkovou kultivační destičku v objemu 500 μ l na jamku. Po 24 h kultivace za běžných podmínek jsem odsála médium a napipetovala nové s testovanými látkami. Po dalších 24 h jsem pomocí kitu Luciferase Assay System (Promega) provedla měření. Médium s plovoucími buňkami jsem přepipetovala do připravených zkumavek a jamky promyla roztokem $1 \times$ PBS. To jsem poté přidala k médiu a vše centrifugovala (5 min, 1 200 otáček/min). Ke zbylým buňkám v jamkách jsem přidala 70 μ l lyzačního pufru a nechala inkubovat na ledě na třepačce po dobu 15 min. Z centrifugovaných zkumavek jsem odsála supernatant a k peletu buněk přenesla lyzát a promíchala pomocí vortexu. Do bílé 96jamkové destičky jsem napipetovala 15 μ l lyzátu a 25 μ l LAR (z angl. *Luciferase Assay Reagent*). Na luminometru TriStar² LB 942 Reader (Berthold Technologies) jsem změřila aktivitu luciferázy.

2.8.2 Stanovení koncentrace proteinů

Měření je založeno na vzniku vazby mezi barvivem Coomassie Brilliant Blue G-250 a proteiny. Po vytvoření vazby je barvivo změněno na stabilní modrou formu, která je poté detekována spektrofotometrickým přístrojem.

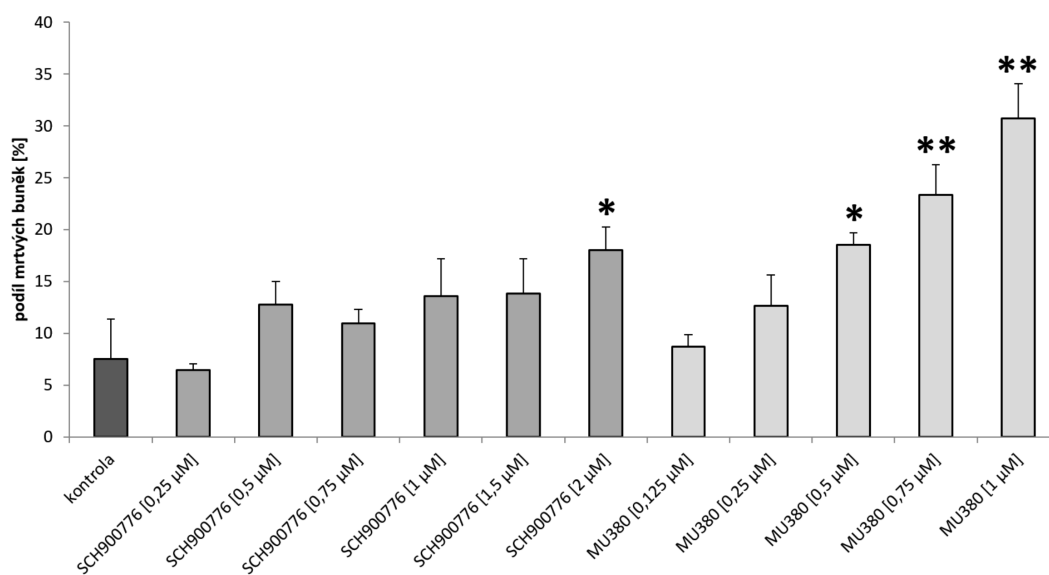
Na 96jamkovou destičku jsem v triplikátech napipetovala po 5 μl lyzátu, 45 μl H_2O a 200 μl reakčního činidla obsahujícího Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bradford Reagent, Bio-Rad). Po 5 min jsem na spektrometru DTX880 Multimode Detector (Beckman Coulter) změřila absorbanci při vlnové délce 595 nm. Změřená absorbance byla přístrojem pomocí koncentrační řady standardů BSA přepočtena na koncentraci proteinů.

2.9 Statistická analýza

Všechny výsledky uvedené v grafech v mé práci jsou průměrnými hodnotami tří nezávislých opakování, u nichž jsem stanovila směrodatnou odchylku. Statistickou významnost rozdílů jsem určila pomocí Studentova t-testu. Hladinu významnosti $P < 0,001$ jsem označila symbolem ***, $P < 0,01$ jsem označila ** a $P < 0,05$ jsem označila *.

3 Výsledky

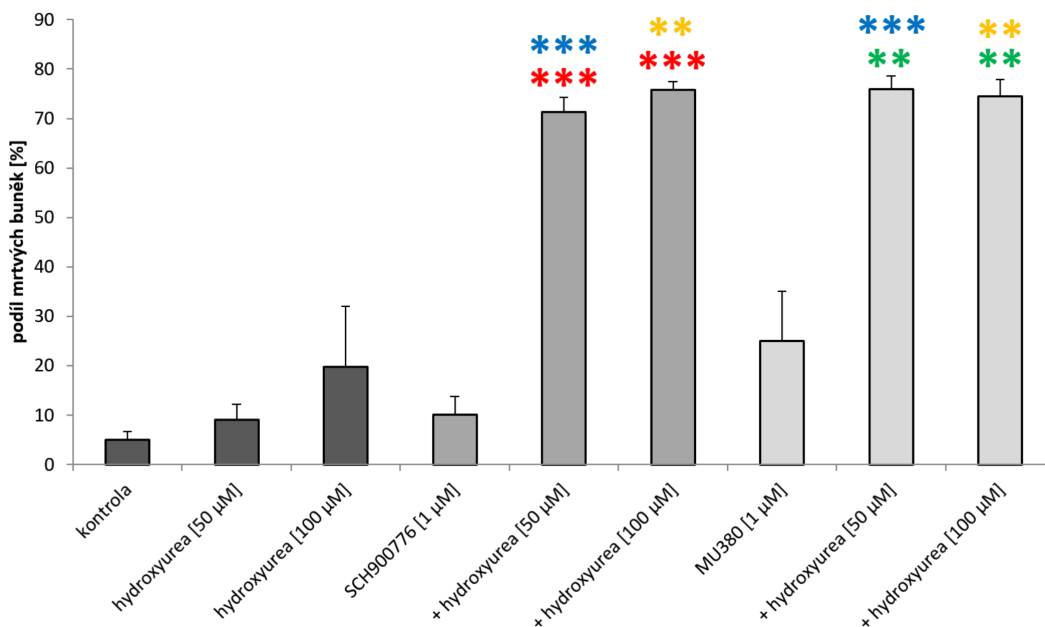
Cílem mé práce bylo srovnání cytotoxického účinku inhibitorů kinázy Chk1 působících samostatně i v kombinacích s jinými látkami. Nejprve jsem tedy pomocí fluorescenčního barviva PI a průtokové cytometrie (viz kapitola 2.5) porovнала vliv inhibitorů Chk1 používaných v mé práci na životaschopnost buněk maligního melanomu linie A375 (mutace BRAF V600E). Inhibitor MU380 je při nižších koncentracích účinnější než inhibitor SCH900776 (viz obrázek 6). Pro všechny následující pokusy jsem pro srovnání účinku kombinací pro oba inhibitory vybrala stejnou koncentraci 1 μM .



Obrázek 6: Vliv inhibitorů kinázy Chk1 SCH900776 a MU380 na životaschopnost buněčné linie A375. Buněčnou linii A375 jsem kultivovala v přítomnosti inhibitoru Chk1 SCH900776 [0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5 a 2 μM] a inhibitoru MU380 [0,125; 0,25; 0,5; 0,75 a 1 μM] po dobu 48 h a poté stanovila životaschopnost buněk pomocí průtokové cytometrie (viz kapitola 2.5). Hodnoty jsou vyjádřeny jako procenta mrtvých buněk. Graf zobrazuje průměrné hodnoty ze tří nezávislých opakování. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Symbol * představuje statisticky významný rozdíl oproti kontrole na hladině významnosti $P < 0,05$, symbol ** na hladině významnosti $P < 0,01$. [autor]

Inhibitory kinázy Chk1 mívají u různých nádorových onemocnění dobré výsledky v kombinaci s cytostatiky. V první polovině mé praktické části se věnuji vlivu inhibitorů SCH900776 a MU380 v kombinaci s cytostatiky hydroxyureou (hydroxymočovinou)

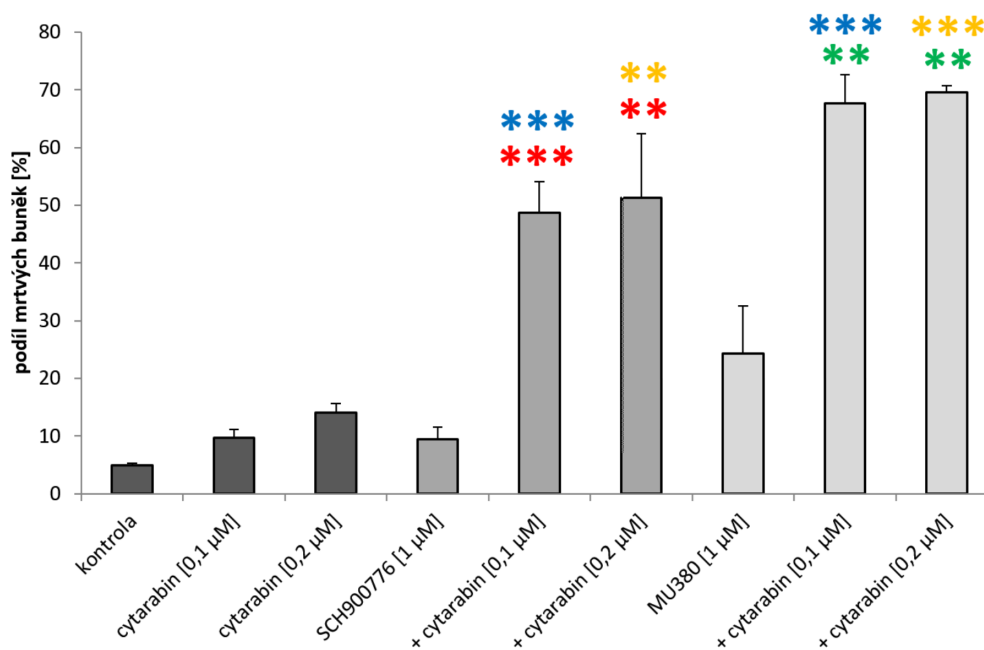
a cytarabinem na buněčné linie maligního melanomu. Obě tyto látky se běžně používají k léčbě nádorů jiných tkání jako chemoterapeutika narušující replikaci DNA v S fázi buněčného cyklu.



Obrázek 7: Vliv inhibitorů kinázy Chk1 SCH900776 a MU380 a cytostatika hydroxyurey na životaschopnost buněčné linie A375. Buněčnou linii A375 jsem kultivovala v přítomnosti inhibitorů Chk1 SCH900776 [1 µM] a MU380 [1 µM], hydroxyurey [50 a 100 µM] a jejich kombinací po dobu 48 h a poté stanovila životaschopnost buněk pomocí průtokové cytometrie (viz kapitola 2.5). Hodnoty jsou vyjádřeny jako procenta mrtvých buněk. Graf zobrazuje průměrné hodnoty ze tří nezávislých opakování. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Symbol ** představuje statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,01$, symbol *** na hladině významnosti $P < 0,001$. Červeně oproti SCH900776, zeleně oproti MU380, modře oproti hydroxyurei [50 µM], oranžově oproti hydroxyurei [100 µM]. [autor]

Obrázek 7 ukazuje, že hydroxyurea, látka na bázi močoviny způsobující inhibici syntézy DNA, měla sama o sobě v použitých koncentracích jen velmi nízký cytotoxický účinek na buněčnou linii maligního melanomu A375. Také cytotoxicita SCH900776 a MU380 byla poměrně nízká. Oproti tomu kombinace hydroxyurey s SCH900776 a MU380 měly výrazný negativní účinek na přežití buněk linie A375, během 48 h zemřelo asi 80 % buněk. Významné rozdíly mezi použitými koncentracemi hydroxyurey zaznamenány

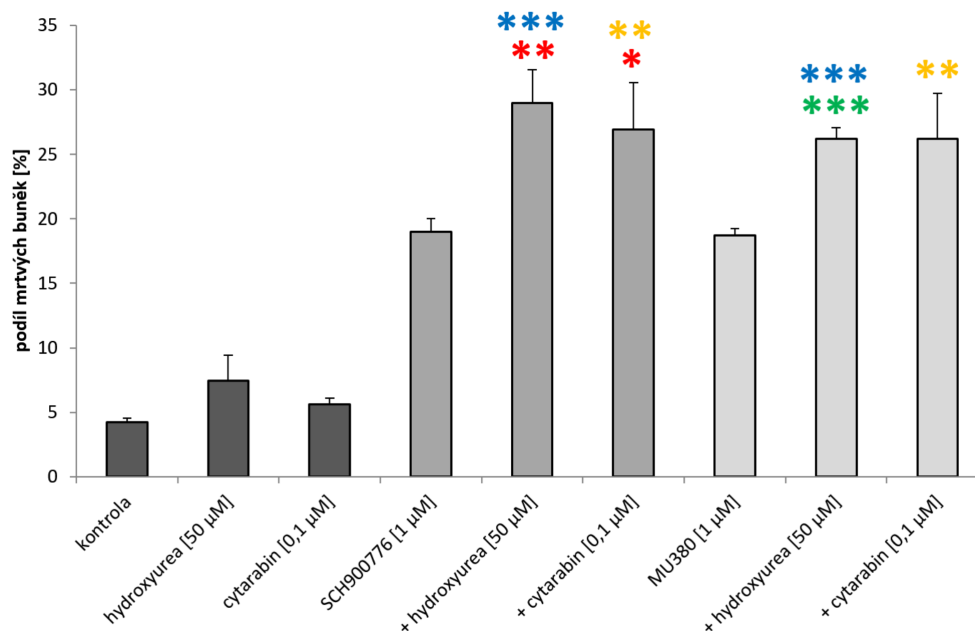
nebyly. Stejně tak nebyl pozorován významný rozdíl v cytotoxickém účinku kombinací hydroxyurey s SCH900776 a hydroxyurey s MU380.



Obrázek 8: Vliv inhibitorů kinázy Chk1 SCH900776 a MU380 a cytostatika cytarabinu na životaschopnost buněčné linie A375. Buněčnou linii A375 jsem kultivovala v přítomnosti inhibitorů Chk1 SCH900776 [1 µM] a MU380 [1 µM], cytarabinu [0,1 a 0,2 µM] a jejich kombinací po dobu 48 h a poté stanovila životaschopnost buněk pomocí průtokové cytometrie (viz kapitola 2.5). Hodnoty jsou vyjádřeny jako procenta mrtvých buněk. Graf zobrazuje průměrné hodnoty ze tří nezávislých opakování. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Symbol ** představuje statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,01$, symbol *** na hladině významnosti $P < 0,001$. Červeně oproti SCH900776, zeleně oproti MU380, modře oproti cytarabinu [0,1 µM], oranžově oproti cytarabinu [0,2 µM]. [autor]

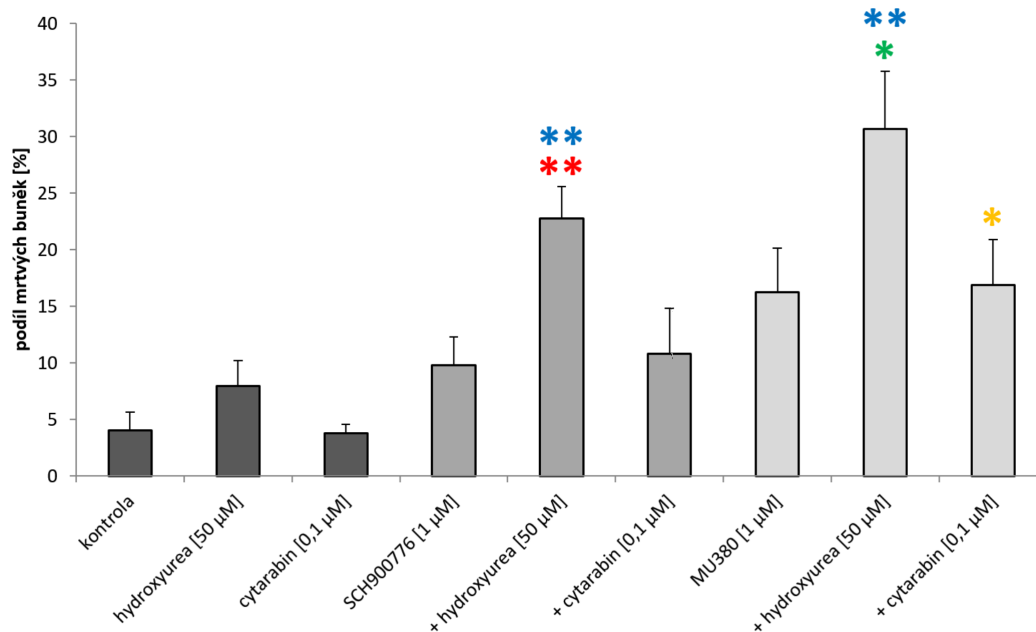
Cytarabin je cytostatikum používané především při léčbě leukémie, které se zabudovává do DNA na místo deoxycytidinu. Podobně jako hydroxyurea, také cytarabin použitý samostatně způsobil pouze velmi omezenou úmrtnost buněk linie A375. Oproti tomu cytotoxicita kombinací cytarabinu s SCH900776 a MU380 byla poměrně vysoká, významně vyšší než cytotoxicita těchto látek aplikovaných samostatně. Mezi použitými koncentracemi cytarabinu opět nebyl rozdíl (viz obrázek 8).

Účinek testovaných kombinací látek jsem ověřovala i na dalších třech lidských buněčných liniích maligního melanomu s různými mutacemi. Tou první byla linie Mel-Juso nesoucí mutaci NRAS. Obrázek 9 ukazuje, že synergie nebyla v tomto případě prokázána. Inhibitor SCH900776 byl sám o sobě toxičtější než pro linii A375.



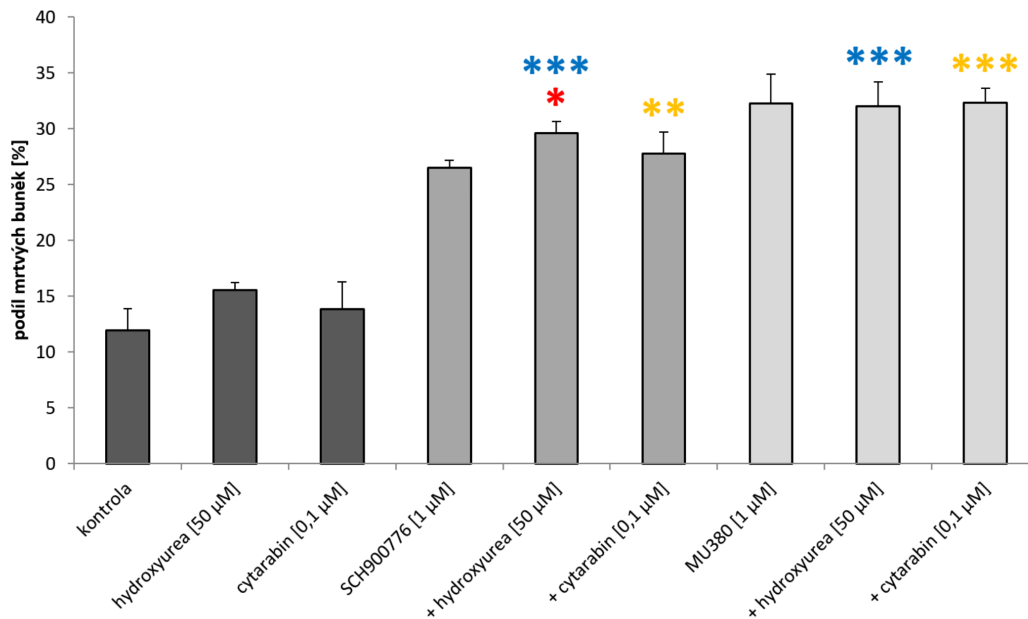
Obrázek 9: **Vliv inhibitorů kinázy Chk1 SCH900776 a MU380 a cytostatik hydroxyurey a cytarabinu na životaschopnost buněčné linie Mel-Juso.** Buněčnou linii Mel-Juso jsem kultivovala v přítomnosti inhibitorů Chk1 SCH900776 [1 µM] a MU380 [1 µM], hydroxyurey [50 µM], cytarabinu [0,1 µM] a jejich kombinací po dobu 48 h a poté stanovila životaschopnost buněk pomocí průtokové cytometrie (viz kapitola 2.5). Hodnoty jsou vyjádřeny jako procenta mrtvých buněk. Graf zobrazuje průměrné hodnoty ze tří nezávislých opakování. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Symbol * představuje statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$, symbol ** na hladině významnosti $P < 0,01$, symbol *** na hladině významnosti $P < 0,001$. Červeně oproti SCH900776, zeleně oproti MU380, modře oproti hydroxyurei, oranžově oproti cytarabinu. [autor]

V obrázku 10 je vidět, že linie G361, maligní melanom s BRAF V600E mutací, byla oproti Mel-Juso vůči působení samotných inhibitorů kinázy Chk1 odolnější. V kombinaci s hydroxyureou se ukázal pouze aditivní efekt. Cytarabin nezvýšil cytotoxicitu ani jednoho z testovaných inhibitorů kinázy Chk1.



Obrázek 10: Vliv inhibitorů kinázy Chk1 SCH900776 a MU380 a cytostatik hydroxyurey a cytarabinu na životaschopnost buněčné linie G361. Buněčnou linii G361 jsem kultivovala v přítomnosti inhibitorů Chk1 SCH900776 [1 µM] a MU380 [1 µM], hydroxyurey [50 µM], cytarabinu [0,1 µM] a jejich kombinací po dobu 48 h a poté stanovila životaschopnost buněk pomocí průtokové cytometrie (viz kapitola 2.5). Hodnoty jsou vyjádřeny jako procenta mrtvých buněk. Graf zobrazuje průměrné hodnoty ze tří nezávislých opakování. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Symbol * představuje statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$, symbol ** na hladině významnosti $P < 0,01$. Červeně oproti SCH900776, zeleně oproti MU380, modře oproti hydroxyurei, oranžově oproti cytarabinu. [autor]

Poslední testovanou linií maligního melanomu byla COLO-800 (mutace BRAF V600E). V tomto případě se synergie vůbec neprojevila. Cytotoxicita inhibitorů kinázy Chk1 v kombinaci s cytostatiky byla totožná jako u samotných inhibitorů (viz obrázek 11).

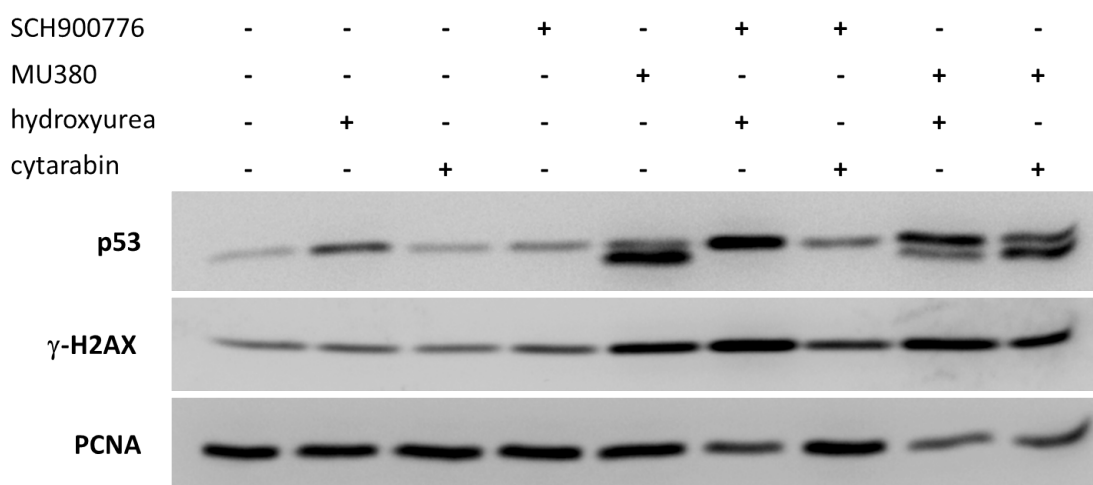


Obrázek 11: Vliv inhibitorů kinázy Chk1 SCH900776 a MU380 a cytostatik hydroxyurey a cytarabinu na životaschopnost buněčné linie COLO-800. Buněčnou linii COLO-800 jsem kultivovala v přítomnosti inhibitorů Chk1 SCH900776 [1 µM] a MU380 [1 µM], hydroxyurey [50 µM], cytarabinu [0,1 µM] a jejich kombinací po dobu 48 h a poté stanovila životaschopnost buněk pomocí průtokové cytometrie (viz kapitola 2.5). Hodnoty jsou vyjádřeny jako procenta mrtvých buněk. Graf zobrazuje průměrné hodnoty ze tří nezávislých opakování. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Symbol * představuje statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$, symbol ** na hladině významnosti $P < 0,01$, symbol *** na hladině významnosti $P < 0,001$. Červeně oproti SCH900776, modře oproti hydroxyurei, oranžově oproti cytarabinu. [autor]

Je-li DNA v buňce nějakým způsobem porušena, spustí se mechanismy zajišťující její opravu. Na těchto dějích se mimo jiné podílí protein p53, odesílající buňky na autodestrukční dráhu, a fosforylovaná forma histonu H2AX na Ser139 (γ -H2AX). Pro zjištění množství zmíněných proteinů po působení inhibitorů kinázy Chk1 a cytostatik jsem aplikovala metodu analýzy Westernovým přenosem a detekce proteinů protilátkou (viz kapitola 2.6).

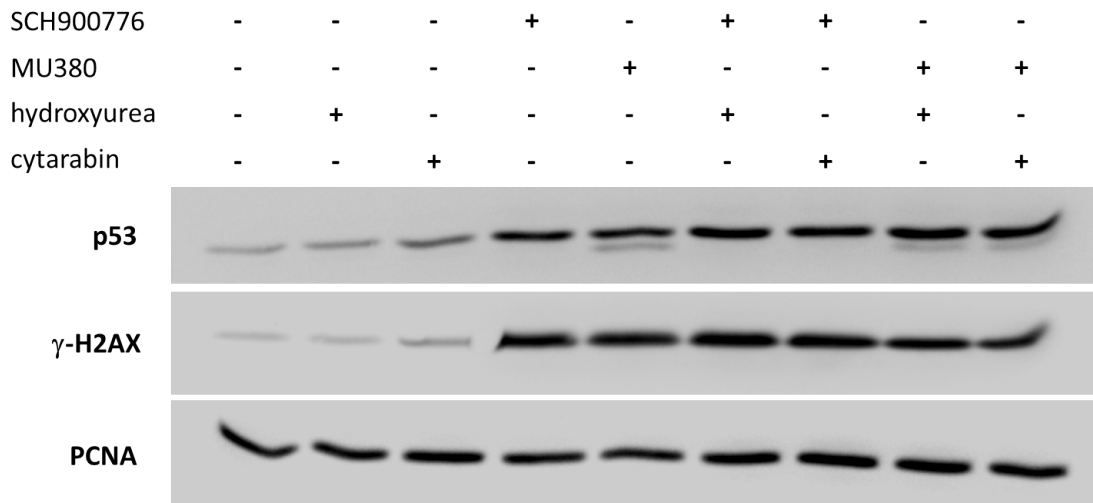
Buňky linie A375 se ukázaly jako nejlépe reagující na zkoumané látky z testovaných linií s BRAF V600E mutací, proto jsem tuto linii použila pro zjištění množství sledovaných proteinů ve vzorcích. Z obrázku 12 plyne, že zvýšená exprese proteinu p53 se projevuje především po aplikaci jak samotného inhibitoru MU380, tak v kombi-

naci s cytostatiky. Sama hydroxyurea též jeho množství v buňkách mírně zvýšila, silnějšího výsledku však dosáhla v kombinaci s inhibitory Chk1. Zajímavé je, že inhibitor MU380 indukoval tvorbu dokonce dvou forem proteinu p53, mírně se lišících svou velikostí. Zvýšená hladina fosforylace histonu H2AX na Ser139 (γ -H2AX) byla nejvíce zaznamenána po působení MU380 samostatně i s cytostatiky a po působení kombinace SCH900776 a hydroxyurey.



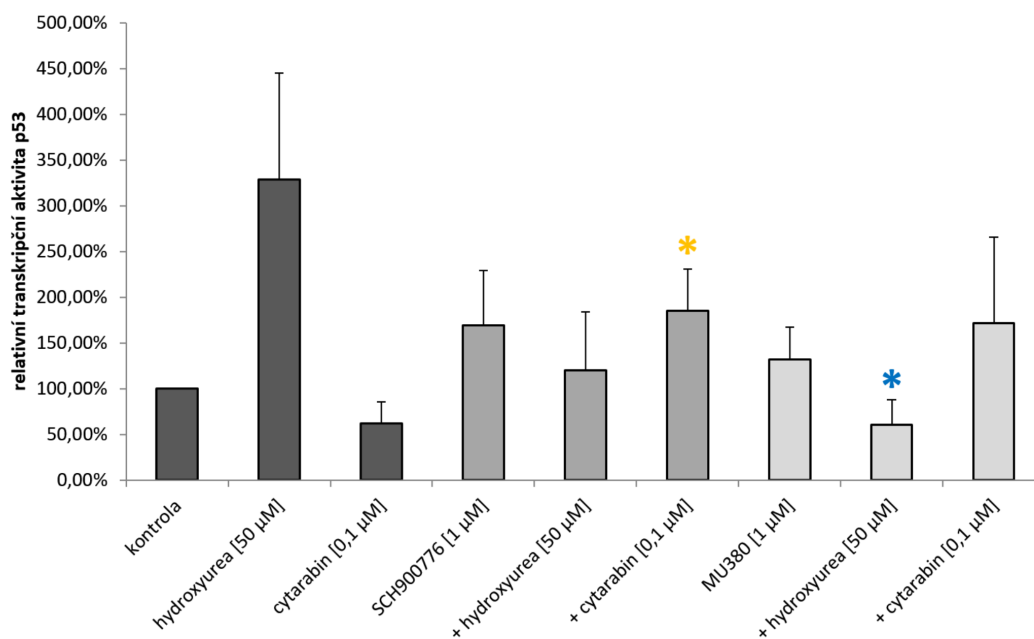
Obrázek 12: Množství proteinů p53, γ -H2AX a PCNA po působení inhibitorů kinázy Chk1 SCH900776 a MU380 a cytostatik hydroxyurey a cytarabinu na buněčnou melanomovou linii A375. Buněčnou linii A375 jsem kultivovala v přítomnosti inhibitorů Chk1 SCH900776 [1 μ M] a MU380 [1 μ M], hydroxyurey [50 μ M], cytarabinu [0,1 μ M] a jejich kombinací po dobu 48 h a následně detekovala hladinu proteinů p53, γ -H2AX a PCNA pomocí monoklonálních protilátek (viz kapitola 2.6). [autor]

Stejný pokus jako s A375 jsem provedla i s linií Mel-Juso, u které se v předchozím pokusu, zaměřeném na sledování cytotoxicity, synergie mezi inhibicí Chk1 a cytostatiky neprokázala. Zde byl viditelný vliv na zvýšenou hladinu zkoumaných proteinů u obou inhibitorů kinázy Chk1 i všech kombinací s cytostatiky. Synergický účinek testovaných kombinací nebyl pozorován. Inhibitor MU380 však opět indukoval tvorbu dvou forem proteinu p53, i když ne v takové míře jako u předcházející linie (viz obrázek 13).



Obrázek 13: Množství proteinů p53, γ -H2AX a PCNA po působení inhibitorů kinázy Chk1 SCH900776 a MU380 a cytostatik hydroxyurey a cytarabinu na buněčnou melanomovou linii Mel-Juso. Buněčnou linii Mel-Juso jsem kultivovala v přítomnosti inhibitorů Chk1 SCH900776 [1 μ M] a MU380 [1 μ M], hydroxyurey [50 μ M], cytarabinu [0,1 μ M] a jejich kombinací po dobu 48 h a následně detekovala hladinu proteinů p53, γ -H2AX a PCNA pomocí monoklonálních protilátek (viz kapitola 2.6). [autor]

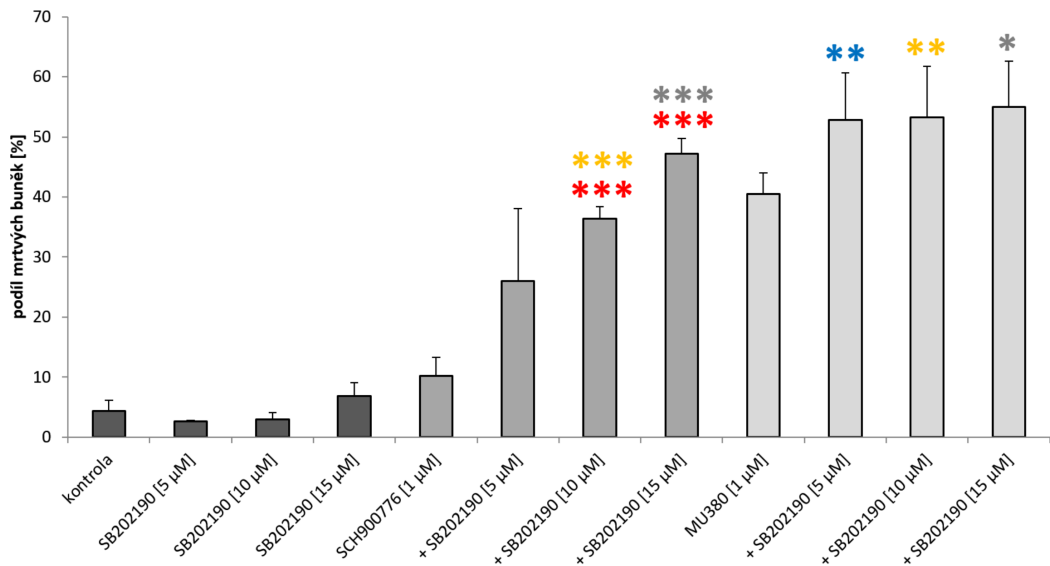
Provedené experimenty ukázaly, že po kultivaci buněk v přítomnosti některých ze mnou zkoumaných látek se zřejmě snižuje degradace proteinu p53 v buňce. Proto jsem stanovila měřením aktivity luciferázy transkripční aktivitu tohoto proteinu v buněčné linii A375-p53-luc (viz kapitola 2.8). Jedná se o linii odvozenou stabilní transfekcí od lidské melanomové linie A375, do které byl vnesen reportérový plazmidový konstrukt pGL4.38[luc2P/p53 RE/Hygro]. Ten obsahuje cDNA genu pro enzym luciferázu řízený responzivním elementem pro protein p53. Následující obrázek 14 ukazuje, že k signifikantnímu navýšení transkripční aktivity proteinu p53 došlo pouze po působení hydroxyurey.



Obrázek 14: **Transkripční aktivita proteinu p53 po působení inhibitorů kinázy Chk1 SCH900776 a MU380 a cytostatik hydroxyurey a cytarabinu na buněčnou melanomovou linii A375-p53-luc.** Buněčnou linii A375-p53-luc jsem kultivovala v přítomnosti inhibitorů Chk1 SCH900776 [1 µM] a MU380 [1 µM], hydroxyurey [50 µM], cytarabinu [0,1 µM] a jejich kombinací po dobu 24 h a následně analyzovala pomocí luciferázového testu (viz kapitola 2.8). Hodnota kontroly je vyjádřena jako 100 %, ostatní výsledky jsou k ní vztaženy. Graf zobrazuje průměrné hodnoty ze tří nezávislých opakování. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Symbol * představuje statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$. **Modře** oproti hydroxyurei, **oranžově** oproti cytarabinu. [autor]

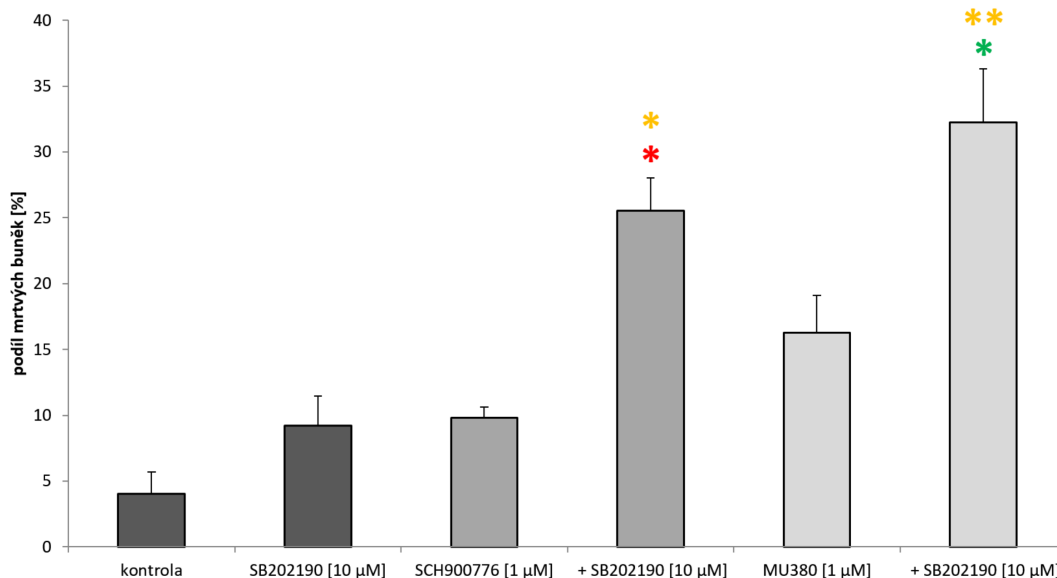
V druhé polovině své práce jsem se zabývala kombinací inhibitorů Chk1 SCH900776 a MU380 s inhibitorem signální dráhy MAPK p38 SB202190. Předchozí výzkumy naší laboratoře totiž naznačovaly synergický efekt těchto kombinací na buňkách maligního melanomu s mutací BRAF a mým úkolem bylo tuto možnost prověřit.

Z obrázku 15 plyne, že inhibitor Chk1 SCH900776 působil s inhibitorem SB202190 synergicky, a to především v koncentracích 10 a 15 µM. Inhibitor MU380 synergický efekt neprokázal. Úmrtnost buněk ovlivněných kombinacemi SB202190 s inhibitory kinázy Chk1 dosahovala až 50 %. V následujících experimentech jsem zvolila pro SB202190 koncentraci 10 µM.



Obrázek 15: Vliv inhibitorů kinázy Chk1 SCH900776 a MU380 a inhibitoru p38 SB202190 na životaschopnost buněčné linie A375. Buněčnou linii A375 jsem kultivovala v přítomnosti inhibitorů SCH900776 [1 μM], MU380 [1 μM], SB202190 [5, 10 a 15 μM] a jejich kombinací po dobu 48 h a poté stanovila životaschopnost buněk pomocí průtokové cytometrie (viz kapitola 2.5). Hodnoty jsou vyjádřeny jako procenta mrtvých buněk. Graf zobrazuje průměrné hodnoty ze tří nezávislých opakování. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Symbol * představuje statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$, symbol ** na hladině významnosti $P < 0,01$, symbol *** na hladině významnosti $P < 0,001$. Červeně oproti SCH900776, modře oproti SB202190 [5 μM], oranžově oproti SB202190 [10 μM], šedě oproti SB202190 [15 μM]. [autor]

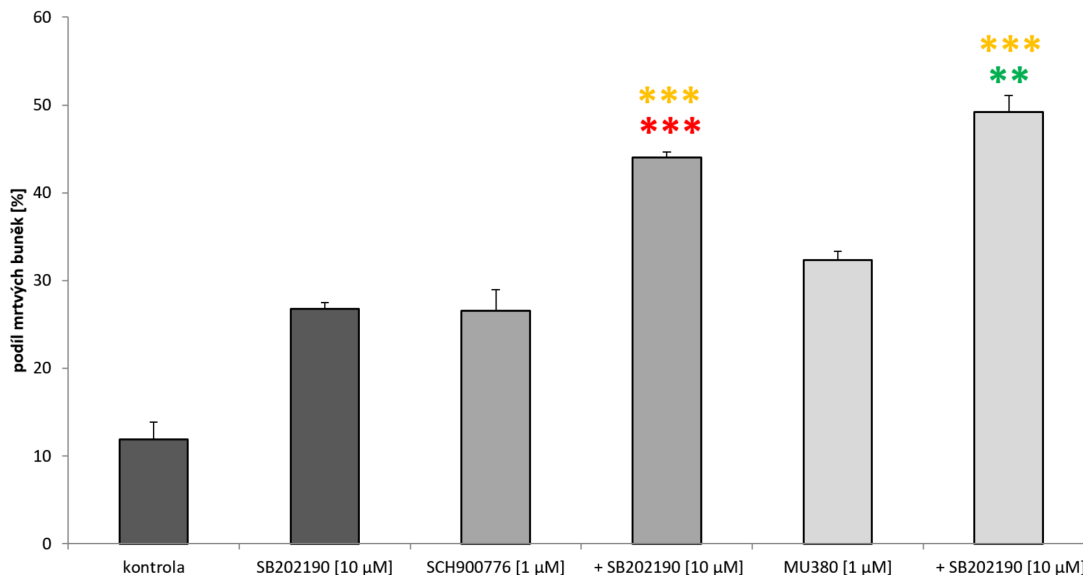
Stejný pokus jsem provedla také na dalších dvou liniích maligního melanomu s mutací BRAF V600E. Jedná se o buňky G361 a COLO-800. Ani u jedné z těchto dvou linií se stejný účinek jako u A375 neukázal.



Obrázek 16: Vliv inhibitorů kinázy Chk1 SCH900776 a MU380 a inhibitoru p38 SB202190 na životaschopnost buněčné linie G361. Buněčnou linii G361 jsem kultivovala v přítomnosti inhibitorů SCH900776 [1 µM], MU380 [1 µM], SB202190 [10 µM] a jejich kombinací po dobu 48 h a poté stanovila životaschopnost buněk pomocí průtokové cytometrie (viz kapitola 2.5). Hodnoty jsou vyjádřeny jako procenta mrtvých buněk. Graf zobrazuje průměrné hodnoty ze tří nezávislých opakování. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Symbol * představuje statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$, symbol ** na hladině významnosti $P < 0,01$. Červeně oproti SCH900776, zeleně oproti MU380, oranžově oproti SB202190. [autor]

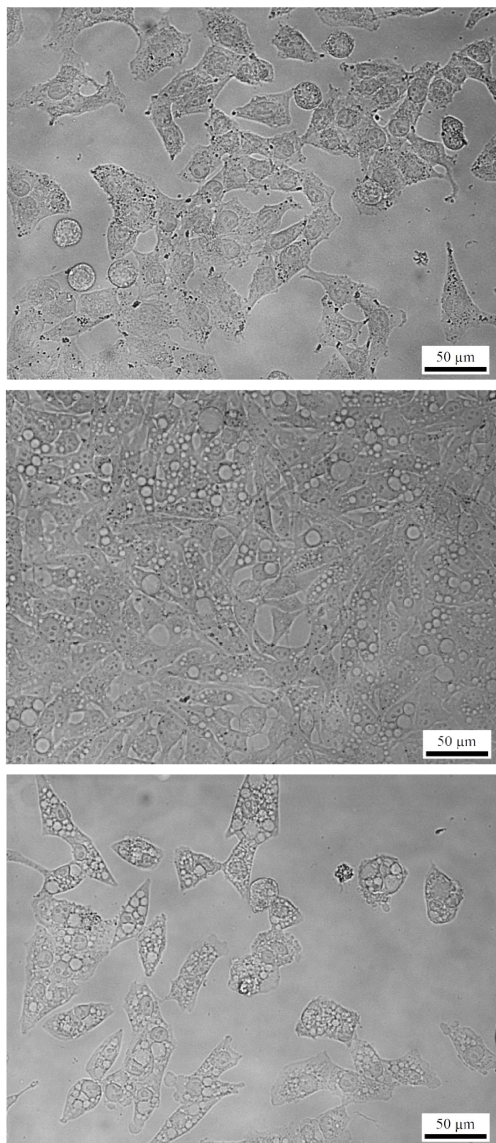
U buněčné melanomové linie G361 byl efekt pouze aditivní. Cytotoxicita samotných látek SB202190 a SCH900776 se pohybovala okolo stejných hodnot jako u linie A375. Účinnost inhibitoru MU380 klesla oproti předchozím výsledkům na polovinu (viz obrázek 16).

Buňky linie COLO-800 umíraly ve větší míře už při působení samotných inhibitorů, při kombinacích se účinek jen mírně zvýšil. Cytotoxicita kombinací látek se blížila výsledkům získaným u buněčné melanomové linie A375 (viz obrázek 17).



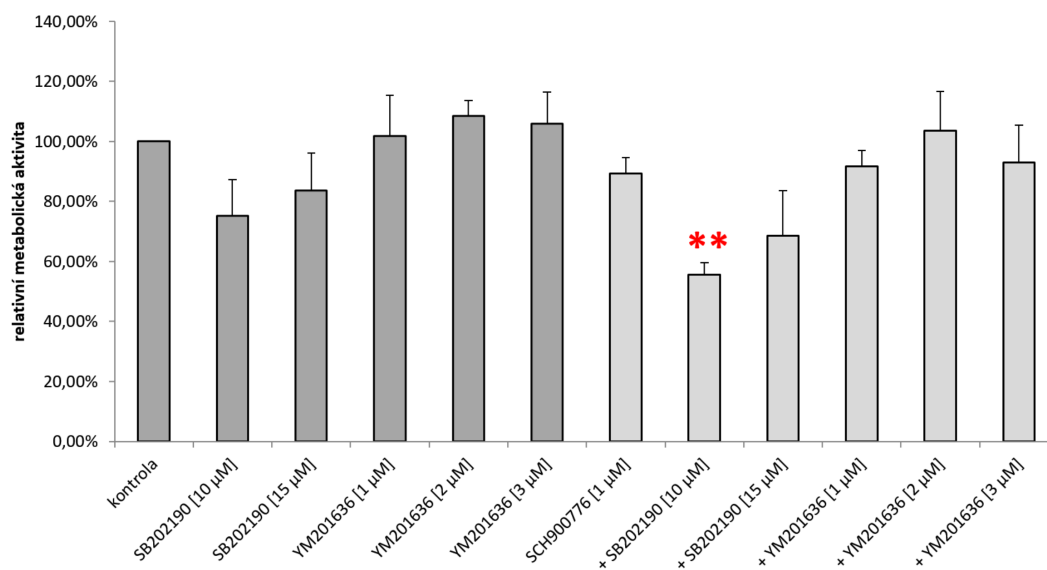
Obrázek 17: Vliv inhibitorů kinázy Chk1 SCH900776 a MU380 a inhibitoru p38 SB202190 na životaschopnost buněčné linie COLO-800. Buněčnou linii COLO-800 jsem kultivovala v přítomnosti inhibitorů SCH900776 [1 µM], MU380 [1 µM], SB202190 [10 µM] a jejich kombinací po dobu 48 h a poté stanovila životaschopnost buněk pomocí průtokové cytometrie (viz kapitola 2.5). Hodnoty jsou vyjádřeny jako procenta mrtvých buněk. Graf zobrazuje průměrné hodnoty ze tří nezávislých opakování. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Symbol ** představuje statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,01$, symbol *** na hladině významnosti $P < 0,001$. Červeně oproti SCH900776, zeleně oproti MU380, oranžově oproti SB202190. [autor]

Při dřívějších experimentech prováděných v laboratoři, kde jsem pracovala, bylo zjištěno, že SB202190 neinhibuje v buňkách melanomu pouze protein p38, ale také negativně ovlivňuje aktivitu kinázy BRAF a narušuje vezikulární transport. Proto jsem se dále snažila zjistit, díky které signální dráze dochází s nárůstem úmrtnosti buněk při kombinaci s inhibitorem kinázy Chk1 SCH900776. Pokusy neprokázaly výjimečné postavení ani jedné z nich. Zato jsem narazila na zajímavý účinek inhibitoru kinázy PIKfyve YM201636. Tato látka stejně jako SB202190 indukovala v buňkách melanomu tvorbu vakuol (viz obrázek 18).



Obrázek 18: **Snímky buněčné linie A375.** Shora: kontrola, SB202190 [10 μM], YM201636 [2 μM]. Snímky byly pořízeny na mikroskopu Leica DMI4000 B (Leica Microsystems) 24 h po nasazení buněk. Zvětšení: 320 \times [autor]

Pomocí roztoku MTT jsem stanovila metabolickou/proliferační aktivitu buněk v jednotlivých vzorcích (viz kapitola 2.7) a výsledky porovnávala se vzorkem kontrolním. Inhibitor YM201636 metabolickou aktivitu buněk nepatrně zvyšoval a mírně snižoval účinnost inhibitoru Chk1 SCH900776. Inhibitor SB202190 svůj protinádorový účinek v kombinaci s inhibitorem Chk1 potvrdil (viz obrázek 19).



Obrázek 19: Metabolická aktivita buněčné linie A375 po působení inhibitoru kinázy Chk1 SCH900776, inhibitoru p38 SB202190 a inhibitoru kinázy PIKfyve YM201636. Buněčnou linii A375 jsem kultivovala v přítomnosti inhibitorů SCH900776 [1 µM], SB202190 [10 a 15 µM], YM201636 [1, 2 a 3 µM] a jejich kombinací po dobu 24 h a stanovila metabolickou aktivitu buněk (viz kapitola 2.7). Hodnota kontroly je vyjádřena jako 100 %, ostatní výsledky jsou k ní vztaženy. Graf zobrazuje průměrné hodnoty ze tří nezávislých opakování. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku. Symbol ** představuje statisticky významný rozdíl oproti SCH900776 na hladině významnosti $P < 0,01$. [autor]

4 Diskuze

Kináza Chk1 hraje nepochybně důležitou úlohu v regulaci buněčného cyklu a oprav poškozené DNA. Jelikož by mohla být perspektivním cílem při léčbě různých nádorových onemocnění, začalo se v posledních letech objevovat stále více vědeckých prací věnovaných inhibici Chk1 nízkomolekulárními látkami. Inhibitory Chk1 zvyšují citlivost nádorových buněk k radioterapii či chemoterapeutikům poškozujícím DNA. Řada klinických testů prováděných s inhibitory této kinázy byla však bohužel zastavena v raných fázích kvůli jejich příliš vysoké toxicitě nebo nízké selektivitě [11]. Účinnost klinicky testovaného inhibitoru Chk1 SCH900776 v kombinaci s léky na bázi platiny (např. cisplatina) byla potvrzena u nádorových buněk tračníku [28], s nukleosidovými analogy (např. cytarabin, gemcitabin, fludarabin) u chronické lymfocytární leukémie [29], s hydroxyureou u buněk karcinomu prsa [30]. U buněk maligního melanomu byla prokázána spolupráce inhibitorů kinázy Chk1 s inhibitory kinázy BRAF (např. vemurafenib) [31]. Vědecká bádání též potvrdila, že inhibitory kinázy Chk1 by se samostatně mohly používat nejen u některých typů melanomu, ale také u dalších druhů nádorů s vysokou mírou replikačního stresu [32].

V experimentech prováděných v rámci mé práce se účinnost inhibitoru kinázy Chk1 SCH900776 a příbuzné sloučeniny MU380 v kombinaci s cytostatiky u buněk maligního melanomu potvrdila. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u linie s mutací BRAF V600E A375, především působením kombinace inhibitorů kinázy Chk1 s hydroxyureou. Cytostatikum poškozuje DNA, což vede ke zvýšení hladiny proteinů p53 a γ -H2AX. Jelikož je zároveň zablokována kináza Chk1, účastníci se oprav DNA, buňka není schopna genetickou informaci účinně opravit a nastane buněčná smrt. Transkripční aktivita proteinu p53 se však po aplikaci kombinace inhibitorů Chk1 a cytostatik výrazně nezvýšila. Dochází tedy zřejmě pouze ke snížení jeho degradace.

Testování cytotoxicity kombinací inhibitorů Chk1 s cytostatiky jsem provedla také na dalších liniích maligního melanomu. U buněk linií G361 a Mel-Juso se při těchto kombinacích ukázal převážně aditivní efekt. Linie COLO-800 nevykazovala výrazné rozdíly

mezi působením samotných inhibitorů kinázy Chk1 a jejich kombinací s cytostatiky. Lze tedy vyvodit, že ne všechny melanomy odpovídají na kombinace těchto látek stejně intenzivně. Bude třeba dalšího studia vzájemných interakcí těchto látek, abychom mohli určit skupinu pacientů, kteří by mohli na tento typ terapie reagovat nejlépe.

Výsledky analýzy množství proteinu p53 Westernovým přenosem a jeho detekce protilátkou přinesly velmi zajímavé výsledky u obou hlavních genetických subtypů melanomu. Jak linie s mutací BRAF, tak linie s mutací NRAS reagovaly na aplikaci inhibitoru kinázy Chk1 MU380 tvorbou dvou forem proteinu p53 s rozdílnou molekulovou hmotností. Tento protein, který má esenciální postavení při buněčné odpovědi na stresové pochody, se v lidských buňkách může teoreticky vyskytovat ve 12 izoformách. Použitá protilátka DO-1 je schopna detekovat izoformy p53 α (53 kDa), p53 β (47 kDa) a p53 γ (48 kDa) [33]. Do budoucna by bylo zajímavé zjistit, jestli detekovaná kratší forma proteinu p53 na membráně představuje β či γ izoformu.

Druhým cílem mé práce bylo ověřit účinnost inhibitorů kinázy Chk1 v kombinaci s inhibitorem SB202190. V laboratoři, kde jsem experimenty prováděla, se již dříve zjistilo, že SB202190 v buňkách maligního melanomu inhibuje také mutovanou kinázu BRAF, jež pohání dělení nádorových buněk u velkého procenta pacientů. Vzhledem k tomu, že v dnešní době je mutovaný protein BRAF u melanomu nejvýznamnějším terapeutickým cílem, zaměřila jsem se primárně na studium účinků této látky na buněčné linie s mutací BRAF. Zatímco u linie A375 se synergické působení prokázalo, pro buňky byly kombinace s inhibitory Chk1 cytotoxické již při relativně nízkých koncentracích, u linie G361 byla pozorována jen malá synergie. U buněk melanomové linie COLO-800 došlo po přidávku SB202190 pouze k mírnému navýšení efektu inhibitoru Chk1. Tyto výsledky naznačují, že inhibice kinázy BRAF pravděpodobně nebyla důvodem pozorované synergie SB202190 s inhibitory Chk1. Experimenty také ukázaly, že inhibitor kinázy PIKfyve YM201636, jenž v buňkách melanomu indukuje velmi podobný fenotyp vakuolizace cytoplazmy, nezapříčiňuje v kombinaci s inhibitory Chk1 sníženou proliferaci. Ani indukce tvorby vakuol tedy zřejmě nebude příčinou synergického efektu látky SB202190 s SCH900776.

Při experimentech jsem používala stejné koncentrace SCH900776 a MU380, abych mohla jejich účinnost porovnat. Dle Samadder a kol. vykazuje inhibitor MU380 u nádorových buněk vyšší efektivitu než SCH900776 [27]. Při experimentech prováděných v rámci zmiňovaného článku byly použity buněčné linie osteosarkomu, karcinomu plic, prostaty, tlustého střeva, prsa, vaječníku, slinivky a děložního hrdla. Mé výsledky potvrdily, že klinicky testovaný inhibitor kinázy Chk1 SCH900776 je sám o sobě vůči buňkám maligního melanomu méně toxický než nedávno syntetizovaný inhibitor MU380. V kombinacích s ostatními testovanými látkami však oba inhibitory vykazovaly obdobnou účinnost.

5 Závěr

Má práce se věnovala možnosti využití inhibitorů kinázy Chk1 v protinádorové terapii buněk maligního melanomu. U některých melanomových linií byl zaznamenán značný cytotoxický účinek inhibitorů Chk1 v kombinaci s cytostatiky hydroxyureou a cytarabinem. Po aplikaci kombinací těchto látek byla zjištěna zvýšená hladina proteinů p53 a γ -H2AX. Kombinace inhibitorů kinázy Chk1 s inhibitorem kináz BRAF a p38 SB202190 měla na životaschopnost buněk podobný vliv jako kombinace s cytostatiky. Podle mých výsledků je inhibitor kinázy Chk1 SCH900776 v kombinacích s látkami testovanými v mé práci stejně účinný jako strukturně podobný inhibitor MU380. Všechny vytyčené cíle jsem splnila a potvrdila, že inhibice kinázy Chk1 by mohlo být využito při léčbě maligního melanomu.

Použitá literatura a zdroje

- [1] SNUSTAD, D. Peter a Michael J. SIMMONS. *Genetika*. Překlad Jiří DOŠKAŘ a kol. Vyd. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2009, 894 s. ISBN 978-80-210-4852-2.
- [2] KRAJSOVÁ, Ivana a Jan BAUER. *Melanom: imunoterapie a cílená léčba*. Praha: Maxdorf, 2017, 381 s. Jessenius. ISBN 978-80-7345-515-6.
- [3] KRAJSOVÁ, Ivana. *Maligní kožní nádory: průvodce diagnostikou a léčbou nemelanomových kožních nádorů a melanomu*. Vyd. 1. Praha: Mladá fronta, 2017, 288 s. Edice postgraduální medicíny. ISBN 978-80-204-4186-7.
- [4] HANAHAN, Douglas a Robert A. WEINBERG. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000, **100**(1), s. 57-70. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- [5] HANAHAN, Douglas a Robert A. WEINBERG. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011, **144**(5), s. 646-674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [6] ALBERTS, Bruce a kol. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Překlad Arnošt KOTYK a kol. Vyd. 1. Ústí nad Labem: Espero Publishing, c1998, 630 s. ISBN 80-902906-0-4.
- [7] KRAJSOVÁ, Ivana. *Melanom: [klasifikace, diagnostika, terapie, prevence]*. Praha: Maxdorf, c2006, 332 s. Jessenius. ISBN: 80-7345-096-8.
- [8] RAMAN, M. a kol. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*. 2007, **26**(22) s. 3100-3112. DOI: 10.1038/sj.onc.1210392.
- [9] BROWN, Matthew D. a David B. SACKS. Protein Scaffolds in MAP Kinase Signalling. *Cellular Signalling*. 2009, **21**(4) s. 462-469. DOI: 10.1016/j.cellsig.2008.11.013.
- [10] *Cancer Browser. COSMIC: Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer* [online]. Cit. 2018-12-26. Dostupné z: https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/browse/tissue?wgs=off&sn=skin&ss=all&hn=malignant_melanoma&sh=all&in=t&src=tissue&all_data=n

- [11] VISCONTI, Roberta a kol. Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2016, **35**(1). DOI: 10.1186/s13046-016-0433-9.
- [12] MAIO, M. Melanoma as a model tumour for immuno-oncology. *Annals of Oncology*. 2012, **23**(suppl 8), s. viii10-viii14. DOI: 10.1093/annonc/mds257.
- [13] TAUCERI, Francesca a kol. Surgery and adjuvant therapies in the treatment of stage IV melanoma: our experience in 84 patients. *Langenbeck's Archives of Surgery*. 2009, **394**(6), s. 1079-1084. DOI: 10.1007/s00423-008-0312-8.
- [14] MAMALIS, Andrew a kol. Targeting the PD-1 pathway: a promising future for the treatment of melanoma. *Archives of Dermatological Research*. 2014, **306**(6), s. 511-519. DOI: 10.1007/s00403-014-1457-7.
- [15] FRANKLIN, C. a kol. Immunotherapy in melanoma: Recent advances and future directions. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*. 2017, **43**(3), s. 604-611. DOI: 10.1016/j.ejso.2016.07.145.
- [16] *Vývoj incidence a mortality zhoubného melanomu v České republice v letech 1980–2011. ÚZIS: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR* [online]. Cit. 2018-09-04. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/rychle-informace/vyvoj-incidence-mortality-zhoubneho-melanomu-ceske-republice-letech-1980-2011>
- [17] *Incidence a mortalita – vývoj v čase. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice* [online]. Cit. 2018-01-17. Dostupné z: <http://www.svod.cz/analyse.php?modul=incmor#>
- [18] MANNING, G. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science*. 2002, **298**(5600), s. 1912-1934. DOI: 10.1126/science.1075762.
- [19] BARTEK, Jiri a Jiri LUKAS. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*. 2003, **3**(5), s. 421-429. DOI: 10.1016/S1535-6108(03)00110-7.

- [20] KANEKO, Yokos a kol. Cell cycle-dependent and ATM-independent expression of human Chk1 kinase. *Oncogene*. 1999, **18**(25), s. 3673-3681. DOI: 10.1038/sj.onc.1202706.
- [21] GOTO, Hidemasa a kol. Novel regulation of checkpoint kinase 1: Is checkpoint kinase 1 a good candidate for anti-cancer therapy?. *Cancer Science*. 2012, **103**(7), s. 1195-1200. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02280.x.
- [22] AL-EJEH, F a kol. Harnessing the complexity of DNA-damage response pathways to improve cancer treatment outcomes. *Oncogene*. 2010, **29**(46), s. 6085-6098. DOI: 10.1038/onc.2010.407.
- [23] SARKARIA, Jann N. a kol. Inhibition of ATM and ATR Kinase Activities by the Radiosensitizing Agent, Caffeine. *Cancer Research*. 1999, **59**(17), s. 4375-4382.
- [24] DAI, Yun a Steven GRANT. New Insights into Checkpoint Kinase 1 in the DNA Damage Response Signaling Network. *Clinical Cancer Research*. 2010, **16**(2), s. 376-383. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1029.
- [25] GUZI, Timothy J. a kol. Targeting the Replication Checkpoint Using SCH 900776, a Potent and Functionally Selective CHK1 Inhibitor Identified via High Content Screening. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2011, **10**(4), s. 591-602. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0928.
- [26] SAMADDER, Pounami. *Checkpoint Kinase 1 (CHK1); A Pharmacological Target in Cancer* [online]. Brno, 2017, 168 s. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/hrb9g/> Disertační práce obhájená na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity, vedoucí práce doc. Lumír Krejčí, Ph.D.
- [27] SAMADDER, Pounami a kol. Synthesis and Profiling of a Novel Potent Selective Inhibitor of CHK1 Kinase Possessing Unusual N-trifluoromethylpyrazole Pharmacophore Resistant to Metabolic N-dealkylation. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2017, **16**(9), s. 1831-1842. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0018.

- [28] HERŮDKOVÁ, Jarmila a kol. Chk1 Inhibitor SCH900776 Effectively Potentiates the Cytotoxic Effects of Platinum-Based Chemotherapeutic Drugs in Human Colon Cancer Cells. *Neoplasia*. 2017, **19**(10), s. 830-841. DOI: 10.1016/j.neo.2017.08.002.
- [29] ZEMANOVA, Jana a kol. Chk1 inhibition significantly potentiates activity of nucleoside analogs in TP53-mutated B-lymphoid cells. *Oncotarget*. 2016, **7**(38), s. 62091-62106. DOI: 10.18632/oncotarget.11388.
- [30] MONTANO, Ryan a kol. Preclinical Development of the Novel Chk1 Inhibitor SCH900776 in Combination with DNA-Damaging Agents and Antimetabolites. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2012, **11**(2), s. 427-438. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0406.
- [31] HWANG, Bor-Jang a kol. Chk1 inhibition as a novel therapeutic strategy in melanoma. *Oncotarget*. 2018, **9**(54), s. 30450-30464. DOI: 10.18632/oncotarget.25765.
- [32] BROOKS, K. a kol. A potent Chk1 inhibitor is selectively cytotoxic in melanomas with high levels of replicative stress. *Oncogene*. 2013, **32**(6), s. 788-796. DOI: 10.1038/onc.2012.72.
- [33] JORUIZ, Sebastien M. a Jean-Christophe BOURDON. p53 Isoforms: Key Regulators of the Cell Fate Decision. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2016, **6**(8). DOI: 10.1101/cshperspect.a026039.

Seznam obrázků

1	Charakteristické znaky nádorových buněk	17
2	Signální dráha ERK	20
3	Procentuální zastoupení nejčastěji mutovaných genů	21
4	Časový vývoj hrubé incidence a mortality 1977–2016	22
5	Mechanismus aktivace kinázy Chk1 a zastavení buněčného cyklu	24
6	Vliv SCH900776 a MU380 na životaschopnost buněčné linie A375	36
7	Vliv SCH900776, MU380 a hydroxyurey na životaschopnost buněčné linie A375	37
8	Vliv SCH900776, MU380 a cytarabinu na životaschopnost buněčné linie A375	38
9	Vliv SCH900776, MU380, hydroxyurey a cytarabinu na životaschopnost buněčné linie Mel-Juso	39
10	Vliv SCH900776, MU380, hydroxyurey a cytarabinu na životaschopnost buněčné linie G361	40
11	Vliv SCH900776, MU380, hydroxyurey a cytarabinu na životaschopnost buněčné linie COLO-800	41
12	Množství proteinů p53, γ -H2AX a PCNA po působení SCH900776, MU380, hydroxyurey a cytarabinu na buněčnou linii A375	42
13	Množství proteinů p53, γ -H2AX a PCNA po působení SCH900776, MU380, hydroxyurey a cytarabinu na buněčnou linii Mel-Juso	43

14	Transkripční aktivita proteinu p53 po působení SCH900776, MU380, hydroxyurey a cytarabinu na buněčnou linii A375-p53-luc	44
15	Vliv SCH900776, MU380 a SB202190 na životaschopnost buněčné linie A375	45
16	Vliv SCH900776, MU380 a SB202190 na životaschopnost buněčné linie G361	46
17	Vliv SCH900776, MU380 a SB202190 na životaschopnost buněčné linie COLO-800	47
18	Snímky buněčné linie A375	48
19	Metabolická aktivita buněčné linie A375 po působení SCH900776, SB202190 a YM201636	49

Seznam tabulek

1	Složení používaných roztoků	28
2	Charakteristika používaných chemikálií	29
3	Charakteristika používaných primárních protilátek	33