

Obrázek na titulní stránce: Inhibice DNA a RNA syntézy roskovitinem ($c=20 \mu\text{M}$) u buněčné linie CEM T-lymfoblastické leukémie. Pro vyhodnocení inhibice DNA byla použita analýza BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridin) inkorporace, BrdU je analog thymidinu inkorporovaný do DNA během biosyntézy. Inkorporovaný BrdU byl vizualizován pomocí anti-BrdU-FITC značené protilátky a detekován měřením na průtokovém cytometru. U buněk přeléčených roskovitinem byla prokázána inhibice DNA syntézy (32.06% vs. 60.99% u kontrolních buněk). Podobně byl analyzován účinek roskovitinu na RNA syntézu, inkorporovaným nukleotidem byl BrU (5'-bromouridin). U buněk přeléčených roskovitinem byla prokázána i inhibice RNA syntézy (84.5% vs. kontrolních 49.96% na úrovni BrU negativních buněk).

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA**



**MECHANIZMY ÚČINKŮ SYNTETICKÝCH
INHIBITORŮ CYKLIN-DEPENDENTNÍCH KINÁZ
ODVOZENÝCH OD OLOMOUCINU**

Mgr. Gabriela Kořínková

Školící pracoviště: Laboratoř experimentální medicíny,
Dětská klinika, LF UP a FN Olomouc

Školitel: MUDr. Marián Hajdúch, PhD.

OLOMOUC 2006

Prohlašuji, že dizertační práci jsem vypracovala samostatně pod odborným vedením svého školitele a vedoucího školícího pracoviště Laboratoře experimentální medicíny MUDr. Mariána Hajdúcha, PhD. a prof. MUDr. Vladimíra Mihála, CSc., přednosta DK FN a LF UP v Olomouci. Všechna literatura citovaná v textu je uvedena na konci práce, v kapitole 5.

Tato studie byla podpořena výzkumným záměrem MŠM 6198959216, projektem GAČR 301/02/0475, interní grantovou agenturou Univerzity Palackého Olomouc a Nadací pro výzkum rakoviny, Olomouc.

Zároveň bych chtěla poděkovat MUDr. Mariánu Hajdúchovi, PhD. za poskytnutí pracovního zázemí, konzultačních hodin, cenných rad a připomínek v průběhu studia a za čas strávený při korekturách dizertační práce.

Dále bych chtěla poděkovat MUDr. Karlu Cwiertkovi, PhD., Mgr. Martině Paprskářové, MUDr. Petru Džubákovi a týmu RNDr. Hany Kovářové, CSc. za intenzivní spolupráci na řešené problematice.

Ráda bych také poděkovala prof. MUDr. Vladimíru Mihálovi, CSc. za cenné rady a připomínky, které mi v průběhu studia uděloval.

Děkuji i laboratorním pracovníkům Bc. Anně Janošákové, Veronice Drábkové a Jiřímu Lipertovi za technickou výpomoc a Ing. Sergeji Kuzminovi za editační práce.

Děkuji také celé své rodině za vyjádřenou podporu a pak především mému manželovi Richardu Kořínkovi nejen za pochopení, podporu ale i za všestrannou technickou výpomoc během sepisování dizertační práce. A na závěr bych ráda za trpělivost poděkovala svým dvěma dětem Vendulce a Danečkovi Kořínkovým.

V Olomouci, 30.9. 2006

.....
Mgr. Gabriela Kořínková

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	7
1. OBECNÝ ÚVOD DO PROBLEMATIKY	9
1.1. Úvod	9
1.2. CDK kinázy a cykliny	9
1.3. Buněčný cyklus	9
1.3.1. Kontrolní body buněčného cyklu	11
1.3.1.1. Kontrolní bod G1/S	12
1.3.1.2. Kontrolní bod G2/M	13
1.3.2. Dysregulace buněčného cyklu	14
1.4. Regulace transkripce prostřednictvím CDK kináz	14
1.5. CDK inhibitory jako nová protinádorová léčiva	15
1.5.1. Trisubstituované puriny	17
1.5.1.1. Historie objevu účinku trisubstituovaných purinů	17
1.5.1.2. Mechanismus účinku trisubstituovaných purinů	17
1.5.1.3. <i>In vivo</i> účinky trisubstituovaných purinů	20
1.5.1.4. Výsledky proběhlých preklinických a klinických zkoušek	20
1.5.2. Perspektivy využití modulátorů buněčného cyklu	21
1.6. Účinky ionizujícího záření na buňky a tkáně	22
1.6.1. Mechanismus oprav dvouřetězcových DNA DSBs (double strand breaks) zlomů	22
1.6.1.1. Homologní rekombinace (HR)	23
ATM/ATR kináza	24
Mediátorové a efektorové proteiny	25
Zablokování buněčného cyklu	27
Reakce na zablokování/kolaps replikační vidlice	27
1.6.1.2. Nehomologní spojování konců DNA (NHEJ)	27
1.6.2. Poruchy DNA oprav ve vztahu k nádorovým onemocněním	28
1.6.3. Transkripce ve vztahu k replikaci a opravám DNA	28
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST, ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ	31
2.1. Cíle dizertační práce	31
2.2. Kapitola první	33
Kovářová H, Hajdúch M, Kořínková G, Halada P, Krupičková S, Gouldsworthy A, Zhelev N, Strnad M. Proteomics approach in classifying the biochemical basis of the anticancer activity of the new olomoucine-derived synthetic cyclin-dependent kinase inhibitor, bohemine. <i>Electrophoresis</i> 2000;21:3757-3764.	
2.3. Kapitola druhá	45
Kořínková G, Cwiertka K, Paprskářová M, Džubák P, Hajdúch M. The radiosensitising effect of synthetic cyclin-dependent kinase inhibitors derived from olomoucine. <i>International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics</i> 2006; v recenzním řízení.	
3. SOUHRN	69
4. SUMMARY	73
5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	77
6. PŘEHLED PUBLIKACÍ AUTORA	85

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

53BP1	mediátor u oprav DNA DSBs (p53 binding protein 1)
ATM	kináza účastníci se DNA oprav (Ataxia telangiectasia mutated)
ATP	adenosintrifosfát
ATR	kináza účastníci se DNA oprav (Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein)
ATRIP	protein interagující s ATR (ATR-interacting protein)
BER	bázová excizní oprava (base excision repair)
BOH	bohemín; 2-[(3-hydroxypropyl)amino]-6-benzylamino-9-isopropylpurin
BRCA1	protein účastníci se homologní rekombinace (Breast cancer type 1 susceptibility protein)
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridin
CAK	cyklin-dependentní kinázy-aktivující kináza (CDK activating kinase)
CDC25s	fosfatázy podílející se na regulaci aktivity CDK kináz (cell division cycle 25s)
CDK	cyklin-dependentní kináza (cyclin-dependent kinase)
CDKI	inhibitor cyklin-dependentní kinázy (cyclin-dependent kinase inhibitor)
CHK1/CHK2	kinázy účastníci se DNA oprav (checkpoint kinase 1/2)
CTDRNAPII	karboxylová terminální doména RNAP II polymerázy (Carboxy-terminal domain of RNAP II)
DLTs	limitní toxicity (dose-limiting toxicities)
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleid acid)
DNA-PK	kináza účastníci se DNA oprav (DNA-activated protein kinase)
DP1	transkripční faktor
DSBs	dvouřetězcové zlomy DNA (double strand breaks)
E2F	transkripční faktor
Gy	Gray
HR	homologní rekombinace (homologous recombination)
γH2AX Ser139	histon H2AX fosforylovaný v místě Ser139, indikátor DSBs
IC _x	koncentrace látky/dávka záření inhibující tvorbu kolonií o x %
INK 4	inhibitor cyklin-dependentní kinázy 4 (kinase 4 inhibitor)
iPA	N ⁶ -(² -isopentenyl)adenosin
Lys	lysin
Mcl-1	antiapoptotický faktor
MDC1	mediátor u oprav DNA DSBs (mediator of DNA damage checkpoint 1)
MDM2	ubiquitinová ligáza regulující p53 protein (murine double minute 2 p53 associated oncogene)
MMR	opravy chybného párování bází během replikace (Methyl directed mismatch repair system)
MPF	maturační promoční faktor (maturation promotion factor)
MRE11	člen multiproteinového komplexu MRN (meiotic recombination 11)
MRN	multiproteinový komplex, senzor DNA DSBs (MRE11/RAD50/NBS1)
mRNA	informační RNA molekula (messenger RNA)
MSH2, MSH6	proteiny účastníci se MMR oprav (mismatch repair protein 2/6)
MTD	maximální tolerovaná dávka (maximum tolerated dose)
Myt1	kináza podílející se na regulaci aktivity CDK1 kinázy
NBS1	člen multiproteinového komplexu MRN (Nijmegen breakage syndrom 1)

NER	nukleotidová excizní oprava (nucleotide excision repair)
NHEJ	nehomologní spojování konců DNA (non-homologous end joining)
NSCLC	nemalobuněčný plicní karcinom (non-small cell lung cancer)
OC	olomoucín; 2-(2-hydroxyetylamin)-6-benzylamino-9-metylpurin
p16, p15, p18 a p19	inhibitory CDK kináz patřící do INK4 rodiny
p21, p27 a p57	inhibitory CDK kináz patřící do Cip/Kip rodiny
p53	nádorový supresorový gen/protein
PARP	poly(ADP-ribozo) polymeráza
PBS	fosfátový fyziologický roztok
PCNA	podjednotka DNA polymerázy δ (proliferating cell nuclear antigen)
PI	propidium jodid
PI3K rodina	rodina proteinových kináz (phosphatidylinositol 3-kinase)
PKC	protein kináza C (protein kinase C)
pRb	nádorový retinoblastomový supresorový gen/protein
p-TEFb	transkripční faktor RNAP II polymerázy
RAD50	člen multiproteinového komplexu MRN
R bod	restrikční bod
RNA	ribonukleová kyselina
RNAP II	transkripční RNA polymeráza II
RHR	proteinový komplex účastnící se HR (RAD9B-RAD1-HUS1)
ROS	roskovitin; 2-(R)-(1-etyl-2-hydroxyetylamin)-6-benzylamino-9-isopropylpurin
RPA	replikační protein A (replication protein A)
RSR	proteinový komplex účastnící se HR (RAD17-RFC2-5)
SDS	dodecylsulfát sodný
Ser	serin
SER	senzitivizační koeficient (sensitizer enhancement ratio)
SF	přežívající frakce (survival fraction)
SMC1	mediátor u oprav DNA DSBs (SMC1-structural maintenance of chromosome 1-like protein)
TAX	taxol neboli paklitaxel
TCR	transkripčně vázané opravy (transcription coupled repair)
TGF	transformační růstový faktor (transforming growth factor)
TFIIH	transkripční faktor RNAP II polymerázy
Thr	threonin
Tyr	tyrosin
tRNA	transferová RNA (transfer RNA)
Wee1	kináza podílející se na regulaci aktivity CDK1 kinázy
Xrcc2, Xrcc3	proteiny účastnící se HR (X-ray repair cross complementing)

1. OBECNÝ ÚVOD DO PROBLEMATIKY

1.1. Úvod

Buňka během svého života přijímá mnoho vnitro- i mimobuněčných signálů, které ovlivňují její průchod buněčným cyklem. Celý proces je kontrolován proteiny ze skupiny cyklin-dependentních kináz (CDKs), jejich cykliny a přirozenými inhibitory cyklin-dependentních kináz (CDKIs) (**Sherr 1996, Morgan 1997**). Rozhodování, zda dojde k buněčnému dělení, probíhá v G1 fázi cyklu, kde mají nezastupitelnou regulační úlohu růstové supresorové geny proteinů pRb a p53. V S fázi cyklu pak probíhá DNA replikace, ve fázi G2 probíhají poslední přípravy buňky na mitózu. Eukaryotické buňky během buněčného cyklu prochází kontrolními body, kde může být v případě poškození buňky celý proces dočasně pozastaven. Pokud je poškození rozsáhlé a neopravitelné, je zahájena apoptóza. Udržuje se tak stabilita a integrita genomu organismu. Jestliže díky genomickým alteracím kontrolní body nefungují, dochází k nekontrolované proliferaci.

Transformace normální buňky v buňku nádorovou je komplexní proces sestávající z většího množství kroků a obvykle není způsoben pouze jedinou funkční poruchou buňky. Zhruba 90% nádorů vykazuje dysregulaci dráhy supresorového proteinu pRb, časté jsou i mutace nádorového supresoru p53, inhibitorů CDK kináz p15, p16 a dalších.

Význam látek inhibujících CDK kinázy pak spočívá právě v jejich schopnosti substituovat v buňce funkci poškozených nádorových supresorů a zamezit dalšímu nádorovému bujení a to buďto znovunastolením rovnováhy v buňce nebo prostřednictvím spuštění apoptózy. Velkým přínosem těchto sloučenin je jejich specifický účinek na proliferující nádorové buňky. Díky evoluční stabilitě CDK kináz jsou tyto látky účinné u širokého spektra organismů a to i při poměrně nízkých koncentracích, přičemž toxické koncentrace pro zdravé buňky se pohybují v řádově vyšších hodnotách. Jednu ze skupin syntetických inhibitorů CDKs tvoří trisubstituované puriny, sloučeniny odvozené od olomoucínu, jejichž účinkům je věnována tato dizertační práce.

Vzhledem k tomu, že dizertační práce pojednává nejen o mechanismech účinků trisubstituovaných purinů, ale i o kombinaci jejich účinků s radioterapií, teoretická část je věnována také poškození DNA indukovanému ionizačním zářením.

1.2. CDK kinázy a cykliny

Cyklin-dependentní kinázy jsou serin/threonin protein kinázové enzymy, které jsou aktivní pouze ve spojení s příslušným cyklinem. V aktivním stavu katalyzují přenos fosfátu z adenosin trifosfátu (ATP) na substrátové proteiny v takovém pořadí, aby úspěšně proběhlo celé buněčné dělení (**Nasmyth 1996, Sherr 1996**). Název cyklinů vychází z faktu, že jsou v dělicích se buňkách cyklicky syntetizovány a že v každé fázi buněčného cyklu jsou přítomny specifické cykliny. Výjimkou jsou cykliny třídy D, které jsou v buňce obsaženy během celého buněčného cyklu, ostatní cykliny jsou vždy v určitém čase syntetizovány i degradovány. Dnes známe celkem 13 CDK kináz a 25 cyklinů (**Knockaert et al. 2002, Murray 2004**), u všech nejsou objasněny jejich biologické funkce a zdaleka ne všechny se uplatňují při regulaci buněčného cyklu (**Tab. 1**). Kináza CDK7 (také CAK – CDK activating kinase) má na rozdíl od ostatních CDKs odlišné postavení, aktivuje ve spojení s cyklinem H ostatní kinázy buněčného cyklu fosforylací na threoninu 161, není tedy fázově specifická. Aktivitu CDK kináz ovlivňují také tumor supresorové geny a jejich subcelulární lokalizace.

1.3. Buněčný cyklus

Buňka nacházející se v G1 fázi cyklu je stimulována ke vstupu do S fáze růstovými faktory. Pokud je mitogenní stimulace dostatečná, buňka překročí nevratně tzv. restriční bod R v G1 fázi cyklu. Dále už pak buňka během celého dělení není závislá na mitogenní stimulaci. Mitogenní stimulace spouští indukci

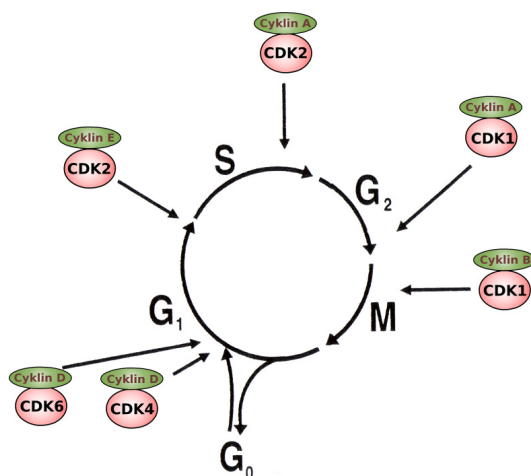
D cyklinů (D1, D2, D3), jejich stabilizaci, translokaci do buněčného jádra a vazbu s CDK kinázami (Sherr et al. 1999, Sherr 1996). Cykliny D rodiny jsou v podstatě senzory růstových faktorů a jejich overexprese je v nádorových buňkách velmi častá (Sewing et al. 1993, Sherr et al. 1999, Sherr 1996).

Tab. 1: Funkce komplexů CDK/cyklin (Fischer et al. 2005).

CDK	Cyklin/ jiný aktivátor	Funkce během:
CDK1	cykliny A a B	cyklus (G ₂ , G ₂ /M, M), NS
CDK2	cykliny E, A a B	cyklus (G ₂ , G ₂ /M, M), apoptóza, RNA transkripce
CDK3	cykliny C a E	cyklus (G ₀ /G ₁ , G ₁ , G/S)
CDK4	cyklin D	cyklus (G ₁), NS, buněčná diferenciace
CDK5	p35 (p25) a p39 (p29)	apoptóza, NS, různé tkáňově specifické funkce
CDK6	cyklin D	cyklus (G ₁), NS, buněčná diferenciace
CDK7	cyklin H	cyklus (CAK), RNA transkripce
CDK8	cyklin C	RNA transkripce
CDK9	cykliny T a K	RNA transkripce, diferenciace, apoptóza
CDK10	?	cyklus (G ₂ /M)
CDK11	cyklin L	cyklus (M), RNA transkripce, apoptóza, NS

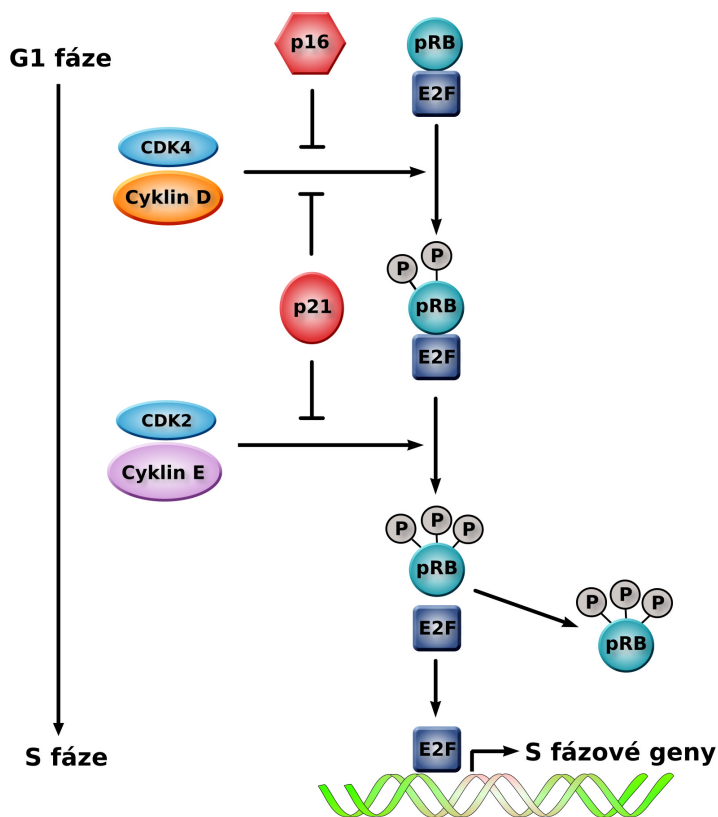
(NS-nervový systém).

Průchod buňky G₁ fází cyklu regulují komplexy CDK4/cyklin D, CDK6/cyklin D, CDK2/cyklin E a CDK2/cyklin A (Sherr et al. 1999) (Obr. 1). Význam bodu R spočívá v regulaci aktivity proteinu pRb, který na sebe váže transkripční faktory E2F rodiny (Obr. 2). Ty jsou potřebné k zahájení transkripce genů nezbytných pro vstup do S fáze cyklu a DNA replikaci, dochází také k transaktivaci cyklinů A a E (Strauss et al. 1995, Swanton 2004). Transkripční faktory se uvolňují po fosforylaci proteinu pRb kinázovými komplexy CDK4/cyklin D a CDK6/cyklin D. Po skončení syntetických pochodů na sebe pRb protein po své defosforylaci znovu naváže transkripční faktory a čeká na další aktivaci. pRb protein je velmi důležitým nádorovým supresorem (Sherr 2004), poruchy jeho regulační cesty a tím i buněčného cyklu jsou v nádorových buňkách velmi časté a vyskytují se u mnoha typů nádorů (Zheng et al. 2001).



Obr. 1: Regulace buněčného cyklu.

Na kinázu CDK2 se během S fáze váže cyklin A, ten na jejím konci přechází na CDK1 kinázu (**Obr. 1**). V pozdní G2 fázi je v komplexu s CDK1 kinázou cyklin A nahrazen cyklinem B. Komplex CDK1/cyklin B nazýváme také maturační promoční faktor (MPF), aktivní MPF faktor spouští mitózu. Regulace aktivity CDK1 kinázy je však složitější než u ostatních kináz. Kromě vazby cyklinu B a fosforylace CDK7 kinázou je CDK1 kináza inhibičně fosforylována na Tyr15 kinázami Wee1 a Myt1. Pro vstup do mitózy je proto inaktivní komplex CDK1/cyklin B aktivován defosforylací na Tyr15 CDC25C fosfatázou (**Smits et al. 2001**).



Obr. 2: Regulace aktivity Rb proteinu (upraveno podle **Stewart et al. 2003**).

1.3.1. Kontrolní body buněčného cyklu

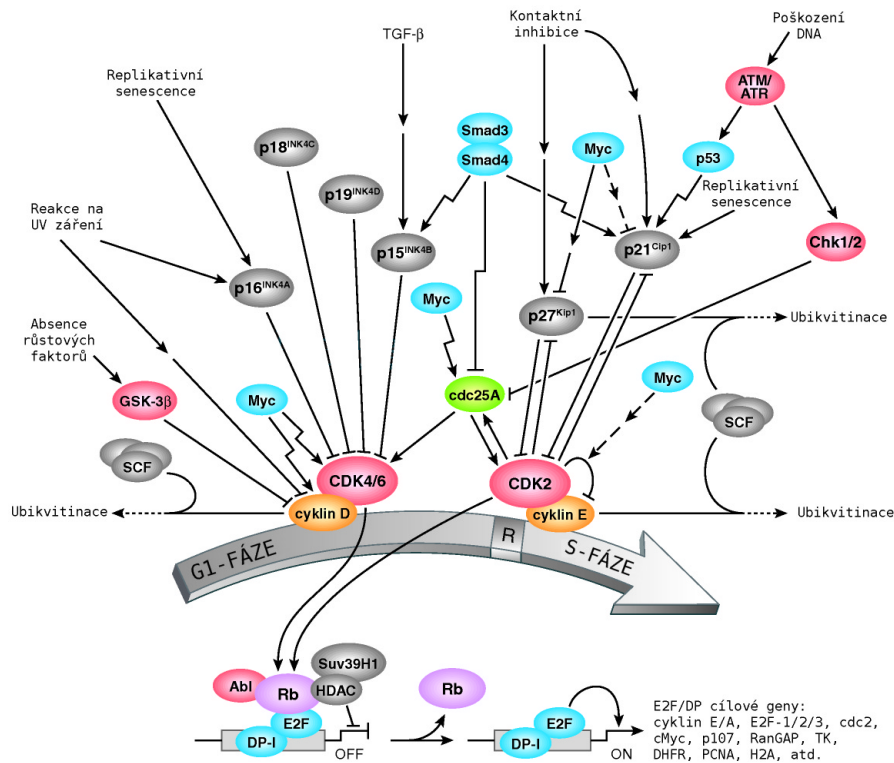
Kontrolní body G1/S a G2/M buněčného cyklu slouží ke kontrole poškození DNA. DNA může být poškozena genotoxickými látkami a/nebo zářením. V kontrolním bodě G1/S je DNA kontrolována před vstupem buňky do S fáze cyklu (**Obr. 3**), v bodě G2/M po replikaci DNA (**Obr. 4**). Pokud je DNA poškozena, buňka se v kontrolním bodě zastaví a spustí DNA opravy nebo apoptózu (**Zhou et al. 2000**, **Lukas et al. 2004**) V buňkách funguje také mitotický kontrolní bod, kde se kontroluje správná segregace chromozomů během mitózy (**Clarke et al. 2000**).

Pro správnou funkčnost kontrolních bodů mají zcela zásadní význam CDKs inhibitory (CDKIs), které se dělí do dvou skupin na INK4 a Cip/Kip inhibitory. Do rodiny INK4 inhibitorů patří p16, p15, p18 a p19; do Cip/Kip rodiny pak p21, p27 a p57. Inhibitory INK4 rodiny jsou specifické pro CDK4 a CDK6 kinázy v G1 fázi cyklu, vážou se na ně místo cyklinů. Inhibitory Kip/Cip mohou působit během celého buněčného cyklu a inhibují komplexy CDK/cyklin (**Sherr et al. 1999**).

1.3.1.1. Kontrolní bod G1/S

Inhibitor p21 je pozitivně regulován supresorovým proteinem p53 nazývaným také strážce genomu (Obr. 3), ten je velmi důležitým nádorovým supresorem. (Sherr 2004). Koncentrace a aktivita proteinu p53 v nepoškozených buňkách je nízká, protein je exprimován až v reakci na poškození DNA např. ionizačním nebo ultrafialovým zářením, cytostatiky nebo při hypertermii či hypoxii. Jeho nejdůležitějším transkripčním cílem je protein p21, jehož exprese vede k zastavení buněčného cyklu (inhibice CDKs) a k inhibici replikace prostřednictvím inaktivace PCNA, což je pomocná podjednotka DNA polymerázy δ (proliferating cell nuclear antigen) (Sherr 2004). Dalšími transkripčními cíli p53 proteinu jsou proteiny účastníci se DNA oprav (GADD45) a v případě rozsáhlého poškození DNA také proteiny indukující apoptózu (BAX) (Stewart et al. 2001, Rousseau et al. 1999). Protein p21 může inhibovat všechny CDK kinázy buněčného cyklu včetně CDK7 kinázy. Protein p21 i protein p27 může být aktivován také kontaktní inhibicí proliferujících buněk. Protein p15 je aktivován v reakci na TGF β (Shapiro et al. 2000) (Obr. 3).

Dalším fenoménem zprostředkujícím inhibici CDKs prostřednictvím p16 i p21 inhibitorů je replikativní senescence, což je v podstatě fyziologický program terminálního růstového bloku stárnoucí buňky (Sherr 2004). Buňky ale mohou přecházet do stadia senescence i díky dalším stresovým faktorům, jako jsou například genetické manipulace, chemoterapie nebo ionizační záření. Senescentní buňky jsou metabolicky aktivní, avšak neproliferují. Dochází u nich k charakteristickým změnám v morfologii, jako například zvýšená granularita, zvětšený a zploštělý tvar. Nejčastěji používaným markerem s vysokou, nicméně ne absolutní specifitou je SA- β -gal (senescence-associated β -galactosidase), který je detekovatelný pomocí X-gal barvení při pH=6 a zřejmě odpovídá zvýšenému množství lysozomů v senescentních buňkách. Léčbou indukovaná senescence vykazuje podobnosti i rozdíly s replikativní senescencí (Roninson 2003).

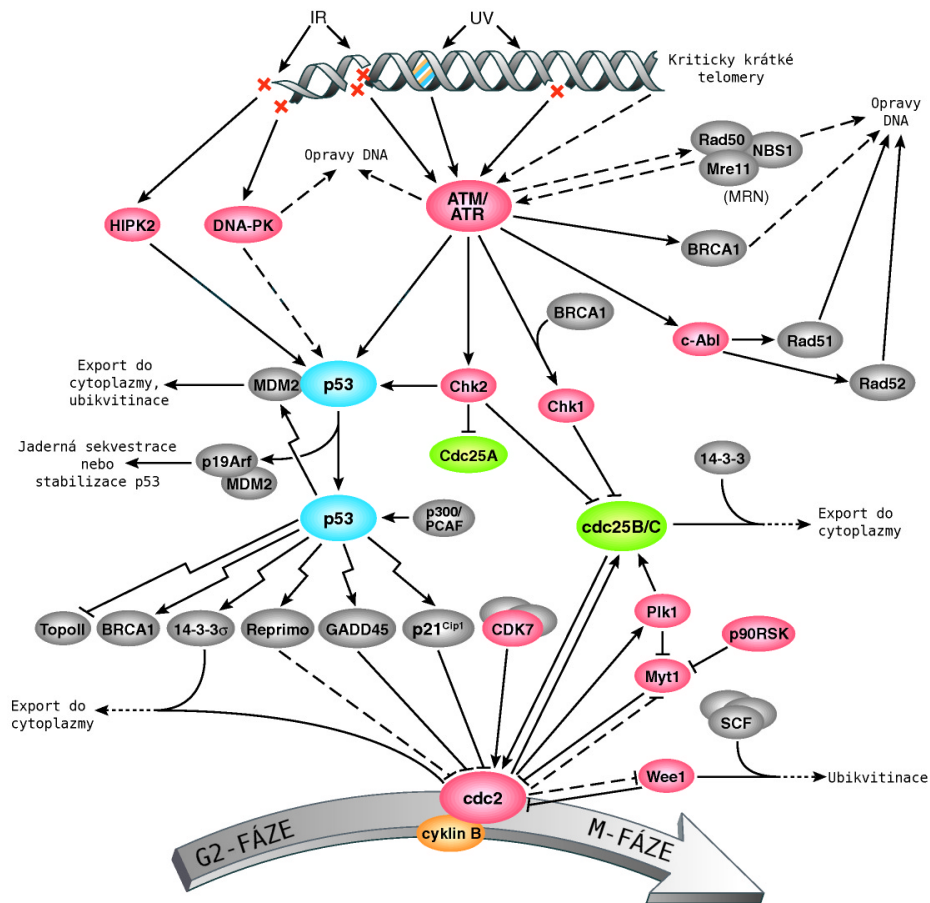


Obr. 3: Kontrolní bod G1/S (upraveno podle Cell Signaling 2006).

1.3.1.2. Kontrolní bod G2/M

Kontrolní bod G2/M je na rozdíl od bodu G1/S aktivován především v reakci na poškození DNA ultrafialovým nebo radioaktivním zářením (**Obr. 4**). Hlavní roli zde hrají kinázy: DNA-PK (DNA protein kinase), ATM (Ataxia telangiectasia mutated kinase) a ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3-related kinase) (**Lisby et al. 2005, Kastan et al. 2004, Bernstein et al. 2002**). Všechny jmenované kinázy mohou v kontrolním bodě G2/M ale i v bodě G1/S, jak již bylo uvedeno, zablokovat buňky prostřednictvím dráhy p53/MDM2-p21 (**Kastan et al. 2004, Lukas et al. 2004**).

ATM/ATR kinázy také mohou prostřednictvím aktivace CHK1/CHK2 kináz (checkpoint kinases 1 a 2) inhibovat kinázu CDK1 (**Obr. 4**). CHK1/CHK2 kinázy fosforylují CDC25C fosfatázu, na kterou se potom váže 14-3-3 protein. Díky této vazbě dochází k transportu CDC25C fosfatázy z buněčného jádra do cytoplazmy, čímž je znemožněna aktivace CDK1 kinázy a buňka zůstává zablokována v G2/M fázi cyklu. Zvýšenou expresi proteinu 14-3-3 přitom reguluje právě protein p53. Protein 14-3-3 se váže i na CDK1 kinázu, která je pak také transportována do cytoplazmy (**Kastan et al. 2004, Lukas et al. 2004**). Další podrobnosti související s opravami DNA poškozené ozářením jsou uvedené v kapitole 1.6. o účincích ionizujícího záření na buňky a tkáň.



Obr. 4: Kontrolní bod G2/M (upraveno podle *Cell Signaling* 2006).

1.3.2. Dysregulace buněčného cyklu

V nádorových buňkách bývají mutovány především dvě skupiny genů. První skupinu tvoří proto-onkogeny, které ve zdravých buňkách stimulují proliferaci. Druhou skupinu tvoří nádorové supresory, především p53 a pRb, které za normálních okolností proliferaci inhibují. Výsledkem je nekontrolovaná proliferace, poněvadž kontrolní body přestávají plnit svoji funkci. Obecně se jedná o mutace genů kódujících cykliny, CDK kinázy a jejich inhibitory i aktivátory, substráty CDKs (pRb) a proteiny fungující v kontrolních bodech buněčného cyklu (p53).

Velmi důležitá je inaktivace funkce pRb proteinu, který může být buďto mutovaný, nebo spíše hyperfosforylovaný díky overexpresi pRb aktivujících cyklinů D a E, kináz CDK4 a CDK6, popř. díky delecii p16 proteinu. Tuto poruchu pRb regulační dráhy má zhruba 90% nádorů. Patří sem zejména nádory prsu, plic, retinoblastom a osteosarkom (**Zheng et al. 2001**). U transgenních myší vede overexprese cyklinu D1 nebo E k vyššímu výskytu adenokarcinomů (**Wang et al. 1994, Bortner et al. 1997**).

Nejčastěji se vyskytující a také velmi významnou genetickou alterací v nádorových buňkách je mutace p53 proteinu (**Stewart et al. 2001**). U pacientů s vrozenou mutací p53 (Li-Fraumeniho syndrom) je zvýšený výskyt nádorů mozku, plic a sarkomů. Funkce p53 může být narušena také overexpresí nebo amplifikací jeho negativního regulátoru MDM2 (**Momand et al. 1998**).

U skupiny INK4 inhibitorů CDKs jsou alterace celkem běžné, zejména u p15 a p16 (**Drexler 1998**). Expresce proteinu p27 u některých typů nádorů koreluje s rezistencí buněk na chemoterapii, nízká exprese proteinu znamená špatnou prognózu (**Porter et al. 1997, Naumann et al. 1999**). Alterace proteinu p21 je málo častá, což ukazuje na jeho význam pro homeostázu a přežití nádorové buňky (**Grana et al. 1995**).

Vyšší pravděpodobnost vzniku nádoru s sebou nesou alterace genů účastnících se v DNA reparačních procesech. Například mutace ATM kinázy (ataxia telangiectasia) je asociována se zvýšenou incidencí leukemií, lymfomů a nádorů prsu (**Khanna 2000**).

1.4. Regulace transkripce prostřednictvím CDK kináz

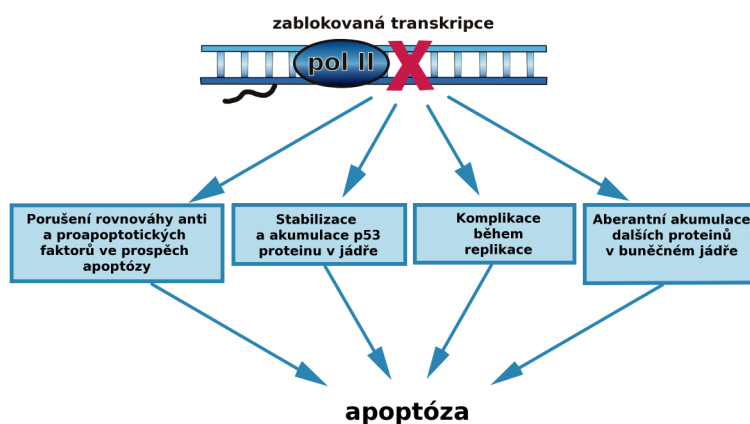
Na transkripci se podílejí celkem tři typy RNA polymeráz (RNAP). Nejdůležitější RNAP II polymeráza hraje významnou roli v transkripci genů na informační mRNA (messenger RNA) molekuly. Samotné transkripce se kromě holoenzymu RNAP II polymerázy účastní také nejrůznější obecné a specifické transkripční faktory, ale i další asociované proteiny tak, aby správně proběhly všechny fáze transkripčního procesu. Tzn. vznik preiniciačního komplexu, vazba na DNA, iniciace transkripce, mRNA elongace, terminace mRNA a posttranskripční úpravy mRNA. Základním mechanismem regulace aktivity RNAP II polymerázy v jednotlivých fázích transkripce je reverzibilní fosforylace její terminální karboxylové domény CTD (Carboxy-terminal domain), ke které dochází díky asociacím či disociacím s různými mRNA proteinovými kinázami (**Fischer et al. 2005, Rosypal 1997**).

K proteinovým kinázám zodpovědným za tyto fosforylace (regulace aktivity RNAP II polymerázy) patří přinejmenším kinázy CDK1, CDK7, CDK8 a CDK9. Konkrétně pak CDK7/cyklin H-MAT1 komplex je součástí transkripčního faktoru IIIH (TFIIH), který reguluje RNAP II polymerázu při přechodu z iniciační do elongační fáze transkripce. Komplex CDK9/cyklin T je součástí transkripčního faktoru p-TEFb, který hraje svoji roli během elongace. Naproti tomu komplexy CDK1/cyklin B a CDK8/cyklin C mají spíše negativní účinek na průběh transkripce. První zabraňuje syntéze mRNA během mitózy a druhý pravděpodobně zabraňuje vstupu faktorů regulujících iniciační fázi do fáze transkripční preiniciace. Současně se zdá, že CDKs mohou regulovat RNAP II polymerázu i mimo CTD doménu (**Fischer et al. 2005, Ljungman et al. 2001**).

Zablokování transkripce může primárně ovlivnit akumulaci transkriptů s krátkými poločasy rozpadu (např. členové antiapoptické rodiny a regulátory buněčného cyklu) a může také způsobit akumulaci některých proteinů v jádře (např. p53 protein) nebo komplikace v průběhu replikace (**Obr. 5**). Z těchto důvodů jsou na inhibici transkripce citlivé především proliferující nádorové buňky, které jsou závislé na konstitutivní expresi antiapoptotických faktorů potřebných jako protiváha k aktivním stresovým signálům uvnitř buňky (**Derheimer et al. 2005, Ljungman et al. 2004**).

RNAP II polymeráza dále funguje jako senzor poškození DNA a to tak, že se zablokuje na místech poškozené DNA. Poté jsou aktivovány transkripčně vázané opravy (TCR-transcription coupled repair) nebo může dojít k odstranění zablokované polymerázy ubikvitinací (**Bernstein et al. 2002**). K TCR opravným systémům patří nukleotidové excizní opravy NER (nucleotide excision repair) a báze excizní opravy BER (base excision repair). Aktivace TCR je doprovázena stabilizací proteinu p53 modifikováním na pozicích Ser15 (fosforylace) a Lys382 (acetylace) a jeho akumulací v buněčném jádře (**Ljungman et al. 2004**). Akumulace p53 proteinu zřejmě souvisí s nefunkčním transportem proteinu z buněčného jádra do cytoplazmy (nepřítomnost exportních mRNA molekul) nebo se změnami jaderných struktur. Pokud není blokáda transkripce včas vyřešena, buňky mohou vstoupit do apoptózy (**Obr. 5**) (**Ljungman et al. 2004, Derheimer et al. 2005**).

Co se týče možných komplikací během replikace, není zcela zřejmé, zda v buňkách může docházet ke kolizím zablokované RNAP II polymerázy s replikačním aparátem, nebo zda RNAP II polymeráza hraje během replikačního procesu buďto přímou nebo nepřímou roli prostřednictvím transkripce genů potřebných pro správný průběh replikace (**Derheimer et al. 2005**). Další teorie související se zablokovanou transkripcí a replikací je uvedena v kapitole 1.6.3.



Obr. 5: Možné mechanismy indukce apoptózy způsobené zablokovanou transkripcí (upraveno podle **Derheimer et al. 2005**).

1.5. CDK inhibitory jako nová protinádorová léčiva

Cílem výzkumu je protinádorová léčba, která by byla vysoce specifická pro nádorové buňky a proto by nezatěžovala zdravou tkáň. Nádorové buňky jsou pro takovou terapii predisponovány díky nefunkčním kontrolním bodům buněčného cyklu, tzn. díky dysregulaci cyklin-dependentních kináz, což jim umožňuje nekontrolovanou proliferaci. Současně se zdá, že jsou tyto proliferující buňky až extrémně závislé na aktivitě transkripční RNAP II polymerázy, která je rovněž regulována prostřednictvím CDK kináz. Z toho vyplývá obrovský potenciál využití CDKs inhibitorů (modulátorů) v protinádorové léčbě.

Existují různé terapeutické strategie pro modulaci aktivity CDK kináz. Inhibitory se dají rozdělit na přímé a nepřímé, ale také podle jejich rozdílné míry specifčnosti pro CDK inhibici (**Tab. 2**). Například staurosporin, suramin a 6-methylaminopurin jsou relativně nespecifickými inhibitory, naopak olomoucín, flavopiridol a paulony jsou mnohem selektivnějšími inhibitory. Flavopiridol inhibuje všechny testované CDK kinázy, ale olomoucín, purvanol a paulon inhibují především kinázy CDK1 a CDK2 a přímo neinhibují kinázy CDK4 a CDK6 (**Fischer et al., 2005**). Nicméně k inhibici CDK4/6 dochází nepřímo prostřednictvím inhibice aktivity CDK7 kinázy, která aktivuje ostatní CDKs kinázy fosforylací na Thr160/161 (**Hajdúch et al. 1999a, b**).

U přímých inhibitorů CDK kináz flavopiridolu, UCN-01 a roskovitinu už byly nastartovány klinické studie. Za zmínku stojí také fakt, že u CDK inhibitorů probíhá výzkum týkající se jejich využití v oblasti virologie a nefrologie. S ohledem na téma dizertační práce se budeme dále zabývat pouze souhrnem údajů týkajících se syntetických inhibitorů CDKs odvozených od olomoucínu.

Tab. 2: Přehled přímých a nepřímých inhibitorů CDK kináz.

A. Přímé CDK inhibitory (“small molecules”)

1. Přírodní nebo syntetické deriváty

Flavopiridol (a deschloroflavopiridol)

Staurosporin and UCN-01

9-Hydroxyelipticin

Toyocamycin

Suramin

Butyrolakton I

Paulony

9-hydroxyelipticin

2. Puriny a jim podobné analogy

6-dimethylamino purin

Isopentenyladenin

Olomoucín

Roskovitin

Bohemín

Purvalanol

3. Peptidy

napodobující p16INK4a a p21Cip1 inhibitory

B. Nepřímé CDK inhibitory

1. Alterující kontrolní body buněčného cyklu

Fosfatázové inhibitory (např. kys. okadaiová)

UCN-01

Kofein

Pentoxifylin

2. Snižující hladinu cyklinů D řady

Rapamycin

Benzochinolonové ansamyciny

Cyklin D1 antisense metody

3. Zvyšující hladinu endogenních CDK inhibitorů

Butyráty

Retinoidy

Látky s diferenciačními účinky

4. Inhibitory proteosomální degradace

PS-34

5. Inhibitory histonových deacetyláz

butyrát

trichostatin A

hybridní polární sloučeniny

FR901228

fenylbutyrát

oxamflatin

MS-27-275

apicidin A

1.5.1. Trisubstituované puriny

1.5.1.1. Historie objevu účinku trisubstituovaných purinů

Historie objevu účinku trisubstituovaných purinů se váže k rostlinným hormonům, cytokininům. Na začátku byly cytokininové sloučeniny rozeznány na základě jejich schopnosti indukovat buněčné dělení u některých rostlinných tkání, dnes se o nich ví, že jejich účinky na rostliny mohou být různé (**Skoog et al. 1970**).

Jedná se o N⁶ substituované adeniny, které se alespoň v rostlinách vyskytují jako nukleotidy, nukleotidy, 3,7,9,O-glukosidy a konjugáty s aminokyselinami. Cytokininy se objevují i jako volné sloučeniny a jsou také nukleosidovou součástí transferové RNA (tRNA) rostlin, zvířat a mikroorganismů (**McGaw et al. 1995**). Převážnou část cytokininů obsažených v tRNA kvasinkových a zvířecích buněk představuje N⁶-(²-isopentenyl)adenosin (iPA). U rostlin a mikroorganismů dochází k přirozenému uvolnění volného iPA po skončení cyklu tRNA, ale to nikdy nebylo detekováno u zvířat. U různých savčích linií iPA inhiboval buněčnou proliferaci (**Slak et al. 1970**). U iPA byly popsány protinádorové účinky v *in vivo* experimentech u Ehrlichova ascitického karcinomu, myší leukémie L1210, lidské myeloidní leukémie (**Grace et al. 1967**), ale nikoliv u sarkomu 180, adenokarcinomu 735, Walkerova 256 karcinosarkomu (**Slak et al. 1970**) a lidské lymfatické leukémie (**Grace et al. 1967**). iPA také inhiboval lymfocyty stimulované fytohemaglutininem (**Gallo et al. 1969**). U stejného pokusu vedly nízké koncentrace iPA (10⁻⁷M) ke stimulaci proliferace lymfocytů, což je v souladu s aktivitou cytokininů v rostlinných tkáních (**Suk et al. 1968**). Přestože měl derivát iPA v *in vivo* testech jen mírný účinek, vstoupil do preklinických testů. Hlavním toxickým účinkem u zvířat byla hepatotoxicita a atrofie žaludku. Látka inhibovala proliferaci gastrointestinální i mízní tkáně a indukovala granulocytózu. U dítěte s akutní promyelocytární leukémií iPA opakovaně indukoval krátkodobou kompletní remisi v kostní dřeni (**Jones et al. 1968**).

Díky těmto biologickým účinkům byla zahájena syntéza dalších derivátů cytokininů (**Grace et al. 1967**). Z nich pouze N⁶-benzyladenosin prošel testy na buněčných kulturách a preklinickými testy (**Mittelman et al. 1972**). Většina těchto experimentů proběhla v sedmdesátých letech bez dalšího pokračování. Až o dvacet let později, především díky novým poznatkům z oblasti buněčného cyklu, byly nastartovány další studie s cílem odpovědět na otázku zda tyto sloučeniny ovlivňují molekulární mechanismy buněčného dělení a jestli cytokinininy interagují se známými regulačními proteiny savčího buněčného cyklu (cyklin-dependentní kinázy, cykliny, atd.). Model živočišných CDKs byl vybrán proto, že u rostlin v té době nebyla analoga CDKs a cyklinů známa. V laboratoři Dr. Meijera (CNRS, Francie) proběhl screening modulace CDK1/cyklin B komplexu u širokého spektra rostlinných hormonů a překvapivě bylo zjištěno, že 2-(2-hydroxyetylamo)-6-benzylamino-9-methylpurin při mikromolárních koncentracích selektivně inhibuje CDK1 a také další homologní kinázy (**Veselý et al. 1994**). Sloučenina byla nazvána olomoucín (OC) na počest města Olomouce, kde pracovala většina členů pracovního týmu (**Obr. 6**). Olomoucín je derivát cytokininu 6-benzylaminopurinu, který byl nejčastěji používán v rostlinných *in vitro* systémech. Původně byl olomoucín nasyntetizován pracovní skupinou Dr. Lethama a rostlinní biologové ho používali jako inhibitor glukosyltransferáz (**Parker et al. 1986**).

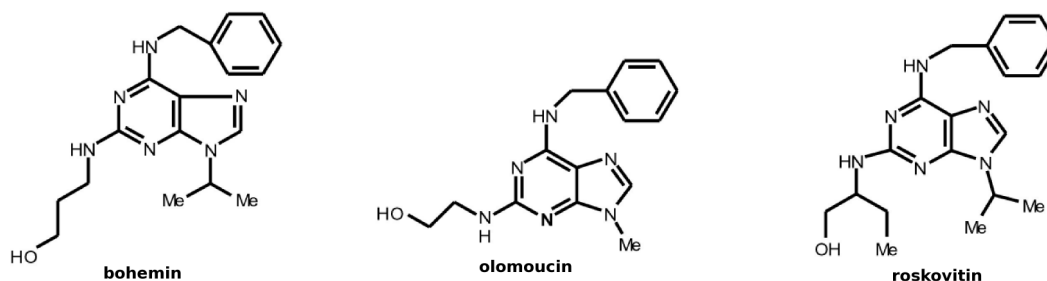
1.5.1.2. Mechanismus účinku trisubstituovaných purinů

Olomoucín selektivně inhiboval CDK1/cyklin B komplex, který je klíčovým mitotickým faktorem, je vysoce konzervovaný a hraje důležitou roli v základních mechanismech kontroly buněčného cyklu všech eukaryot. Sloučenina neinhibovala ostatní buněčné kinázy (**Tab. 3**) jako je např. protein kináza C (PKC). Dnes máme nasyntetizovanou řadu sloučenin s větším potenciálem pro inhibici CDK1 kinázy než má OC. Jeden z prvních podstatně účinnějších derivátů olomoucínu byl nazván roskovitin (ROS), chemicky je to 2-(R)-(1-etyl-2-hydroxyetylamo)-6-benzylamino-9-isopropylpurin (**Meijer et al. 1997**) (**Obr. 6**).

Syntetické inhibitory CDK kináz odvozené od olomoucínu se chovají jako kompetitivní inhibitory vazby ATP na CDK1 kinázu (**Veselý et al. 1994**). Ve spolupráci s Dr. De Azevedo a Dr. Kimem (Kalifornská

univerita) byly provedeny první krystalografické studie OC a ROS, ze kterých vyplynulo, že purinová část derivátů se váže do ATP vazebného místa CDK2 kinázy (do adeninové kapsy), ovšem benzylová skupina je vázána vně tohoto místa a je stejně jako fenylová skupina flavopiridolu zodpovědná za vysokou specifitu vazby látek na kinázu. Jejich celková prostorová orientace ve vazebné kapse kinázy je tudíž odlišná od orientace samotného ligandu (Schulze-Gahmen et al. 1995, De Azavedo et al. 1997). Znalosti z krystalografických studií umožnily zabývat se designem ještě účinnějších inhibitorů CDK kináz. K dnešnímu dni byly nasynthetizovány stovky biologicky aktivních sloučenin s více než 10 až 30-krát zvýšenou inhibiční kapacitou (Havlíček et al. 1997, Trávníček et al. 2000, Kryštof et al. 2002). Ze vztahu struktura-aktivita vyplynulo, že v 1, 3 a 7 pozici purinového kruhu nesmí být žádné substituenty, původní skupiny zřejmě hrají roli při vzniku vodíkových vazeb s CDK kinázami (Havlíček et al. 1997). Naproti tomu OC, ROS a další C²,N⁶,N⁹-trisubstituované adeniny vykazují vysokou CDK inhibiční kapacitu. V pozici 2 nesmí dojít k odstranění ani ke změně postranní skupiny, zároveň v poloze 9 nesmí být žádná hydrofobní skupina, jinak dochází k dramatickému snížení inhibičních vlastností látek (Havlíček et al. 1997).

Během studia nové generace cytokininů s CDK1 kinázovou inhibiční aktivitou byl naší pracovní skupinou identifikován mechanismus protinádorového účinku těchto látek (Hajdúch et al. 1997b, Hajdúch et al. 1998, Hajdúch et al. 1999a, b, Kovářová et al. 2002, Skalniková et al. 2005). Do studie byl jako negativní kontrola zařazen strukturně podobný a inhibičně neúčinný derivát isopentenyladenin (IP), dále pak potenciální inhibitory CDK kináz: OC, ROS a bohemín (BOH), 2-[(3-hydroxypropyl)amino]-6-benzylamino-9-isopropylpurin (Obr. 6). Přestože tyto látky v *in vitro* testech nehibují CDK4 kinázu, jak už bylo dříve publikováno, v *in vivo* podmínkách byla kináza CDK4 inhibována právě díky přímé inhibici CDK7 kinázy, jejímž úkolem je aktivace ostatních kináz buněčného cyklu (Obr. 7). Syntetické inhibitory odvozené od olomoucínu při koncentracích 1-30 μM v *in vitro* testech u mnoha nádorových a leukemických linií indukují apoptózu, přičemž nemaligní buňky často přežívají koncentrace vyšší než 250 μM (Stýskalová et al. 2006). Indukovaná apoptóza je nezávislá na statutu p53 a pRb proteinu, nukleo/proteosyntéze *de novo* a naopak je závislá na aktivitě kaspáz a fosfatáz. Aktivace kaspáz byla potvrzena i rozštěpením laminu B a pRb proteinu v průběhu apoptózy (Hajdúch et al. 1997b, Hajdúch et al. 1998).

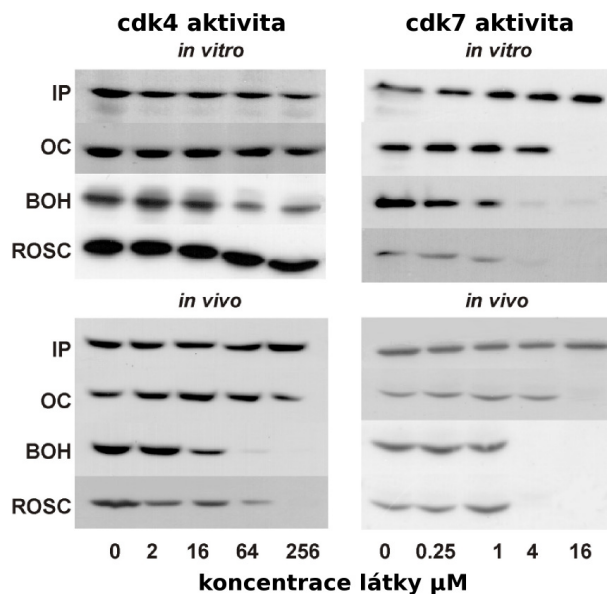


Obr. 6: Chemické vzorce olomoucínu, boheminu a roskovitinu.

Pro analýzu mechanismů vzniku rezistence na syntetické inhibitory CDK kináz byly připraveny také rezistentní sublinie (klony) u T-lymfoblastické leukémie (CEM linie) a to tak, že tyto buňky byly pěstovány s postupně rostoucími subtoxickými koncentracemi boheminu. Mechanismus rezistence byl unikátní: 1) snížená proliferace, 2) indukce buněčné senescence, 3) inhibice exprese CDK1 a CDK7 kinázy (Obr. 8), 4) znovuoobnovení exprese přirozeného inhibitoru CDK kináz p21^{WAF1}, 5) pokles DNA-polymerázové a 6) DNA-telomerázové aktivity (Hajdúch et al. 1997b).

V souhrnu řečeno, inhibitory OC, ROS i BOH mají v *in vitro* i v *in vivo* podmínkách schopnost blokovat buňky na přechodech G1/S a G2/M fáze cyklu a zpomalovat jejich průchod S fází buněčného cyklu, tyto látky také indukují apoptózu a to ze všech fází buněčného cyklu (Meijer et al. 1997, Raynaud et al. 2005, Hajdúch et al. 1997b, Wojciechowski et al. 2003, MacCallum et al. 2005, Hajdúch et al. 1999a, b).

Sloučeniny původně identifikované jako inhibitory CDK1/2 kinázy inhibují kromě CDK7 kinázy také kinázy CDK5 a CDK9 (Meijer et al. 1997, Raynaud et al. 2005, Hajdúch et al. 1999a, b). Profil inhibičních aktivit trisubstituovaných purinů je uveden v tabulce č. 3. Prostřednictvím inhibice CDK7 a CDK9 kinázy pak inhibují transkripční RNAP II polymerázu (MacCallum et al. 2005, Raynaud et al. 2005, Ljungman et al. 2001). Inhibice RNAP II polymerázy jednoznačně souvisí s faktem, že roskovitin u nádorových buněk obsahujících přirozený (wild type) protein p53 způsobuje jeho stabilizaci a jadernou akumulaci (David-Pfeuty et al. 2001, Ljungman et al. 2001, Blaydes et al. 2000, Wojciechowski et al. 2003) doprovázenou dekondukcí chromatinu a fragmentací jádra (David-Pfeuty et al. 2001, Wojciechowski et al. 2003). Příčinou stabilizace p53 proteinu je transkripční suprese ubikvitinové ligázy MDM2, která je negativním regulátorem proteinu p53 (Lu et al. 2001, David-Pfeuty et al. 2001).



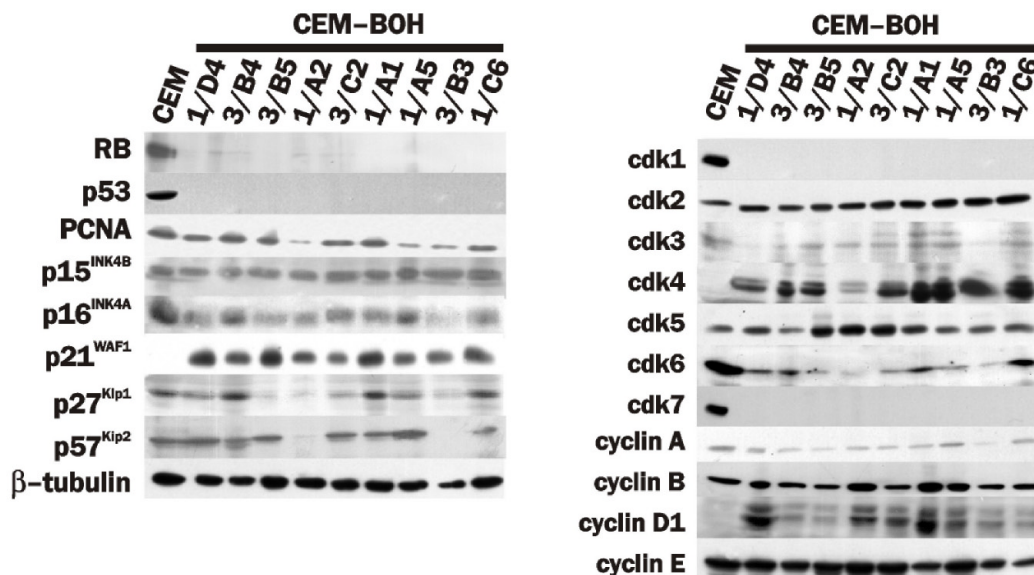
Obr. 7: *In vitro* a *in vivo* aktivita CDK4 a CDK7 kináz inhibovaných trisubstituovanými puriny.

Obecně inhibice RNAP II polymerázy vede také k poklesu hladiny mRNA antiapoptotických faktorů s krátkým poločasem rozpadu. U roskovitinu byla popsána downregulace antiapoptotického faktoru Mcl-1 s poločasem rozpadu 30 minut, u které bylo experimentálně prokázáno, že sama o sobě stačí k indukci apoptózy u myelomových buněk (MacCallum et al. 2005).

Zdá se, že jevy související s inhibicí RNAP II polymerázy roskovitinem, předcházejí samotné zablokování buněčného cyklu a také že mají přímou souvislost s indukcí apoptózy v nádorových buňkách (Fischer et al. 2005, Wojciechowski et al. 2003).

Tab. 3: Inhibice aktivity enzymů trisubstituovanými puriny (IC_{50} , μM).

	CDK1	CDK2	CDK4	CDK5/p53	CDK7	MAPK	PKC	EGFR
olomoucín	7	7	>1000	3	11.3	30	>1000	440
roskovitin	0.65	0.7	>1000	0.16	1.4	30	>1000	
bohemin	1		>250		1.8			



Obr. 8: Molekulární profil bohemín rezistentních klonů linie CEM (T-lymfoblastická leukémie).

1.5.1.3. *In vivo* účinky trisubstituovaných purinů

Inhibitory CDK odvozené od olomoucínu byly aktivní v orální aplikační formě u řady zvířecích nádorových modelů, např. OC a BOH u myších modelů P388D1 leukémie a B16 melanomu prodloužily střední čas přežití, popřípadě vyléčily zvířata s transplantovanými tumory (Hajdúch et al. 1997b, Hajdúch et al. 1998). Mimo už zmíněných zvířecích modelů byl náš pracovní skupinou publikován i případ dogy se spontánním maligním melanomem, kde OC aplikace vyvolala masivní indukci apoptózy (Hajdúch et al. 1997a). Látka o koncentraci 8 mg/kg/den byla intravenózně aplikována vždy 1 krát denně po dobu sedmi dní. Opakovaná biopsie metastatické cervikální lymfy uzlin ukázala indukci apoptózy nádorových buněk po třetím dni léčby. Nebyla prokázána myelosuprese, hepatotoxicita, nefrotoxicita či neurotoxicita. Nicméně doga měla přechodnou anemii, jelikož došlo ke krvácení z devitalizované nádorové hmoty. Zvíře proto podstoupilo chirurgický zákrok, kde byly odebrány dva kilogramy nádoru a metastázy cervikálních uzlin. Ačkoliv pes operaci nepřežil v důsledku útlumu respiračního centra, histologické vyšetření nádoru prokázalo známky apoptózy v buňkách primárního nádoru i metastáz. Olomoucín eradikoval nejméně 50 % nádorových buněk. U zbývajících nádorových buněk byla otestována jejich *in vitro* senzitivita na olomoucín a další látky běžně užívané v chemoterapeutické praxi se zjištěním, že OC krátkodobě předlěčená nádorová populace si zachovává v *in vitro* podmínkách chemosenzitivitu na toto léčivo (Hajdúch et al. 1997a).

1.5.1.4. Výsledky proběhlých preklinických a klinických zkoušek

Nedávno byly publikovány i výsledky preklinických studií u myši s xenografty lidské kolorektální nádorové linie Lovo. Zvířata dostávala intraperitoneálně ROS o koncentraci 100 mg/kg 3 x denně po dobu pěti dnů. Došlo k výrazné 45% redukci růstu nádoru ve srovnání s kontrolou (McClue et al. 2002). V dalších experimentech s lidskými uterinními xenografty MESSA-DX5 (500 mg/kg t.i.d., 4dny) a kolorektálním nádorem KM12 (200 mg/kg t.i.d., 5 dnů) byl ROS podáván orálně, redukce nádorového růstu byla 62%/53% (McClue et al. 2002, Raynaud et al. 2000). U xenograftu s pomalu rostoucími prostatickými buňkami, kde byl ROS podáván rovněž orálně (100 nebo 200 mg/kg b.i.d., ve dnech 0-4,

7-11 a 14-18), byla dosažena až 35% redukce nádorového růstu (**Fischer et al. 2003**). Výsledky preklinické studie na xenograftech lidské kolorektální nádorové linie HCT116 pro orálně podaný roskovitin (200 mg/kg 3 krát denně nebo 500 mg/kg dvakrát denně, 5 dnů) ukázaly relativně pomalý clearance z plazmy a vysokou orální dostupnost (až 86%). Redukce nádorového růstu pátý den léčby byla v rozmezí 65-79%. Orální podání roskovitinu jednoznačně umožnilo dosažení aktivních koncentrací v nádoru, inhibici růstu nádoru a modulaci farmakodynamických markerů (defosforylace Rb proteinu nebo deplece cyklinu D1 po více než 24 hodinách léčby) (**Raynaud et al. 2005**).

Ve Velké Británii byla ukončena fáze I klinických zkoušek a nyní probíhá fáze II. Ve studii fáze I klinického zkoušení se zdravými dobrovolníky byly u roskovitinu (≤ 800 mg p.o.) potvrzeny závěry z preklinických studií ukazujících efektivní absorpci derivátu z gastrointestinálního traktu s výslednou vysokou orální dostupností látky. Jídlo podávané současně s lékem pouze oddálilo začátek absorpce a lehce snížilo procento absorbované dávky. Ostatní farmakokinetické hodnoty včetně dostupnosti zůstaly nezměněny, z těchto závěrů jednoznačně vyplynula použitelnost orálně podaného roskovitinu pro další klinický vývoj (**de la Motte et al. 2004**).

V eskalační studii fáze I klinického zkoušení u pacientů s pokročilými malignitami byl roskovitin podáván v jedné nebo ve více dávkách ve dvou- či třítýdenních cyklech. Studie byla zaměřena na zjištění maximální tolerované dávky MTD (maximum tolerated dose), profilu nepříznivých účinků, limitních toxicit DLTs (dose-limiting toxicities) a dalších farmakokinetických a farmakodynamických dat. U prvního schématu (2 x denně; podání každý 5., 7. a 10. den třítýdenního cyklu) byly DLTs 1600, 800 a 800 mg b.i.d. Limitní toxicitou byla nauzea, zvracení, hypokalémie, zvýšený kreatinin a vyrážka. Všechny tyto účinky byly reverzibilní a odezněly po skončení léčby roskovitinem (**Pierga et al. 2003, White et al. 2004**). U druhého schématu (podání po 3 dny každé dva týdny) byly DLTs hodnoty srovnatelné s těmi, které byly dosaženy při 1800 b.i.d. Celkově bylo do studie zařazeno 70 pacientů. Byla zaznamenána jedna parciální odpověď u pacienta s hepatocelulárním karcinomem a 10 stabilizací onemocnění trvajících déle než 4 měsíce; z toho byli dva pacienti s nemalobuněčným plicním karcinomem NSCLC (non-small cell lung cancer) a oba byli stabilní více než 1 rok.

Účinky roskovitinu jsou v současné době testovány ve čtyřech studiích fáze II klinických zkoušek. První studie probíhá u hematologických B-buněčných malignit. V dalších třech studiích je roskovitin testován v kombinaci s gemcitabinem/cisplatinou v první linii NSCLC, v kombinaci s docetaxelem ve druhé linii NSCLC a v kombinaci s kapecitabinem u metastatického prsního karcinomu (**Green S et al.**). U všech klinických zkoušek se s cílem nalezení markerů biologické aktivity dělaly farmakodynamické studie. Pomocí analýzy proteomického profilu krevní plazmy byly detekovány, dosud však neidentifikovány, proteiny, které jsou zřejmě specificky ovlivněny roskovitinem (**Green S et al.**). Detekce těchto markerů by mohla do budoucna přispět k identifikaci pacientů s vyšší pravděpodobností k odpovědi na léčbu, případně indikovat dosažení inhibice CDKs *in vivo*.

1.5.2. Perspektivy využití modulátorů buněčného cyklu

V souhrnu se dá říci, že olomoucín a od něj odvozené sloučeniny bohemín a roskovitin mají vyšší protinádorové účinky než se původně předpokládalo na základě výsledků *in vitro* studií. Zdá se, že schopnosti této skupiny látek brzdit nádorovou proliferaci a indukovat apoptózu zdaleka nesouvisí pouze s inhibicí CDK2 kinázy, která v nádorových buňkách umožňuje obnovu funkčnosti G1/S kontrolního bodu. V poslední době do popředí vyvstává fakt, že tyto sloučeniny prostřednictvím inhibice CDK7 a CDK9 kinázy downregulují transkripční aktivitu RNAP II polymerázy, což také nemalou mírou přispívá k celkovým protinádorovým účinkům látek.

Do klinických zkoušek vstoupily minimálně tři látky inhibující CDK kinázy: flavopiridol, UCN-01 a v nedávné době také roskovitin. První dva deriváty (flavopiridol a UCN-01) byly aplikovány intravenózně, jejich toxické a protinádorové účinky byly rozdílné. U flavopiridolu se ukázalo, že v klinických zkouškách nemá nijak výrazný efekt v monoterapii, naděje se teď vkládá spíše do použití flavopiridolu v kombinaci s jinými modalitami jako je ozařování nebo chemoterapeutika. U obou látek byly koncentrace dosažené v plazmě dostatečné pro inhibici funkcí CDK kináz, přičemž derivát UCN-01 má delší poločas rozpadu než flavopiridol (**Fischer et al. 2005**). Z předběžných výsledků klinických studií u roskovitinu zatím

vyplývá jeho dobrá orální dostupnost. V současnosti probíhá jeho klinické zkoušení fáze II u hematologických B-buněčných malignit, u nemalobuněčného karcinomu plic a u karcinomu prsu. U solidních tumorů je testována jeho kombinace s dalšími chemoterapeutiky. Obecně velké naděje se vkládají do vylepšení aplikačních schémat těchto látek a také do konceptu korelace účinků látek s definováním statutu/změn v nádorovém profilu díky moderním technologiím jako např. expresní microarray technologie. Kombinace těchto přístupů by znamenala krok k cílené terapii nádorových onemocnění s minimálním toxickým účinkem na zdravou tkáň. U všech tří látek se očekává výrazný efekt při kombinované terapii se zářením a s chemoterapií.

1.6. Účinky ionizujícího záření na buňky a tkáň

Radioterapie patří spolu s chemoterapií a chirurgií k základním metodám komplexní onkologické léčby. Léčebným prostředkem v radioterapii je ionizující záření. Během posledních dvaceti let se ukázalo, že výsledný efekt radioterapie neurčují pouze standardně volené podmínky jako například dávka záření, typ záření, načasování a frakcionace, ale že zde hraje roli řada dalších faktorů. Radiosensitivita/radiorezistence je závislá také na proliferační aktivitě buněk a na jejich reparačních schopnostech. Citlivost na záření může být rovněž ovlivněna množstvím kyslíku, obsahem vody ve tkáni, teplotou tkáně i okolí, přítomností některých hormonů (např. hormony štítné žlázy), vitaminů (A,K) a léků, mezi které náleží především cytostatika (např. alkylační cytostatika, tzv. radiomimetika, protinádorová antibiotika).

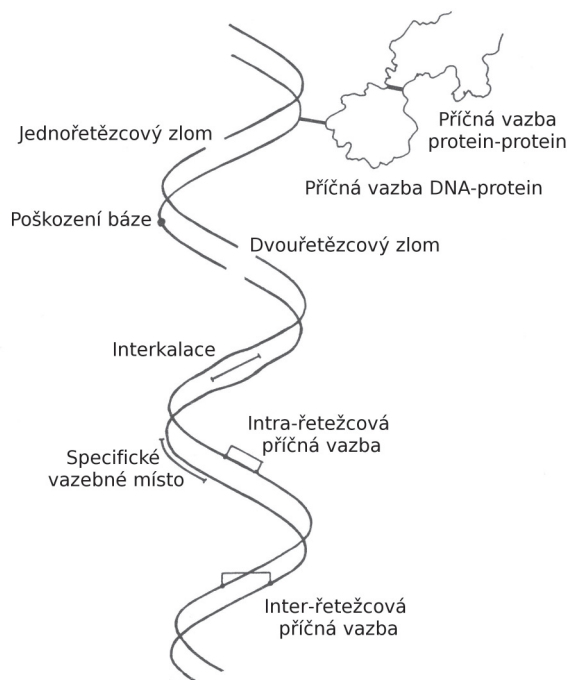
Mechanismus působení ionizujícího záření na živou hmotu je přímý nebo nepřímý. Přímý účinek fotonového záření je poměrně omezený pro relativně malé množství DNA v buňce. Přímé poškození řetězců DNA má pak obvykle letální účinek. Substrátem pro častější nepřímý efekt záření je voda, obsažená v buněčných strukturách. Účinkem záření podléhá voda radiolýze za vzniku radikálů H, OH, H₂O₂ a HO₂, jež jsou biologicky aktivní a reagují se strukturami DNA a dalších biomolekul. Vznikající radikály způsobují převážně reparaibilní poškození buněk. Ukázalo se, že účinek záření je znášen právě prostřednictvím vodných systémů a následnou tvorbou radikálů (Steel, 1993; Macháček, et al., 1996).

Účinek záření se projevuje jak na úrovni molekulární (účinek na DNA, geny), tak na úrovni buněčné (změny proliferační aktivity). DNA může být poškozena v místech bází i cukrů, mohou vznikat příčné vazby mezi řetězci dvoušroubovice tzv. DNA-cross link (intra i inter vazby), také zde často vznikají reparaibilní jednořetězcové DNA zlomy (Obr. 9). Nejzávažnějším, potenciálně letálním a současně méně častým poškozením je vznik dvouřetězcových DNA zlomů. Na úrovni genů a s nimi souvisejících proteinů pak může účinkem záření docházet k jejich indukci nebo supresi, což může vést k deregulaci proliferačních i reparačních pochodů. Z tohoto důvodu jsou k záření citlivější rychleji proliferující buňky. Této teorii odpovídá fakt, že buňky nacházející se v časně S fázi, ve fázi G₂ a na začátku mitózy jsou k záření mnohem citlivější než buňky ve fázi G₁ a v pozdní S fázi (vyšší reparační kapacita související s kontrolou DNA na konci replikačního procesu) (Steel, 1993; Macháček, et al., 1996).

Akumulace radiačních změn v buňce může vyústit v buněčnou smrt formou apoptózy nebo může buňka při menším poškození přejít do stadia senescence. Další formu buněčné smrti u ozářených buněk představuje mitotická katastrofa, která je výsledkem abnormálně probíhající mitózy vedoucí ke vzniku velkých neživotaschopných buněk obsahujících mikrojádra, což jsou oddělené části nezkonzenovaného chromatinu nacházející se mimo buněčné jádro (Castedo, et al., 2002).

1.6.1. Mechanismus oprav dvouřetězcových DNA DSBs (double strand breaks) zlomů

Ke vzniku dvouřetězcových DNA zlomů v buňkách dochází nejen díky účinkům ionizačního záření, ale také díky V(D)J rekombinaci, která je potřebná pro zachování protilátkové diverzity. V místech zlomů vznikají ohniska oprav (foci), do kterých se soustřeďují opravné systémy (Paull et al. 2000). Vznik a zánik těchto center je vysoce dynamický proces pohybující se v řádu minut. Buňka musí velmi rychle zkoordinovat celkovou odezvu na poškození, tzn. opravy DNA, zablokování buněčného cyklu, remodelaci chromatinu a případně spustit apoptózu. Opravy DNA DSBs mají naprosto zásadní význam



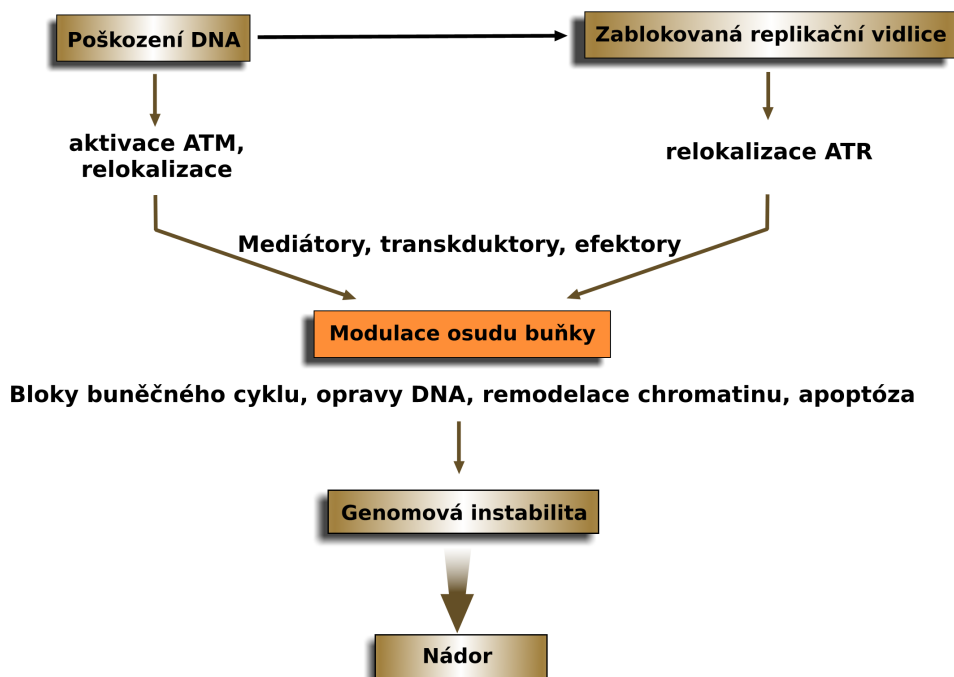
Obr. 9: Typy poškození DNA vznikající účinkem ionizačního záření (upraveno podle **Steel 2003**).

pro životaschopnost buněk. Eukaryotickými buňkami jsou pro tyto opravy využívány přinejmenším dva mechanismy. Prvním mechanismem je homologní rekombinace HR (homologous recombination), druhým mechanismem je nehomologní spojování konců DNA NHEJ (non-homologous end joining) (**Bernstein et al. 2002, Lisby et al. 2005**). Během homologní rekombinace se jako templát nepoškozené DNA využívá sesterská chromatida. Mechanismus HR je přesný, nevznikají při něm chyby a převažuje v pozdní S/G2 fázi buněčného cyklu (**Lisby et al. 2005**). Naproti tomu NHEJ mechanismus je nepřesný, jedná se v podstatě o jednoduchou ligaci bez ohledu na přesnou homologii konců dvouřetězcových zlomů. Díky tomu je tento mechanismus náchylný ke vzniku chyb, často dochází ke ztrátě několika nukleotidů v místě opraveného zlomu a to 1-10 bází v úseku 20 bází od konce zlomu. NHEJ proces převažuje v G0 a G1 fázi buněčného cyklu (**Lees-Miller SP et al. 2003**). Vzájemná koordinace HR a NHEJ mechanismů není dosud známa. Zdá se, že mechanismus NHEJ je napojen na HR (**Bernstein et al. 2002**).

1.6.1.1. Homologní rekombinace (HR)

Hlavní roli zde hrají ATM (Ataxia telangiectasia mutated) a také ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3-related) kinázy, které patří do rodiny PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) proteinových kináz. Kináza ATM je specificky aktivována v reakci na vznik DNA DSBs. Kdežto ATR kináza je primárně aktivována na místech poškozené DNA zablokovanou replikační vidlicí, například po expozici buňky ultrafialovému záření (**Lisby et al. 2005, Kastan et al. 2004**) (**Obr. 10**). Funkčnost ATR kinázy je naprosto zásadní pro správný průběh replikace, tedy pro zachování integrity genomu. Její exprese v buňkách je konstitutivní a její aktivita je kontrolována subcelulární lokalizací (**Zachos et al. 2005**). Naproti tomu kináza ATM je pro běžnou buněčnou proliferaci a diferenciaci postradatelná, v buňkách je přítomna ve

větší míře až v reakci na buněčný stres. Protože mnohé druhy poškození DNA vedou ke vzniku DSBs a k zablokování replikačního procesu, zdá se, že kinázy ATM a ATR se ve výsledku účastní různých typů odpovědí na stresové situace a tudíž je nutná jejich vzájemná kooperace. Zdá se, že aktivace ATR kinázy představuje něco jako kompenzační systém pro ATM kinázu. Dokonce v ATM deficitních buňkách ATR kináza fosforyluje mnohé ATM substráty (**Kastan et al. 2004**).



Obr. 10: Základní schéma odpovědi buňky na poškození DNA a zablokování replikační vidlice (upraveno podle **Kastan et al. 2004**).

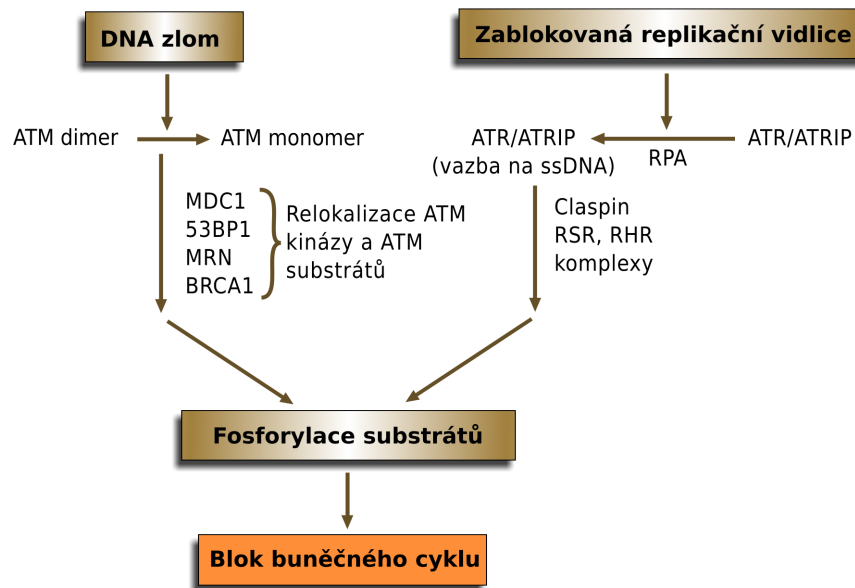
ATM/ATR kináza

Hlavním senzorem DNA DSBs je ATM kináza, která je v nepoškozených buňkách přítomna ve formě inaktivního homodimeru, popřípadě ve formě multimeru. Vznik DSBs doprovázený reorganizací chromatinových struktur vede k rychlé aktivaci kinázy prostřednictvím disociace homodimeru a autofosforylace ATM kinázy v místě Ser1981 (**Kastan et al. 2004, Lukas et al. 2004**) (**Obr. 11**). Přesný způsob aktivace ATM kinázy není dosud znám, ale je zřejmé, že se na ní podílí nukleázový multiproteinový komplex MRN skládající se z proteinů MRE11 (meiotic recombination 11), RAD50 a NBS1 (Nijmegen breakage syndrom 1) (**Kobayashi et al. 2004**). Tento komplex je nejranějším senzorem DSBs a hraje pravděpodobně svoji roli nejen v rámci oprav mechanismem HR, ale zřejmě se účastní i NHEJ opravné cesty. Je pravděpodobné, že MRE11 nukleáza upravuje a tím stabilizuje konce DNA i před nastartováním NHEJ (**Lisby et al. 2005, Lisby et al. 2004**).

Pro celkovou aktivaci ATM kinázy je nezbytná také její relokalizace do míst DSBs. Relokalizace ATM monomeru a jeho substrátů je modulována pomocí MRN komplexu a pomocí tzv. mediátorů, mezi které patří protein MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint 1), protein 53BP1 (p53 binding protein 1)

a protein BRCA1 (Breast cancer type 1 susceptibility protein) (Kastan et al. 2004, Lukas et al. 2004) (Obr. 11).

ATR kináza je v buňce přítomna ve formě komplexu s ATR interagujícím proteinem ATRIP (ATR-interacting protein) prostřednictvím kterého se váže na replikační protein A (RPA, replication protein A) navázaný na jednořetězcové molekuly DNA vzniklé během replikace. Optimální fosforylace substrátů je pak závislá na proteinech, jako je claspin a komplexy RSR (RAD17-RFC2-5), RHR (RAD9B-RAD1-HUS1) a zřejmě i na dalších možných proteinech (Lisby et al. 2005, Zachos et al. 2005) (Obr. 11).



Obr. 11: Základní schéma aktivace kinázy ATM a ATR potřebné pro fosforylaci dalších substrátů (upraveno podle Kastan et al. 2004).

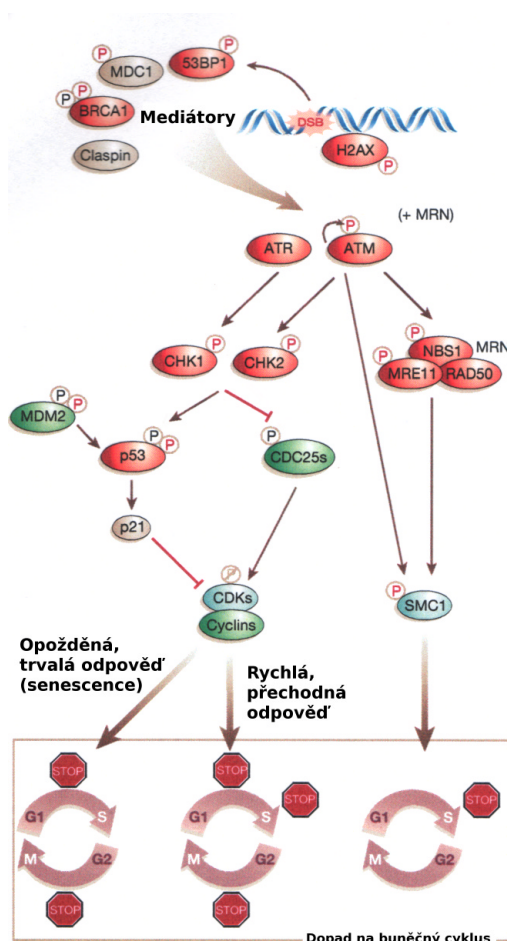
Mediátorové a efektorové proteiny

Pro organizaci celkové odpovědi na buněčný stres (DNA opravy, zablokování buněčného cyklu, remodelace chromatinu, apoptóza) potřebují ATM a ATR kinázy kromě mediátorů (adaptorů) také efektorové kinázy (transduktory) a další regulační proteiny (Lisby et al. 2005, Bernstein et al. 2002) (Obr. 10). Úkolem mediátorů je umožnit interakci kináz ATM/ATR s jejich substráty tak, aby probíhala na správném místě a také ve správný čas. ATM mediátory jsou, jak už bylo uvedeno, proteiny MDC1, 53BP1 a BRCA1. ATR mediátorem je protein claspin, který se selektivně váže na rozvolněné DNA struktury vznikající díky aktivní replikační vidlici (Kastan et al. 2004) (Obr. 11).

ATM mediátory jsou velké multidoménné proteiny. Na jejich C konci jsou dva tandemy tzv. BRCT (Brca 1 carboxy terminal) domén, které umožňují vznik vazeb protein-fosfoprotein, což zřejmě umožňuje opakované a přechodné interakce všech proteinů v místě poškozené DNA. Mediátory se akumulují v ohniscích oprav na základě ATM/ATR zprostředkované fosforylaci histonu H2AX, například MDC1 protein funguje jako most mezi fosforylovaným H2AX a proteinem NBS1 (MRN komplex) (Kastan et al. 2004, Lukas et al. 2004). Na jeden dvouřetězcový zlom připadá zhruba 2000 fosforylací H2AX (vznik γ H2AX Ser139), naznačí se tak megadaltony DNA v místě zlomu. Pomocí anti- γ H2AX Ser139 protilátky

se tak dají snadno zviditelnit ohniska oprav DSBs, která jsou detekovatelná už 1 minutu po expozici buňky ionizačnímu záření (Paull et al. 2000). Fosforylace histonu H2AX je tak v podstatě indikátorem probíhajících oprav DNA DSBs (Olive et al. 2004, Banáth et al. 2003). Nicméně přesná role fosforylovaného histonu v rámci oprav DNA není dosud objasněna (Fernandez-Capetillo et al. 2004, Wang et al. 2005). V zásadě se popisují dvě možnosti, podle první teorie spočívá úloha fosforylovaného histonu H2AX v rekrutování všech členů oprav na místo DSBs. Podle druhé teorie dochází k reorganizaci chromatinu ve snaze předejít předčasnému oddělení konců DNA dvouřetězcového zlomu a tím potenciálně vzniklým mutacím (Fernandez-Capetillo et al. 2004).

Prominentními substráty ATM/ATR kináz jsou serin/threonin efektorové kinázy CHK1 a CHK2 (check-point kinases 1 a 2) (Obr. 12, 13). ATM fosforyluje CHK2 kinázu v místě Thr68 a ATR fosforyluje CHK1 kinázu v místě Ser345. Fosforylace CHK2 Thr68 má zřejmě regulační funkci a je předpokladem pro další aktivační proces, kterým je autofosforylace CHK2 kinázy v místě Thr383 a Thr387 (Motoyama et al. 2004). Existuje však celá řada dalších fosforylačních míst aktivovaných prostřednictvím ATM/ATR kináz (CHK1 Ser317; CHK2 Ser19, Thr26, Ser33, Ser35, Ser50). Zcela jednoznačné rozlišení opravných modulů ATM-CHK2 a ATR-CHK1 není možné, existuje řada sdílených substrátů a jak už zde bylo uvedeno, ATR kináza má kompenzační funkci vzhledem k ATM kináze a může fosforylovat mnohé ATM substráty. Naproti tomu ATM kináza může fosforylovat také CHK1 kinázu. CHK1/CHK2 kinázy pomáhají ATM/ATR kinázám „roznést signál po buňce“ (Lisby et al. 2005, Kastan et al. 2004).



Obr. 12: Zjednodušené schéma popisující dopad aktivace ATM/ATR kináz na buněčný cyklus (upraveno podle Kastan et al. 2004).

Zablokování buněčného cyklu

V reakci na poškození DNA blokuje kaskáda ATM/ATR-CHK1/CHK2 prostřednictvím p53/MDM2-p21 cesty buněčný cyklus v G1 a G2 fázi (**Obr. 12**). K zablokování cyklu touto cestou dochází pomaleji, na rozdíl od okamžitě a dočasně iniciované kaskády využívající CDC25s fosfatáz. Takto vzniklý blok buněčného cyklu má dlouhotrvající, popřípadě trvalý charakter (senescence) (**Lisby et al. 2005, Lukas et al. 2004**). ATM/ATR kinázy stabilizují p53 protein fosforylací v místě Ser15, CHK1/CHK2 kinázy v místě Ser20 a Thr18. Navíc všechny čtyři kinázy (ATM, ATR, CHK1, CHK2) fosforylací inaktivují ubikvitinovou ligázu MDM2, která je negativním regulátorem p53 proteinu. Díky těmto jevům dochází ke stabilizaci p53 proteinu a jeho akumulaci v buněčném jádře, která vede ke zvýšení jeho transkripční kapacity (**Kastan et al. 2004**).

Aktivace ATM/ATR-CHK1/CHK2-CDC25s kaskády vede k zablokování buněčného cyklu v G1, S a G2 fázi (**Obr. 12**). Konkrétněji v pozdní G1 fázi a během S fáze cyklu CHK1/CHK2 kinázy inhibují komplexy CDK2-cyklin E/A prostřednictvím inaktivační fosforylace CDC25A fosfatázy. V G2 fázi je pak prostřednictvím inaktivační fosforylace CDC25C fosfatázy inaktivován komplex CDK1-cyklin B (**Kastan et al. 2004, Motoyama et al. 2004**).

Ve skutečnosti jsou všechny tyto uvedené mechanismy daleko složitější a zdaleka nejsou jediné. K zablokování S fáze cyklu může dojít také prostřednictvím ATM-NBS1-SMC1 kaskády (SMC1-structural maintenance of chromosome 1-like protein) (**Obr. 12**). ATM kináza fosforyluje NBS1 protein (člen MRN komplexu), ten pak dále fosforyluje SMC1/SMC3 proteiny, které se účastní koheze sesterských chromatid. Nezbytná pro vznik S bloku je také přímá fosforylace SMC1 proteinu ATM kinázou (**Motoyama et al. 2004, Kastan et al. 2004, Lukas et al. 2004**).

Samotné homologní rekombinace se účastní BRCA1 a BRCA2 proteiny, proteiny RAD52, RAD51 a RAD54 rodiny a dále například Xrcc2 a Xrcc3 proteiny (X-ray repair cross complementing protein 1 a 3) (**Lisby et al. 2005, Bernstein et al. 2002**).

Reakce na zablokování/kolaps replikační vidlice

Běžného replikačního procesu a oprav poškozených sekvencí DNA excizní opravou vyštěpením se účastní polymerázy Pol δ a Pol ϵ . V případě, že DNA léze nemůže být jednoduše odstraněna, polymerázy Pol η , Pol ι , Pol ζ a Pol κ umožní „bypass“ poškozené léze a dokončení opravy se děje postreplikačně. Pokud není ani tento mechanismus odstranění léze dostatečný, replikační vidlice kolabuje, dojde k její disociaci z místa léze. Opravy poškozeného místa se dějí mechanismem homologní rekombinace, poté může být replikace znovu nastartována. Na stabilizaci zablokované replikační vidlice se podílejí proteiny RAD53, claspin a další (**Lisby et al. 2005**).

1.6.1.2. Nehomologní spojování konců DNA (NHEJ)

Druhým mechanismem oprav DNA DSBs je nehomologní spojování konců DNA, což je v podstatě jednoduchá ligace bez předchozích minimálních nebo žádných úprav spojovaných konců nukleázami. Klíčovou roli zde hraje DNA-PK (DNA-activated protein kinase) proteinová kináza, která se skládá z katalytické podjednotky DNA-PKcs a DNA vazebné a současně regulační podjednotky, heterodimeru Ku70/Ku86 (**Lees-Miller et al. 2003**). Výsledná aktivace DNA-PK probíhá tak, že se Ku heterodimer váže do míst DSBs a na něj se poté naváže DNA-PKcs. Úkolem aktivní DNA-PK kinázy (469KDa) je zarovnat protilehlé konce dvouřetězcových zlomů a umožnit tak jejich ligaci DNA ligázou IV. DNA-PK kináza mimo jiné fosforyluje p53 protein v místě Ser15 a Ser37 a umožňuje jeho akumulaci v buněčném jádře díky inaktivující fosforylací MDM2 proteinu (**Bernstein et al. 2002, Lees-Miller et al. 2003**). DNA-PK kináza zřejmě fosforyluje také histon H2AX (**Fernandez-Capetillo et al. 2004, Wang et al. 2005, Paull et al. 2000**).

1.6.2. Poruchy DNA oprav ve vztahu k nádorovým onemocněním

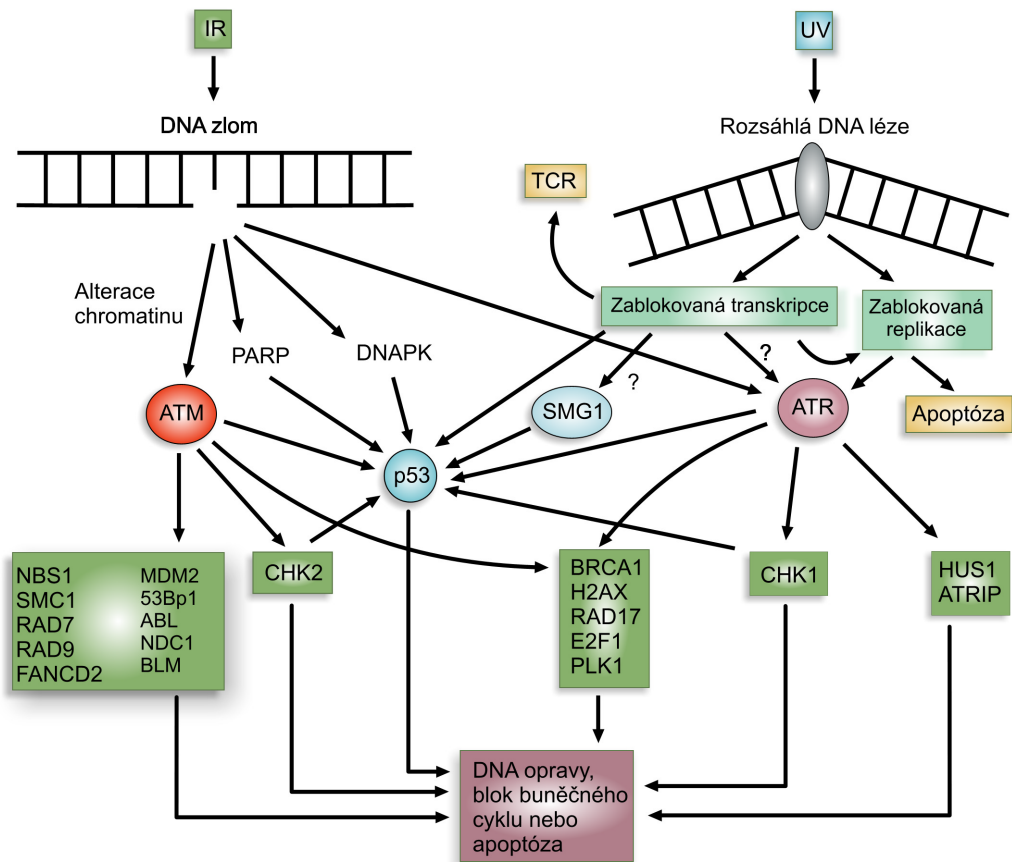
Mnohé faktory účastníci se odpovědi na DNA poškození byly klasifikovány jako nádorové supresorové geny a onkogeny. Některé z nich pouze ovlivňují predispozice k nádorovému onemocnění a některé se přímo účastní nádorové tumorigeneze. Přehled některých nádorových onemocnění spojených s poruchami odpovědi na DNA poškození je uveden v tabulce č. 4. Funkčnost DNA opravných systémů v ranných fázích tumorigeneze představuje jakousi přirozenou bariéru proti možné maligní konverzi (**Bartkova et al. 2005, Kastan et al. 2004**). Bylo popsáno, že díky intenzivní mitogenní stimulaci vzniká v buňkách replikační stres, replikační proces je pak neuspořádaný a neregulovaný, S fáze cyklu je prodloužená. Tato dysregulace může vést ke vzniku dvouřetězcových zlomů. U klinických vzorků časných prekursorových lézí různého původu (močový měchýř, plíce, prsa, tlusté střevo) byla prokázána aktivace kináz ATM/ATR, CHK2 a také fosforylace histonu H2AX a proteinu p53 (**Bartkova et al. 2005**). Stejný molekulární profil, tedy aktivace členů DNA opravných mechanismů, byl sledován i u buněčných kultur (např. U2OS buněčná linie; lidský osteosarkom) po intenzivní mitogenní stimulaci (cyklin E, CDC25A a E2F1) (**Bartkova et al. 2005**). Pokud má buňka tyto DNA opravné mechanismy defektní, jedná se především o ATM-CHK2-p53 dráhu, může dále proliferovat, což zvyšuje nestabilitu genomu a umožňuje nádorovou progresi.

Tab. 4: Přehled některých nádorových onemocnění spojených s poruchami odpovědi na DNA poškození.

Gen	Mechanismus oprav	Asociovaná nádorová onemocnění
BRCA1, BRCA2	HR	Hereditární forma nádorů prsu/ovarií
ATM	HR	Leukémie, lymfomy, nádory prsu Ataxia-telangiectasia (A-T) syndrom
NBS1	HR	Leukémie, lymfomy Nijmegen breakage syndrome (NBS)
Mre11	HR	Leukémie, lymfomy A-T like disorder (ATLD)
p53	HR, NHEJ, TCR	Sarkomy, leukémie, nádory mozku a jiné Li-Fraumeni syndrom
MSH2, MSH6, PMS2		
MLH1, PMS1	MMR, HR, TCR	Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom; HNPCC-Lynchův syndrom

1.6.3. Transkripce ve vztahu k replikaci a opravám DNA

Děje související s inhibicí transkripce nebyly dosud stejně jako opravy dvouřetězcových zlomů přesně popsány a je více než zřejmé, že spolu úzce souvisí (**Obr. 13**). Inhibice transkripce může obecně vést ke vzniku komplikací během replikačního procesu ať už jde o možnost kolize RNAP II polymerázy s replikační vidlicí nebo o možné zapojení RNAP II polymerázy v replikaci (**Derheimer et al. 2005**). Současně je možné, že by ATR kináza, senzor zablokované replikace, mohla být senzorem i pro zablokované transkripční komplexy, ale tato teorie nebyla doposud potvrzena (**Derheimer et al. 2005, Ljungman et al. 2004**) (**Obr. 13**). Kontroly transkripce se zřejmě účastní i další nově objevená kináza PI3K rodiny, SMG1 kináza, která by mohla být senzorem pro nekompletní (neukončené) mRNA molekuly vzniklé při zablokované transkripci (**Ljungman et al. 2004**) (**Obr. 13**). Ljungman dokonce navrhl, že by transkripční mašinerie mohla fungovat jako dozimetr poškození DNA a to tak, že by počet míst se zablokovanou transkripční mašinerií určoval závažnost poškození buňky a tím i její další osud (**Ljungman et al. 2004**). Celkově se zdá, že inhibice transkripce představuje novou potenciální strategii účinné protinádorové léčby (**Derheimer et al. 2005, Ljungman et al. 2004**).



Obr. 13: Základní schéma propojení mechanismů DNA oprav se zablokovaným transkripčním a replikačním procesem (upraveno podle **Ljungman et al. 2004**).

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST, ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

2.1. Cíle dizertační práce

Cílem prvního projektu bylo analyzovat změny proteomického profilu buněčné linie CEM T-lymfoblastické leukémie po inkubaci s boheminem. Současně jsme se snažili nalézt kandidátní biomarkery, což jsou proteiny vykazující výrazné a charakteristické změny po expozici tomuto syntetickému CDK inhibitoru.

Cílem druhého projektu bylo studium potenciálních radiosenzitizačních účinků boheminu a roskovitinu v *in vitro* podmínkách na buněčné linii A549 lidského plicního karcinomu. Byla studována celkem tři možná schémata uspořádání kombinované terapie: A-preinkubace, B-současná aplikace a C-postinkubace.

2.2. Kapitola první

Proteomics approach in classifying the biochemical basis of the anticancer activity of the new olomoucine-derived synthetic cyclin-dependent kinase inhibitor, bohemine.

Hana Kovářová¹
 Marián Hajdúch²
 Gabriela Kořínková²
 Petr Halada³
 Stanislava Krupičková¹
 Adam Gouldsworthy⁴
 Nikolai Zhelev⁵
 Miroslav Strnad⁶

¹Institute of Radiobiology and Immunology, Purkyne Medical Academy, Hradec Králové, Czech Republic

²Laboratory of Experimental Medicine, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Palacky University and Faculty Hospital, Olomouc, Czech Republic

³Institute of Microbiology, Academy of Sciences, Prague, Czech Republic

⁴Edinburgh Center for Protein Technology, The University of Edinburgh, Edinburgh, UK

⁵Cyclacel, Ltd., Dundee, UK

⁶Laboratory of Growth Regulators, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

Proteomics approach in classifying the biochemical basis of the anticancer activity of the new olomoucine-derived synthetic cyclin-dependent kinase inhibitor, bohemine

The aim of this study was to use two-dimensional electrophoresis (2-DE) coupled with multivariate principal component analysis (PCA) to characterize the quantitative changes in the protein composition of the CEM T-lymphoblastic leukemia cell line after treatment with bohemine (BOH), a synthetic olomoucine-derived cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI). Cell classification, reflecting protein patterns, clearly distinguished two main groups: one group consists of 9, 12 and 24 h treated BOH cells while the second is represented by the 0 and 24 h control untreated cells and the 6 h BOH-exposed CEM lymphoblasts. Discriminant protein spots differentially expressed in the BOH-treated CEM cells were selected for identification by matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI-MS) or electrospray ionization-tandem MS (ESI-MS/MS). Five of the selected protein spots were unequivocally identified as α -enolase, triosephosphate isomerase, eukaryotic initiation factor 5A, and α - and β -subunits of Rho GDP-dissociation inhibitor 1. These proteins, all significantly downregulated in CEM T-lymphoblast leukemia in the course of BOH treatment, are known to play an important role in cellular functions such as glycolysis, protein biosynthesis, and cytoskeleton rearrangement. These results indicate that the cellular effects of olomoucine-derived CDKIs are not dependent on their ability to inhibit CDKs and could be mediated by several factors such as a decrease in protein synthesis and/or glycolysis which in turn diminishes the ability of cancer cells to function.

Keywords: Cyclin-dependent kinase inhibitor / CEM T-lymphoblastic leukemia / Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis / Mass spectrometry / Glycolysis / Protein synthesis / Actin cytoskeleton

EL 4193

1 Introduction

Cancer is now believed to result from the unconstrained growth of a given cell and is often due to a block in the ability of the cell to undergo differentiation and/or apoptosis. The key enzymes involved in the cell cycle machinery belong to a group of homologous serine/threonine protein kinases known as cyclin-dependent kinases (CDKs) which typically have as their regulatory subunit a cyclin [1]. Until now, nine CDKs, named *cdk1* (*cdc2*) – *cdk9*, have been identified in both humans and animals [1–4].

These enzymes preferentially phosphorylate substrates such as lamins, vimentin, caldesmon, and histone H1, which play a key role in cell division during the G2/M phase of the cell cycle, or they phosphorylate proteins (RBs, E2Fs, DP-1, RNA-polymerase II, EF-2) implicated in activation of the S-phase-specific genes on the G1/S boundary [3]. The enzymatic activity of CDKs in normal somatic cells is precisely regulated by several mechanisms. The natural CDK inhibitors (CDKIs) [5, 6] play an important role in this process. These proteins bind to the cyclin-CDK complex and inhibit its activity. Consequently, the entry of the cell into the cell cycle is blocked. Due to the fact that the family of natural CDKIs and/or genes that control CDKs transcription (*e.g.*, *p53*) belong to the most frequently mutated proteins in cancer cells [7–13], molecules that could mimic their biological activities are attractive candidates for anticancer treatment [14–16]. Studying a group of plant hormones, cytokinins, we have identified specific inhibitors of the *cdk1* family of CDKs, the first of which (6-benzylamino-2-(2-hydroxyethylamino)-9-methylpurine) has been named olomoucine (OC) [17]. OC failed

Correspondence: Hana Kovářová, PhD, Institute of Immunology and Radiobiology, Trebeská str. 1575, 50001 Hradec Králové, Czech Republic

E-mail: kovarova@pmfhk.cz

Fax: +420-49-5513018

Abbreviations: BOH, bohemine; CDK, cyclin-dependent kinase; CDKI, cyclin-dependent kinase inhibitor; PCA, principal component analysis

to exert an inhibitory effect on major cellular kinases such as cAMP- and cGMP-dependent kinases, protein kinase C, *src* kinases, and it has a capacity to block cells at the G1/S and G2/M boundaries [17]. Recently we synthesized a new group of CDKIs with higher specificity and effectiveness [18, 19]. They are strongly cytotoxic to many tumor cell lines *in vitro* and one of them, named bohemeine (BOH), was also effective under *in vivo* conditions [16]. The aim of this study was to use high resolution 2-DE coupled with multivariate principal component analysis (PCA) to characterize the changes in the protein composition of the CEM T-lymphoblastic leukemia cell line after treatment with BOH. As was expected, this approach allowed us to select proteins differentially expressed in BOH-treated CEM cells compared to untreated CEM cells. Three of these candidate proteins associated with the drug effects *in vitro* were identified by means of MS as α -enolase, triosephosphate isomerase and eukaryotic initiation factor 5A.

2 Materials and methods

2.1 Materials

Immobiline DryStrip pH 3–10 NL, 18 cm, carrier ampholytes pH 9–11 and bromophenol blue were from Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden); highly liquid paraffin, urea glycerol and acetonitrile were from Merck (Darmstadt, Germany); Resolyte pH 4–8 was purchased from BDH (Poole, UK); CHAPS, Tris-base, Tris-HCl, agarose, iodoacetamide and α -cyano-4-hydroxycinnamic acid were from Sigma (St. Louis, MO, USA), dithiothreitol (DTT), acrylamide, piperazinediacrylamide (PDA), ammonium persulfate (APS), and TEMED were from Bio-Rad (Hercules, CA, USA); sodium dodecyl sulfate (SDS) and glycine were from Fluka (Buchs, Switzerland); sequencing grade trypsin was from Promega (Madison, WI, USA).

2.2 BOH synthesis

BOH (2-(3-hydroxypropylamino)-6-benzylamino-9-isopropylpurine) was synthesized from 2,6-dichlorpurine as described previously [19]. The stock solution (10 mM) of the compound was prepared in 10% dimethylsulfoxide/40 mM HCl/saline and stored at -20°C until use.

2.3 Cell cultures and sample preparation

CEM cells (kindly provided by Dr. Thomas Beck, St. Jude Children Research Hospital, Memphis, TN, USA) were cultured in 1 mL aliquots at a density of 1×10^6 cells/mL in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin and 30% fetal calf serum with or without addition of BOH (10 μM) at 37°C and 5% CO_2 for 0, 6, 9, 12, and 24 h, re-

spectively. After incubation, cells were pelleted and washed three times in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS). After the last wash the supernatants were carefully removed and cell pellets were lysed in 60 μL of lysis buffer containing 8 M urea, 4% w/v CHAPS, 40 mM Tris, 65 mM DTT, 2% v/v carrier ampholytes pH 9–11, and a trace of bromophenol blue. The samples were centrifuged for 5 min at 12 000 rpm. The total protein concentration in the samples was measured using the Bio-Rad protein concentration assay kit, slightly modified according to Ramagli and Rodriguez [20]. Samples equal to 100 μg and 250 μg of proteins for analytical run and MS identification, respectively, were loaded on immobilized pH gradient strips for 2-DE.

2.4 2-DE

The separations were performed as described by Hochstrasser *et al.* [21]. The isoelectric focusing, with immobilized sigmoid pH 3.5–10 gradient, was carried out in a Multiphore apparatus with 5000 V power supply. The second dimension was done in 9–16% polyacrylamide gradient gels using the Protean II xi 2D multi cell. Protein spots were visualized by sensitive ammoniacal silver staining or Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB) [22]. CBB staining, compared to the silver staining, was approximately ten times less sensitive according to the estimated number of 200 spots.

2.5 Image processing

Silver-stained gels were scanned using a laser densitometer (Personal Densitometer, 4000×5000 pixels, 12 bits/pixel, stored on 16 bits, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) generating 20 Mb images. The images were then transferred to the SUN workstation for analysis with Melanie II, version 2.2, software (Bio-Rad). For each gel the spots were detected and quantified automatically, using default spot detection parameters from Melanie II. Manual spot editing was performed in agreement with the visual inspection of the gels. Quantification of spots was done in terms of their relative volume (%VOL), *i.e.* the digitized staining volume which is the spot volume of an individual spot divided by the sum of the staining volumes of all spots in the image and then multiplied by 100. The relative volume was calculated in order to correct for any differences in protein loading and gel staining. The gels were matched in terms of their spot position with 24 h control BOH-untreated gel as the reference gel.

2.6 Data analysis

To evaluate quantitative changes in protein expression in CEM samples, the analysis of 2-DE gel data was performed using multifactorial PCA which enables a compre-

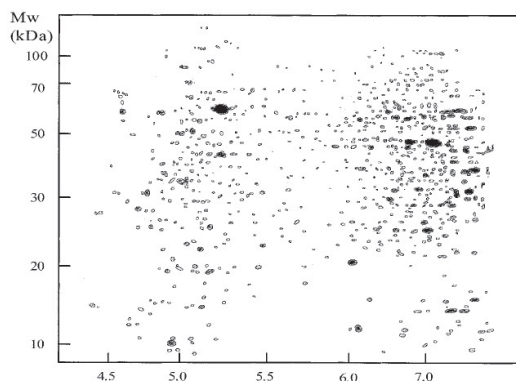


Figure 1. Subset of 748 protein spots matched in all six gels of the experimental set. These spots, spread all over the gel, are the basis for multivariate principal component analysis.

hensive analysis of a large data set [23]. The 748 spots for this study were chosen on the basis of the criterion of their presence on all six gels of one experimental set and their %Vol served as the source for the initial matrix with six rows (gels) and 748 columns (spots). The statistical calculations of the principal components were calculated by finding the eigenvalues and the eigenvectors of the correlation matrix. These calculation were performed using Statgraphic software, version 4.2. The quantitative differences of selected candidate proteins were verified in two independent experimental series. The significance of the differences in the protein abundance of the differentially expressed proteins was calculated by analysis of the variance ($p < 0.05$) for the three experimental data sets.

2.7 MALDI-MS

CBB-stained protein spots were cut from the gel and washed with 200 μ L of 100 mM Tris-HCl, pH 8.5, buffer in 50% ACN. Following dehydration and shrinkage in ACN and by speed vacuum centrifugation, the gel pieces were swollen in a digestion buffer containing 100 mM Tris-HCl, pH 8.1, 1 mM CaCl_2 , 10% ACN and 0.5 μ g of sequencing-grade trypsin. The resulting peptides were extracted in 50% ACN/2% TFA after overnight digestion. A 1 μ L aliquot of peptide mixture was deposited on the target and after few seconds 1 μ L of a matrix solution (saturated α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 30% ACN/0.2% TFA) was added. The mixture was allowed to dry at ambient temperature. Positive-ion mass spectrum was measured on a MALDI reflectron time-of-flight mass spectrometer BIFLEX (Brucker-Franzen, Bremen, Germany) equipped with a nitrogen laser (337 nm) and a gridless delayed extraction ion source. Ion acceleration voltage was 19 kV

and the reflectron voltage was set to 20 kV. The reported spectra were accumulated from 50 to 100 laser shots. The spectrometer was calibrated internally using the monoisotopic $[\text{M}+\text{H}]^+$ ions of the peptide standards of angiotensin II and insulin. Protein spots were identified by searching for their peptide mass fingerprints in a non-redundant database NCBI using the search program ProFound (<http://prowl.rockefeller.edu/cgibin/ProFound>).

2.8 ESI-MS/MS

Excised protein spots were destained in 40% EtOH, 60% 50 mM NH_4HCO_3 until clear, then finely chopped and equilibrated to pH 7–8 in 25 mM NH_4HCO_3 . Following dehydration and shrinkage in ACN and by speed vacuum centrifugation, the gel pieces were rehydrated in a minimal volume digestion buffer of 12.5 ng/ μ L sequencing-grade trypsin in 25 mM NH_4HCO_3 at 4°C (on ice) for 60 min. The digestion buffer was replaced with sufficient volume of the same buffer but without the protease to keep the gel pieces wet during the enzymatic cleavage (37°C overnight). Resultant tryptic peptides were extracted in 50% ACN/5% aqueous TFA (3 \times) and ACN (3 \times), the recovered extracts combined and dried down on a SpeedVac. Immediately prior to MS analysis the protein digests were concentrated and desalted using Millipore P10 μ ZipTip_{c18} (Millipore UK, Watford, Herts, UK). Positive-ion nanoelectrospray-MS was performed on a Q-TOF instrument (Micromass UK, Manchester, UK), using borosilicate glass capillaries on a total sample volume of 2.0 μ L. Ions were produced in an atmospheric pressure ionization source at a temperature of 40°C and an applied capillary potential of 1.2 kV. The cone voltage was fixed at 45 V. The MS acquisitions were performed over the mass range 200–1600 Da m/z , and the quadrupole mass analyzer was used to select precursor ions for collision-induced dissociation (CID) in the hexapole collision cell (MS/MS). Proteins were characterized by searching the OWL nonredundant database using the Mascot computer program [24].

3 Results

We performed a 2-DE protein analysis of CEM T-lymphoblastic leukemia cells which were untreated or treated with BOH. Since the CEM cell line represents a relatively homogeneous clonal population, sample-to-sample variability is minimal. Therefore, this experimental model is a powerful tool for both the detection of proteins differentially expressed in cells treated by BOH and for identification of candidate proteins that are associated with the drug effects *in vitro*.

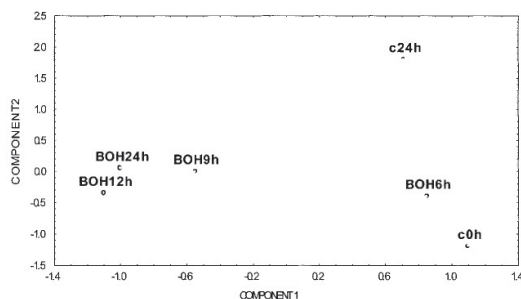


Figure 2. The spatial distribution of 2-D gel analyses of BOH-treated and control untreated CEM cells in 2-D PCA space.

About 2000 polypeptide spots were detected in each of the gels in the separating area of the 3.5–10 pH range and molecular mass range of 8–200 kDa using the Melanie II software. Approximately 40%, *e.g.*, 748 spots, of the total number of polypeptide spots were successfully matched in all of the six analyzed cell samples from one experiment (Fig. 1). Reproducibility of the 2-DE gels seems to be sufficient, as demonstrated by both the closely matching results and the confirmation of described protein alterations obtained from the two independently prepared sets of gels.

3.1 PCA analysis

Because the analysis of such a large amount of data would have been difficult by classical means, we applied PCA to the quantitative 2-DE gel data. It is a classification procedure using numeric taxonomy in which the taxonomic distance is given by a relative hyperdimensional distance in the chosen projection planes. This multifactorial approach makes it possible to reduce the number of observed abundant variables (protein spots) whilst preserving as much as possible of the original data. The principal components are measures of truly different “dimensions” in the data set with lack of abundant correlations. To remove a major source of variance, which is usually the variation in spot abundance, we used relative instead of absolute VOL values of analyzed spots. The first three components cover 89% of the total variance.

Figure 2 illustrates the spatial distribution of gel samples using a 2-D PCA-space projection. It is possible to recognize two main groups of protein patterns. The group on the left side of the first principal component consists of the 9, 12 and 24 h BOH-treated cells while the group on the right side is represented by the 0 and 24 h control cells and 6 h BOH-exposed CEM lymphoblasts. The rela-

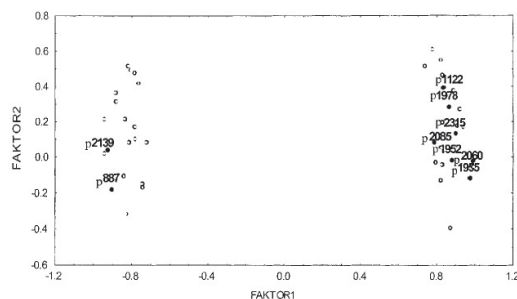


Figure 3. Scatter plot showing the most typical proteins in the factorial space defined by the two largest eigenvalues. The spots are selected by their absolute contribution to the first factorial axis. Nine numbered spots (spot group number) showed reproducible positions in two independent experiments and were selected for identification.

tive nearness for each gel in PCA space illustrates a similarity. The larger distance between the analyzed samples indicates a dissimilarity in polypeptide abundance. PCA is not only suitable for grouping the gels according to a relationship in their protein patterns but also for the determination of typical polypeptide spots in the analyzed gels. This mathematical procedure allows the projection of eigenvectors for the most distinct proteins present in the same space defined by the first two principal components with the largest eigenvalues (Fig. 3). The positions of the proteins with significant eigenvector values for the first principal component are shown and only protein spots which showed reproducible positions in two independent experiments and significant differences in their abundance calculated by analysis of the variance ($p < 0.05$) for the three experimental data sets are numbered.

3.2 Protein identification

In Fig. 4, “discriminant spots” are highlighted on the 24 h CEM cells and their relative abundance following BOH treatment is detailed in Fig. 5. These proteins were selected for identification by MS. To date, five of the altered proteins have been identified by peptide mass profiling by MALDI-MS or ESI-MS/MS. These protein spots were unequivocally identified as α -enolase, triose-phosphate isomerase, eukaryotic initiation factor 5A, α - and β -subunits of Rho GDP-dissociation inhibitor 1. A summary of the identification data is shown in Table 1. All identified proteins are significantly downregulated in CEM T-lymphoblast leukemia in the course of BOH treatment (Fig. 5). These proteins are known to play an important part in metabolic pathways and cellular functions.

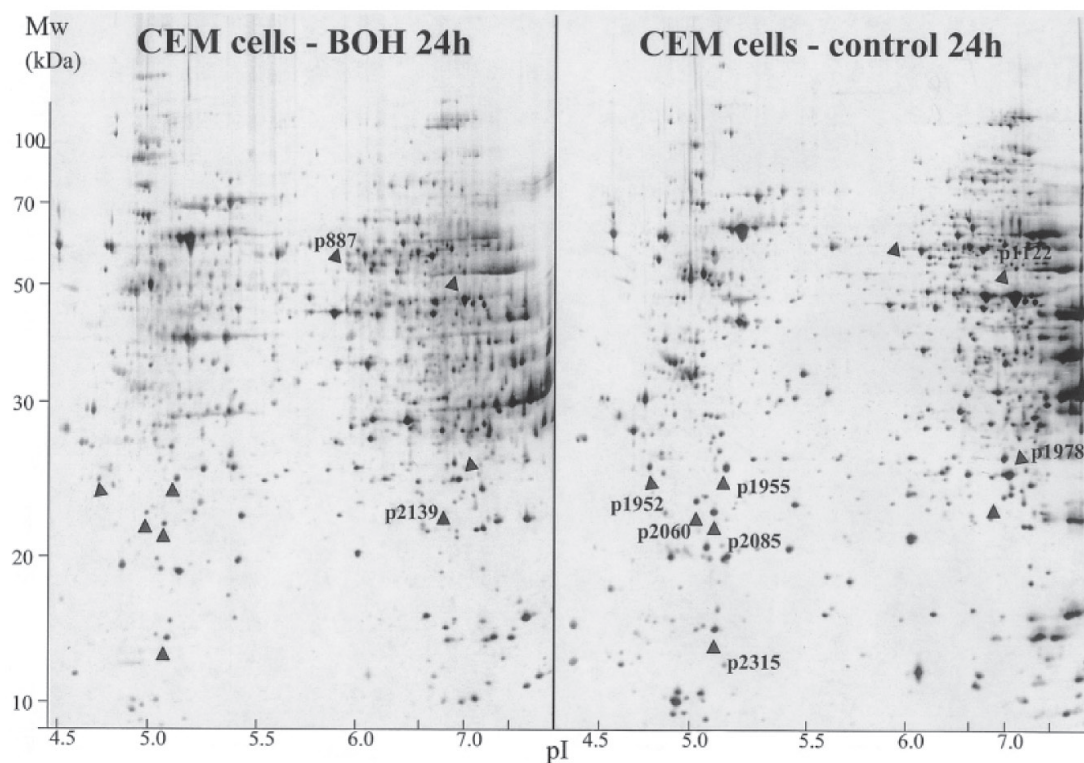


Figure 4. Standard images of silver-stained gels of 24 h CEM cells with marked positions of the nine most different spots between BOH exposed and control CEM cells determined by multivariate PCA.

Table 1. Identification of proteins of CEM cells affected by BOH

Spot No.	2-DE pI/mol.mass (kDa)	Identification method	Number of found peptides	Sequence coverage (%)	Number of matched sequences	Protein name/Pathway
p1122	7.17/47.6	Mass fingerprinting (MALDI-MS)	13	46	—	Alpha-enolase/glycolysis E.C. 4.2.1.11.
p1978	7.10/25.8	Mass fingerprinting MS sequencing (ESI-MS/MS)	6	29	4	Triosephosphate isomerase/glycolysis E.C. 5.3.1.1.
p2315	5.10/15.3	Mass fingerprinting MS sequencing (ESI-MS/MS)	3	18	2	Initiation factor 5A/protein synthesis
p2060	4.99/26.6	Mass fingerprinting (MALDI-MS)	6	35	—	Alpha-Rho GDP dis. inhibitor 1 / cytoskeleton
p2085	5.08/22.7	Mass fingerprinting (MALDI-MS)	4	32	—	Beta-Rho GDP dis. inhibitor 1 / cytoskeleton

4 Discussion

The ability to control the cell cycle progression *via* inhibition of key CDKs by synthetic CDKIs provides a unique opportunity to control cellular division. Indeed, we have shown that olomoucine inhibits, *in vitro*, the M-phase promoting factor activity in metaphase-arrested *Xenopus* egg extracts, DNA synthesis in interphase *Xenopus* eggs, and *in vivo* starfish oocyte G2/M transition [17, 25]. This compound also inhibits the licensing factor, an essential replication factor ensuring that DNA is replicated only once in each cell cycle. Consistent with its inhibitory effect on G1/S and mitotic kinases, OC arrests cells in both G1/S and G2/M boundaries [17, 25]. Recently we showed that the OC-derived synthetic CDKIs inhibit cdk7 [16, 26], induce apoptosis in tumor cells, and are effective in various *in vivo* tumor models [16, 27].

4.1 Principal component

Using a 2-DE analysis of cellular proteins we were able to measure simultaneously the abundance of a large number of gene products. To evaluate the quantitative alterations of protein spots, *i.e.*, variables, and to search for co-regulated proteins that might be helpful in interpreting the drug mechanism of action, we utilized the multifactorial method known as PCA. Instead of multidimensional space we can restrict ourselves to the first components that reflect the relevant differences in the protein patterns analyzed. The position of the cell samples as well as the original variables are usually represented by biplots. The vector values of these positions indicate their relative “weight” for the principal component. These values are especially important in the proposal and resolution of the possible mechanism related to the differences in the studied samples [23]. This approach proved to be beneficial. CEM T-lymphoblastic leukemia cells treated 9–24 h with BOH, a synthetic CDK inhibitor with anticancer activity, have been satisfactorily distinguished from 6 h treated and untreated cells.

4.2 Proteins coregulated after BOH treatment

We show here, in addition to the previously described downregulation of CDK activities by synthetic CDKIs in cell lines, that the downregulation of key enzymes of both the glycolytic pathway (α -enolase, triosephosphate isomerase) and of protein synthesis (eukaryotic initiation factor 5A) is synchronous. Although the precise role for eukaryotic initiation factor 5A remains to be identified, it appears to function by promoting the formation of the first peptide bond [28]. Downregulation of protein synthesis is also suggested from previously published data on inhibition of

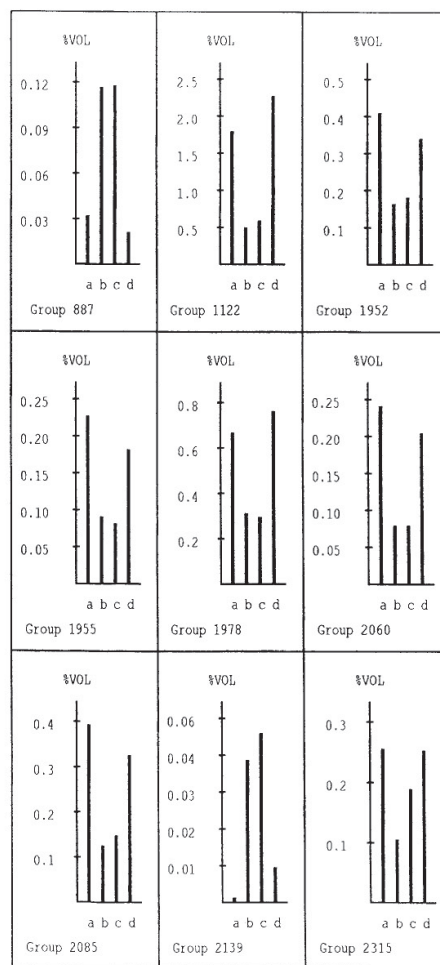


Figure 5. The abundance of the nine selected protein spots are indicated by histograms. Bars a and d correspond to 0 and 24 h control untreated CEM cells, respectively; bars b and c represent 12 and 24 h BOH exposed CEM cells, respectively. The values of spot relative volumes (%VOL) were obtained using Melanie II software. The data represent one typical experiment. Analysis of %VOL values from three independent experiments confirmed significant differences ($p < 0.05$) in abundance of all nine proteins in 24 h BOH-exposed samples compared to untreated controls.

phosphorylation/activity of γ - and δ -subunits of the elongation factor 1 complex [17]. Those results collectively indicate possible links between cell cycle regulation and protein synthesis.

The other two identified proteins play an important role in metabolic pathways. Triosephosphate isomerase (E.C. 5.3.1.1) is involved in several metabolic pathways and its deficiency is the most severe clinical disorder of glycolysis [29]. This enzyme catalyzes the isomerization of D-glyceraldehyde 3-phosphate and dihydroxy-acetone phosphate. Alpha-enolase (E.C. 4.2.1.11) is also an important glycolytic enzyme which cleaves 2-phospho-D-glycerate to the high energy phosphoenolpyruvate, a precursor of acetyl-CoA. A decrease in the levels of these substrates within the BOH-treated cancer cells decreases the capacity of the tricarboxylic acid cycle and, consequently, decreases mitochondrial function and ATP production. Since the OC-derived CDK inhibitors compete with ATP for binding to the ATP-pocket of the kinase [18], we suggest that a decrease in the ATP level facilitates a more effective binding of the CDK inhibitors. We propose that those compounds effect their own CDK inhibitory activity in a feed-back loop manner, which may further increase the *in vivo* effectiveness of these drugs. The presented results and the proposed hypothesis allow us a deeper understanding of the biochemical basis of the potent anticancer activity of the relatively weak CKD inhibitor, OC, under *in vivo* conditions [27]. Additionally, it is generally accepted that cancer cells in solid tumors are energetically deficient due to starvation. This condition could further facilitate the *in vivo* anticancer potency of the synthetic CDK inhibitors and other ATP analogs.

Finding downregulation of Rho GDP-dissociation inhibitor 1 in cancer cells by BOH treatment indicates modulation of the activity of the Rho proteins. While it was shown that the overexpression of Rho GDP-dissociation inhibitor 1 mimics phenotypic changes associated with the inactivation of Rho proteins and leads to disruption of action cytoskeleton [30], the rearrangement of these cytoskeletal structures may be mediated by BOH. Overall, these data indicate that the cellular effects of the OC-derived CDK inhibitors on cancer cells may be partly independent of their ability to inhibit CDKs, and could be mediated by several cellular factors, among them due to decreases in both protein synthesis and glycolysis, which thus decreases the ability of cells to function. Verification of the above proposed hypothesis is under scrutiny in our laboratories.

This project was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (# 204/96/K235), the Ministry of Education (# VZ J14198/51100001), and the Cancer Research Foundation in Olomouc. The technical assistance of J. Michaličková, A. Firyčová, J., Žáková, A., Janošťáková and M. Šafářová is greatly appreciated. We are grateful to Jeane Thompson for editorial help.

Received June 15, 2000

5 References

- [1] Pestell, R. G., Albanese, C., Reutens, A. T., Segall, J. E., Arnold, A., *Endocrine Rev.* 1999, 20, 501–534.
- [2] Sherr, C. J., *Science* 1996, 274, 1672–1677.
- [3] Morgan, D. O., Fisher, R. P., Espinoza, F. H., Farrell, A., Nourse, J., Chamberlin, H., Jin, P., *Cancer J. Sci. Am.* 1998, 7, S77–83.
- [4] Maclachlan, T. K., Sang, N., Giordano, A., *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 1995, 5, 127–156.
- [5] Sherr, C. J., Roberts, J. M., *Genes Dev.* 1999, 13, 1501–1512.
- [6] Labaer, J., Garret, M. D., Stevenson, L. F., Slingerland, J. M., Sandhu, C., Chou, H. S., Fattaey, A., Harlow, E., *Genes Dev.* 1997, 11, 847–862.
- [7] Amanatullah, D. F., Reutens, B., Zafonte, B., Fu, M., Mani, S., Pestell, R. G., *Front. Biosci.* 2000, 5, D372–D390.
- [8] Asp, J., Sangiorgi, L., Inerot, S. E., Lindahl, A., Molendini, L., Benassi, M. S., Picci, P., *Int. J. Cancer* 2000, 85, 782–786.
- [9] Tsujie, M., Yamamoto, H., Tomita, N., Sugita, Y., Ohue, M., Sakita, I., Tamaki, Y., Sekimoto, M., Doki, Y., Inoue, M., Matsuura, N., Monden, T., Shiozaki, H., Monden, M., *Oncology* 2000, 58, 126–136.
- [10] Tsuda, H., Yamamoto, K., Inoue, T., Uchizama, I., Umesaki, N., *Br. J. Cancer* 2000, 82, 675–682.
- [11] Kusume, T., Tsuda, H., Kawabata, M., Inaoue, T., Umesaki, N., Suzuki, T., Yamamoto, K., *Clin. Cancer Res.* 1999, 5, 4152–4157.
- [12] Miracca, E. C., Kowalski, L. P., Naga, I., *Br. J. Cancer* 1999, 81, 677–683.
- [13] Wistuba, I. I., Albores-Saavedra, J., *J. Hepatobil. Pancreat. Surg.* 1999, 6, 237–244.
- [14] Reutens, A. T., Pestell, R. G., *Royal Australian College of Physicians. J. Fellowship Affairs, Continuing Education Series*, Sydney, 1997, pp. 4–13.
- [15] Senderowicz, A. M., Sausville, E. A., *J. Natl. Cancer Inst.* 2000, 92, 376–387.
- [16] Hajdich, M., Havlicek, L., Vesely, J., Novotny, R., Mihal, V., Strnad, M., *Adv. Exp. Med. Biol.* 1999, 457, 341–353.
- [17] Vesely, J., Havlicek, L., Strnad, M., Blow, J. J., Donella-Deana, A., Pinna, L., Letham, D. S., Kato, J., Detivaud, L., Leclerc, S., *Eur. J. Biochem.* 1994, 224, 771–786.
- [18] De Azevedo, W. F., Leclerc, S., Meijer, L., Havlicek, L., Strnad, M., Kim, S. H., *Eur. J. Biochem.* 1997, 243, 518–526.
- [19] Havlicek, L., Hanus, J., Vesely, J., Leclerc, S., Meijer, L., Shaw, G., Strnad, M., *J. Med. Chem.* 1997, 40, 408–412.
- [20] Ramagli, L. S., Rodriguez, L. V., *Electrophoresis* 1985, 6, 559–563.
- [21] Hochstrasser, D. F., Frutiger, S., Paquet, N., Bairoch, A., Ravier, F., Pasquali, C., Sanchez, J.-C., Tissot, J.-D., Bjellqvist, B., Vargas, R., Appel, R. D., Hughes, G. J., *Electrophoresis* 1992, 13, 992–1001.
- [22] Bjellqvist, B., Pasquali, C., Ravier, F., Sanchez, J.-C., Hochstrasser, D. F., *Electrophoresis* 1993, 14, 1357–1365.
- [23] Manly, B. F. J., *Multivariate Statistical Methods: A Primer*, Chapman and Hall, London 1986, pp. 59–71.

- [24] Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., Cottrell, J. S., *Electrophoresis* 1999, 20, 3551–3567.
- [25] Meijer, L., Borgne, A., Mulner, O., Moulinox, J. P., *Eur. J. Biochem.* 1997, 243, 527–536.
- [26] Hajdúch, M., Nosková, V., Feketová, G., Novotný, R., Jess, K., Gojová, L., Kašpárek, I., Kryštof, V., Veselý, J., Strnad, M., Mihál, V., *Leukemia* 1998, 12, 268.
- [27] Hajdúch, M., Kolář, R., Hanuš, J., Mihál, V., Hlobílková, A., Nosková, V., Strnad, M., *Anti-Cancer Drugs* 1997, 8, 1007–1013.
- [28] <http://www.expasy.ch/sprot;SWISS-PROT> accession number P10159.
- [29] Mande, S. C., Mainfroid, V., Kalk, K. H., Goraj, K., Martial, J. A., Hol, W. G. J., *Prot. Sci.* 1994, 3, 810–821.
- [30] Leffers, H., Nielsen, M. S., Andersen, A. H., Honoré, B., Madsen, P., Vandekerckhoven, J., Celis, J. E., *Exp. Cell Res.* 1993, 209, 165–173.

2.3. Kapitola druhá

The radiosensitising effect of synthetic cyclin-dependent kinase inhibitors derived from olomoucine.

THE RADIOSENSITISING EFFECT OF OLOMOUCINE DERIVED SYNTHETIC CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITORS

Gabriela Kořínková[#], Karel Cwierka^{*}, Martina Paprskářová[#], Petr Džubák[#], Marian Hajdúch^{#,*}

[#]Laboratory of Experimental Medicine, Department of Pediatrics and ^{*}Department of Oncology, Faculty of Medicine, Palacký University and Faculty Hospital in Olomouc, Puškinova 6, 775 20 Olomouc, Czech Republic

corresponding author:

Marian Hajdúch
Laboratory of Experimental Medicine
Department of Pediatrics, Faculty hospital in Olomouc
Puškinova 6
775 20 Olomouc
Czech Republic
Tel: +420 588 444 421 (4441) Fax: +420 588 442 527
hajduchm@gmail.com

Abstract

Background and Purpose: To evaluate potential *in vitro* radiosensitising effect of bohemine (BOH) and roscovitine (ROS).

Material and Methods: Clonogenic survival assay on human lung adenocarcinoma cell line A549 (wt p53) were used. Treatment schedules were: A-pre-treatment, B-concomitant application and C-post-treatment. Tested concentrations corresponded to IC_{10} , IC_{25} and IC_{50} for BOH/ROS. The radiation doses were 1, 2 or 3 Gy. Flow cytometry and western blot analysis were used to characterize cell cycle distribution and DNA repair processes.

Results: The highest *in vitro* radiosensitising effect of BOH/ROS was observed for Schedule A in all tested concentrations (SER 37% values from 1.46 to 3.20). In the other schedules synergistic effect was achieved in highest concentration only (IC_{50}). Redistribution of the cell cycle was only moderate with unaltered level of apoptosis. In Schedule A we observed rearrangements/inhibition of the DNA DSBs repair processes and mild stabilisation of p53 protein accompanied by strong induction of p21 protein 12 hours after treatment.

Conclusions: The results demonstrated strong *in vitro* radiosensitising effect of BOH/ROS, which is concentration and schedule dependent. This effect is probably mediated through the hyperstimulation of p53 protein activity and subsequent enduring or permanent G1 arrest caused by induction of p21 protein.

Keywords: Bohemine; Roscovitine; Radiosensitivity; Cyclin-dependent kinase inhibitors; Activation of p53

1. Introduction

Bohemine and roscovitine, compounds structurally derived from olomoucine, act as inhibitors of cyclin-dependent kinases [CDKs; 1-2]. Cyclin-dependent kinases (CDKs) are key regulators of cell cycle, which is often disrupted in cancer cells resulting in uncontrollable proliferation. Therefore, research on the synthetic CDKs brings interesting possibilities for anticancer therapy. The greatest activity of BOH/ROS was described against CDK2, CDK7 and CDK9, but also CDK1 and CDK5 are affected [2-4]. These compounds have demonstrated their potential to block the proliferation and induce apoptosis under both *in vitro* and *in vivo* conditions [2-5]. Currently the phase II clinical trials for roscovitine are underway [6].

Repair of DNA DSBs (double strand breaks), caused by ionizing radiation, is essential for survival of the cell. In eukaryotes, DSBs are either repaired by homologous recombination (HR) or non-homologous end joining (NHEJ) [7]. HR works accurately and functions preferentially in late S/G2 phase. The central role in HR is played by ATM and ATR kinases, which phosphorylate diverse components of the DNA DSBs repair network/apoptosis pathway either directly or through the transducing kinases CHK2 and CHK1 [8-9]. Although ATR-CHK1 pathway seems to be primarily activated by arrest of the DNA replication fork [8]. In response to DNA damage, these kinases can rapidly and transiently delay cell-cycle progression in G1, S or G2 phases through the CDC25s phosphatase pathway. They can also impose delayed and enduring cell-cycle arrest in G1 or G2 phase through the p53/MDM2-p21 pathway [9]. NHEJ however is the prominent repair pathway during the G0/G1 phase and it is a potentially error-prone. The key role in NHEJ is played by the kinase DNA-PK [7]. ATM, ATR and also DNA-PK kinases directly activate and stabilize p53 protein by phosphorylation of his Serine-15 site. This modification of p53 protein stimulates further protein modifications [9-10]. CHK1 and CHK2 kinases phosphorylate p53 on Ser20 and Thr18. In addition the ubiquitin ligase MDM2, that normally ensures rapid p53 turnover, is also targeted by ATM/ATR and CHK1/CHK2 kinases [8].

Treatment of cell lines with BOH/ROS at micromolar level leads to arrest of the cell cycle on G1/S and G2/M boundaries and deceleration of S phase development. The synchronised cells, especially those blocked in the G2/M boundary, could sensitively respond to consequent irradiation. Moreover roscovitine treatment causes stabilisation and nuclear accumulation of wild-type p53 protein [5, 11-13], which is accompanied by nucleolar fragmentation [11, 5]. This stabilisation occurs due to the downregulation of the ubiquitin ligase MDM2 that normally ensures rapid p53 turnover [11, 14]. Possible hyperstimulation of p53 activity using roscovitine in combination with irradiation was proposed [13-14]. In contrast to this hypothesis, Dr. Maggiorella described the radiosensitising effect of concomitantly administered roscovitine using p53 mutated breast cancer MDA-MB231 cell line under *in vitro* and also *in vivo* conditions [15].

The aim of this study was to evaluate *in vitro* radiosensitising effects of BOH/ROS using clonogenic survival assay on p53 wild-type human lung adenocarcinoma cell line A549. Paclitaxel was used as a positive control for its known radiosensitising effect. This study deals mainly with rearrangements and inhibition of DNA repair processes in response to BOH/ROS combined with irradiation.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and cell line

Human lung adenocarcinoma cell line A549 was purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, USA). The cells were grown in RPMI medium supplemented with 10% fetal calf serum and containing 100 U/ml penicilin, 100 µg/ml streptomycin at 37°C and 5% CO₂. All experiments were performed in exponentially and asynchronously growing cultures.

2.2. Tested compounds and irradiation conditions

Tested compounds were bohemine, roscovitine (BOH and ROS; Laboratory of Growth Regulators, Palacky University, Olomouc, Czech Republic) and paclitaxel (TAX; Bristol-Myers Squibb, USA). 10mM stock solutions of BOH/ROSC were prepared in 10% DMSO in saline and stored at -20°C. α -irradiation was delivered at room temperature using ⁶⁰Co source (Chisostat, Chirana, Czech Republic).

2.3. Clonogenic survival assay

Cells were seeded in triplicates into 6-well plates (250 cells per well) and left to stabilize for 24 hours. Initial experiments were designed to determine doses of radiation and drugs, which inhibit growth of 10, 25 and 50% of tumour cells (IC_{10} , IC_{25} , IC_{50}). Then we used those values for experiments combining irradiation and CDKIs. Three different schedules were used: **A–pre-treatment**, of cells with drugs before irradiation; **B–concomitant**, concomitant application of radiation and drugs followed by wash-out of the drugs 24 hours later; and **C–post-treatment**, treatment of cells with drugs 1 day after irradiation for 24 hours. Treated cultures were incubated for additional 7 days in drug-free medium to grow-up colonies. Finally, the cultures were fixed, stained and colonies containing >50 cells were counted.

2.4. Flow cytometry methods

Briefly, cells were treated with radiation (2 Gy) and/or IC_{25} of BOH/ROS (12.5/9 μ M) respectively according to above mentioned schedules, and analysed by flow-cytometry 24 and 48 hours later. For BrdU (bromodeoxyuridine) incorporation assay, cells were exposed to 10 μ M BrdU for 30 minutes before trypsinization and fixed in ice-cold ethanol. DNA content and cell cycle analysis was performed using hypotonic citrate buffer and propidium iodide staining method [16]. BrdU positive cells were visualized using anti-BrdU-FITC antibody (Becton Dickinson, San Jose, USA) after chemical DNA denaturation according to the manufacturer's instructions.

Cell suspensions were measured on Becton Dickinson FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, USA) at excitation wavelength of 488nm. Cell cycle histograms were analyzed using ModFit software (Verity Software House, Inc., Topsham, USA). Cell Quest software (Becton Dickinson, San Jose, USA) was used for quantification of both apoptotic subG1 and BrdU positive cells. The ratio of G2/M BrdU positive versus negative cells was calculated to reflect the intensity of DNA repair (ratio= G2/M BrdU positive/ G2/M BrdU negative x 10).

2.5. Immunoblotting

Cell cultures irradiated with 10 Gy and pretreated (Schedule A) with IC_{25} of BOH/ROS (12.5/9 μ M) were prepared in different time points after complex therapy and analysed for expression of key cell cycle regulatory/DNA repair proteins by immunoblotting protocol developed by Cell Signaling company in combination with the enhanced chemiluminescent detection ECL system (Amersham, Little Chalfont, UK). The used antibodies were: polyclonal antibody anti-phospho H2AX(Ser139) (Upstate, Lake Placid, NY); polyclonal antibodies p53, CHK1, CHK2 and phospho p53(Ser15), p53(Ser20), p53(Ser46), p53(Ser392), CHK1(Ser345), CHK2(Thr68) (Cell Signaling, Danvers, MA); monoclonal antibody p21CIP1/WAF1 (Exbio, Prague, Czech Republic); monoclonal antibodies PARP, MSH6, MSH2 and DNA-PKcs/p350 (BD Biosciences Pharmingen, Philadelphia, PA). Control of protein loading was performed using monoclonal antibody against β -tubulin (Sigma, St Louis, USA).

2.6. Statistical methods

The survival rates are reported as survival curves. Each data point is represented by 6/9 replicates from two/three independent experiments and standard deviation of the mean. The values of the sensitising enhancement ratio (SER) for 37% survival level were calculated. The radiation dose that reduced the surviving colonies to 37% of the non-treated controls was divided by the radiation dose that reduced survival to 37% in combination with BOH/ROS. Statistical comparison of the survival curves was performed using the one-tailed t-test for each data point. Data analysis and graphics were made using PRISM 4.01 software (Graph-Pad, San Diego, USA).

3. Results

3.1. Cytotoxic/cytostatic activities of monotherapy

Survival curves for individual treatment modalities were analyzed for proper dosage of drugs and radiation in combinations (Fig 1) using the standard clonogenic survival assay. Cells were exposed to CDKIs for 24 hours only, since this was previously shown to be sufficient [4]. The concentrations inhibiting colony formation for 10, 25 or 50% (IC_{10} , IC_{25} and IC_{50}) were calculated and were used further in the combination therapies (0.1 μ M, 12.5 μ M and 30 μ M for bohemine; 0.1 μ M, 9 μ M and 13 μ M for roscovitine; 0.02 nM, 0.53 nM and 1.64 nM for paclitaxel). Mean IC_{50} values of BOH and ROS (30 μ M and 13 μ M respectively) were comparable to the mean IC_{50} values (27 μ M for BOH and 15 μ M for ROS) obtained across a panel of 24 human tumour cell lines [4]. As shown in Figure 1, the A549 cells were relatively sensitive to radiation, since they significantly responded to irradiation in low, clinically relevant doses (1-3 Gy).

3.2. Cytotoxic/cytostatic activities of combined treatment

Schedule A-pre-treatment schedule

All three compounds clearly demonstrated radiosensitising effects (Fig 2) even in the lowest tested concentrations (IC_{10}). The SER(37%) values for IC_{10} concentrations were 1.55/1.47/1.6 for bohemine/roscovitine/paclitaxel respectively. However, in higher concentrations of CDKIs (IC_{50}), their radiosensitising effect was even more apparent than in the case of paclitaxel. The highest SER(37%) values achieved were 3.20 for BOH and 2.53 for ROS at level of IC_{50} . The achieved SER values for paclitaxel were similar to those obtained by the Dr. Zanelli et al. [17]. Decrease of survival fraction was significant for all tested concentrations of BOH/ROS ($p < 0.0001$).

Schedule B-concomitant application

The only significant radiosensitising effect was registered for the highest concentrations (IC_{50} levels) of both BOH ($p < 0.0001$) and ROS ($p < 0.0204$) (Fig 3). The relevant SER(37%) values were 1.77/1.76 for BOH/ROS respectively. However, at lower concentrations (IC_{10} , IC_{25}) the effects were merely additive.

Schedule C-post-treatment schedule

Similarly to Schedule B, the radiosensitising effect was found in the highest concentrations of CDKIs (IC_{50}) with SER(37%) 1.56($p < 0.0058$)/1.61($p < 0.0001$) for BOH/ROS respectively. A weak radiosensitising effect was also demonstrated for ROS at level of IC_{25} with SER(37%) 1.18 ($p < 0.0464$).

The typical result of clonogenic assay is presented on Figure 4, which clearly demonstrate synergistic effect of radiation and synthetic CDKIs in pre-treatment Schedule A, while other combinations were merely additive.

3.3. Cell cycle analysis

Figure 5 summarizes the effects of radiation and compounds 24 hours after the wash-out of the drugs. Our data demonstrate that the combined therapy leads to substantially decreased count of S phase cells and increase in G2/M population. The most noticeable redistribution of cell cycle phases occurred in Schedule A (before irradiation). Bohemine and roscovitine alone reduced S phase of the cell cycle (29.5% for BOH and 29.7% for ROS, control cells 40%). In Schedule A the level of S phase was decreased to 22.6% / 19.8% for BOH/ROS respectively. The decreased level of S phase remained on the same level also 48 hours after the wash-out and the percentage of cells in G0/G1 phase was increased (67.5% / 65.5% for BOH/ROS respectively) at the expense of G2/M phase (data for time interval 48 hours are not shown). In the same time interval the irradiated cells and the cells treated with BOH/ROS demonstrate the common profile of exponentially growing A549 cells (S phase 30-37%, G2/M phase 13-14% and G0/G1 48-58%). Similar, although weaker trend to develop G1 arrest was also shown for Schedule B.

The analysis of subG1 peak (Fig 5) showed that the level of apoptosis for the irradiated cells was increased 24 h after irradiation (8%). Similar fraction of apoptotic cells was observed 48 hours after wash-out for BOH plus irradiation (Schedule A; 9.6%) and for ROS plus irradiation (Schedule B; 8.3%). In

summary the data of the radiosensitising treatment schedule A (before irradiation) showed inhibition of the cell proliferation, which is not accompanied by increased level of apoptosis even 48 hours after the wash-out of the drugs.

3.4. BrdU incorporation assay and DNA repair

For finer distinction of S phase cells and cells currently undergoing DNA repair, we have implemented the BrdU incorporation assay. In this analysis, the pulse labelled BrdU positive cells are either S phase cells (S-phase DNA content) or cells undergoing DNA repair (G2/M DNA content). The ratio of BrdU positive/negative cells in the G2/M phase reflects the percentage of DNA repairing cells. Figure 6 shows significant inhibition of DNA repair for Schedule A. This suggests that pre-treatment of tumour cells with BOH/ROSC results in strong inhibition of DNA repairs. Mild inhibition was also registered in the case of Schedule B (concomitant application). Inhibition of DNA DSBs repair by roscovitine 24 hours after treatment was also shown in the paper of Dr.Maggiorella [15], where the pulse-field gel electrophoresis (PFGE) was used.

3.5. Molecular changes of A549 cells treated using Schedule A-before irradiation

Cell lysates corresponding to the intervals 1, 3, 6 and 12 hours after the wash-out of the drugs were prepared. The irradiation dose used for immunoblotting (10Gy) was increased in order to enhance the chances of capturing some of the DNA DSBs repairs. Resulting western blot pictures are shown in Figure 7. To describe inhibition of DNA repair we initially used antibody against phosphorylated form of histone H2AX (γ -H2AX Ser139), this phosphorylation could be an indicator of ongoing DNA DSBs repair. Our data showed more noticeable phosphorylation of histone H2AX at the time interval 6 and 12 hours in the case of preincubation with bohemine or roscovitine, indicating long lasting DNA repair after incubation with compounds.

Unambiguous inhibition of DNA-PK kinase give evidence of influence on DNA DSBs repair after incubation with BOH/ROS (time intervals 3 hours). DNA-PK inhibition in combined treatment was described also by Dr. Maggiorella, where in accordance with our data (BOH and ROS, time interval 1 and 3 hours) they described also activation of DNA-PK by roscovitine (5 μ M). It means, that incubation with CDKI caused formation of DNA DSBs. This was demonstrated using the mikronuclei assay and PFGE analysis [15].

ATM/ATR kinases phosphorylate mainly Thr68 site of CHK2 kinase and Ser345 or Ser317 sites of CHK1 kinase. In our experiments the inhibition of CHK2 kinase was not detected, on the contrary stronger activation in the case of combined therapy was observed using the CHK2(Thr68) antibody at time interval 1 hour. Stronger induction of CHK1 kinase with different dynamics for bohemine or roscovitine was detected. Only mild decrease of activity in the case of roscovitine plus irradiation was observed using CHK1(Ser345) antibody. Phosphorylation of Ser317 site of CHK1 was not examined.

Up-regulation of MSH6 protein after incubation with BOH/ROS indicates activation of methyl directed mismatch repair system (MMR), which is a mechanism for post-replication DNA repair. Complex MSH2-MSH6, inducing during MMR conformational changes in the DNA before excision repair, probably plays a role in HR to correct base mispairs or other abnormalities that can arise from the strand reactions of HR [7]. Up-regulation of MSH6 protein, observed after irradiation, points to involvement of MSH2-MSH6 complex in DNA DSBs repairs. The levels for MSH2 protein were not affected.

As a next step we decided to investigate p53 status. BOH/ROS alone did not influence the stability of p53 protein. Our results in the case of combined therapy demonstrated mild stabilisation of nonphosphorylated p53 protein at time interval 12 hours that could be attributed to stabilisation of Ser15 phosphorylated form of p53 (12 hours). Phosphorylation of p53 on Ser20 showed no remarkable differences between irradiation and combined therapy. No signal was observed using p53(Ser46) and p53(Ser392) antibodies. Stabilisation of p53 protein at time interval 12 hour was accompanied by strong induction of its key transcriptional target, protein p21, which is an inhibitor of cyclin-dependent kinases. Strong induction of p21 protein at 3 hours in response to irradiation was transient, however combined therapy

caused delayed and prolonged induction of p21 starting at 3 hours and clearly visible at 6 and 12 hours. In the case of incubation with roscovitine, mild induction of p21 was also observed. Together with no cleavage of PARP protein and flow cytometry data describing cell cycle distribution and apoptosis, induction of p21 suggests prolonged or permanent blockage (senescence) of cells in the G0/G1 phase of the cell cycle.

4. Discussion

Recently the role of CDK kinases in the regulation of the RNA polymerase II (RNAP II) transcription has been highlighted. Kinases CDK 1, 7, 8 and 9 activate RNA II polymerase and thus facilitate efficient transcriptional initiation and elongation [6, 12]. Blockage of transcription can primarily affect the accumulation of transcripts with short half-lives, inappropriate accumulation of proteins in the nucleus or complications during replication. Moreover RNAP II blocked at sites of DNA lesions acts as the sensor of DNA damage triggering transcription coupled repair (TCR) and stabilising p53 protein by modifications at the Ser15 (phosphorylation) and Lys382 (acetylation) sites [10, 18].

Stabilization of p53 protein [5, 11-13], down-regulation of antiapoptotic factor Mcl-1 [19], depletion of cyclins [4] and induction of apoptosis [19] occur due to inhibition of RNA polymerase II by roscovitine (above 20) and bohemine (above 50 μM) [4, 12, 19]. Moreover stabilisation of p53 together with inhibition of CDK2 probably leads to down-regulation of the CHK1 kinase [20]. Our data showed, that roscovitine and bohemine alone at concentration 9/12.5 μM respectively did not stabilize p53 protein, however mild induction of p21 protein was detectable for roscovitine (Fig 7). Mild induction of CHK1 kinase and also increased amount of MSH6 protein suggests possible problems caused by BOH/ROS arising during the replication (Fig 7). Dr. Derheimer suggested, that ATR-CHK1 pathway can also play a role in transcription control [18]. Activation of DNA-PK (NHEJ pathway) gives evidence of occurring DNA DSBs (Fig 7). Both occurrence of DSBs and activation of DNA-PK induced by roscovitine also described Dr. Maggiora [15]. In the case of HR, induction of MSH6 protein suggests possible activation of HR. The detailed mechanism by which BOH/ROS might cause DNA DSBs is yet unclear. Our first hypothesis is, that DNA DSBs probably arise in a response to aberrant replication process either due to inhibition of CDK2 kinase or due to possible collision of the replication machinery with stalled RNA polymerase complex. The second hypothesis is related to fact, that under *in vitro* conditions during mitosis CDK1 kinase forms stable molecular complexes with topoisomerase II α , thus leads to altered DNA/topoisomerase interactions and to possible occurrence of DNA DSBs [21]. Inhibition of CDK2 or possibly CDK1 kinase is in all likelihood important for the resulting effect, because incubation with the inhibitor of RNAP II polymerase transcription 5,6-dichloro-1-b-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB; inhibitor of CDK7 and CDK9) does not result in DNA damage [18]. Finally bohemine and roscovitine, inhibiting kinases CDK1, 2, 7 and 9, at very low concentrations (about 10 μM) alter transcription and also replication process [5, 12] and possibly also inhibit activity of topoisomerase II α , all these events lead to occurrence of DNA DSBs and to activation of DNA-PK.

In the case of combined therapy (BOH/ROS plus irradiation) some rearrangements/inhibition of DNA DSBs processes were observed. DNA-PK kinase was inhibited compared to irradiation only, although BOH/ROS alone cause its activation (Fig 7). On the other hand CHK2 kinase exhibited higher activity due to the incubation with the compounds (Fig 7, time interval 1 hour). Though the clear coordination of HR and NHEJ repairs is unknown [8], our data suggest preferential activation of ATM-CHK2 pathway in response to combined therapy. The possible reason is, that combined therapy induces earlier than 24 hours after irradiation strong G2/M arrest, where the homologous recombination predominates. Inhibition of DNA-PK activity related to strong G2/M arrest was also described in literature in the case of combination roscovitine with irradiation [15] and with sublethal dose of doxorubicine [22]. Inhibition of DNA repair processes resulted from BrdU incorporation assay (Fig 6) and long-lasting phosphorylation of histone H2AX (Fig 7) indicates longer DNA repair after incubation with the compounds. This occurred either due to rearrangements of DNA DSBs processes or due to possible inhibition in HR downstream of the ATM-CHK2 pathway. In literature is also suggested possible role of CDK kinases in regulation of

homologous recombination in yeast cells [23]. Strong induction of p21 gives evidence for hyperstimulation of p53 protein activity, although strong stabilisation of p53 was not shown.

The highest *in vitro* radiosensitising effect of BOH/ROS was observed for Schedule A in all tested concentrations. This effect is probably mediated through the hyperstimulation of p53 protein activity and subsequent enduring or permanent G1 arrest (senescence) caused by induction of p21 protein. The fact can be explained so that even the smallest concentrations of BOH/ROS used in preincubation (Schedule A) are sufficient to increase nuclear accumulation of p53 protein before irradiation, although the overall level of p53 protein is unaffected. On the other hand in Schedules B and C higher concentrations have to be used to achieve p53 activity hyperstimulation.

The mechanism of radiosensitising effect of roscovitine at $c=5 \mu\text{M}$ (but not for $2.5 \mu\text{M}$) on p53 mutated cell-line MDA-MB231 has yet to be studied. Dr. Maggiorella believed that the radiosensitising effect is caused by the inhibition of DNA-PK kinase and possible effect on HR was not studied [15]. Dr. Maggiorella showed strong cytostatic effect and no increase of apoptotic induction even on the fourth day after finishing the treatment. The viability of treated cells was still 80-95% at this time interval. We presume, that signal cascades ATM/ATR-CHK1/CHK2-CDC25s and ATM-NBS1-SMC1 were able to fully compensate the cascade ATM/ATR-CHK1/CHK2-p53/MDM2-p21 and that the subsequent and final state was directly senescence. Another mechanism that could explain the studied radiosensitisation would be the mitotic catastrophe-cell death resulting from abnormal mitosis. However this phenomenon is yet to be studied in the field of radiosensitisation effect of bohemine and roscovitine.

Finally it is clear, that inhibition of transcription by the CDK inhibitors bohemine and roscovitine is an important phenomenon not only for their radiosensitising effect. Cell-cycle arrest or apoptosis occur depending on used concentration of compounds. Importantly, transformed cells seem to be more sensitive to disruption of RNA synthesis than corresponding normal cells. We can presume that the cyclin-dependent kinase inhibitors may have a promising therapeutic potential as radiosensitisers.

References

1. Vesely J, Havlicek L, Strnad M, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur J Biochem* 1994; 224:771-786.
2. Meijer L, Borgne A, Mulner O, et al. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem* 1997;243:527-536.
3. Hajduch M, Havlicek L, Vesely J, Novotny R, Mihal V, Strnad M. Synthetic cyclin dependent kinase inhibitors. New generation of potent anti-cancer drugs. *Adv Exp Med Biol* 1999;457:341-353.
4. Raynaud FI, Whittaker SR, Fischer PM, et al. In vitro and in vivo pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships for the trisubstituted aminopurine cyclin-dependent kinase inhibitors olomoucine, bohemine and CYC202. *Clin Cancer Res* 2005;11:4875-4888.
5. Wojciechowski J, Horky M, Gueorguieva M, Wesierska-Gadek J. Rapid onset of nucleolar disintegration preceding cell cycle arrest in roscovitine-induced apoptosis of human MCF-7 breast cancer cells. *Int J Cancer* 2003;106:486-495.
6. Fischer PM, Gianella-Borradori A. Recent progress in the discovery and development of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs* 2005;14:457-477.
7. Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Garewal H. DNA repair/pro-apoptotic proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat Res* 2002;511:145-178.
8. Lisby M, Rothstein R. Localization of checkpoint and repair proteins in eukaryotes. *Biochimie* 2005;87:579-589.
9. Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 2004;432:316-323.
10. Ljungman M, Lane DP. Transcription-guarding the genome by sensing DNA damage. *Nat Rev Cancer* 2004;4:727-737.
11. David-Pfeuty T, Nouvian-Dooghe Y, Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdun D. Common and reversible regulation of wild-type p53 function and of ribosomal biogenesis by protein kinases in human cells. *Oncogene* 2001;20:5951-5963.
12. Ljungman M, Paulsen MT. The cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine inhibits RNA synthesis and triggers nuclear accumulation of p53 that is unmodified at ser15 and lys383. *Mol Pharmacol* 2001;60:785-789.
13. Blaydes JP, Craig AL, Wallace M, et al. Synergistic activation of p53-dependent transcription by two cooperating damage recognition pathways. *Oncogene* 2000;19:3829-3839.
14. Lu W, Chen L, Peng Y, et al. Activation of p53 by roscovitine-mediated suppression of MDM2 expression. *Oncogene* 2001;20:3206-3216.
15. Maggiorella L, Deutsch E, Frascogna V, et al. Enhancement of radiation response by roscovitine in human breast carcinoma in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2003;63:2513-2517.
16. Diamond RA, DeMaggio S. In living color: Protocols in flow cytometry and cell sorting. Springer Lab Manuals. USA, 2000. ISBN: 3540651497
17. Zanelli GD, Quaia M, Robieux I, et al. Paclitaxel as a radiosensitizer: A proposed schedule of administration based on in vitro data and pharmacokinetic calculations. *Eur J Cancer* 1997;33:486-492.
18. Derheimer FA, Chang C, Ljungman M. Transcription inhibition: A potential strategy for cancer therapeutics. *Eur J Cancer* 2005;41:2569-2576.
19. MacCallum DE, Melville J, Frame S, et al. Seliciclib (CYC202, R-Roscovitine) induces cell death in multiple myeloma cells by inhibition of RNA polymerase II-dependent transcription and down-regulation of Mcl-1. *Cancer Res* 2005;65:5399-5407.
20. Maude SL, Enders GH. Cdk inhibition in human cells compromises Chk1 function and activates a DNA damage response. *Cancer Res* 2005;65:780-786.
21. Escarquié AE, Plisov SY, Skladanowski A, et al. Recruitment of cdc2 kinase by DNA topoisomerase II is coupled to chromatin remodeling. *FASEB J* 2001;15:2288-2290.
22. Crescenzi E, Palumbo G, Brady HJM. Roscovitine modulates DNA repair and senescence: Implications for combination chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005;11(22):8158-8171.
23. Aylon Y, Liefshitz B, Kupiec M. The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle. *EMBO J* 2004;23(24):4868-4875.

Figures

Fig. 1. Cytotoxic/cytostatic activity of monotherapy in clonogenic survival assay. The A549 cells were either irradiated or incubated for 24 hours with the compound and after 7 days incubation the colonies were counted and survival fractions were calculated. The concentrations inhibiting colony formation for 10, 25 or 50% (IC_{10} , IC_{25} and IC_{50}) were calculated. Each data point represents the mean \pm S.D. from at least three separate experiments.

Fig. 2. Cytotoxic/cytostatic activities of combined therapy; Schedule A. The A549 cells were incubated with the compounds for 24 hours and then irradiated, after 7 days incubation the colonies were counted and survival fractions were calculated. Each data point represents the mean \pm S.D. from three separate experiments.

Fig. 3. Cytotoxic/cytostatic activities of combined therapy; Schedule B and C. In Schedule B, the A549 cells were exposed to the compounds and immediately irradiated. In Schedule C A549 cells were first irradiated and then after 24 hours of resting were treated with the compounds. Each data point represents the mean \pm S.D. from two or three separate experiments.

Fig. 4. Typical results of clonogenic survival assay for all three treatment schedules on A549 cell line. Irradiation dose was 2 Gy, concentrations of BOH/ROS were 12.5/9 μ M respectively (IC_{25}).

Fig. 5. Cell cycle and subG1 peak analysis. Data correspond to 24 hours after the wash-out of the drugs for all treatment schedules. Irradiation dose was 2Gy and concentrations of BOH/ROS were 12.5/9 μ M respectively (IC_{25}). Each data point represents the mean \pm S.D. from two separate experiments.

Fig. 6. BrdU incorporation assay. Data correspond to 24 hours after the wash-out of the drugs for all treatment schedules. Irradiation dose was 2Gy and concentrations of BOH/ROS were 12.5/9 μ M respectively (IC_{25}). The ratio of G2/M BrdU positive versus negative cells was calculated to reflect the intensity of DNA repair (ratio= G2/M BrdU positive/ G2/M BrdU negative x 10). Each data point represents the mean \pm S.D. from two separate experiments.

Fig. 7. Immunoblotting of selected proteins related to DNA repair. Cell lysates corresponding to the schedule A and to the intervals 1, 3, 6 and 12 hours after the wash-out of the drugs were prepared. Irradiation dose was 10 Gy and concentrations of BOH/ROS were 12.5/9 μ M respectively (IC_{25}). Loaded protein volumes were usually 20 μ g or 50 μ g (CHK1, CHK1(ser345), CHK2(Thr68), CHK2) or 100 μ g (DNA-PKcs/p350, γ H2AX, p21).

Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (MSM 6198959216) and the Grant Agency of the Czech Republic (GACR 301/02/0475).

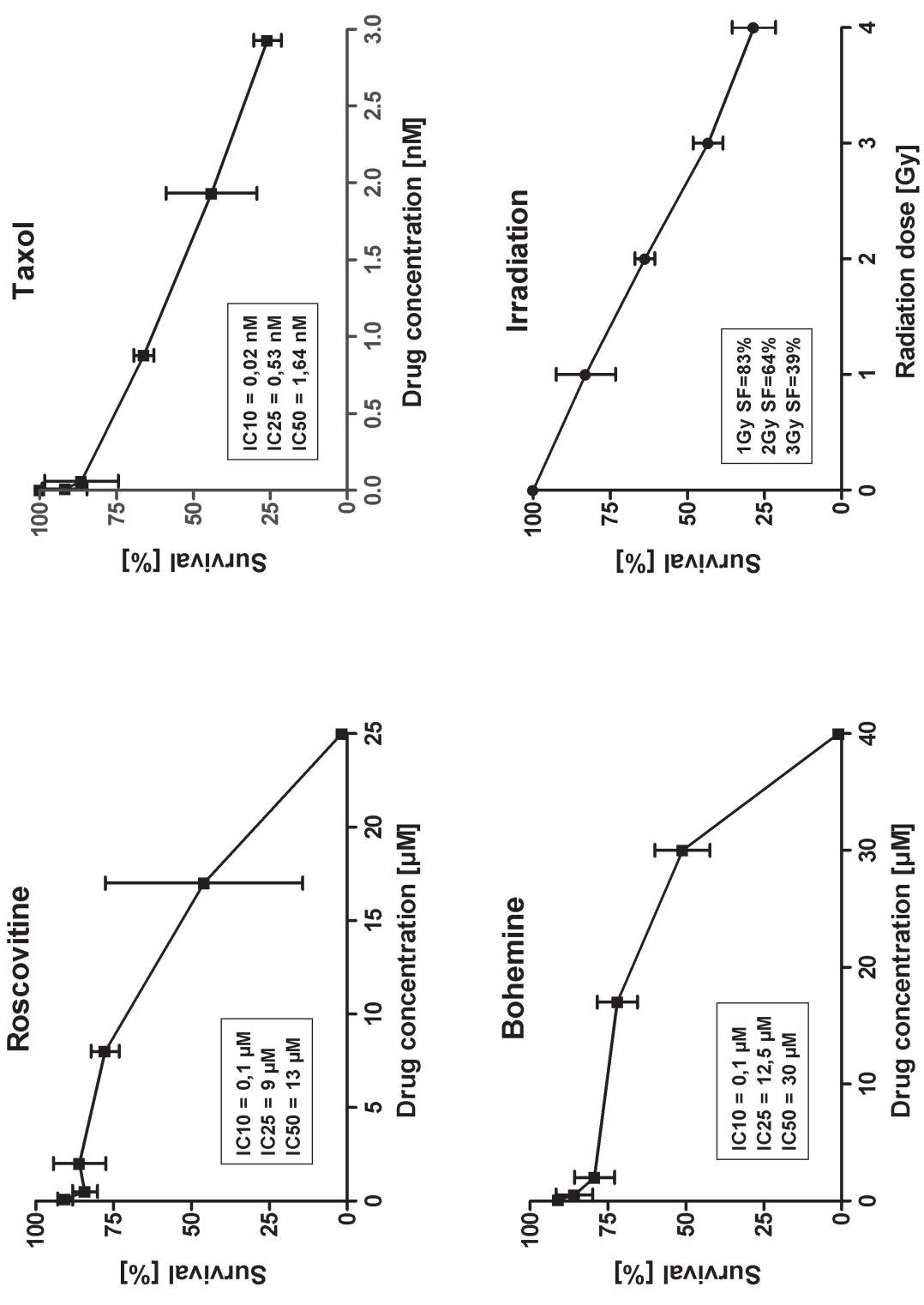


Fig. 1

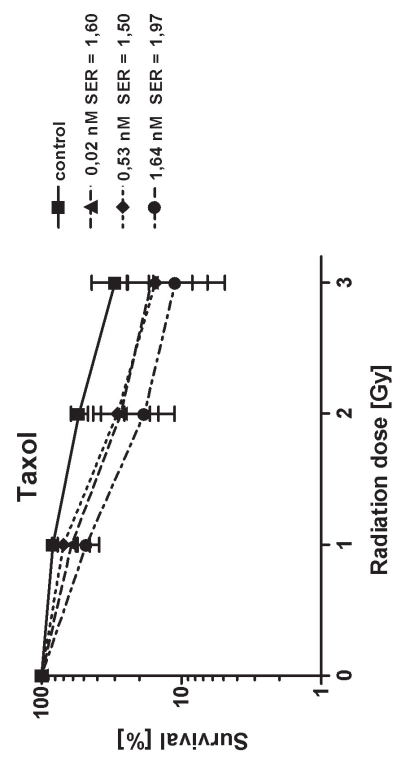
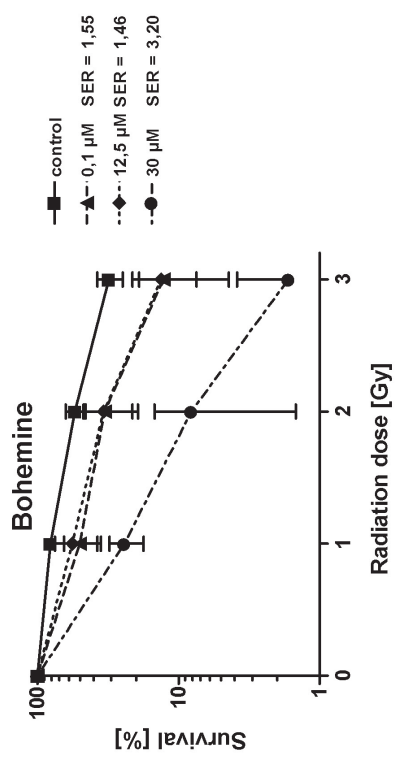
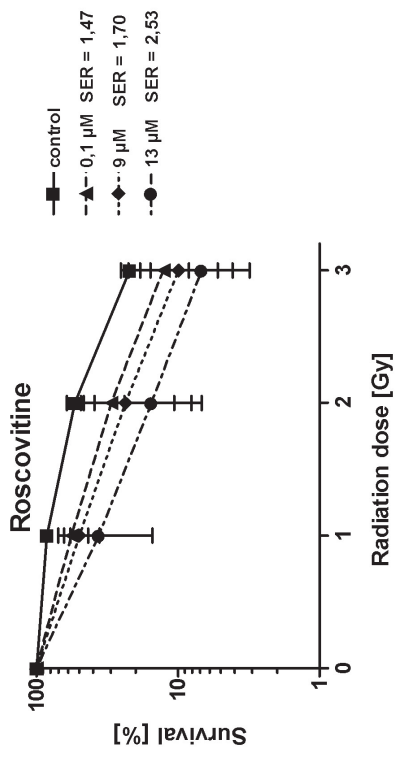
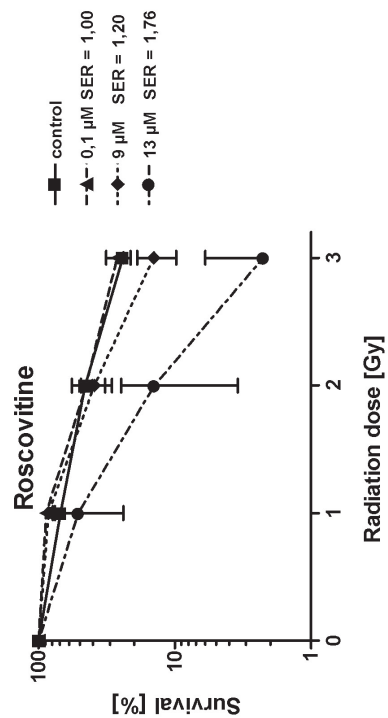
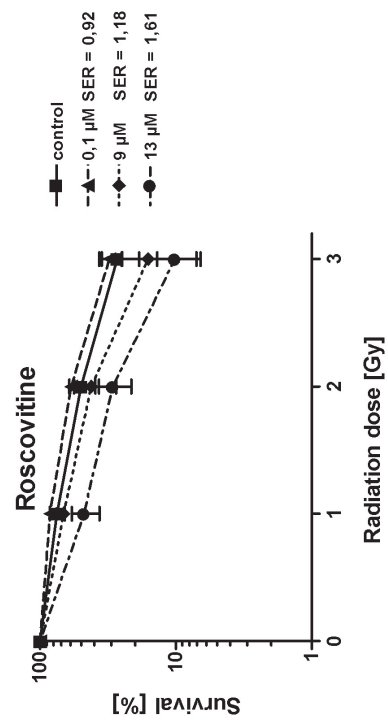
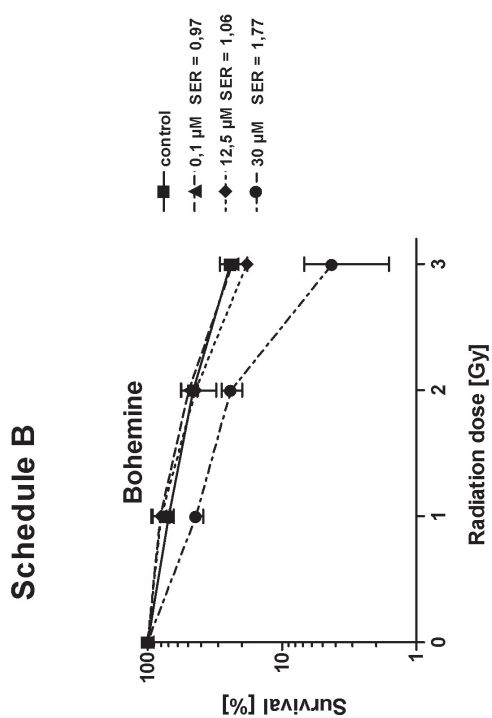
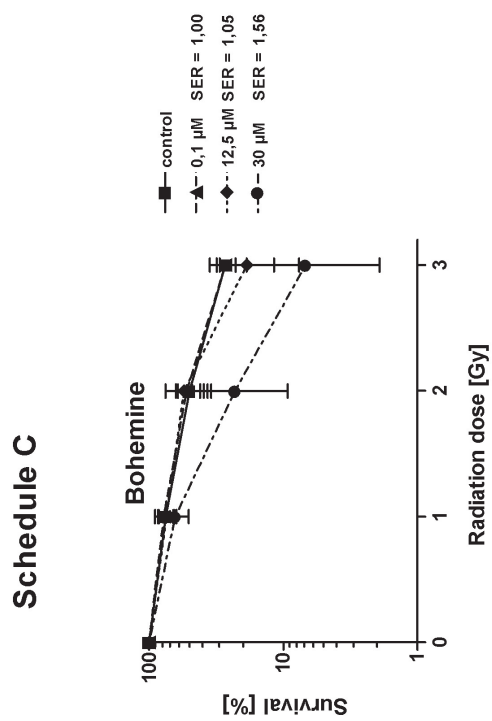


Fig. 2



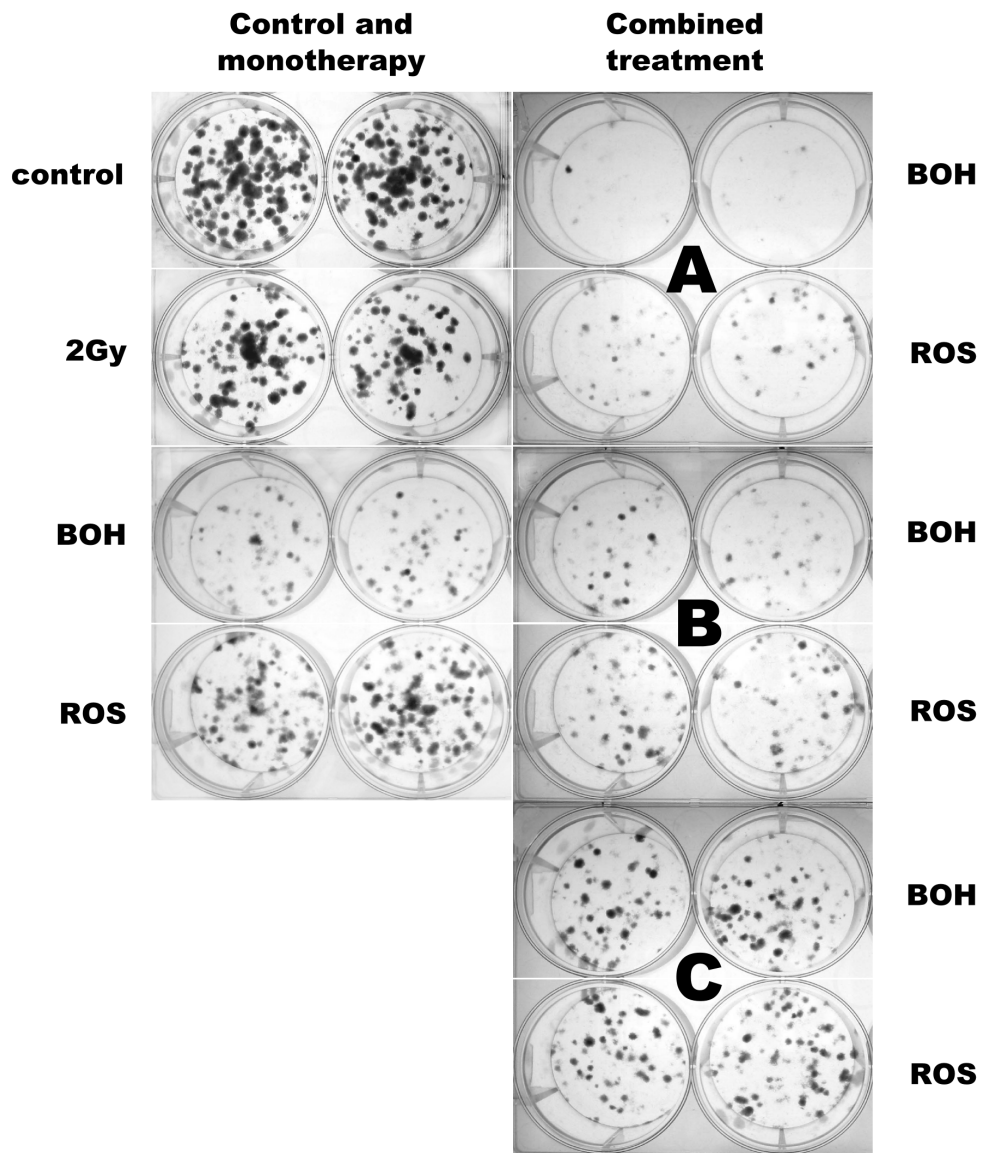


Fig. 4

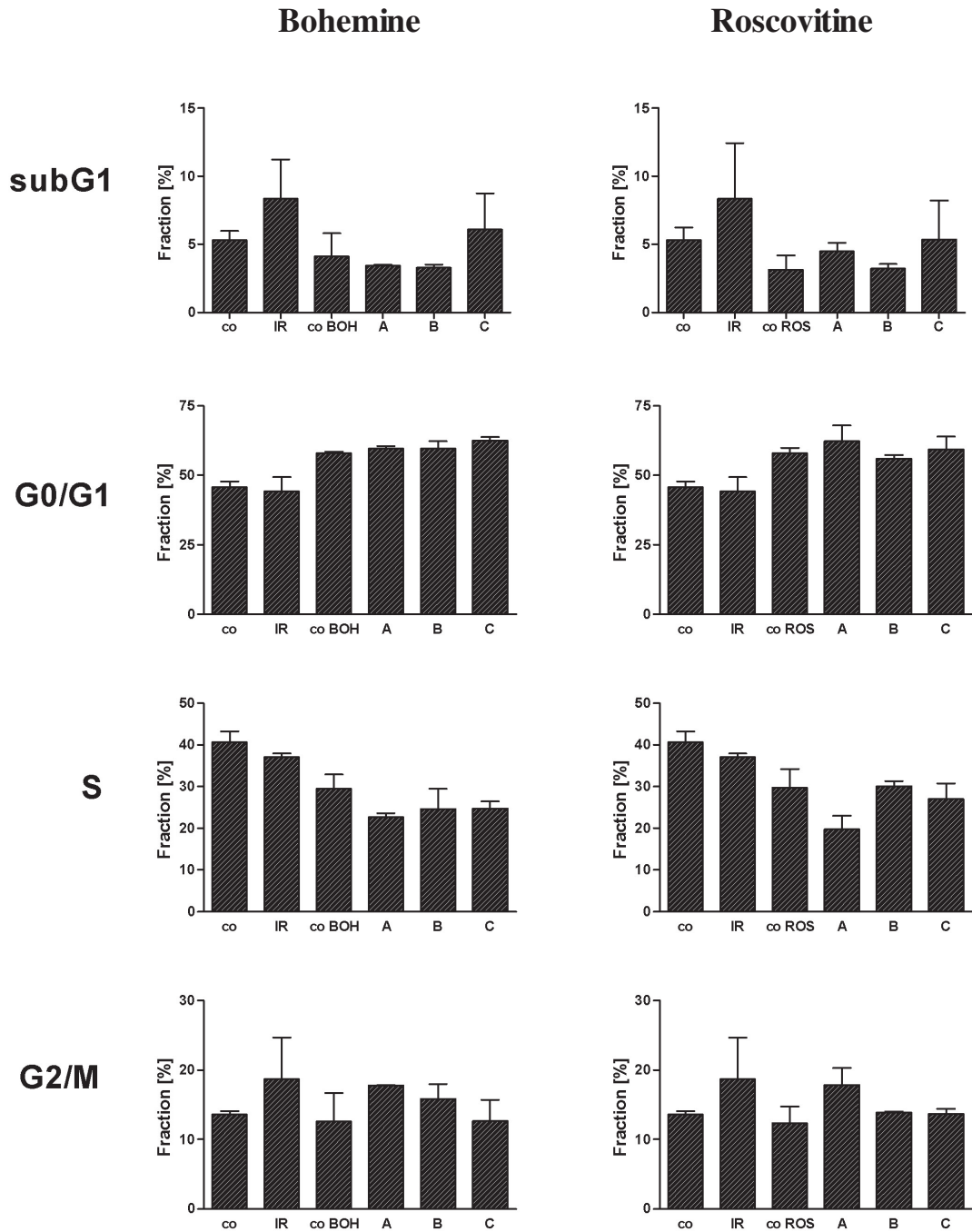


Fig. 5

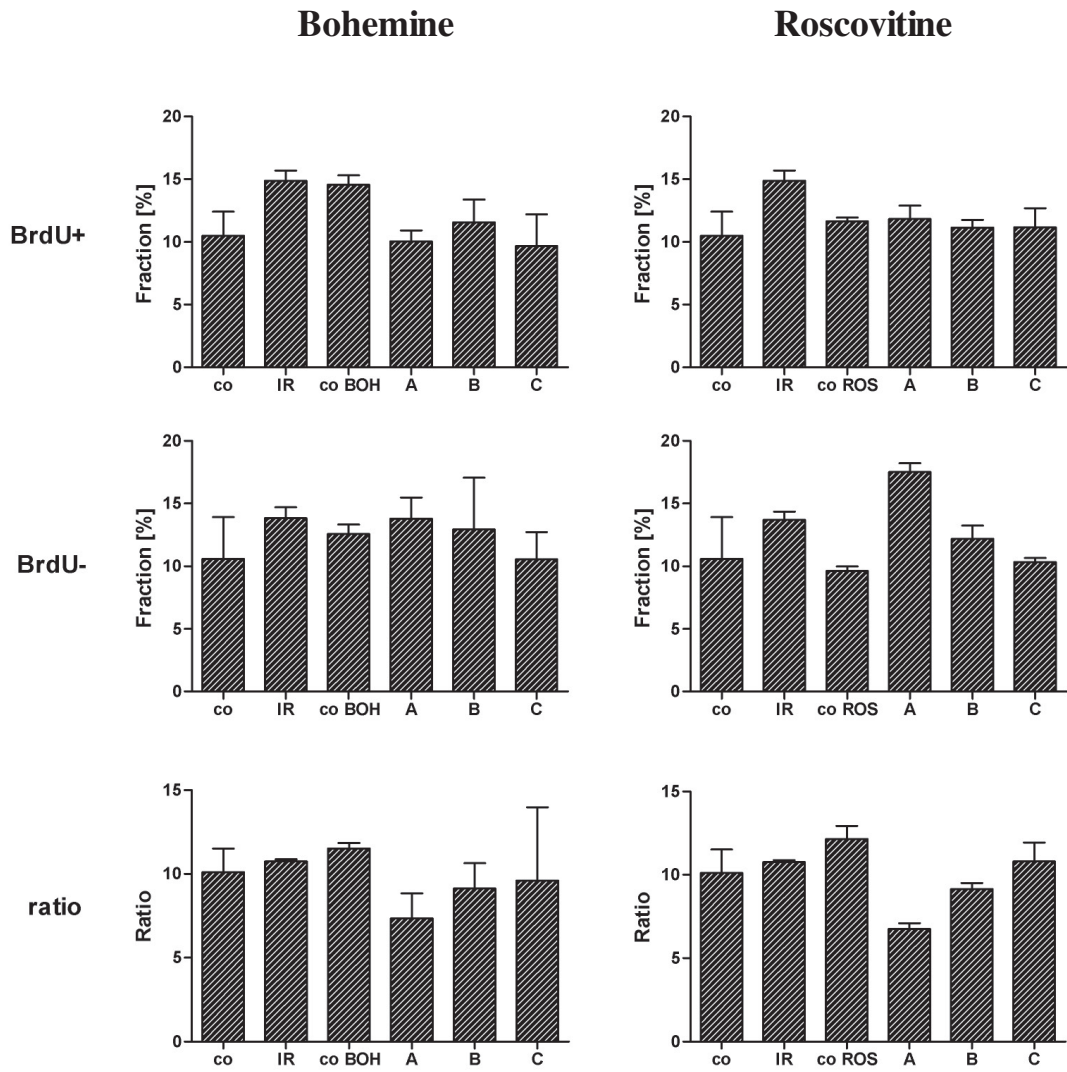


Fig. 6

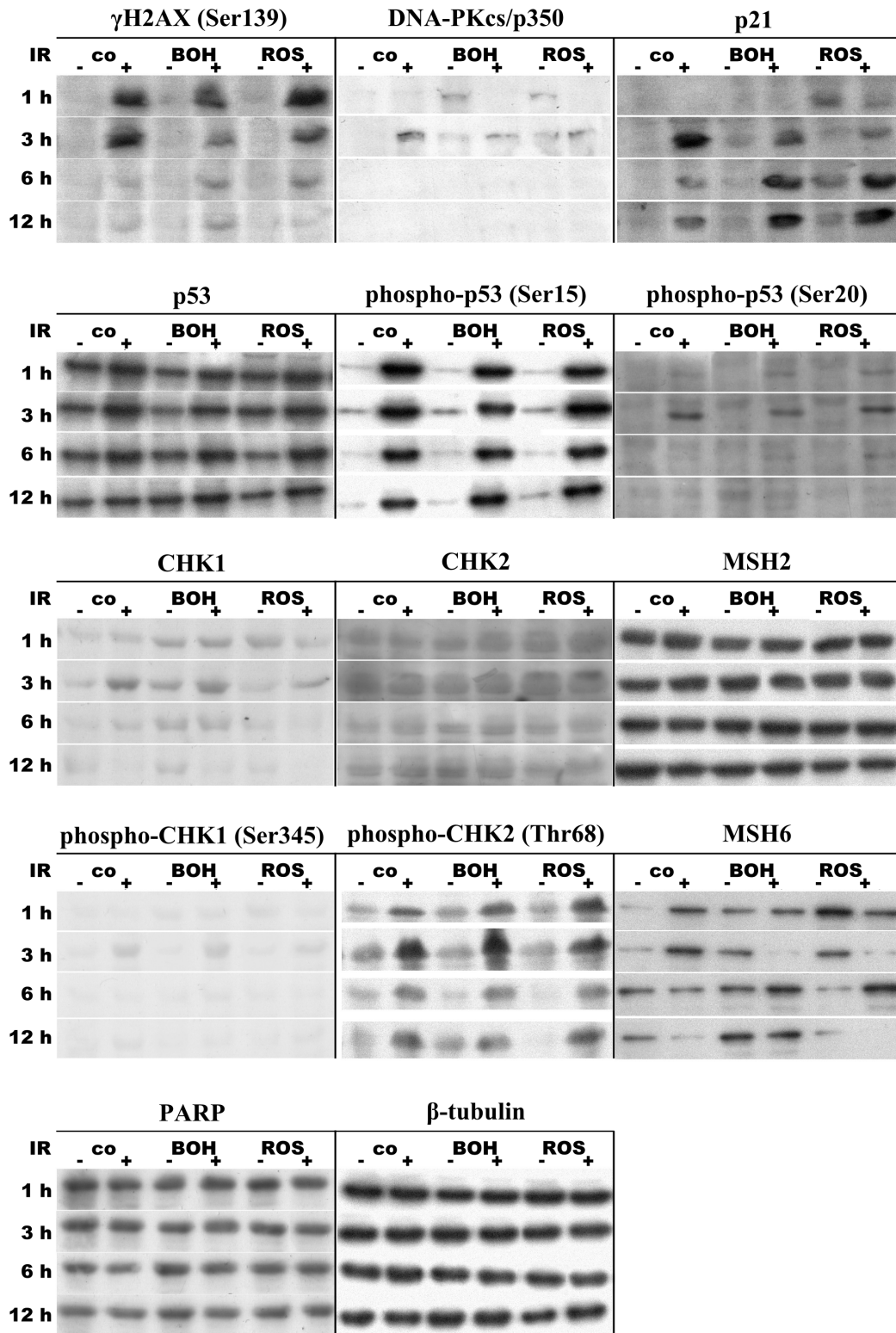


Fig. 7

3. SOUHRN

Inhibitory CDK kináz olomoucín, bohemín a roskovitin původně identifikované jako inhibitory CDK1/2 kinázy inhibují kromě CDK7 kinázy také kinázy CDK5 a CDK9 (Mejjer et al. 1997, Raynaud et al. 2005, Hajdúch et al. 1999a, b). Prostřednictvím inhibice CDK7 a CDK9 kinázy pak inhibují transkripční RNAP II polymerázu (MacCallum et al. 2005, Raynaud et al. 2005, Ljungman et al. 2001). V poslední době se zdá být více než zřejmé, že jevy související s inhibicí RNAP II polymerázy roskovitinem, předcházejí samotné zablokování buněčného cyklu a také že mají přímou souvislost s indukcí apoptózy v nádorových buňkách (Fischer et al. 2005, Wojciechowski et al. 2003).

V projektu č.1 jsme popsali, že se na celkovém antiproliferačním účinku těchto látek podílejí i další jevy, jako je inhibice proteosyntézy, změny v expresi cytoskeletárních bílkovin a inhibice metabolických pochodů, konkrétně glykolýzy. Detailněji, pomocí konvenční dvourozměrné gelové elektroforézy (2-DE) jsme analyzovali buňky CEM T-lymfoblastické leukémie inkubované s BOH ($c=10 \mu\text{M}$) po dobu 0, 6, 9, 12 a 24 hodin. Parametry elektroforetického dělení byly v rozpětí pH 3.5-10 a Mr 8-200 kDa. Za účelem kvantifikace změn v proteinové expresi u jednotlivých vzorků jsme použili multivariační analýzu (PCA-Principal component analysis), která umožňuje komplexní analýzu objemných dat. Z celkového počtu 2000 detekovaných proteinových bodů jsme analyzovali sadu 748 proteinových bodů nalezených vždy na všech zkoumaných gelech. Pomocí PCA analýzy je možné nalézt podobnosti/odlišnosti mezi jednotlivými gely a také nalézt proteinové body (kandidátní biomarkery) charakteristické pro daný typ vzorku. Výsledky této klasifikace nám umožnily jednoznačně odlišit dvě skupiny buněčných lyzátů. Jednu skupinu tvoří buňky inkubované s BOH po dobu 9, 12 a 24 hodin, ve druhé skupině jsou buňky inkubované s BOH po dobu 6 hodin a také kontrolní nepřeléčené buňky odpovídající intervalu 0 a 24 hodin. Tzn., že po 9-ti hodinách inkubace s BOH se podstatným způsobem mění množství detekovaných proteinových bodů. Pomocí PCA analýzy jsme dále vytipovali skupinu typických proteinových bodů, z toho u pěti proteinů byla pomocí metod MALDI-MS (matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry) a ESI-MS/MS (electrospray ionization-tandem MS) provedena identifikace. Mezi identifikovanými proteiny jsou α -enoláza a trisafosfátisomeráza, enzymy účastníci se glykolýzy, dále eukaryotický iniciační faktor 5A, jehož role je v oblasti regulace proteosyntézy. Posledními identifikovanými proteiny jsou α a β podjednotky Rho GDP-disociačního inhibitoru 1, které jsou spojeny se změnami v uspořádání cytoskeletu. V souhrnu řečeno, inkubace CEM T-lymfoblastických buněk s bohemínem zde nebyla asociována s inhibicí CDK kináz, ale vedla k inhibici metabolických pochodů a buněčných funkcí na různých úrovních, což je v podstatě konzistentní s blokadou transkripce a následně i translace (Kovářová et al. 2000).

U bohemínu a roskovitinu bylo popsáno, že prostřednictvím inhibice CDK kináz blokují buněčný cyklus na přechodu G1/S a G2/M fáze a současně zpomalují průběh S fáze cyklu. Synchronizované buňky, jedná se především o buňky zablokované na přechodu G2/M fáze cyklu, by pak mohly velice citlivě reagovat na ozáření. Navíc u buněk s nemutovaným (wild-type) p53 proteinem dochází k jeho stabilizaci a akumulaci v buněčném jádře (David-Pfeuty et al. 2001, Ljungman et al. 2001, Blaydes et al. 2000, Wojciechowski et al. 2003). Protein p53 hraje obecně důležitou roli v odpovědi na poškození DNA, tedy i na poškození vzniklé po ozáření. Možnost hyperstimulace aktivity p53 proteinu při použití roskovitinu v kombinaci se zářením již byla zmíněna dříve (Blaydes et al. 2000, Lu et al. 2001). V kontrastu s touto hypotézou byl popsán *in vitro* i *in vivo* radiosenzitizační účinek roskovitinu u p53 mutované linie MDA-MB231 (Maggiorella et al. 2003). U této práce nebyl definitivně objasněn mechanismus radiosenzitizačních účinků a nebyla zde ani zkoumána možnost změny v uspořádání kombinované terapie. V projektu č. 2 jsme se zabývali možnostmi kombinace antiproliferačních účinků bohemínu a roskovitinu s účinky ionizovaného záření, tedy možnostmi nalezení radiosenzitizačních účinků a to v *in vitro* podmínkách na buněčné linii A549 lidského plicního karcinomu, která nevykazuje žádné delece ani mutace proteinu p53. Studovali jsme celkem tři možná schémata uspořádání kombinované terapie: A-preinkubace, B-současná aplikace a C-postinkubace s CDK inhibitorem. Pro popis cytotoxických/cytostatických účinků jsme použili standardní metodu klonogenních testů. Nejvyšší radiosenzitizační účinky jsme našli u schématu A, tzn. při preinkubaci, kdy byly buňky před ozářením 24 hodin inkubovány s BOH/ROS. Hodnoty senzitivizačních koeficientů $\text{SER}(37\%)$ se pohybovaly v rozmezí od 1.47 do 3.20.

Příčemž i nejnižší testované koncentrace BOH/ROS (0.1/0.1 μM) odpovídající hladině IC_{10} , tedy koncentrace které snižují tvorbu kolonií o pouhých 10 %, vedly k radiosenzitizačnímu účinku s hodnotami $\text{SER}(37\%)$ 1.55/1.47 pro BOH/ROS. U ostatních schémat (schéma B a C) jsme popsali radiosenzitizační účinek pouze při nejvyšších testovaných koncentracích odpovídajících hladině IC_{50} (30/13 μM pro BOH/ROS). Analýza distribuce fází buněčného cyklu odpovídající 24 hodinám po skončení léčby ukázala, že kombinovaná terapie (dávka záření 2 Gy a koncentrace BOH/ROS 12.5/9 μM) vede ke snížení počtu buněk v S fázi cyklu a k nárůstu populace v G2/M fázi, přičemž nejvýraznější redistribuce fází byla právě u preinkubačního schématu A. V časovém intervalu 48 hodin po skončení léčby (schéma A) zůstává hladina S fáze nezměněna a na úkor G2/M fáze cyklu se zvýšilo procento buněk nacházejících se v G0/G1 fázi buněčného cyklu (67,5% / 65,5% pro BOH/ROS). Ve stejném časovém intervalu již kontrolní ozářené buňky i buňky inkubované pouze s BOH/ROS vykazovaly typický profil exponenciálně rostoucích nádorových buněk linie A549 (S fáze 30–37%, G2/M fáze 13–14% a G0/G1 48–58%). Podobná, ačkoliv slabší tendence k tvorbě G1 bloku byla zaznamenána i u schématu B. Analýza subG1 píku ukázala, že změny v G2/M a S fázi cyklu po kombinované terapii nebyly doprovázeny korespondujícím nárůstem počtu apoptotických buněk. Pomocí metody BrdU inkorporace jsme u schématu A zjistili výraznou inhibici DNA oprav pro buňky léčené s BOH/ROS v časovém intervalu 24 hodin po ozáření. Inhibice oprav dvouřetězcových DNA zlomů roskovitinem ($c=5 \mu\text{M}$) 24 hodin po léčbě byla také demonstrována v publikaci Dr. Maggiorelly (**Maggiorella et al. 2003**), kde byla použita metoda PFGE (pulse-field gel electrophoresis). Naše data ukázala, že by inhibice DNA oprav mohla být jedním z hlavních mechanismů radiosenzitizačního účinků boheminu a roskovitinu.

V druhé části projektu č. 2 jsme se zaměřili na popis molekulárních změn souvisejících s radiosenzitizačním účinkem boheminu a roskovitinu, nalezeným v preinkubačním schématu A. S cílem zvýšit pravděpodobnost zachycení molekulárních změn souvisejících s opravami DNA jsme zvýšili dávku záření na 10 Gy, použité koncentrace ROS/BOH byly 9/12,5 μM . Naše data ukázala, že samotný roskovitin a bohemin v monoterapii nezvyšují expresi proteinu p53. Aktivace DNA-PK kinázy (tedy NHEJ dráhy) po inkubaci s oběma látkami ukazuje na vznik dvouřetězcových zlomů. Dr. Maggiorella také prokázal vznik DNA DSBs (micronuclei assay) a aktivaci DNA-PK kinázy roskovitinem ($c=5 \mu\text{M}$) (**Maggiorella et al. 2003**). Pro aktivaci homologní rekombinace (HR), druhého mechanismu oprav DNA DSBs, hovoří snad jen zvýšené množství MSH6 proteinu a slabá indukce CHK1 kinázy, která je přednostně aktivována v reakci na replikační stres buňky. Detailní mechanismus, kterým BOH/ROS indukují vznik DNA dvouřetězcových zlomů, zatím není známý. Naši první hypotézou je, že DNA DSBs pravděpodobně vznikají jako reakce na aberantní průběh replikačního procesu a to buďto díky inhibici CKD2 kinázy nebo kvůli možným kolizím replikační vidlice s neaktivním zablokovaným komplexem RNAP II polymerázy. Je také možné, že RNAP II polymeráza hraje přímou či nepřímou podpůrnou regulační roli i během replikace (**Derheimer et al. 2005**). Druhá naše hypotéza o vzniku DNA DSBs souvisí s faktem, že CDK1 kináza tvoří během mitózy v *in vitro* podmínkách stabilní molekulární komplexy s topoizomerázou $\text{II}\alpha$ a tím ovlivňuje její interakce s molekulami DNA, což může také vést ke vzniku dvouřetězcových zlomů (**Escarquiel et al. 2001, Larsen et al. 2003, Wells NJ et al. 1995**). Inhibice CDK2, popř. CDK1 kinázy je zcela určitě nezbytná pro výsledný efekt, neboť inkubace s inhibitorem RNAP II transkripce 5,6-dichloro-1-b-D-ribofuranosylbenzimidazolem (DRB), inhibitorem CDK7 a CDK9 kináz, nevede k poškození DNA (**Derheimer et al. 2005**). Skutečnost, že roskovitin při koncentraci pod 5 μM inhibuje syntézu jak RNA tak DNA, také podporuje naši hypotézu (**Ljungman et al. 2001, Wojciechowski et al. 2003**). V souhrnu řečeno, bohemin a roskovitin již při velmi nízkých koncentracích zasahují prostřednictvím inhibice CDK kináz 1, 2, 7 a 9 nejen do správného průběhu replikace a transkripce, ale pravděpodobně také inhibují aktivitu topoizomerázy $\text{II}\alpha$, což je doprovázeno vznikem dvouřetězcových zlomů.

Výsledky kombinované terapie v projektu č.2 ukázaly reorganizaci a také inhibici oprav DNA DSBs. U kombinované terapie (BOH/ROS plus záření) byly pozorovány určité změny nebo inhibice oprav DNA DSBs. Ve srovnání s ozářenými buňkami zde byla po preinkubaci s BOH/ROS inhibována DNA-PK kináza (NHEJ), přestože BOH/ROS samy o sobě kinázu aktivují. Na druhé straně kináza CHK2 (HR) vykazovala vyšší aktivitu. Ačkoliv dosud není známa jednoznačná koordinace HR a NHEJ drah mezi sebou (**Lisby et al. 2005, Bernstein et al. 2002**), naše data poukazují na preferenční aktivaci ATM-CHK2

cesty v odpovědi na kombinovanou terapii. Možné vysvětlení této reorganizace vychází z redistribuce fázi buněčného cyklu. Samotný ROS/BOH při těchto koncentracích (9/12.5 μ M) po 24 hodinové inkubaci zvyšuje procento buněk v G2/M fázi cyklu (posun z 11.5 na 18.3/19.6 % pro ROS/BOH) a roskovitin také snižuje S fázi cyklu (posun z 36.5 na 25.6). U boheminu dochází k deceleraci S fáze cyklu později. Těsně po ozáření se také zvyšuje procento buněk v G2/M fázi cyklu (posun z 11.5 na 18.7 %; dávka záření 2Gy) (**zatím nepublikovaná data**). Na základě těchto informací se domníváme, že po ozáření BOH/ROS preinkubovaných buněk vzniká silný G2/M blok, kde, jak už bylo uvedeno v teorii, probíhají opravy DSBs přednostně cestou homologní rekombinace HR.

Inhibice aktivity DNA-PK kinázy související s přítomností silného G2/M bloku byla popsána v případě použití roskovitinu v kombinaci se zářením nebo se subletálními dávkami doxorubicinu (**Maggiorella et al. 2003, Crescenzi et al. 2005**). Fosforylace histonu H2AX pak ukazuje na dlouhodobé opravy DNA DSBs způsobené buďto díky diskutovaným změnám ve vzájemné koordinaci HR a NHEJ systémů nebo díky dalším možným poruchám uvnitř těchto drah. Je možné, že CDK kinázy jsou přímo zapojeny i do odpovědi na poškození DNA. Konkrétně bylo u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* popsáno, že CDK kinázy regulují opravy dvouřetězcových zlomů mechanismem homologní rekombinace (**Aylon et al. 2004**). Navíc Dr. Crescenzi pak prokázal inhibici homologní rekombinace roskovitinem v *in vivo* rekombinačním testu u buněčné linie HeLa lidského karcinomu děložního krkčku (**Crescenzi et al. 2005**).

Silná indukce p21 proteinu v reakci na kombinovanou terapii (projekt č. 2) svědčí jasně pro hyperstimulaci aktivity p53 proteinu, ačkoliv zvýšená exprese p53 proteinu nebyla prokázána. Možné vysvětlení je, že již nejnižší koncentrace BOH/ROS použité v preinkubaci (Schéma A) jsou dostatečné pro zvýšení jaderné akumulace proteinu p53 před ozářením, ačkoliv celkové množství proteinu p53 zůstává nezměněno. U schématu B (současná aplikace) a C (postinkubace) pak k hyperstimulaci dochází pouze při vyšších koncentracích. Silná indukce proteinu p21 pak vede k dlouhotrvajícímu, popř. k trvalému (senescence) G1 bloku (**Kastan et al. 2004, Roninson et al. 2003**). Další možnou alternativou vedle senescence by mohla být mitotická katastrofa – buněčná smrt způsobená abnormálně probíhající mitózou, která obvykle vede ke vzniku velkých buněk obsahujících četná mikrojadérka a nez kondenzovaný chromatin (**Castedo, et al., 2002, Roninson et al. 2003**). Mechanismus radiosenzitizačního účinku roskovitinu na p53 mutovaných buňkách linie MDA-MB231 prsního karcinomu pak zůstává zcela neobjasněn. Dr. Maggiorella (**Maggiorella et al. 2003**) předpokládá, že radiosenzitizační účinek je způsoben inhibicí DNA-PK kinázy (NHEJ) a možný vliv na HR nebyl zkoumán. Byl zde prokázán silný cytostatický účinek (82 % G2/M blok 24 hodin po ozáření) avšak bez indukce apoptózy a to dokonce ani čtvrtý den po skončení léčby. Životaschopnost buněk zde zůstala zachována na hladině 80-95% (**Maggiorella et al. 2003**). Předpokládáme, že kaskády ATM/ATR-CHK1/CHK2-CDC25s a ATM-NBS1-SMC1 v nepřítomnosti p53 proteinu plně kompenzovaly kaskádu ATM/ATR-CHK1/CHK2-p53/MDM2-p21 a také vedly k zablokování buněčného cyklu a že následujícím finálním stavem by mohla být právě buněčná senescence nebo mitotická katastrofa (**Kastan et al. 2004, Roninson et al. 2003**).

Naše výsledky projektu č. 2 jednoznačně ukázaly, že látky bohemin a roskovitin mají velmi silný radiosenzitizační účinek při preinkubaci (schéma A), který je zprostředkován reorganizací/inhibicí oprav DNA DSBs a následným G1 blokem souvisejícím se silnou indukcí proteinu p21 směřujícím pravděpodobně k senescenci.

Co se týče možných chemosenzitizačních účinků inhibitorů CDKs, v nedávné době bylo popsáno, že použití roskovitinu (10 μ M) u buněk přeléčených subletálními dávkami doxorubicinu vede u některých buněčných linií buďto k prohloubení G2/M bloku (buněčná linie HCT116 a H1299) nebo k prohloubení senescence (buněčná linie A549 a HEC1B) (**Crescenzi et al. 2005**). Výsledný efekt byl pak závislý na aktivitě pRb dráhy u konkrétní buněčné linie, její inaktivace vedla k zesílení G2/M bloku a ke snížení tvorby kolonií ve srovnání se samotným doxorubicinem. Naopak aktivní pRb dráha umožnila prohloubení senescence indukované primárně i doxorubicinem a ke zvýšené tvorbě kolonií ve srovnání s doxorubicinem. Bylo zde popsáno, že inkubace s roskovitinem vede k alteracím obou DNA DSBs opravných systémů, tzn. HR i NHEJ. Roskovitin byl zde použit i v kombinaci s etopozidem (buněčná linie H1299 a A549), ukázalo se, že výsledný efekt byl závislý na použité dávce doxorubicinu, která buďto vedla nebo nevedla k inaktivaci Rb proteinu (**Crescenzi et al. 2005**). Roskovitin byl v rámci preklinických studií použit také v kombinaci s docetaxelem, přičemž synergický efekt byl závislý na správné volbě schématu. Kombinace

roskovitin plus docetaxel je v současné době testována v rámci II fáze klinických zkoušek u NSCLC (Fischer et al. 2005). Z našich předběžných, dosud nepublikovaných výsledků týkajících se použití roskovitinu a boheminu v kombinaci s různými typy cytostatik vyplývá, že synergický účinek je dosažen především při kombinaci CDKIs s cytostatiky, jejichž použití vede ke vzniku dvouřetězcových a jednořetězcových DNA zlomů, např. bleomycin, daunorubicin a topotekan. Zřejmě pak ROS/BOH, stejně jako u DNA poškozené ozářením, inhibují opravy DNA. Naše výsledky také jednoznačně podtrhly důležitost správné volby léčebného schématu.

V souhrnu se dá říci, že olomoucín a od něj odvozené sloučeniny bohemin a roskovitin mají vyšší protinádorové účinky než se původně předpokládalo na základě výsledků *in vitro* studií. Zdá se, že schopnosti této skupiny látek brzdit nádorovou proliferaci a indukovat apoptózu zdaleka nespočívá pouze s inhibicí CDK2 kinázy, která v nádorových buňkách umožňuje obnovu funkčnosti G1/S kontrolního bodu. V poslední době do popředí vyvstává fakt, že tyto sloučeniny prostřednictvím inhibice CDK7 a CDK9 kinázy downregulují transkripční aktivitu RNAP II polymerázy a že inhibují DNA opravy, což také nemalou mírou přispívá k celkovým protinádorovým účinkům látek. Celkovou komplexnost účinků těchto látek dokumentují i zmíněné proteomické studie. Radiosenzitizační i chemosenzitizační studie následně podtrhují důležitost volby správného léčebného schématu v případě kombinace inhibitorů CDK kináz se zářením nebo jinými cytostatiky. Všechny zmiňované mechanismy účinků podporují fakt, že vůči těmto látkám jsou senzitivní především proliferující nádorové buňky. Zároveň se zdá, že senescence je vedle možné indukce apoptózy důležitou odpovědí na expozici buněk inhibitorům CDK kináz. Velký potenciál těchto látek coby klinicky používaných léků dokládá fakt, že v současné době probíhá ve Velké Británii II. fáze klinických zkoušek roskovitinu.

4. SUMMARY

The compounds olomoucine, bohemine and roscovitine originally acknowledged as CDK1/2 inhibitors inhibit in addition to CDK7 kinase also CDK5 and CDK9 kinases (Meijer et al. 1997, Raynaud et al. 2005, Hajdúch et al. 1999a, b). Through inhibition of CDK7 and CDK9 they inhibit transcriptional RNAP II polymerase (MacCallum et al. 2005, Raynaud et al. 2005, Ljungman et al. 2001). Recently, it seems more than obvious, that the actions related to the inhibition of RNAP II polymerase by roscovitine precede the blockage of cell cycle itself and that they also are directly related to apoptosis induction in cancer cells (Fischer et al. 2005, Wojciechowski et al. 2003).

In the project no.1 we have shown that the overall anti-proliferative effect of these compounds is also influenced by other phenomenon: inhibition of protein synthesis, changes in expression of cytoskeletal polypeptides and inhibition of metabolic processes, concretely glycolysis. In more detail, using conventional (2-DE) gel electrophoresis we have analysed the CEM T-lymphoblastic cells incubated with BOH ($c=10\mu\text{M}$) for 0, 6, 9, 12 and 24 hours. The parameters for electrophoretic separation were ranging from pH 3.5 to 10 and Mr 8 – 200kDa. PCA (Principal Component Analysis) multivariate analysis was used for quantification of changes in protein expression. The method is useful for complex analysis of large amount of data. From the overall number of 2000 detected protein spots we have analysed 748 protein spots that were found on all examined gels. The PCA analysis can find similarities and differences between individual gels and also find specific spots (candidate biomarkers) that are unique for the given sample types. The results of this classification helped us to identify two groups of cell lysates. One group contains cells incubated with BOH for 9, 12 and 24 hours, the other group contains cells incubated with BOH for 6 hours and also control untreated cells that correspond to the intervals 0 and 24 hours. The results suggest that after 9 hour incubation the number of detected protein spots substantially changes. Using the PCA analysis we have found a group of typical protein spots. From this group five proteins were further identified via the methods MALDI-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-mass Spectrometry) and ESI-MS/MS (Electrospray Ionizing Tandem – MS). Among the identified proteins there were α -enolase and triosephosphate isomerase, enzymes participating in glycolysis and eukaryotic initiation factor 5A, that plays an important role in protein synthesis. The last identified proteins were α and β -subunits of Rho GDP-dissociation inhibitor 1, that are related to the changes in cytoskeletal structure. Finally, the incubation of CEM T-lymphoblastic cells with bohemine was not associated with CDK inhibition but led to inhibition of metabolic processes and cell functions on various levels, which is virtually consistent with blockage of transcription and consequent blockage of translation. (Kovářová et al. 2000).

Bohemine and roscovitine are known to arrest the cell cycle on G1/S and G2/M boundaries via the inhibition of CDKs and also decelerate of S phase development. The synchronised cells, especially those blocked on the G2/M boundary, could sensitively respond to consequent irradiation. Moreover in cancer cells with wild-type p53 protein expression, roscovitine treatment causes stabilisation and nuclear accumulation of this protein (David-Pfeuty et al. 2001, Ljungman et al. 2001, Blaydes et al. 2000, Wojciechowski et al. 2003). Protein p53 generally plays a significant role in response to DNA damage and therefore to damage caused by radiation. Possible hyperstimulation of p53 activity using roscovitine in combination with irradiation was proposed earlier (Blaydes et al. 2000, Lu et al. 2001). In contrast to this hypothesis Dr. Maggiorella (Maggiorella et al. 2003) described the radiosensitising effect of roscovitine using p53 mutated breast cancer MDA-MB231 cell line under *in vitro* and also *in vivo* conditions. The mechanism of radiosensitising action was not completely explained in this work. The possibilities of change in schedule of combined therapy were also not examined.

In project no. 2 we have dealt with the possibility of combining the anti-proliferative effects of bohemine and roscovitine with the effects of ionising radiation, i.e. with looking for radiosensitising effects of the given compounds. The tests were carried out under *in vitro* conditions on A549 human lung carcinoma cell line, which does not exhibit any deletion or mutation of p53 protein. We have studied three possible schedules of combined therapy: A-preincubation, B-concomitant application and C-postincubation with CDK inhibitors. We have used standard method of clonogenic survival assay for description of cytotoxic/cytostatic actions. The highest radiosensitising effect was found in Schedule

A–preincubation, when the cells were incubated with BOH/ROS for 24 hours and then irradiated. The values of sensitising enhancement ratios SER (37%) ranged from 1.47 to 3.20. Whereas the lowest tested concentrations of BOH/ROS (0.1/0.1 μM) corresponding to IC_{10} level, i.e. they decrease the colony formation by mere 10%, led to radiosensitising action with SER(37%) values of 1.55/1.47 for BOH/ROS. In the other used schedules (Schedule B and C) we have found a radiosensitising effect only in the highest tested concentrations on the IC_{50} level (30/13 μM for BOH/ROS). The analysis of cell cycle distribution representing 24 hours after finishing the treatment showed that the combined therapy (dose 2 Gy and concentration of BOH/ROS 12.5/9 μM) led to decrease in number of cells in the S phase of the cell cycle and to growth in the population in G2/M phase. Nevertheless, the most remarkable redistribution occurred in Schedule A. The decreased level of S phase remained on the same level also 48 hours after irradiation and the percentage of cells in G0/G1 phase was increased (67.5 % / 65.5 % for BOH/ROS respectively) at the expense of G2/M phase. In the same time interval the control irradiated cells and the cells treated with BOH/ROS demonstrated the common profile of exponentially growing cancer cell line A549 (S phase 30-37 %, G2/M phase 13-14 % and G0/G1 48-58. Similar, though weaker tendency towards G1 block was observed in Schedule B. The analysis of subG1 peak revealed that the changes in G2/M and S phase of the cell cycle after the combined therapy were not accompanied by corresponding growth in number of apoptotic cells. Using BrdU incorporation assay a strong inhibition of DNA repairs for cells treated with BOH/ROS was found 24 hours after irradiation. Inhibition of DNA double strand break repairs by roscovitine (c=5 μM) 24 hours after treatment was also described in the publication by Dr. Maggiorella (**Maggiorella et al. 2003**) where the PFGE method (pulse-field gel electrophoresis) was used. Our data showed that DNA inhibition could be one of the key mechanisms of radiosensitising effects of bohemine and roscovitine.

In the second part of project no. 2 we focused on description of molecular changes corresponding with radiosensitising effects of bohemine and roscovitine, which were discovered in preincubation Schedule A. The irradiation dose used for immunoblotting (10 Gy) was increased in order to enhance the chances of capturing some of the DNA DSBs repairs. The used concentrations of ROS/BOH were 9/12.5 μM . Our data showed that roscovitine and bohemine alone in monotherapy did not increase expression of p53 protein. Activation of DNA-PK (NHEJ pathway) after incubation with both compounds gave evidence of occurring DNA DSBs. Dr. Maggiorella also showed occurrence of the DNA DSBs (micronuclei assay) and activation of DNA-PK caused by roscovitine (c=5 μM) (**Maggiorella et al. 2003**). The only fact supporting the theory of activation of homologue recombination (HR) – the second mechanism of DNA DSBs repairs - may be the increased amount of MSH6 protein and weak induction of CHK1 kinases, which is preferentially activated in response to replication cell stress. The detailed mechanism by which BOH/ROS might cause DNA DSBs is yet unclear. Our first hypothesis was that DNA DSBs probably arised in a response to aberrant replication process either due to inhibition of CDK2 kinase or due to possible collision of the replication machinery with stalled RNA polymerase complex. It is also possible that RNAII polymerase plays a direct or indirect supporting role in replication (**Derheimer et al. 2005**). The second hypothesis is related to fact, that under *in vitro* conditions during mitosis CDK1 kinase forms stabile molecular complexes with topoisomerase II α , thus leads to altered DNA/topoisomerase interactions and to possible occurrence of DNA DSBs (**Escarquiel et al. 2001, Larsen et al. 2003, Wells NJ et al. 1995**). The inhibition of CDK2 or possibly CDK1 kinase is in all likelihood important for the resulting effect, because incubation with the inhibitor of RNAII polymerase transcription 5,6-dichloro-1-b-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB; inhibitor of CDK7 and CDK9) does not result in DNA damage (**Derheimer et al. 2005**). The fact, that roscovitine at the concentration under 5 μM inhibits RNA as well as DNA synthesis also supports our hypothesis (**Ljungman et al. 2001, Wojciechowski et al. 2003**). Finally bohemine and roscovitine at very low concentrations through the inhibition of CDK1, 2, 7 and 9 alter not only transcription and replication processes, but probably also inhibit activity of topoisomerase II α , all these events lead to occurrence of DNA DSBs.

In the case of combined therapy (BOH/ROS plus irradiation), studied also in project no. 2, some rearrangements/inhibition of DNA DSBs processes were observed. DNA-PK kinase was inhibited compared to irradiation only, although BOH/ROS alone cause its activation. On the other hand CHK2 kinase (HR pathway) exhibited higher activity due to the incubation with the compounds. Though the clear coordination of HR and NHEJ repairs is unknown (**Lisby et al. 2005, Bernstein et al. 2002**), our data suggest

preferential activation of ATM-CHK2 pathway in response to combined therapy. Possible explanation of this re-organisation comes from the redistribution of cell cycle phases. ROS/BOH (9/12.5 μM) themselves increase the percentage of cells in G2/M phase (shift from 11.5% to 18.3/19.6 %) after 24 hours incubation and roscovitine also decreases the S phase (shift from 36.5% to 25.6%). In bohemine the deceleration of the S phase occurs later. Immediately after irradiation the percentage of cells in G2/M phase of the cycle also increases (shift from 11.5 to 18.7%; radiation dose 2 Gy) (**yet unpublished data**). On the bases of this information we believe that immediately after irradiation there occurs a strong G2/M arrest in BOH/ROS preincubated cells, where, as previously suggested in the theory, the repairs of DSBs take place mainly via the homologous recombination (HR) pathway.

Inhibition of DNA-PK activity related to strong G2/M arrest was also described in literature in the case of combination roscovitine with irradiation (**Maggiorella et al. 2003**) and with sub lethal dose of doxorubicine (**Crescenzi et al. 2005**). Phosphorylation of histone H2AX indicates long-lasting DNA DSBs repair after incubation with the compounds. This occurred either due to the rearrangements of DNA DSBs processes or due to possible lesions downstream these pathways. Literature also describes possible role of CDK kinases in regulation of homologous recombination in yeast cells, concretely in *Saccharomyces cerevisiae*, where the CDKs regulate DNA DSBs repair by homologous recombination (**Aylon et al. 2004**). Dr. Crescenzi then demonstrated the inhibition of homologous recombination by roscovitine in *in vivo* recombination test on HeLa cell line of human cervical carcinoma (**Crescenzi et al. 2005**).

Strong induction of p21 in reaction to the combined therapy (project no. 2) gives evidence for hyperstimulation of p53 protein activity, although increased expression of p53 was not shown. The fact can be explained so that even the smallest concentrations of BOH/ROS used in preincubation (Schedule A) are sufficient to increase nuclear accumulation of p53 protein before irradiation, although the overall level of p53 protein is unaffected. On the other hand in Schedules B (concomitant application) and C (postincubation) higher concentrations have to be used to achieve p53 activity hyperstimulation. Strong induction of p21 then leads to long-lasting or possibly permanent G1 arrest (senescence). (**Kastan et al. 2004, Roninson et al. 2003**). Another mechanism would be the mitotic catastrophe-cell death resulting from abnormal mitosis-cell death that results from aberrant mitosis, leading to the formation of the large non-viable cells with several micronuclei containing uncondensed chromosomes (**Castedo, et al., 2002, Roninson et al. 2003**). The mechanism of radiosensitising effect of roscovitine at $c=5 \mu\text{M}$ (but not for $2.5 \mu\text{M}$) on p53 mutated cell-line MDA-MB231 remains unexplained. Dr. Maggiorella believed that the radiosensitising effect is caused by the inhibition of DNA-PK kinase (NHEJ pathway) and possible effect on HR was not studied (**Maggiorella et al. 2003**). Dr. Maggiorella showed strong cytostatic effect (82% G2/M arrest 24 hours after irradiation) however without induction of apoptosis even on the fourth day after finishing the treatment. The viability of treated cells was still 80-95% at this time interval. We presume, that signal cascades ATM/ATR-CHK1/CHK2-CDC25s and ATM-NBS1-SMC1 were able to fully compensate the cascade ATM/ATR-CHK1/CHK2-p53/MDM2-p21 and they also led to cell cycle arrest and that the subsequent and final state should be directly senescence or mitotic catastrophe (**Kastan et al. 2004, Roninson et al. 2003**).

Our results of the project no. 2 clearly demonstrated strong radiosensitising effect of bohemine and roscovitine in the case of preincubation (Schedule A), that is mediated via rearrangements/inhibition of DNA double strand breaks repair with subsequent G1 arrest corresponding with strong induction of p21 protein leading probably to the senescence.

Concerning the possible chemosensitising effects of CDK inhibitors, a recent publication describes that using roscovitine (10 μM) on cells previously treated by sublethal doses of doxorubicine results in deepening of G2/M arrest in some cell lines (cell line HCT116 a H1299) or to deepening of senescence in others (cell line A549 a HEC1B) (**Crescenzi et al. 2005**). The final effect depended on the activity of pRb pathway in specific cell lines. Its inactivation resulted in strengthening of G2/M arrest and to decrease in colony formation compared to doxorubicine itself. On the other hand the active pRb pathway enabled deepening of senescence induced primarily also by doxorubicine and to increased colony formation compared to doxorubicine itself. It has been described that incubation with roscovitine leads to alterations of both DNA DSBs repair systems – i.e. HR as well as NHEJ. Roscovitine was used here in combination with etoposide (cell line H1299 and A549). The resulting action depended on the doxorubicine dose which either did or did not lead to Rb protein inactivation (**Crescenzi et al. 2005**). In pre-clinical

trials roscovitine was used also together with docetaxel while the synergistic effect was dependent on correct choice of application schedule. The combination of roscovitine and docetaxel is currently tested in the phase II of clinical trials in NSCLC (**Fischer et al. 2005**). Our preliminary unpublished results on usage of roscovitine and bohemine in combination with various types of cytostatic drugs show that the synergistic effect is achieved mainly in combination with CDKIs with cytostatic drugs which cause single and double strand DNA breaks – e.g. bleomycin, daunorubicin and topotecan. Possibly BOH/ROS inhibit the DNA repairs in the same way as with irradiation. Our results unambiguously stress the importance of correct choice of treatment schedule.

We can say that olomoucine and its derived compounds bohemine and roscovitine have higher anticancer effect than was previously expected from the results of *in vitro* studies. It seems that ability of these compounds to hinder tumour proliferation and induce apoptosis is related not only to the inhibition of CDK2 kinases, which renews the functionality of G1/S checkpoint in cancer cells. Recent studies suggest that these compounds via inhibition CDK7 and CDK9 downregulate the transcription activity of RNAP II polymerase and also inhibit DNA repairs, which also aids in the overall anticancer efficiency. The complexity of effects of these compounds is also illustrated by the cited proteomic study. Radiosensitising and chemosensitising studies consequently stress the importance of careful choice of suitable treatment schedule in combination of synthetic inhibitors of CDKs with irradiation or with other chemotherapeutics. All described mechanisms of action support the fact, that it must be the proliferating cancer cells that are sensitive to these compounds. At the same time it seems that senescence may be apart from apoptosis induction also an important response to cell exposure to synthetic CDK inhibitors. The great potential of these compounds as clinically useful drugs is also supported by the fact that currently the second phase of clinical trials of roscovitine is taking place in the Great Britain.

5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Aylon Y, Liefshitz B, Kupiec M. The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle. *EMBO J* 2004;23(24):4868–4875.

Bartkova J, Horejsi Z, Koed K et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 2005;434:864-870.

Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Garewal H. DNA repair/pro-apoptotic proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutation Research* 2002;511:145-178.

Blaydes JP, Craig AL, Wallace M, et al. Synergistic activation of p53-dependent transcription by two cooperating damage recognition pathways. *Oncogene* 2000;19:3829-3839.

Bortner DM and Rosenberg MP. Induction of mammary gland hyperplasia and carcinomas in transgenic mice expressing human cyclin E *Mol Cell Biol* 1997;17:453-459.

Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Kroemer G. Cyclin-dependent kinase-1: linking apoptosis to cell cycle and mitotic catastrophe. *Cell Death and Differentiation* 2002;9:1287-1293.

Clarke DJ, Gimenez-Abian JF. Checkpoints controlling mitosis. *Bioessays* 2000;22:351- 363.

Crescenzi E, Palumbo G, Brady HJM. Roscovitine modulates DNA repair and senescence: Implications for combination chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005;11(22):8158-8171.

Curran WJ. New chemotherapeutic agents: update of major chemoradiation trials in solid tumors. *Oncology* 2002;63 Suppl 2:29-38.

David-Pfeuty T, Nouvian-Dooghe Y, Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdun D. Common and reversible regulation of wild-type p53 function and of ribosomal biogenesis by protein kinases in human cells. *Oncogene* 2001;20:5951-5963.

De Azavedo WF, Leclerc S, Meijer L, Havlicek L, Strnad M, Kim SH. Inhibition of cyclindependent kinases by purine analogues. Crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur J Biochem* 1997;243:518-526.

Derheimer FA, Chang C, Ljungman M. Transcription inhibition: A potential strategy for cancer therapeutics. *European Journal of Cancer* 2005;41:2569-2576.

Drexler HG. Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes p15, p16, p18 and p19 in human leukemia-lymphoma cells. *Leukemia* 1998;12:845-859.

Eckschlager T, et al. Průtoková cytometrie v klinické praxi. Grada Publishing 1999.

Escarquiel AE, Plisov SY, Skladanowski A, Borgne A, Meijer L et al. Recruitment of cdc2 kinase by DNA topoisomerase II is coupled to chromatin remodeling. *FASEB J* 2001;15:2288-2290.

Eshleman JS, Carlson BL, Mladek AC, Kastner BD, Shide KL, Sarkaria JN. Inhibition of the mammalian target of rapamycin sensitizes U87 xenografts to fractionated radiation therapy. *Cancer Res* 2002;62:7291-7297.

Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A. H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair* 2004;8-9:959-67.

Fischer PM, Gianella-Borradori A. Recent progress in the discovery and development of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs* 2005;14(4):457-477.

Gallo RC, Whang-Peng J, Perry S. Isopentenyl-adenosine stimulates and inhibits mitosis of lymphocytes treated with phytohemagglutinin. *Science* 1969;165:400-402.

Grace JT, Hakal MT, Hall RM, Blakeslee J. N6-Substituted adenine derivatives as growth inhibitors of human leukemic myeloblasts and S-180 cells. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1967;8:23-27.

Grana X, Reddy P. Cell cycle control in mammals: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor gene and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Blood* 1995;11:211-219.

Green S, MacCallum DE, Fleming IN et al. The mode of action of CYC202 (Roscovitine) a cyclin dependent kinase inhibitor currently in Phase II clinical trials. *Eur J Cancer* 2004;2(Suppl.8):126.

Hajduch M, Kolar Z, Novotny R, Hanus J, Mihal V, Hlobilkova A, Noskova V, Strnad M. Induction of apoptosis and regression of spontaneous dog melanoma following *in vivo* application of synthetic cyclin-dependent kinase inhibitor olomoucine. *Anti-Cancer Drugs* 1997a;8:1007-1013.

Hajduch M, Noskova V, Havlicek L, Feketova G, Gojova L, Michalek T, Novotny R, Krystof V, Kotala V, Vesely J, Strnad M, Mihal V. Olomoucine-derived synthetic cdk inhibitors: the mechanism of apoptotic death of tumor cells and *in vivo* antitumor activity. *In: In: Cell Cycle Therapeutics. The Conference held on November 6-7, 1997b, Washington, DC, USA. Book of Abstracts.* Published by International Business Communications (225 Turnpike Road, Southborough, MA 01772-1749, USA).

Hajduch M, Noskova V, Feketova G, Novotny R, Jess K, Gojova L, Kasperek I, Krystof V, Vesely J, Strnad M, Mihal V. Olomoucine derived synthetic cyclin dependent kinase inhibitors – New generation of potent anti-cancer drugs. *Leukemia* Vol. 12, No.2, 1998, p.268.

Hajduch M, Havlicek L, Vesely J, Novotny R, Mihal V, Strnad M. Synthetic cyclin dependent kinase inhibitors. New generation of potent anti-cancer drugs. *Adv Exp Med Biol* 1999a;457:341-353.

Hajduch M, Havlicek L, Vesely J, Novotny R, Strnad M, Mihal V. Synthetic cyclin dependent kinase inhibitors. *In: Pieters R, Veerman A, Kaspers GJL (Eds.): Drug Resistance in Leukaemia and Lymphoma, Advances in Experimental Medicine and Biology, Kluwer Academic/Plenum Press, New York, 1999b, 341-353.*

Havlicek L, Hanus J, Vesely J, Leclerc S, Meijer L, Shaw G, Strnad M. Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *J Med Chem* 1997;40:1997:408-412.

Choy H, Rodrigues FF, Koester S, et al. Investigation of taxol as a potential radiation sensitizer. *Cancer* 1993;71(11):3774-3778.

Jones R, Grace JT, Mittelman A, and Woodruff MW. Human pharmacology and initial clinical trial of isopentenyl adenosine (iPA). *Proc Am Assoc Cancer Res* 1968;9:35.

Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 2004;432:316-323.

- Khanna KK. Cancer risk and the ATM gene: a continuing debate. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:795-802.
- Knockaert N, Greengard P, Meier L. Pharmacological inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:417 – 425.
- Kobayashi J, Antocchia A, Tauchi H et al. NBS1 and its functional role in the DNA damage response. *DNA Repair* 2004;3(8-9):855-61.
- Kovarova H, Hajduch M, Korinkova G, Halada P, Krupickova S, Gouldsworthy A, Zhelev N, Strnad M. Proteomics approach in classifying the biochemical basis of the anticancer activity of the new olomoucine-derived synthetic cyclin-dependent kinase inhibitor, bohemine. *Electrophoresis* 2000;21:3757-3764.
- Kovarova H, Halada P, Man P, Dzubak P, Hajduch M. Application of proteomics in the search for novel proteins associated with the anti-cancer effect of the synthetic cyclin-dependent kinases inhibitor, bohemine. *Technology in Cancer Research&Treatment* 2002;1(4):247-256.
- Krystof V, Lenobel R, Havlicek L, Kuzma M, Strnad M. Synthesis and biological activity of olomoucine II, *Bioorg Med Chem Lett* 2002;18:3283-3286.
- Larsen AK, Escarquié AE, Skladanowski A. From DNA damage to G2 arrest: the many roles of topoisomerase II. *Prog Cell Cycle Res* 2003;5:295-300.
- Lees-Miller SP and Meek K. Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie* 2003;
- Lisby M, Barlow JH, Burgess RC, Rothstein R. Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* 2004 Sep 17;118(6):699-713.
- Lisby M, Rothstein R. Localization of checkpoint and repair proteins in eukaryotes. *Biochimie* 2005;87:579-589.
- Ljungman M, Paulsen MT. The cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine inhibits RNA synthesis and triggers nuclear accumulation of p53 that is unmodified at ser15 and lys383. *Mol pharmacol* 2001;60:785-789.
- Ljungman M, Lane DP. Transcription-guarding the genome by sensing DNA damage. *Nat Rev Cancer* 2004;4(9):727-737.
- Lu W, Chen L, Peng Y. et al. Activation of p53 by roscovitine-mediated suppression of MDM2 expression. *Oncogene* 2001;20:3206-3216.
- Lukas J, Lukas C, Bartek J. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA repair* 2004;3:997-1007.
- MacCallum DE, Melville J, Frame S, et al. Seliciclib (CYC202, R-Roscovitine) induces cell death in multiple myeloma cells by inhibition of RNA polymerase II-dependent transcription and down-regulation of Mcl-1. *Cancer Res* 2005;65(12):5399-5407.
- Maggiorella L, Deutsch E, Frascogna V, et al. Enhancement of radiation response by roscovitine in human breast carcinoma in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2003;63:2513-2517.
- Machacek J, Cwiertka K. *Základy radiační a klinické onkologie*. Vydavatelství UP Olomouc;Olomouc 1996.

Maude SL, Enders GH. Cdk inhibition in human cells compromises Chk1 function and activates a DNA damage response. *Cancer Res* 2005;65(3):780-786.

McClue SJ, Blake D, Clarke R et al. *In vitro* and *in vivo* antitumor properties of the cyclin dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine). *Int J Cancer* 2002;102:463-468.

McGaw B A, Burch L R. Cytokinin biosynthesis and metabolism. In: Davies, P.J. (Ed.): *Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, 98-117. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995.

Meijer L, Borgne A, Mulner O, et al. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem* 1997;243:527-536.

Mittelman A, Evans JT, Chheda GB. Cytokinins as chemotherapeutic agents. *Ann N Y Acad Sci* 1972;15:225-23.

Momand J et al. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res* 1998;26:3453-3459.

Morgan DO. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997;13:261-291.

Motoyama N and Naka K. DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Current Opinion in Genetics and Development* 2004;14:11-16.

de la Motte S, Gianella-Borradori A. Pharmacokinetic model of R-roscovitine and its metabolite in healthy male subjects. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2004;42(4):232-9.

Murray AW. Recycling the cell cycle: Cyclins revisited. *Cell* 2004;116: 221-234.

Nasmyth K. Viewpoint: Putting the cell cycle in order. *Science* 1996;274:1643-1645.

Naumann U, Weit S, Rieger L, et al. p27 modulates cell cycle progression and chemosensitivity in human malignant glioma. *Biochem and Biophys Res Communications* 1999;261:890-896.

Niero A, Emiliani E, Monti G, et al. Paclitaxel and radiotherapy: Sequence-dependent efficacy-a preclinical model. *Clin Cancer Res* 1999;5(8):2213-2222.

Olive PL, Banath JP. Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2004;58(2):331-335.

Parker CW, Wilson M, Letham DS, Cowley DE, MacLeod JK. Inhibitors of two new enzymes which metabolize cytokinins. *Phytochem* 1986; 25:303-310.

Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V et al. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology* 2000;10:886-895.

Pierga JY, Faivre S, Vera K et al. A phase I and pharmacokinetic (PK) trial of CYC202, a novel oral cyclin dependent kinase (CDK) inhibitor, in patients (pts) with advanced solid tumors. *Proc Amer Soc Clin Oncol* (2003) 22:210 (Abstrakt 840).

Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, et al. Expression of cell-cycle regulators p27Kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nature Med* 1997;3:222-225.

Raynaud FI, Nutley BP, Goddard PM et al. Antitumour activity and oral bioavailability of the cyclin dependent kinase (CDK) inhibitor roscovitine. *Proc. NCI-EORTC-AACR Symp.* (2000) (Abstrakt 317).

Raynaud FI, Whittaker SR, Fischer PM, et al. In vitro and in vivo pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships for the trisubstituted aminopurine cyclin-dependent kinase inhibitors olomoucine, boheminine and CYC202. *Clin Cancer Res* 2005;11(13):4875-4888.

Roninson IB. Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Research* 2003;63:2705-2715.

Rosypal S. Úvod do molekulární biologie. Vydavatel Rosypal S. 1997, Brno.

Rousseau D, Cannella D, Boulaire J, et al. Growth inhibition by CDK-cyclin and PCNA binding domains of p21 occurs by distinct mechanisms and is regulated by ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene* 1999;30:4313-4325.

Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989, N.Y.

Sewing A, Burger C, Brusselbach S, et al. Human cyclin D1 encodes a labile nuclear protein whose synthesis is directly induced by growth factors and suppressed by cyclic AMP. *J Cell Sci* 1993;104:545-555.

Shapiro GI et al. The physiology of p16(INK4A)- mediated G1 proliferative arrest. *Cell Biochem Phys* 2000;33:189-197.

Sherr CJ. *Cancer Cell Cycles*. *Science* 1996;274:1672-1677.

Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999;13:1501-1512.

Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell* 2004;116:235-246.

Schulze-Gahmen U, Brandsen J, Jones H D, Morgan DO, Meijer L, Vesely J, Kim SH: Multiple modes of ligand recognition: Crystal structures of cyclin-dependent protein kinase 2 in complex with ATP and two inhibitors, olomoucine and isopentenyladenine. *Proteins: Structure, function, and genetics* 1995;22:378-391.

Skalnikova H, Halada P, Dzubak P, Hajduch M, Kovarova H. Protein fingerprints of anti-cancer effects of cyclin-dependent kinase inhibition: Identification of candidate biomarkers using 2-D liquid phase separation coupled to mass spectrometry. *Technology in cancer research and treatment* 2005;4:1-8.

Skoog F, Armstrong DJ. Cytokinins *Annu Rev Plant Physiol* 1970;21:359-384.

Slak D, Simpson CL, Minich E. Toxicological and antiproliferative effects of N⁶-(2-isopentenyl)adenosine, a natural component of mammalian transfer RNA. *Cancer Res* 1970;30:1429-1439.

Smits V, Medema RH. Checking out the G2/M transition. *Biochim. Biophys. Acta* 2001;1519:2-18.

- Steel GG. Basic clinical radiobiology. Edward Arnold Publishers; Great Britain 1993. ISBN 0-340-60144-2
- Stewart Z and Pietenpol JA. p53 signaling and cell cycle checkpoints. *Chem Res Toxicol* 2001;14:243-263.
- Stewart Z, Westfall MD, Pietenpol JA. Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy. *Trends in Pharmacological Sciences* 2003;24:139-145.
- Strauss M, Lukas J, Bartek J. Unrestricted cell cycling and cancer. *Natur Medicine* 1995;1:1245-1246.
- Styskalová L, Noskova V, Janostakova A, Radova L, Cwierka K, Mihal V, Hajduch M. Cytotoxická aktivita boheminu *in vitro* na primárních nádorových buňkách. *Klinická Farmakologie a Farmacie* 2006 (v recenzním řízení).
- Suk D, Simpson CL, Minich E. Antitumor and toxicologic effects of N6-(2-isopentenyl)adenosine (iPA). *Proc Am Assoc Cancer Res* 1968;9:69-74.
- Swanton C. Cell-cycle targeted therapies. *The Lancet Oncology* 2004;5:27-36.
- Travnicek Z, Malon M, Biler M, Hajduch M, Broz P, Dolezal K, Holub J, Krystof V, Strnad M. Synthesis, characterization and biological activity of two nickel(II) complexes with 6-(2-chlorobenzylamino)purine. *Transition Metal Chemistry* 2000;25:265-269.
- Vesely J, Havlicek L, Strnad M, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur J Biochem* 1994; 224:771-786.
- Wang H, Wang M, Wang H et al. Complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM and DNA-PK in human cells exposed to ionising radiation and treated with kinase inhibitors. *Journal of Cellular Physiology* 2005;202:492-502.
- Wang TC, et al. Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice. *Nature* 1994;369:669-671.
- Wells NJ, Hickson ID. Human topoisomerase II alpha is phosphorylated in a cell-cycle phase-dependent manner by a proline-directed kinase. *Eur J Biochem* 1995;231(2):491-497.
- White JD, Cassidy J, Twelves C et al. A phase I trial of the oral cyclin dependent kinase inhibitor CYC202 in patients with advanced malignancy. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2004:Abstrakt 3042.
- Wojciechowski J, Horky M, Gueorguieva M, Wesierska-Gadek J. Rapid onset of nucleolar disintegration preceding cell cycle arrest in roscovitine-induced apoptosis of human MCF-7 breast cancer cells. *Int J Cancer* 2003;106:486-495.
- Xu HJ, Zhou Y, Ji W, et al. Reexpression of the retinoblastoma protein in tumor cells induces senescence and telomerase inhibition. *Oncogene* 1997;15:2589-2596.
- Zachos G, Rainey MD, Gillespie DAF. CHK1-dependent S-M checkpoint delay in vertebrate cells is linked to maintenance of viable replication structures. *Moll Cell Biol* 2005;25:563-574.
- Zanelli GD, Quaia M, Robieux I, et al. Paclitaxel as a radiosensitiser: A proposed schedule of administration based on *in vitro* data and pharmacokinetic calculations. *European Journal of Cancer* 1997;33(3):486-492.

Zheng L, Lee WH. The retinoblastoma gene: a prototypic and multifunctional tumor suppressor. *Exp Cell Res* 2001;264:2-18.

Zhou B, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000;408:433-439.

6. PŘEHLED PUBLIKACÍ AUTORA

Původní a přehledové práce

Práce vztahující se k tématu dizertační práce jsou označeny *

*1. Hajdúch M, Nosková V, Novotný R, **Feketová G**, Gojová L, Kašpárek I, Havlíček L, Strnad M, Veselý J. Mechanismus protinádorového účinku syntetických inhibitorů cyklin-dependentních kináz odvozených od olomoucínu. (Mechanisms of anti-cancer activity of olomoucine derived synthetic cyclin dependent kinase inhibitors). Farmakologický Zpravodaj 1998;12:15-16.

ISSN: 1211-166X

2. Mihál V, Hajdúch M, Nosková V, **Feketová G**, Jess K, Gojová L, Kašpárek I, Starý J, Blažek B. Differential antileukemic activity of prednisolone and dexamethasone in freshly isolated leukemic cells. In: Pieters, R., Veerman, A., Kaspers, GJL (Eds.): Drug Resistance in Leukaemia and Lymphoma, Advances in Experimental Medicine and Biology, Kluwer Academic/Plenum Press, New York, 461-471, 1999

ISSN: 0065-2598 IF(1999): 0.635

3. Mihál V, Hajdúch M, Nosková V, **Feketová G**, Jess K, Gojová L, Kašpárek I, Starý J, Blažek B, Pospíšilová D, Novák Z. Differential antileukemic activity of prednisolone and dexamethasone in freshly isolated leukemic cells. Adv Exp Med Biol 1999;457:461-71.

*4. Kovářová H, Hajdúch M, **Kořínková G**, Halada P, Krupičková S, Gouldsworthy A, Zhelev N, Strnad M. Proteomics Approach in Classifying the Biochemical Basis of the Anticancer Activity of the New Olomoucine-Derived Synthetic Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor, Bohemine. Electrophoresis 2000;21:3757-3764

ISSN: 0173-0835 IF(2001): 3.385

5. Žaloudík J, Hajdúch M, Vyzula R, Kiss I, Coufal O, Kocáková I, Nosková V, Orel M, **Feketová G**, Kuzmina G, Vomela J, Janíček P. Výsledky MTT testů chemorezistence u karcinomu plic, kolorekta a sarkomů měkkých tkání. (Results of the MTT chemoresistance testing in carcinomas of lung, colon and rectum and soft tissue sarcomas). Klinická onkologie 2000;2:37-38.

ISSN: 0862-495X

6. Ludková A, Hajdúch M, Nosková V, Žaloudík J, Král V, Klein J, Stehlík D, **Feketová G**, Trojanec R, Gojová L, Džubák P, Kašpárek I, Bražinová S, Mihál V, Cwiertka K, Kolek V, Šafářová M, Janošťáková A, Pilka R, Kouzmina G, Kala M. Průměrné hodnoty *in vitro* chemosensitivit pro jednotlivá protinádorová léčiva u nádorů rozdílného histogenetického původu. (Mean values of *in vitro* chemosensitivities in tumors of different histogenetic origin to individual anti-cancer drugs). Klinická onkologie 2000;2:33-36.

ISSN: 0862-495X

7. Vietor I, Vadivelu SK, Wick N, Hoffman R, Cotton M, Seiser C, Fialka I, Wunderlich W, Haase A, **Kořínková G**, Brosch G, Huber LA. TIS7 interacts with the mammalian SIN3 histone deacetylase complex in epithelial cells. EMBO J 2002;21(17):4621-31.

ISSN: 0261-4189 IF(2002): 10.698

8. Nosková V, Džubák P, Kuzmina G, Ludková A, Stehlík D, Trojanec R, Janošťáková A, **Kořínková G**, Mihál V, Hajdúch M. In vitro chemoresistance profile and expression/function of MDR associated proteins in resistant cell lines derived from CCRF-CEM, K562, A549 and MDA MB 231 parental cells. Neoplasma 2002;49(6):418-25.

ISSN: 0862-495X

9. Šarek J, Džubák P, Klinotová E, Nosková V, Křeček V, **Kořínková G**, Thomson JO, Janošťáková A, Wang S, Parsons S, Fischer PM, Zhelev N, Hajdúch M. New lupane derived compounds with Pro-Apoptotic activity in cancer cells: Synthesis and structure – activity relationships. *Journal of Medicinal Chemistry* 2003;46(25):5402-5415.

ISSN: 0022-2623 IF(2002): 4.566

10. Urban M, Šarek J, Klinot J, **Kořínková G**, Hajdúch M. Synthesis of A-seco derivatives of betulinic acid with cytotoxic activity. *Journal of Natural Products* 2004;67(7):1100-1105.

ISSN: 0163-3864 IF(2003): 1,849

11. Janků F, Srovnal J, **Kořínková G**, Petruželka L, Matouš B, Hajdúch M. Detekce minimální residuální choroby v kostní dřeni pacientek s časným karcinomem prsu technikou kvantitativní RT-PCR v reálném čase pro karcinoembryonální antigen (Detection of minimal residual disease in the bone marrow of early breast cancer patients using quantitative Real-Time RT-PCR for carcinoembryonic antigen). *Klinická onkologie* 2005;19(1):15-18.

ISSN: 0862-495X

*12. Kořínková G, Cwierka K, Paprskářová M, Džubák P, Hajdúch M. The radiosensitising effect of synthetic cyclin-dependent kinase inhibitors derived from olomoucine. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 2006; v recenzním řízení.

ISSN: 0360-3016 IF(2006): 4,556

Abstrakta

1. Hajdúch, M., Nosková, V., **Feketová, G.**, Novotný, R., Jess, K., Gojová, L., Kašpárek, I., Kryštof, V., Veselý, J., Strnad, M., Mihál, V.: Olomoucine derived synthetic cyclin dependent kinase inhibitors - New generation of potent anti-cancer drugs. *Leukemia*, Vol. 12, No.2, 1998, p.268.

2. Mihál, V., Hajdúch, M., Nosková, V., **Feketová, G.**, Jess, K., Gojová, L., Kašpárek, I., Starý, J., Blažek, B.: Lack of correlation of antileukemic activity of prednisolone and dexamethasone in freshly isolated leukemic cells. *Leukemia*, Vol. 12, No.2, 1998, p.281.

3. Orel, M., Hajdúch, M., Nosková, V., **Feketová, G.**, Gojová, L., Trojanec, R., Bražinová, S., Kouzmina, G.: Analýza in vitro lékové rezistence. (Analysis of in vitro drug resistance.) *Biologické dny*, 3. - 9. září, 1999, České Budějovice, Česká republika. Main topic: Tumour and normal cells. Abstracts., 106, 1999.

4. **Feketová, G.**, Hajdúch, M., Cwiertka, K., Šafářová, M.: Kombinované účinky syntetických inhibitorů cyklín dependentních kináz. (Combined effects of synthetic cyclin dependent kinase inhibitors.) *Biologické dny*, 3. - 9. září, 1999, České Budějovice, Česká republika, Main topic: Tumour and normal cells. Abstracts. , 56, 1999.

5. Džubák, P., Hajdúch, M., Bouchal, J., Fajkus, J., Skleničnová, M., Orel, M., Trojanec, R., Bražinová, S., Gojová, L., **Feketová, G.**, Kašpárek, I., Šafářová, M., Janošťáková, A., Kouzmina, G., Tumer, R.: Prognostický význam délky telomer a telomerázové aktivity versus in vitro rezistence u nádorů plic. (Prognostic significance of telomere lengths and telomerase activity versus in vitro drug resistance in lung tumours.) *Biologické dny*, 3. - 9. září, 1999, České Budějovice, Česká republika. Main topic: Tumour and normal cells. Abstracts. , 51, 1999.

6. Nosková V., Cwiertka K., Jess K., Šafářová M., Ludková A., Kouzmina G., Thomson J., **Kořínková G.**, Hajdúch M.: Study of cell cycle alterations and their implication for tumor cell resistance to anti-cancer drugs. 4th international symposia *Leukemia and Lymphoma*, Amsterdam, March 7-10th, 2001, The Netherlands. *Leukemia* 15, 507, 2001.

7. Hajdúch M., Ludková A., Žaloudík J., Král V., Klein J., Stehlík D., **Kořínková G.**, Trojanec R., Gojová L., Džubák P., Kašpárek I., Bražinová S., Cwiertka K., Kolek V., Šafářová M., Janošťáková A., Pilka R., Kouzmina G., Kala M., Mihál V.: Comparison of in vitro drug resistance profiles in lung cancer versus other solid tumors. *Lung cancer* 32, (Suppl. 1), 2001, S59.

8. **Kořínková G.**, Cwiertka K., Paprskářová M., Džubák P., Janošťáková A., Hajdúch M.: Radiosenzitizační účinky syntetických inhibitorů cyklín dependentní kináz odvozených od olomoucínu a jejich mechanismus účinku na buněčný cyklus. (Radiosensitising effects of synthetic cyclin dependent kinases inhibitors derived from olomoucine and their mechanism of action on the cell cycle.) Sborník konference Analytická cytometrie II, s42, 2003.

ISBN: 80-239-0520-1

9. **Kořínková G.**, Cwiertka K., Paprskářová M., Džubák P., Janošťáková A., Hajdúch M.: Radiosenzitizační účinky syntetických inhibitorů cyklín dependentní kináz odvozených od olomoucínu a jejich mechanismus účinku na buněčný cyklus. (Radiosensitising effects of synthetic cyclin dependent kinases inhibitors derived from olomoucine and their mechanism of action on the cell cycle.) Edukační sborník XXVII. Brněnské onkologické dny, s.117, 2003.

ISBN: 80-239-0175-3

10. **Kořínková G.**, Srovnal J., Janošťáková A., Růžková V., Džubák P., Vysloužil K., Duda M., Cwierka K., Beneš P., Hajdúch M.: Možnosti detekce minimální reziduální choroby u pacientů s epiteliálními tumory. (Possibilities of minimal residual disease detection for patients with epithelial tumors.) Edukační sborník XXVIII. Brněnské onkologické dny, s.57, 2004†

11. Janků F., Srovnal J., **Kořínková G.**, Novotný J., Petruželka L., Hajdúch M.: Molekulární detekce okultních nádorových buněk v kostní dřeni pacientek s časnými stádii karcinomu prsu. (Molecular detection of occult cancer cells in bone marrow of patients in early stages of breast carcinoma.) Edukační sborník, XXIX. Brněnské onkologické dny, s.224-229, 2005.

ISBN: 80-86793-05-2

12. Srovnal J., **Kořínková G.**, Vysloužil K., Duda M., Skalický P., Cwierka K., Švébišová H., Gajová B., Hajdúch M.: Předběžné výsledky vyšetření minimální reziduální choroby u kolorektálního karcinomu – korelace s klinicko – patologickými charakteristikami nemoci. (Preliminary results of minimal residual disease examinations in colorectal carcinoma – correlations with clinical and pathology characteristics of the disease.) Edukační sborník, XXIX. Brněnské onkologické dny, s.168, 2005.

ISBN: 80-86793-05-2

13. Skalický P., Vysloužil K., Duda M., Klementa I., Starý L., Hajdúch M., Srovnal J., **Kořínková G.**: Chirurgické aspekty detekce minimální reziduální choroby u kolorektálního karcinomu. (Surgical aspects of minimal residual disease in colorectal carcinoma.) Edukační sborník, XXIX. Brněnské onkologické dny, s.167, 2005.

ISBN: 80-86793-05-2

14. Janků F., **Kořínková G.**, Srovnal J., Kleibl Z., Novotný J., Petruželka L., Matouš B., Hajdúch M.: Detection of breast cancer cells in the bone marrow of early breast cancer patients using quantitative RT PCR for CEA. Journal of Clinical Oncology 23 (16S), June 1, 870s, ASCO Annual Meeting Proceedings, 2005.

ISSN: 0732-183X

15. **Kořínková G.**, Cwierka K., Paprskářová M., Džubák P., Hajdúch M.: The radiosensitizing effect of synthetic cyclin-dependent kinase inhibitors derived from olomoucine. conference Novel targeting drugs and Radiotherapy, Book of abstracts, p.20, June 16th-17th 2005, Toulouse, France.

16. Srovnal J., **Kořínková G.**, Vysloužil K., Duda M., Skalický P., Cwierka K., Švébišová H., Gajová B., Hajdúch M.: Vyšetření minimální reziduální choroby u solidních nádorů. (Minimal residual disease examination in solid tumours.) Sborník abstraktů. Analytická cytometrie III, s. 69-70, 2005

ISBN: 80-239-5155-6

17. Srovnal J., **Kořínková G.**, Švébišová H., Cwierka K., Vysloužil K., Klein J., Švach I., Pilka R., Kala M., Hajdúch M.: Přínos molekulárního vyšetření při objasnění histogeneze metastáz nádorů neznáméh origa. (Contribution of molecular examination in clarification of histogenesis of unknown origin tumor metastasis.) Edukační sborník, XXIX. Brněnské onkologické dny, 11.-13. května 2006, Brno: Masarykův onkologický ústav, 2006, p. 239.

ISBN: 80-86793-06-0

18. Srovnal J., **Kořínková G.**, Švébišová H., Cwierka K., Minařík J., Zlámalová N., Švach I., Stehlík D., Hajdúch M.: Detekce mikrometastatického postižení sentinelových uzlin u karcinomu prsu metodou real-time RT-PCR. (Detection of micrometastatically affected sentinel ganglions in breast carcinoma using real-time RT-PCR.) Edukační sborník, XXIX. Brněnské onkologické dny, 11.-13. května 2006, Brno: Masarykův onkologický ústav, 2006, p. 152.

ISBN: 80-86793-06-0

19. Vysloužil K., Duda M., Klementa I., Skalický P., Starý L., Zbořil P., Cwiertka K., Srovnal J., **Kořínková G.**, Hajdúch M.: Opakované operace a derivační výkony u karcinomu rekta. (Repeated surgeries and derivative operations in rectal carcinoma.) Edukační sborník, XXIX. Brněnské onkologické dny, 11.-13. května 2006, Brno: Masarykův onkologický ústav, 2006, p. 175.

ISBN: 80-86793-06-0

20. Duda M., Vysloužil K., Skalický P., Klementa I., Dlouhý M., Zbořil P., Cwiertka K., Srovnal J., **Kořínková G.**, Hajdúch M.: Opakované resekcce jaterních metastáz u kolorektálního karcinomu. (Repeated resections of liver metastasis in colorectal carcinoma.) Edukační sborník, XXIX. Brněnské onkologické dny, 11.-13. května 2006, Brno: Masarykův onkologický ústav, 2006, p. 177.

ISBN: 80-86793-06-0

Přednášky na konferencích

1. **Feketová, G.**, Jílek, J., Šimek, J.: Stanovení fosforu atomovou absorpční spektroskopií za použití grafitové pece a porovnání s fotometrickou metodou. (Determination of phosphorus by atomic absorption spectroscopy using graphite furnace and comparison with photometric method.) XXXIV. Konference pro technologii a analýzu jedlých tuků a olejů, Třešť, 15. -17. května 1996, Česká republika.

2. **Feketová, G.**, Jílek, J., Šimek, J.: Stanovení fosforu v jedlých tucích metodou AAS s atomizací v grafitové peci. (Determination of phosphorus in edible fats and oils by method AAS with atomization in graphite furnace.) Seminář nové trendy v AAS a analýza biologický materiálů; Olomouc, 16. -18. září 1996, Česká republika.

3. **Feketová, G.**, Hajdúch, M., Nosková, V., Havlíček, L., Gojová, L., Michálek, T., Novotný, R., Kryštof, V., Kotala, V., Veselý, J., Strnad, V., Mihál, V.: Synthetic cyclin-dependent kinase inhibitors induced apoptosis of tumour cells. The 5th Central European Conference of FACS Users, October 5-8, 1997, Pula, Chorvatia.

4. Hajdúch, M., Antálek, P., Drábek, J., Venháčová, J., Gojová, L., **Feketová, G.**, Nosková V., Ambrůzová, Z., Heřmanová, Z., Szotkowská, J., Ordeltová, M., Konečný, O., Mihál, V.: Imunologické a imunogenetické charakteristiky dětí s IDDM (Immunological and immunogenetic characteristics of children with IDDM.) 8. konference českých a slovenských imunologů. 7. - 10. září, 1997, Piešťany, Slovensko.

5. Antálek, P., Hajdúch, M., Venháčová, J., Drábek, J., Gojová, L., **Feketová, G.**, Nosková, V., Ambrůzová, Z., Heřmanová, Z., Budíková, M., Szotkowská, J., Ordeltová, M., Kopečný, O., Mihál, V.: Imunologické a genetické vlastnosti pacientů s IDDM (Immunological and genetic features of IDDM patients.) 1. slovenský pediatrický kongres, 1997, Bratislava, Slovensko.

6. Hajdúch, M., Nosková, V., Havlíček, L., Gojová, L., **Feketová, G.**, Michálek, T., Novotný, R., Kryštof, L., Kotala, V., Veselý, J., Strnad, M., Mihál, V. : Protinádorové účinky syntetických inhibitorů cyklin-dependentní kináz (Anti-cancer activities of synthetic inhibitors of cyclin-dependent kinases.) 43. farmakologické dny, 3. - 5. září, 1997, Košice, Slovensko.

7. Hajdúch, M., Michálek, T., Nosková, V., Kotala, V., Kryštof, V., Novotný, R., Hanuš, J., Kovářová, H., **Feketová, G.**, Gojová, L., Veselý, J., Strnad, M., Mihál, V.: Olomoucine derived synthetic inhibitors of cdk kinases III: The induction of G1/S and G2/M arrest and apoptosis in tumour cells under in vitro and in vivo conditions. Third International Conference on Cell Cycle Therapeutics. November 6-7, 1997, Washington, USA.

8. Hajdúch, M., Nosková, V., **Feketová, G.**, Novotný, R., Jess, K., Gojová, L., Kašpárek, I., Kryštof, V., Veselý, J., Strnad, M., Mihál, V.: Perspektivy klinické aplikace syntetických inhibitorů cyklin-dependentní kináz (vyžádaná přednáška). (The perspectives of clinical application of synthetic cyclin-dependent kinase inhibitors.) Semináře oddělení pediatrické onkologie v Praze 5 – Motol, Praha, Česká republika.

9. Hajdúch, M., Nosková, V., **Feketová, G.**, Novotný, R., Jess, K., Gojová, L., Kašpárek, I., Kryštof, V., Veselý, J., Strnad, M., Mihál, V.: Olomoucine derived synthetic cyclin dependent kinase inhibitors - New generation of potent anti-cancer drugs. NCI-EORTC: 10th Symposium on New Drugs in Cancer Therapy, June 16-19, 1998, Amsterdam, The Netherlands.

10. Hajdúch, M., Antálek, P., Venháčová, J., Drábek, J., Gojová, L., **Feketová, G.**, Nosková, V., Ambrůzová, Z., Heřmanová, Z., Szotkowská, J., Ordeltová, M., Mihál, V.: Analýza genetických a imunologických rizikových faktorů u dětí s IDDM. (Analysis of genetic and immunologic risk factors in children with IDDM.) XXXIV. Diabetologické dny, 16. -18. dubna, 1998, Luhačovice, Česká republika.

11. Hajdúch, M., Nosková, V., Havlíček, L., **Feketová, G.**, Gojová, L., Kryštof, V., Veselý, J., Strnad, M., Míhál, V.: Alterace buněčného cyklu nádorových buněk a syntetické inhibitory cyklín dependentních kináz. (Cell cycle alterations in tumour cells and synthetic cyclin dependent kinase inhibitors.) XI. Olomoucké hematologické dny, 18. -20. června, 1998, Olomouc, Česká republika.

12. Orel, M., Hajdúch, M., Nosková, V., **Feketová, G.**, Gojová, L., Trojanec, R., Bražínová, S., Kouzmina, G.: Analýza in vitro lékové rezistence. (Analysis of in vitro drug resistance.) Biologické dny, 3. - 9. září, 1999, České Budějovice, Česká republika.

13. **Feketová, G.**, Hajdúch, M., Cwiertka, K., Šafářová, M.: Kombinované účinky syntetických inhibitorů cyklín dependentních kináz. (Combined effects of synthetic cyclin dependent kinase inhibitors.) Biologické dny, 3. - 9. září, 1999, České Budějovice, Česká republika.

14. Džubák, P., Hajdúch, M., Bouchal, J., Fajkus, J., Skleničnová, M., Orel, M., Trojanec, R., Bražínová, S., Gojová, L., **Feketová, G.**, Kašpárek, I., Šafářová, M., Janošťáková, A., Kouzmina, G., Tumer, R.: Prognostický význam délky telomer a telomerázové aktivity versus in vitro rezistence u nádorů plic. (Prognostic significance of telomere lengths and telomerase activity versus in vitro drug resistance in lung tumours.) Biologické dny, 3. - 9. září, 1999, České Budějovice, Česká republika.

15. Hajdúch M., Trojanec, R., **Feketová, G.**, Nosková, V., Bouchal, J., Orel, M., Vydra, D., Kouzmina, G., Bražínová, S., Kašpárek, I., Gojová, L., Míhál, V.: Vybrané molekulární markery u solidních tumorů (Selected cellular and molecular markers in solid tumors.) Místní konference České lékařské společnosti, 2. února, 2000, Česká republika.

16. Džubák, P., Hajdúch, M., Bouchal, J., Nosková, V., Orel, M.: Kouzmina, G., Trojanec, R., **Feketová, G.**, Bražínová, S., Kašpárek, I.: Telomery, telomerázy a léková rezistence plicních nádorů na chemoterapii (Telomeres, telomerases and drug resistance of lung cancer to chemotherapy.) Místní konference České lékařské společnosti, 2. února, 2000, Česká republika.

17. Hajdúch, M., Nosková, V., Chmelařová, A., Orel, M., Kouzmina, G., Trojanec, R., **Kořínková, G.**, Míhál, V., Žaloudík, J., Cwiertka, K., Král, V., Janošťáková, A.: Testy in vitro chemosensitivity v onkologickém výzkumu a klinické praxi. (In vitro chemosensitivity assays in oncology research and clinical practice.) II. česko - slovenská konference Hodnocení rizik pro životní prostředí – ERA 2000, Brno, 12. - 15. března, 2000, Česká republika.

18. Nosková V., Cwiertka K., Jess K., Šafářová M., Ludková A., Kouzmina G., Thomson J., **Kořínková G.**, Hajdúch M.: Study of cell cycle alterations and their implication for tumor cell resistance to anti-cancer drugs. 4th international symposia Leukemia and Lymphoma, Amsterdam, March 7-10th, 2001, The Netherlands.

19. Nosková V., Cwiertka K., Jess K., Šafářová M., Ludková A., Kouzmina G., Thomson J., Džubák P., **Kořínková G.**, Hajdúch M.: Účinky proteinů regulujících buněčný cyklus na mnohočetnou lékovou rezistenci. (The effects of cell cycle regulating proteins on the multidrug resistance of tumor cells.) XXV. Brněnské onkologické dny, 30. května – 1. června, 2001, Brno, Česká republika.

20. Hajdúch M., Nosková V., Cwiertka K., Špačková K., **Kořínková G.**, Gojová L., Trojanec R., Ludková A., Kouzmina G., Thomson J., Džubák P., Kašpárek I., Bražínová S., Firoze W., Černáková I., Míhál V.: Některé současné možnosti pro predikci výsledků protinádorové léčby. (Some contemporary possibilities for prediction of the outcome of anticancer therapy) XXV. Brněnské onkologické dny, 30. května – 1. června, 2001, Brno, Česká republika.

21. Hajdúch M., Nosková V., Cwiertka K., Špačková K., **Kořínková G.**, Gojová L., Trojanec R., Ludková A., Kuzmina G., Thomson J., Džubák P., Kašpárek I., Bražínová S., Firoze W., Černáková I., Mihál V.: Některé současné možnosti pro predikci výsledků protinádorové léčby. (Some contemporary possibilities for prediction of the outcome of anticancer therapy.) Pracovní setkání lékařů, 6. - 7. října .2001, Valtice.

22. **Kořínková G.**, Cwiertka K., Paprskářová M., Džubák P., Janošťáková A., Hajdúch M.: Radiosenzitizační účinky syntetických inhibitorů cyklín dependentní kináz odvozených od olomoucínu a jejich mechanismus účinku na buněčný cyklus. (Radiosensitising effects of synthetic cyclin dependent kinases inhibitors derived from olomoucine and their mechanism of action on the cell cycle.) II. Konference analytické cytometrie, 11. - 14. května 2003, Brno, Česká republika.

23. **Kořínková G.**, Cwiertka K., Paprskářová M., Džubák P., Janošťáková A., Hajdúch M.: Radiosenzitizační účinky syntetických inhibitorů cyklín dependentní kináz odvozených od olomoucínu a jejich mechanismus účinku na buněčný cyklus. (Radiosensitising effects of synthetic cyclin dependent kinases inhibitors derived from olomoucine and their mechanism of action on the cell cycle.) XXVII Brněnské onkologické dny, 22. - 24. května 2003, Brno, Česká republika.

24. Srovnal J., **Kořínková G.**, Vysloužil K., Duda M., Cwiertka K., Bílková R., Růžková V., Hajdúch M.: Detekce minimální reziduální choroby u solidních tumorů se zvláštním zřetelem na kolorektální karcinom. (Detection of minimal residual disease for solid tumors with special respect to colorectal carcinoma.) Krajský seminář Onkologické kliniky a Laboratoře experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc, 14. prosince 2004, Olomouc, Česká republika.

25. Janků F., **Kořínková G.**, Srovnal J., Novotný J., Petruželka L., Hajdúch M.: RT-PCR detekce minimální reziduální choroby v kostní dřeni u pacientek s časnými stadii karcinomu prsu. (RT-PCR detection of minimal residual disease in patients with early stages of breast carcinoma.) X. dny profesora Vladimíra Staška, 4.-5.3. 2005, Praha, Česká republika.

26. Srovnal J., **Kořínková G.**, Vysloužil K., Duda M., Cwiertka K., Švébišová H., Gajová B., Hajdúch M.: Minimální reziduální choroba u kolorektálního karcinomu a její možnosti v monitorování adjuvantní terapie. (Minimal residual disease in colorectal carcinoma and possibilities of its monitoring in adjuvant therapy.) X. dny profesora Vladimíra Staška, 4.-5.3. 2005, Praha, Česká republika.

27. **Kořínková G.**, Srovnal J., Hajdúch M., Švébišová H., Cwiertka K., Mínařík J.: Vyšetřování minimální reziduální nemoci v sentinelové uzlině u karcinomu prsu. (Minimal residual disease examinations in sentinel node in breast carcinoma.) Krajský seminář Onkologické kliniky a Laboratoře experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc, 26. dubna 2005, Olomouc, Česká republika.

28. Janků F., Srovnal J., **Kořínková G.**, Novotný J., Petruželka L., Hajdúch M.: Molekulární detekce okultních nádorových buněk v kostní dřeni pacientek s časnými stadii karcinomu prsu. (Molecular detection of occult cancer cells in bone marrow of patients in early stages of breast carcinoma.) 29. Brněnské onkologické dny, 26. - 28. května. 2005, Brno, Česká republika.

29. Srovnal J., **Kořínková G.**, Vysloužil K., Duda M., Skalický P., Cwiertka K., Švébišová H., Gajová B., Hajdúch M.: Předběžné výsledky vyšetření minimální reziduální choroby u kolorektálního karcinomu – korelace s klinicko – patologickými charakteristikami nemoci. (Preliminary results of minimal residual disease examinations in colorectal carcinoma – correlations with clinical and pathology characteristics of the disease.) 29. Brněnské onkologické dny, 26. - 28. května. 2005, Brno, Česká republika.

30. Skalický P., Vysloužil K., Duda M., Klementa I., Starý L., Hajdúch M., Srovnal J., **Kořínková G.**: Chirurgické aspekty detekce minimální reziduální choroby u kolorektálního karcinomu. (Surgical aspects of minimal residual disease in colorectal carcinoma.) 29. Brněnské onkologické dny, 26. - 28. května. 2005, Brno, Česká republika.

31. Srovnal J., **Kořínková G.**, Vysloužil K., Duda M., Skalický P., Cwiertka K., Švébišová H., Gajová B., Hajdúch M.: Vyšetření minimální reziduální choroby u solidních nádorů. (Minimal residual disease examination in solid tumours.) III. Konference analytické cytometrie, 21. - 25. června 2005, Červenohorské sedlo, Česká republika.

32. Janků F., Srovnal J., **Kořínková G.**, Hajdúch M.: Molekulární detekce okultních nádorových buněk v kostní dřeni pacientek s časným karcinomem prsu pomocí kvantitativní RT-PCR pro CEA. (Molecular detection of occult cancer cells in bone marrow of patients with early breast carcinoma using quantitative RT-PCR for CEA). Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, 9. - 10. 12. 2005, Olomouc, Česká republika.

33. Klementa I., Skalický P., Vysloužil K., Duda M., Starý L., Hajdúch M., Srovnal J., **Kořínková G.**: Chirurgické aspekty detekce minimální reziduální choroby u kolorektálního karcinomu. (Surgical aspects of minimal residual disease in colorectal carcinoma.) Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, 9. - 10. 12. 2005, Olomouc, Česká republika.

34. **Kořínková G.**, Srovnal J., Hajdúch M., Švach I., Zlámalová N., Švébišová H., Cwiertka K., Minařík J.: Detekce minimální reziduální choroby technikou PCR v reálném čase v sentinelových uzlinách u karcinomu prsu. (Real time PCR technique used in detection of minimal residual disease.) Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, 9. - 10. 12. 2005, Olomouc, Česká republika.

35. Srovnal J., **Kořínková G.**, Vysloužil K., Duda M., Skalický P., Cwiertka K., Švébišová H., Gajová B., Hajdúch M.: Minimální reziduální choroba u kolorektálního karcinomu – korelace s klinicko-patologickými charakteristikami nemoci. (Minimal residual disease in colorectal carcinoma – correlations with clinical and pathology characteristics of the disease.) Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, 9. - 10. 12. 2005, Olomouc, Česká republika.

36. Duda M., Vysloužil K., Skalický P., Klementa I., Starý L., Cwiertka K., Srovnal J., **Kořínková G.**, Hajdúch M.: Nové trendy v chirurgii kolorektálního karcinomu. (New trends in colorectal carcinoma surgery.) Přednáškový večer Spolku lékařů českých, LF UP Olomouc, 10. 5. 2006, Olomouc, Česká republika.

37. Srovnal J., **Kořínková G.**, Švébišová H., Cwiertka K., Minařík J., Zlámalová N., Švach I., Stehlík D., Hajdúch M.: Detekce mikrometastatického postižení sentinelových uzlin u karcinomu prsu metodou real-time RT-PCR. (Detection of micrometastatic affected sentinel nodes in breast carcinoma using real-time RT-PCR.) Krajský seminář Onkologické kliniky a Laboratoře experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc, 9. 5. 2006, Olomouc, Česká republika.

38. Srovnal J., **Kořínková G.**, Švébišová H., Cwiertka K., Vysloužil K., Klein J., Švach I., Pilka R., Kala M., Hajdúch M.: Přínos molekulárního vyšetření při objasnění histogeneze metastáz nádorů neznámého origa. (Contribution of molecular examination in clarification of histogenesis of unknown origin tumor metastasis.) XXX. Brněnské onkologické dny, 11. - 13. 5. 2006, Brno, Česká republika.

39. Srovnal J., **Kořínková G.**, Švébišová H., Cwiertka K., Minařík J., Zlámalová N., Švach I., Stehlík D., Hajdúch M.: Detekce mikrometastatického postižení sentinelových uzlin u karcinomu prsu metodou real-time RT-PCR. (Detection of micrometastatically affected sentinel nodes in breast carcinoma using real-time RT-PCR.) XXX. Brněnské onkologické dny, 11. - 13. 5. 2006, Brno, Česká republika.

40. Vysloužil K., Duda M., Klementa I., Skalický P., Starý L., Zbořil P., Cwiertka K., Srovnal J., **Kořínková G.**, Hajdúch M.: Opakované operace a derivační výkony u karcinomu rekta. (Repeated surgeries and derivative operations in rectal carcinoma.) XXX. Brněnské onkologické dny, 11. – 13. 5. 2006, Brno, Česká republika.

41. Duda M., Vysloužil K., Skalický P., Klementa I., Dlouhý M., Zbořil P., Cwiertka K., Srovnal J., **Kořínková G.**, Hajdúch M.: Opakované resekcce jaterních metastáz u kolorektálního karcinomu. (Repeated resections of liver metastasis in colorectal carcinoma.) XXX. Brněnské onkologické dny, 11. – 13. 5. 2006, Brno, Česká republika.