

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Účinky inhibitorů cyklin-dependentních kinas na  
lidské endotelové buňky *in vitro***

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Vypracoval:

Bc. Tomáš Maděrka

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Lucie Rárová, Ph.D

Studijní program:

N1501 Experimentální biologie

Studijní obor:

Experimentální biologie

Forma studia:

Prezenční

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracoval samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne .....

Podpis .....

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěl především poděkovat vedoucí své diplomové práce Mgr. Lucii Rárové, Ph.D za odborné rady, cenné připomínky, poskytnuté materiály a trpělivost. Dále děkuji všem členům kolektivu Laboratoře růstových regulátorů, kteří mi byli vždy ochotni poradit. Jmenovitě pak především doc. RNDr. Vladimíru Kryštofovi, Ph.D., Mgr. Radku Jordovi, Ph.D., Mgr. Evě Řezníčkové a Olze Hustákové. Mé díky také patří paní prof. RNDr. Jitce Ulrichové, CSc za poskytnuté buňky. V neposlední řadě chci poděkovat svým rodičům, přátelům a své partnerce za podporu a lásku v každodenním životě.

## OBSAH

OBSAH	4
Bibliografické informace	6
Bibliographical information	7
Cíle práce	8
Teoretická část	9
1. Angiogeneze	10
2. Krevní kapiláry	11
3. Tvorba krevních cév <i>de novo</i>	12
4. Typy angiogeneze	13
4.1. Angiogeneze pučením (sprouting angiogenesis)	13
4.1.1. Specifikace endotelových buněk	14
4.1.2. Notch signální dráha	15
4.2. Angiogeneze vchlipováním (intussusceptive angiogenesis)	15
5. Angiogenní faktory	17
5.1. Rodina VEGF proteinů	18
5.1.1. Hypoxie a exprese VEGF	20
5.2. Placentární růstový faktor	21
5.3. Fibroblastový růstový faktor	21
5.4. Destičkový růstový faktor	23
5.5. Angiopoetiny a další růstové faktory	23
5.6. Hlavní antiangiogenní faktory	25
6. Inhibice angiogeneze	25
6.1. Použití přirozených antagonistů angiogeneze	26
6.2. Blokáda angiogenních faktorů	26
6.2.1. Inhibice signální dráhy VEGF-VEGFR	26
6.2.2. Axitinib (AG-013736) – inhibitor VEGF signalizace	27
6.3. Inhibice proliferace endotelových buněk	28
6.4. Disrupce nádorových buněk	28
6.5. Stabilizace bazální membrány endotelových buněk	28
6.6. Hledání nových mechanismů inhibice angiogeneze	29
7. Cyklin dependentní kinasy	30
7.1. Regulace cyklin dependentních kinas	33
7.2. Význam cyklin dependentní kinasy 5 při angiogenezi	34
7.3. Inhibitory cyklin dependentních kinas	35
7.4. Inhibitory CDK a jejich vliv na angiogenezi	37

7.4.1. Roskovitin	38
7.4.2. Flavopiridol (Alvocidib, HMR1275)	39
7.4.3. SNS-032 (BMS-387032)	39
7.4.4. PD-0332991(Palbociclib)	40
7.4.5. Dinaciclib (BMS-387032)	40
7.4.6. DRB (5,6-dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazol)	41
7.4.7. AT-7519	41
Praktická část	43
8. Materiál a přístroje	44
8.1. Chemikálie	44
8.2. Protilátky	44
8.3. Testované látky	45
8.4. Roztoky	46
8.5. Příkladové vybavení	46
8.6. Biologický materiál	47
9. Metody	47
9.1. Stanovení životaschopnosti buněk	47
9.2. Kultivace a pasážování buněk	47
9.3. <i>In vitro</i> migrační rýhový test (Scratch assay)	48
9.4. <i>In vitro</i> test kapilární formace (Tube formation assay)	48
9.5. Analýza buněčného cyklu	49
9.6. Lyzace buněk	49
9.7. SDS-PAGE a western blotting	50
10. Výsledky	51
10.1. Účinek testovaných látek na migraci endotelových buněk	51
10.2. Kapilární formace <i>in vitro</i> po ovlivnění testovanými látkami	53
10.3. Vliv testovaných látek na buněčný cyklus endotelových buněk	55
10.4. Vliv testovaných látek na hladiny vybraných proteinů	56
11. Diskuze	60
12. Závěr	64
13. Seznam použitých zkratk	66
14. Seznam použité literatury	69

## **Bibliografické informace**

Jméno a příjmení autora: Tomáš Maděrka  
Název práce: Účinky inhibitorů cyklin-dependentních kinas na lidské endotelové buňky *in vitro*  
Typ práce: Diplomová  
Pracoviště: Laboratoř růstových regulátorů, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci  
Vedoucí práce: Mgr. Lucie Rárová, Ph.D  
Rok obhajoby práce: 2016

**Abstrakt:** Angiogeneze je proces novotvorby krevních cév, který se kromě fyziologických procesů uplatňuje i v patogenezi řady onemocnění, včetně rakoviny. Z tohoto důvodu se v posledních letech velmi zintenzivnil výzkum zaměřený na hledání látek, které by mohly sloužit jako nové potencionální inhibitory angiogeneze. Nedávno byl antiangiogenní účinek popsán u některých cyklin dependentních kinas (CDK), které jsou zapojeny do řady buněčných procesů včetně regulace buněčného cyklu a transkripce. Teoretická část této práce je věnována dosavadním poznatkům tykajících se procesu angiogeneze a možnostmi její inhibice. Dále se zabývá CDK a jejich známými inhibitory. V praktické části byl testován a porovnán účinek vybraných inhibitorů CDK na endotelové buňky z lidského pupečníku (HUVEC). Kromě klasických angiogenních testů jako jsou migrační rýhový test a test kapilární formace, byla provedena i analýza buněčného cyklu a western blotové stanovení hladin vybraných proteinů.

Klíčová slova: Angiogeneze, cyklin dependentní kinasy, endotelové buňky, inhibitory CDK, HUVEC  
Počet stran: 109  
Počet příloh: 0  
Jazyk: Český

### **Bibliographic information**

Autor's name: Tomáš Maděrka  
Title: The effects of cyclin-dependent kinase inhibitors on human endothelial cells *in vitro*  
Type of thesis: Diploma  
Department: Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacky University  
Supervisor: Mgr. Lucie Rárová, Ph.D  
The year of presentation: 2016

Abstract: Angiogenesis is a process of formation of new blood vessels, which in addition to the physiological processes plays a role in the pathogenesis of many diseases, including cancer. For this reason, in recent years intensive research has aimed at finding substances that could serve as potential new inhibitors of angiogenesis. Recently antiangiogenic effect in some cyclin dependent kinases (CDKs), which are involved in numerous cellular processes including cell cycle regulation and transcription has been described. The theoretical part of this thesis is devoted to contemporary knowledge of the process of angiogenesis and its inhibition possibilities. It also deals with CDK and its inhibitors. In the practical part, the effects of selected CDK inhibitors on endothelial cells from human umbilical cord (HUVEC) were tested and compared. Besides the typical angiogenic tests such as Scratch assay and Tube formation assay, the Cell cycle analysis and Western blot determination of protein's levels were performed.

Keywords: Angiogenesis, cyclin-dependent kinases, CDK inhibitors, endothelial cells, HUVEC  
Number of pages: 109  
Number of appendices: 0  
Language: Czech

## **Cíle práce**

- Vypracování literární rešerše na téma diplomové práce.
- Otestování a porovnání účinku vybraných inhibitorů CDK na endotelové buňky HUVEC.
- Zpracování získaných výsledků a jejich diskuze.



# **Teoretická část**

## 1. Angiogeneze

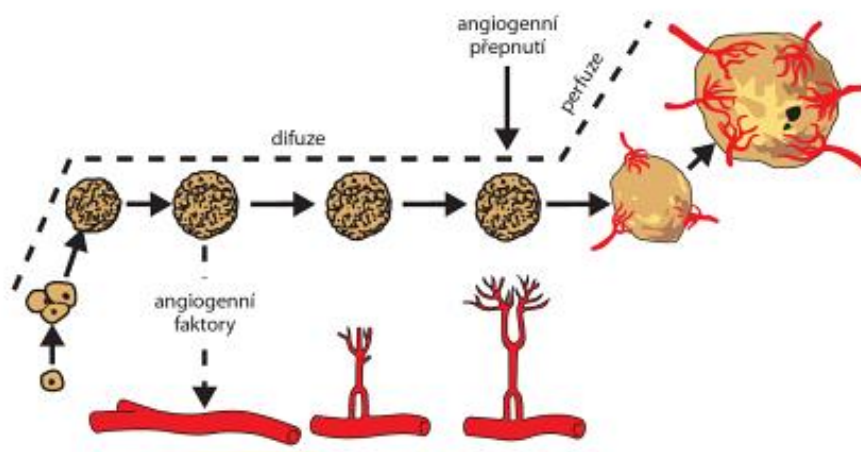
Pojmem angiogeneze (neovaskularizace) se označuje proces novotvorby krevních cév z cév již předem existujících (Folkman, 1971). Tím se odlišuje od vaskulogeneze, při níž se endotelové buňky cév tvoří *de novo* z prekurzorových buněk mezodermu (Risau & Flamme, 1995). Termín angiogeneze poprvé použil doktor Hertig v roce 1935 k popsání tvorby nových krevních cév v placentě (Hertig, 1935).

Angiogeneze se uplatňuje při řadě fyziologických pochodů. Zejména během embryogeneze (Breier, 2000) a reparačních procesů, kde zajišťuje přísun potřebných látek, kyslíku a buněk do místa poškození (Knighton et al., 1981; Swift et al., 1999). Má také význam při novotvorbě cév ve žlutém tělísku, ovariálním folikulu a endometriu v průběhu menstruačního cyklu (Findlay, 1986; Gordon et al., 1995; Maas et al., 2001). V těchto případech je angiogeneze vysoce regulovaná, zapíná se jen na určitou a krátkou dobu, jinak je přísně inhibována (Folkman & Shing, 1992). Porušení této regulace, ať už směrem ke zvýšení nebo snížení angiogeneze, může vyústit v závažné patologické stavy, jako jsou systémový lupus (Sakly et al. 2009), ženská neplodnost (Lin et al., 2008), chronický zánět (Costa et al., 2007), revmatoidní artritida (Koch, 2003), obezita (Cao, 2010), kardiovaskulární choroby (Deveza et al., 2012), diabetes mellitus (Martin et al., 2003) a mnoho dalších. U pacientů s diabetes mellitus se setkáváme s abnormalitami ledvin, plodu a sítnice s možnou poruchou zraku, která může vyústit až k úplné slepotě. Pacienti mají zhoršené hojení ran, zvýšené riziko odmítnutí transplantovaného orgánu a sníženou tvorbu koronárních kolaterál. V patogenezi všech těchto poruch se uplatňuje narušení komplexního procesu regulace angiogeneze (Martin et al., 2003).

Na regulaci angiogeneze se podílí celá řada látek, buněčných struktur a signálních drah. Patří sem například endotelové buňky, pericyty obklopující krevní kapiláry, extracelulární matrix, buňky stromatu, cytokiny, integriny, adhezivní molekuly a růstové faktory (Carmeliet, 2000). Zásadní je také vzájemný poměr mezi angiogenními a antiangiogenními faktory. K hlavním angiogenním faktorům patří vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF), který se váže na transmembránové tyrosin kinasové receptory VEGFR1 a VEGFR2 endotelových buněk. K dalším pak patří fibroblastový růstový faktor (FGF) a angiopoetiny. Hlavními antiangiogenními faktory jsou trombospondin, angiostatin a endostatin (Huang & Bao, 2004). V současné době je již známo daleko větší množství těchto faktorů a jejich počet se neustále zvyšuje. Expresi angiogenních faktorů také zvyšuje hypoxie, nedostatek živin a mutace v některých onkogenech jako je například RAS (Hanahan & Weiberg, 2000).

Spojitosť medzi angiogenezí a nádorovými bujením byla objevena již v roce 1971 doktorem Judahem Folkmanem (Folkman, 1971). Angiogeneze je nezbytná pro růst a následné metastazování nádorů. Nádorové ložisko nemůže bez cévního zásobení dosáhnout většího rozměru než 1-2 mm<sup>3</sup>. Pro další růst již nestačí prostá difuze kyslíku k nádorovým buňkám. Vzniká hypoxie, která způsobí genetickou nestabilitu a objevuje se nový typ nádorových buněk charakterizovaný zvýšenou produkcí angiogenních faktorů (Carmeliet & Jain, 2000). Tato změna bývá označována jako „angiogenní přepnutí“ (viz Obr. č. 1; Bergers & Benjamin, 2003).

S poznáním, jak důležitý je proces angiogeneze pro rozvoj a manifestaci nádorů, se od druhé poloviny devadesátých let začaly objevovat výzkumné projekty zaměřené na antiangiogenní léky. Zároveň se začaly intenzivně zkoumat a ověřovat antiangiogenní účinky již známých látek (Ribatti et al., 1996). Přes slibné vyhlídky je většinou antiangiogenní terapie ve fázi testování.



Obr. č. 1: Růst nádoru a angiogenní přepnutí (převzato z Kleiner & Kleiner jr., 2009).

## 2. Krevní kapiláry

Krevní kapiláry (vlásečnice) jsou tenkostěnné velmi jemné cévy propojující tepny a žíly. Jejich funkci objasnil v roce 1661 významný italský lékař a přírodovědec Marcello Malpighi (Pearce, 2007). Kapilární stěna je tvořena jedinou vrstvou pevně spojených endotelových buněk, které spočívají na souvislé bazální membráně. Zevně se k ní přikládají buňky s dlouhými cytoplazmatickými výběžky, částečně obepínající endotelovou trubici, označované jako pericyty. Kapiláry měří okolo 5 - 10 mikrometrů v průměru a umožňují výměnu vody, kyslíku, oxidu uhličitého, živin a odpadních látek

mezi krví a tkání, která je obklopuje, a tím zajišťují tělní mikrocirkulaci. Existují tři typy kapilár: souvislé, nesouvislé a fenestrované, které se částečně liší ve své stavbě. Kapiláry vytvářejí rozsáhlou kapilární síť, kterou zásobují cílové tkáně a orgány. Čím více jsou tyto tkáně a orgány metabolicky aktivní, tím více kapilár se vytváří (Maton et al., 1994). Během časného embryonálního vývoje se kapiláry vytvářejí *de novo* z endotelových buněk procesem vaskulogeneze (Risau & Flamme, 1995). V dospělosti se vytváří z již existujících cév procesem angiogeneze (Folkman, 1971), nicméně vaskulogeneze se může také objevit (Rafii et al., 2002).

Kapiláry vytvářené působením angiogenních faktorů uvolněných z nádorů jsou morfologicky odlišné od kapilár fyziologických. Nádorové cévy lze poznat podle toho, že směřují nahodilými směry, jsou různě pokroucené, nemají souvislou bazální membránu a mají snížené množství pericytů (Baish & Jain, 2000). Dalším charakteristickým znakem je zvýšená permeabilita způsobující intersticiální hypertenzi, která může omezovat průnik některých léků k nádorům (Jain, 1994; Jain, 1998).

### **3. Tvorba krevních cév *de novo***

Tvorbu krevních cév *de novo* (vaskulogenezi) lze v průběhu života savců poprvé pozorovat v zárodečném žloutkovém vaku embryí. Tento proces je velmi důležitý pro správný vývoj embrya. Podílí se zejména na tvorbě primitivních embryonálních cév, které jsou nezbytné pro výživu embrya a růst nově vznikajících orgánů.

Vaskulogeneze probíhá souběžně s křetvorbou, což znamená, že jsou vaskulární endotelové buňky a krevní buňky odvozeny ze společného předchůdce tzv. hemangioblastu (Šimíčková et al., 2006). Hemangioblasty vznikají z buněk mezodermy činností fibroblastového růstového faktoru 2 (FGF2), který nejdříve působí na buňky extraembryonálního mezodermy a později i na buňky mezodermy intraembryonálního. Hemangioblasty vytvářejí shluky označované jako krevní ostrůvky (Goldie et al., 2008). Vlivem vaskulárního endotelového růstového faktoru A (VEGF-A), který je produkován okolními mesenchymovými buňkami, dochází k diferenciaci jednotlivých buněk krevních ostrůvků. VEGF se váže na dva druhy receptorů s tyrozinkinasovou aktivitou, receptor typu 1 (VEGFR-1 (Flt-1)) a receptor typu 2 (VEGFR-2 (KDR/Flk-1)). Vazba na receptory typu 2 má za následek diferenciaci povrchových hemangioblastů krevních ostrůvků v endotelové buňky. Vnitřní hemangioblasty, které nejsou v kontaktu s okolním mesenchymem se mění v krevní kmenové buňky. Inaktivace genů pro VEGF-A a VEGFR-2 vede k závažnému narušení embryonální vaskulogeneze a křetvorby

(Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996; Shalaby et al., 1997; Ferrara, 1999). Naproti tomu VEGFR-1 plní během vaskulogeneze úlohu negativního regulátoru. Myši s utlumenou expresí VEGFR-1 zemřely v raných stádiích vývoje z důvodu zvýšeného počtu endotelových buněčných progenitorů, což vedlo k obstrukci lumenu cév. Vlastní diferenciaci endotelových buněk však narušena nebyla (Fong et al., 1995).

Na správném průběhu vaskulogeneze se podílí i celá řada dalších molekul. Patří sem například molekuly zprostředkující interakce mezi endotelovými buňkami a makromolekulami matrix, fibronektin nebo  $\alpha_5$  integrin. O mechanismech, které řídí osud endotelových buněk během vaskulogeneze je toho zatím známo jen velmi málo. Dlouhou dobu se například předpokládalo, že endotelové prekurzory se vyskytují pouze během embryonálního vývoje. V současné době však byly nalezeny v kostní dřeni a periferní krvi dospělých (Takahashi et al., 1999; Peichev et al., 2000).

#### **4. Typy angiogeneze**

V současné době jsou známy dva základní druhy angiogeneze. Angiogeneze pučením a angiogeneze vchlipováním.

##### **4.1. Angiogeneze pučením (sprouting angiogenesis)**

Jedná se o nejstarší (Ausprunk & Folkman, 1977) a nejlépe prozkoumanou formu angiogeneze. Probíhá v několika etapách označovaných jako angiogenní kaskáda (viz Tab. č. 1; Klener, 2005; Naňka & Grim, 2009). Angiogeneze pučením se uplatňuje především při hojení ran. Je velmi invazivní a schopna tvořit cévy v místech, kde se žádná cévní síť nenachází. Jedná se o relativně pomalý proces, zejména kvůli nutnosti buněčné proliferace (Burri et al., 2004).

V první fázi angiogenní kaskády dochází k disoluci bazální membrány, které předchází vazodilatace a protažení endotelových buněk. Cévní výstelka je narušována nejen mechanicky, ale také enzymaticky působením proteolytických enzymů matrixmetaloproteáz, které způsobují degradaci buněčných spojů a extracelulární matrix (Hessig et al., 2003). Účinkem angiogenních faktorů, zejména pak VEGF, se zvyšuje permeabilita bazální membrány, což vede k uvolnění fibrinogenu a plazminogenu z cévy a jejich následné přeměně na fibrin a plazmin. Síť fibrinových vláken tvoří základ pro růst nových cév, plazmin přispívá svým proteolytickým účinkem

k další disoluci membrány a narušení extracelulární matrix (Colville-Nash & Willoughby, 1997).

Druhá fáze je charakterizována proliferací a migrací endotelových buněk ve směru atrahujícího signálu. Na povrchu cév se nejprve vytváří útvary připomínající pupeny. Endotelové buňky následně migrují a uchycují se na síť fibrinových vláken (Karkkainen & Petrova, 2000).

Poslední fází angiogenní kaskády je morfogeneze vlastní cévy spočívající v aktivaci pericytů a vytvoření nové bazální membrány a lumina cévy. Působením PD-ECGF a TGF- $\alpha$  dochází ke zvýšené syntéze kolagenu a fibroblastů (Gerhardt & Betsholtz, 2003).

*Tab. č. 1: Fáze angiogenní kaskády a faktory, které se podílejí na jejich průběhu. VEGF – vascular endothelial growth factor, TIMP – tissue inhibitor of matrixmetalloproteinase, TGF – transforming growth factor, INF – interferon, PF 4 – platelet factor 4, IL – interleukin, FGF – fibroblast growth factor, EGF – epidermal growth factor, PD-ECGF – plateled derived endothelial cell growth factor (převzato a upraveno z Klener, 2005).*

<b>fáze kaskády</b>	<b>proces</b>	<b>stimulátory</b>	<b>inhibitory</b>
<b>1</b>	zvýšení permeability disoluce bazální membrány porušení mezibuněčných spojů	VEGF matrixmetalloproteázy TGF, angiogenin	trombospondin TIMP angiostatin, endostatin
<b>2</b>	proliferace endotelií migrace endotelií morfogeneze nové cévy	VEGF integriny, IL-6, IL-8 angiopoetiny	INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ PF-4, IL-12, TGF- $\beta$ vazostatin
<b>3</b>	adheze a formace lumina proliferace fibroblastů syntéza kolagenu, maturace	E-cadherin FGF, PD-ECGF EGF	tumstatin TIMP

#### **4.1.1. Specifikace endotelových buněk**

Pro zahájení pučení v první fázi angiogenní kaskády je nezbytná specifikace endotelových buněk do tzv „tip“ buněk a „stalk“ buněk, které mají odlišnou morfologii a funkční vlastnosti (Gerhardt et al., 2003). Tato specifikace je pouze dočasná a reverzibilní a rozhoduje o ní rovnováha mezi proangiogenními faktory (VEGF, JAG-1) a supresory buněčné proliferace (aktivita Dll4-notch; Eilken & Adams, 2010; Geudens & Gerhardt, 2011; Wacker & Gerhardt, 2011).

Posláním endotelových „tip“ buněk je především migrace, proliferační jen minimálně. Vytvářejí četná filopodia, která slouží k navedení nové krevní cévy směrem k angiogennímu stimulu (Isogai et al., 2003). Během pohybu přijímají vysoce rozvětvený tvar. „Tip“ buňky exprimují vysoké hladiny Dll-4, PDGF- $\beta$ , VEGFR-2, VEGFR-3/Flt-4 a mají nízkou aktivitu notch signalizace (Gerhardt et al., 2003; Claxton & Fruttiger, 2004; Suchting et al., 2007).

„Stalk“ buňky produkují méně filopodií, daleko více proliferační a vytvářejí cévní lumen (Thurston & Kitajewski, 2008). Také se podílejí na tvorbě spojů mezi sousedními buňkami a syntetizují základní komponenty bazální membrány (Phng & Gerhardt, 2009).

#### **4.1.2. Notch signální dráha**

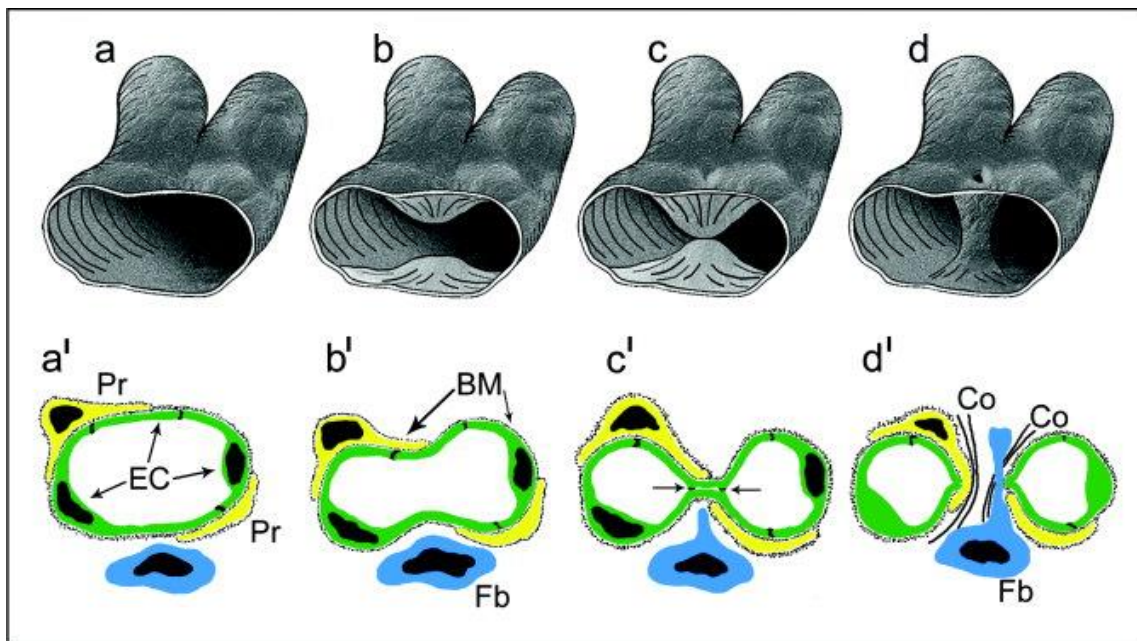
Notch receptory a notch ligandy jsou součástí notch signální dráhy, která je nezbytná pro angiogenezi a správný vývoj cév. Notch receptory jsou velké transmembránové proteiny, které jsou aktivovány jejich ligandy exprimovanými zpravidla na sousedních buňkách (Bray, 2006). Nezbytnost Dll-4/Notch-1 signalizace v endotelu je dobře popsána a ztráta jediné kopie Dll-4 nebo delece Notch-1 způsobí cévní vady a následnou smrt zárodku (Gale et al., 2004; Limbourg et al., 2005). V endotelových buňkách jsou exprimovány geny pro receptory notch-1, notch-4 a tři geny pro notch ligandy JAG-1, Dll-1, a Dll-4. Ovlivňují správný osud endotelových buněk během vývoje a při angiogenním pučení jsou velmi důležité pro specifikaci endotelových buněk v „tip“ nebo „stalk“ buňky. (Kume, 2009). Ztráta notch signalizace vyvolává angiogenní pučení, aktivace notch signalizace vede k jeho utlumení. Notch-1 deficientní endotelové buňky mají charakteristiky „tip“ buněk, zatímco endotelové buňky s aktivní notch signalizací vykazují charakteristiky „stalk“ buněk (Hellstrom et al., 2007).

#### **4.2. Angiogeneze vchlipováním (intussusceptive angiogenesis)**

Tento typ angiogeneze byl poprvé objeven a popsán na základě mikroskopických studií rychle se rozvíjejícího krevního řečiště postnatálních krysích plic, ve kterých dochází během třetího týdne života k markantním přestavbám cévní sítě (Burri, 1974; Caduff et al., 1986). Angiogeneze vchlipováním probíhá především v hustě vaskularizovaných tkáních, jako je například gastrointestinální trakt nebo

cévnatka oka, v menší míře se vyskytuje i v myokardu (Patan et al., 1992). Nevyžaduje buněčnou proliferaci a umožňuje cévám rychle expandovat do svého okolí. Dochází tak ke zvýšení počtu krevních kapilár bez odpovídajícího zvýšení počtu endotelových buněk, což je velmi důležité především při vývoji embrya.

Podstatou je rozdělení větších cév na menší (viz Obr. č. 2). Proces je zahájen vchlípením protilehlých stěn kapiláry do lumenu cévy. V místě jejich kontaktu vzniká dvojrstva endotelových buněk, která je posléze perforována, čímž je umožněn vstup růstových faktorů a buněk do lumenu cévy. V místě kontaktu se utváří tzv. „jádro“, které se postupně vyplňuje pericyty a myofibroblasty. Tyto nové buňky produkují kolagenní vlákna, která napomáhají ke stabilizaci celého komplexu. V posledním kroku se jádro rozdělí a z původní cévy vznikají dvě nové. Mechanismus, který stojí za počátečním vchlípením protilehlých stěn kapiláry, zatím není znám (Burri et al., 2004).



Obr. č. 2: Trojrozměrná (a - d) a dvojrozměrná (a' - d') vizualizace vzniku cévy angiogenním vchlípením. (a, b, a', b'): vchlípení protilehlých stěn do lumenu cévy, (c, c'): ustanovení intraendotelového kontaktu, (d, d'): endotelová (EC) dvojrstva a bazální membrána (BM) jsou centrálně perforovány a nově vytvořené jádro je vyplněno fibroblasty (Fb) a pericyty (Pr), které produkují kolagenní vlákna (Co) (převzato z Kurz et al., 2003; Burri et al., 2004).



## 5. Angiogenní faktory

Za fyziologických podmínek je angiogeneze velmi přísně regulovaný proces (Papetti & Herman, 2002). Faktory stimulující tvorbu cév (proangiogenní) jsou v rovnováze s faktory, které jejich tvorbu potlačují (antiangiogenní). Narušení této rovnováhy může vést k řadě imunitních, zánětlivých, ischemických a maligních chorob (Italiano et al., 2008). Mezi angiogenní faktory patří především růstové faktory, cytokiny, solubilní polypeptidy, matrix degradující enzymy, bioaktivní lipidy a další malé molekuly (Klener, 2002). Kromě přímých angiogenních faktorů (VEGF, bFGF a HGF) existují i tzv. nepřímé angiogenní faktory (TGF- $\alpha$ , EGF, PDGF), které způsobují zvýšený výdej faktorů přímých (Börset et al., 1996)

Pro zahájení nádorové angiogeneze je nejdůležitějším stimulem hypoxie v rostoucím nádoru. Ta vede ke zvýšení exprese hypoxií indukovaných transkripčních faktorů HIF-1 $\alpha$  a HIF-2 $\alpha$ , které dále zvyšují expresi proangiogenních faktorů a expresi antiangiogenních faktorů naopak snižují. Výsledkem této nerovnováhy je „angiogenní switch“ nádorové buňky (Kerbel, 2008). Hypoxie také může přispívat ke genetické nestabilitě (například mutace genu p53, aktivace onkogenu K-Ras), což může vést k potlačení produkce důležitého antiangiogenního faktoru trombospondinu (Klener, 2005). Hlavní známé angiogenní faktory jsou uvedeny v Tab. č. 2. Díky intenzivnímu výzkumu jsou však objevovány stále další.

Tab. č. 2: Nejvýznamnější angiogenní faktory a jejich funkce (převzato a upraveno z Klener, 2002).

<b>angiogenní faktor</b>	<b>mechanismus účinku</b>
<b>rodina VEGF</b> (vascular endothelial growth factor) – VEGF A-E – PLGF - (placental growth factor)	indukce proliferace endotelií zvýšení permeability bazální membrány
<b>FGF</b> (Fibroblast growth factor) – aFGF (acidický) – bFGF (bazický)	mitogenní účinek na endotélie
<b>HGF</b> (hepatocyte growth factor)	morfogeneze nové cévy
<b>MMP</b> (matrix metalloproteases) – matrilysin – stromelysin – želatinasa – kolagenasy	proteolýza bazální membrány a extracelulární matrix
<b>angiopoetiny</b> – angiopoetin-1 – angiogenin – angiotropin	komplexní antiangiogenní účinky, omezení exprese adhezních molekul, aktivace pericytů
<b>PDGF</b> (platelet derived growth factor)	stimulace a proliferace fibroblastů a produkce kolagenu
<b>PD-ECGF</b> (platelet derived endothelial cell growth factor)	usnadnění migrace endotelií
<b>TNF-<math>\alpha</math></b> (tumor necrosis factor)	aktivace MMP
<b>EGF</b> (epidermal growth factor)	nepřímé účinky, stimulace výdeje VEGF
<b>TGF-<math>\alpha</math></b> (transforming growth factor)	nepřímé účinky, stimulace výdeje VEGF
<b>interleukiny (IL-1, IL-6, IL-8)</b>	stimulace mitogeneze a migrace endotelií
<b>integriny</b>	usnadnění migrace buněk

### 5.1. Rodina VEGF proteinů

Už v roce 1983 Senger a jeho kolegové objevili protein způsobující zvýšení propustnosti krevních cév a pojmenovali ho VPF (vascular permeability factor; Senger

et al., 1983). V dalších studiích se ukázalo, že VPF a VEGF je jedna a ta samá molekula (Leung et al., 1989; Keck et al., 1989). V roce 1992 bylo potvrzeno, že zvýšená exprese VEGF souvisí s rozvojem krevního řečiště u myších embryí (Breier et al., 1992). Inaktivace jedné ze dvou VEGF alel vedla k závažným poruchám tvorby cév, což v konečném důsledku vedlo až k smrti embryí. Naopak zvýšená exprese VEGF se ukázala jako nezbytná pro růst nádorů bez velikostního omezení. Všechny tyto poznatky naznačovaly, že by VEGF mohl být velmi důležitým angiogenním faktorem (Veikkola & Alitalo, 1999).

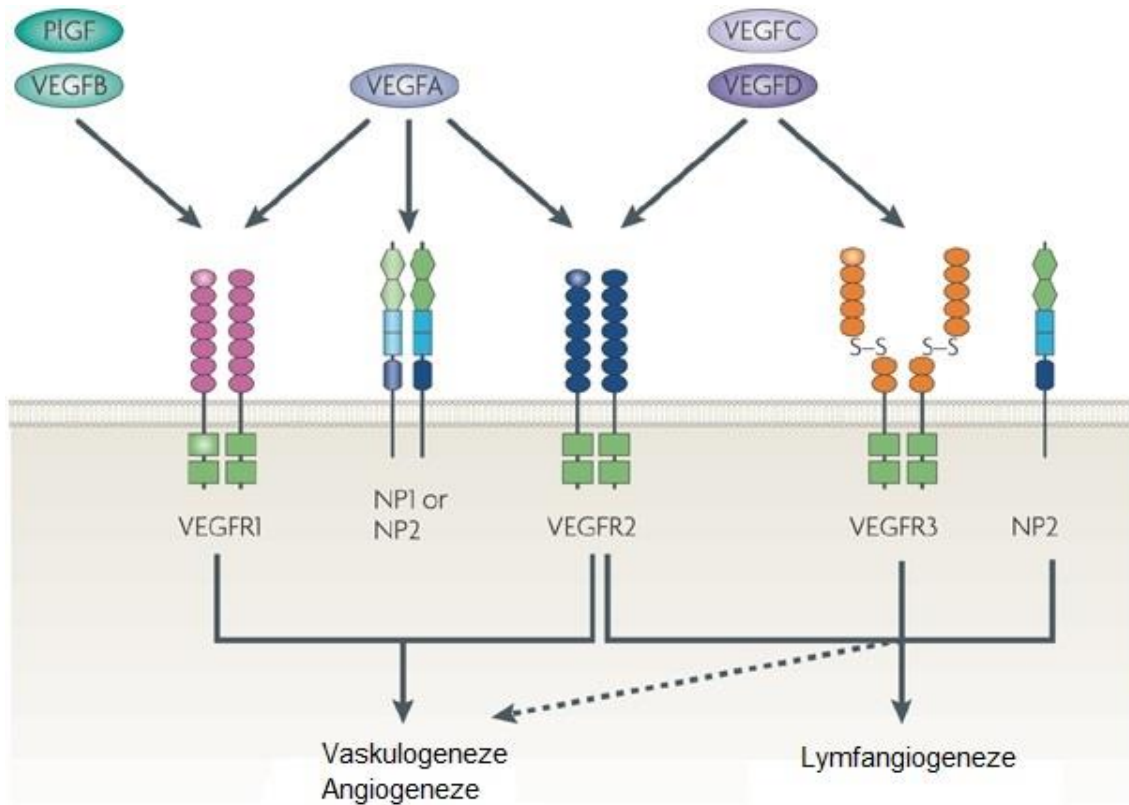
V současné době je VEGF nejvýznamnější a nejprostudovanější angiogenní faktor. Bylo identifikováno sedm variant (VEGF - A, B, C, D, E, F a PlGF (placental growth factor)), které souhrnně tvoří skupinu označovanou jako „rodina VEGF proteinů“ (Pinedo & Slamon, 2000). Jedná se o dimerické glykoproteiny obsahující 8 cysteinových zbytků. Za fyziologických podmínek se uvolňují z fibroblastů, monocytů nebo pericytů, za patologických podmínek především z nádorových buněk (Connolly et al., 1989; Klener, 2002; Darland et al., 2003).

VEGF-A, VEGF-B a VEGF-E mají velmi podobné biologické účinky. Stimulují proliferaci a migraci endotelových buněk a zvyšují cévní permeabilitu (Shinkaruk et al., 2003). VEGF-C a VEGF-D jsou důležité při stimulaci lymfangiogeneze. Jejich zvýšená exprese byla nalezena zejména u nádorů metastazujících lymfatickou cestou (Skobe et al., 2001; Yonemura et al., 2005). VEGF-E je produkován Orf virem (Meyer et al., 1999) a VEGF-F lze nalézt v hadím jedu (Suto et al., 2005).

VEGF se podobně jako jiné růstové faktory vážou na specifické receptory lokalizované na membránách endotelových buněk. Tyto receptory vykazují tyrosinkinasovou aktivitu. Jejich extracelulární část se skládá ze sedmi imunoglobulinu podobných domén, transmembránová a intracelulární část obsahuje tyrosinkinasovou doménu. Existují tři receptory pro VEGF: VEGFR1/FLT1 (fms-like tyrosine kinase-1), VEGFR-2/FLK1/KDR (fetal liver kinase 1/kinase domain receptor) a VEGFR3/FLT4 (fms-like tyrosine kinase-4). VEGF-A se váže na receptory VEGFR-1 a VEGFR-2 (Ferrara, 2004), VEGF-B a PlGF jsou specifické pro receptory VEGFR-1 a zbylé VEGF se vážou zejména na receptory VEGFR-3 (Holmes et al., 2007). VEGF-A také může interagovat s neuropilinem 1 a 2 (NP1 a NP2), které slouží jako koreceptory a zesilují tedy vazebnou afinitu ligandů k jejich receptorům. Interakce jednotlivých VEGF s příslušnými receptory je zobrazena na Obr. č. 3.

VEGFR-1 a VEGFR-2 stimulují proliferaci a migraci endotelových buněk, snižují jejich citlivost k apoptóze a zvyšují permeabilitu cév. VEGFR-2 je nejčastěji zvýšeně exprimovaným receptorem na nádorových endotelových buňkách, a byl proto

jedním z prvních cílů antiangiogenní terapie. VEGFR-3 je exprimován zejména na lymfatických cévách (Chung et al., 2010).



Obr. č. 3: Rodina VEGF proteinů a jejich příslušné receptory (převzato a upraveno z Ellis & Hicklin, 2008).

### 5.1.1. Hypoxie a exprese VEGF

Hlavním stimulem pro expresi VEGF je hypoxie a hypoglykémie (Shweiki et al., 1992). Zásadní úlohu v celém procesu hrají hypoxií indukované faktory (HIF) patřící mezi transkripční faktory, které zprostředkovávají odpověď na změny parciálního tlaku kyslíku v buňce. Nejrozšířenějším HIF faktorem je HIF-1, exprese HIF-2 a HIF-3 je méně častá (Semenza, 2000). HIF-1 má dimerickou strukturu. Je složen z podjednotek HIF-1 $\alpha$  a HIF-1 $\beta$ , která slouží jako jaderný translokátor. Po dimerizaci těchto dvou podjednotek a translokaci do jádra se HIF-1 $\alpha$  váže na hypoxii responzivní element (HRE) cílových genů (např. geny pro VEGF, PlGF a angiopoetin 2) a tím stimuluje jejich expresi (Ortiz-Barahona et al., 2010). Při normoxii jsou HIF-1 $\alpha$  podjednotky

hydroxylovány prolylhydroxylázou. To umožňuje jejich rozpoznání a ubiquitinaci VHL (von Hippel-Lindau) E3 ubiquitin ligázou, která je označí k rychlé degradaci v proteazomu (Maxwell et al., 1999). Během hypoxie jsou prolylhydroxylázy inhibovány a tím je umožněna vazba HIF-1 $\alpha$  na HRE (Semenza, 2004).

## **5.2. Placentární růstový faktor**

Placental growth factor (Placental growth factor) je signální protein kódovaný jediným *plgf* genem lokalizovaným na 14. chromozomu (Maglione et al., 1993) a patří do rodiny VEGF proteinů. S VEGF sdílí 53% sekvenční homologii (Maglione et al., 1991). Za fyziologických podmínek je produkován buňkami stromatu a lze ho najít především v trofoblastu placenty. Jeho uvolňování je stejně jako u VEGF stimulováno zejména hypoxií. Většinou se vyskytuje ve formě dimeru spojeného disulfidickým můstkem. V současné době jsou známi čtyři izoformy PlGF (PlGF 1-4). PlGF 1 a 3 se vážou pouze na receptor VEGFR-1. PlGF-2 a 4 se mohou vázat i na neuropilin 1 a 2 (Migdal et al., 1998). Proangiogenní účinky PlGF byly popsány v roce 1997. PlGF stimuluje proliferaci, migraci a přežití endotelových buněk (Ziche et al., 1997; Carmeliet et al., 2001; Adini et al., 2002; Fischer et al., 2007; Schmidt et al., 2011).

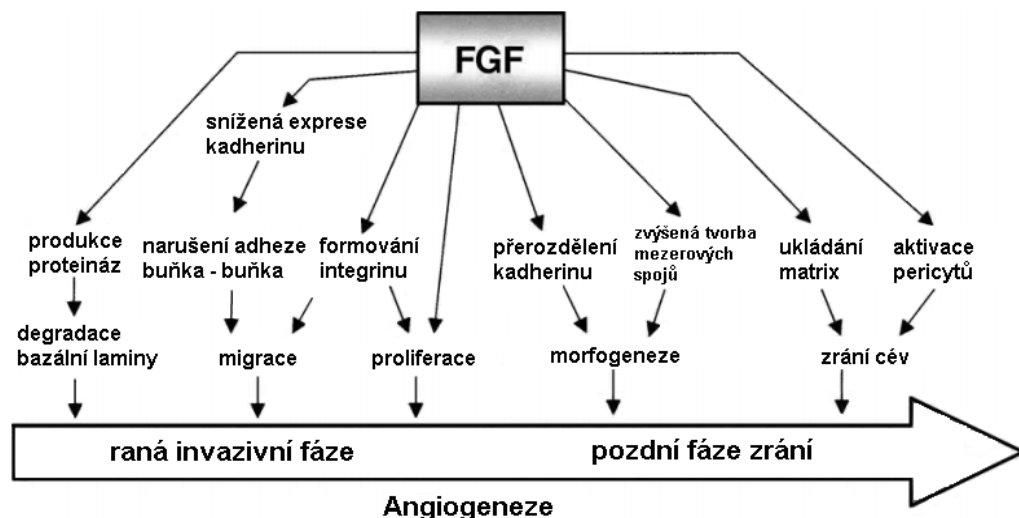
## **5.3. Fibroblastový růstový faktor**

Fibroblastové růstové faktory patří do rodiny strukturálně a funkčně podobných polypeptidů. V současné době tato rodina čítá 22 zástupců, z nichž jsou nejlépe popsány růstové faktory FGF1 (aFGF – acidic Fibroblast growth factor) a FGF2 (bFGF – basic Fibroblast growth factor; Itoh & Ornitz, 2004). Jejich N-sekvence není na rozdíl od ostatní zástupců odštěpitelná a není tedy zatím zcela jasné, jakým způsobem dochází k jejich sekreci do extracelulární matrix (Burgess & Maciag, 1989). FGF jsou uvolňovány především z aktivovaných T-lymfocytů, makrofágů, endotelových a nádorových buněk (Folkman & Klagsburn, 1987). Některé FGF se exprimují výhradně během embryonálního vývoje (FGF-3, 4, 8, 15, 17 a 19), zatímco ostatní se mohou exprimovat jak během embryonálního vývoje, tak i v dospělých tkáních (FGF-1, 2, 5-7, 9-14, 16, 18 a 20-23). Během embryonálního vývoje mají významnou úlohu při regulaci buněčné proliferace, migrace a diferenciace. V dospělém organismu jsou homeostatickými faktory uplatňujícími se při reparaci tkání a odpovědi organismu na

poranění. Dojde-li k jejich deregulované expresi, mohou některé FGF zásadně přispívat k patogenezi nádorových onemocnění (Itoh & Ornitz, 2004).

FGF se vážou na příslušné buňky prostřednictvím FGF receptorů (FGFR). FGFR jsou transmembránové proteiny s tyrosinkinaseovou aktivitou obsahující 2 nebo 3 imunoglobulinu podobné domény a jednu extracelulární sekvenci pro vazbu heparinu (Lee et al., 1989; Johnson & Williams, 1993; McKeehan et al., 1998). Jsou známy pouze čtyři FGFR receptory (FGFR 1-4), nicméně jejich specifčnost k různým ligandům se může měnit alternativním sestřihem mRNA, při kterém dochází k tvorbě mnoha izoform VEGFR (Miki et al. 1992). Interakce mezi FGF a heparinem nebo FGF a heparan sulfát proteoglykanem (HSPG), který se nachází na povrchu většiny buněk a v extracelulární matrix jsou velmi důležité pro biologickou aktivitu FGF (Ornitz, 2000). Tyto interakce stabilizují FGF před tepelnou denaturací, proteolýzou a mohou výrazně ovlivnit jejich uvolňování do intersticiálního prostoru (Moscatelli, 1987; Flaumenhaft et al., 1990).

Vliv FGF na angiogenezi je vysoce komplexní. Stimulují proliferaci a migraci endotelových buněk a zvyšují expresi proteas, integrinů a kadherinů (Javerzat et al., 2002; viz Obr. č. 4). Degradace extracelulární matrix prostřednictvím plasmin-plasminogenního aktivačního (PA) systému je velmi důležitým krokem angiogeneze (Liotta et al., 1991). FGF zvyšují produkci urokinasy PA (uPA) a matrix metaloproteináz (MMP) v endotelových buňkách (Rusnati et al., 1996; Taraboletti et al., 2002). uPA přeměňuje plasminogen na plasmin, který degraduje různé proteiny matrix a aktivuje MMP (Hiraoka et al., 1998). FGF-2 se také podílí na stimulaci chemotaxe/chemokineze endotelových buněk (Terranova et al., 1985).



Obr. č. 4: Úloha FGF během angiogeneze (převzato a upraveno z Itoh & Ornitz, 2004).

#### **5.4. Destičkový růstový faktor**

Dalším velmi důležitým růstovým faktorem, který má zásadní roli při tvorbě nových cév je destičkový růstový faktor (PDGF). Jedná se o dimerický glykoprotein, který se vyskytuje ve formě heterodimeru PDGF-AB nebo homodimerů PDGF-AA a PDGF-BB složených z řetězců A a B. Intenzivním výzkumem byly dále objeveny i geny kódující řetězce C a D, které dávají vzniknout homodimerům PDGF-CC a PDGF-DD (Li et al., 2000; Bergsten et al., 2001; Heldin et al., 2002). Za fyziologických podmínek je PDGF produkován fibroblasty, buňkami hladké svaloviny, makrofágy, pericyty, krevními destičkami, gliovými a endotelovými buňkami (Heldin & Westermark, 1999).

Stejně jako ostatní růstové faktory se i PDGF váže na příslušné receptory cílových buněk. Pro izoformy PDGF existují dva odlišné tyrosinkinasové receptory, PDGFR $\alpha$  a PDGFR $\beta$ . Vazba ligandu vede k autofosforylaci receptorů na tyrosinových zbytcích a následné aktivaci dalších signálních molekul (Magnusson et al., 2006). Isoformy PDGF mají k těmto receptorům různou afinitu. PDGFR $\alpha$  má vysokou afinitu k PDGF-A, -B a -C, zatímco PDGFR $\beta$  k PDGF-B a -D (Betscholtz, 2003).

PDGF se uplatňuje především během embryonálního vývoje, v dospělosti se účastní procesů hojení ran, stimulují buněčnou proliferaci, migraci a angiogenezi. Jejich vliv lze také nalézt při patogenezi řady onemocnění. Pro jejich působení je většinou nezbytná přítomnost specifických molekul extracelulární matrix, jako jsou heparin a kolagen. Bylo prokázáno, že heparin zlepšuje vazbu PDGF na kolagen a vzniklý komplex PDGF-heparin-kolagen podporuje proliferaci fibroblastů, migraci buněk a vaskularizaci tkání (Sun et al., 2009).

Pro angiogenezi je nejdůležitější signální dráha PDGF-B/ PDGFR $\beta$ , která je nezbytná pro správné začlenění pericytů do nově vznikající cévy. V průběhu angiogeneze se PDGF uvolňují z endotelových buněk a vážou se na PDGFR $\beta$  pericytů. To vyvolá jejich proliferaci, dozrávání a začlenění do nově vznikající cévy (Sundberg et al., 2009; Genové et al., 2014). Také faktory PDGF-A a PDGF-C jsou schopny stimulovat angiogenezi. Po vazbě na PDGFR $\alpha$  zvyšují produkci faktoru VEGF-A (Li et al., 2000).

#### **5.5. Angiopoetiny a další růstové faktory**

Rodinu angiopoetinů tvoří čtyři zástupci: ANG-1, ANG-2, ANG-3 a ANG-4. Kromě nich byla dále nalezena celá řada strukturálně angiopoetinům podobných proteinů, jejichž funkce ale zatím nejsou zcela objasněny. Angiopoetiny se vážou na

Tie (Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains) receptory (Tie-1 a Tie-2) s tyrosinkinasovou aktivitou (Augustin et al., 2009). Přenos signálu ANG-1 a 2 může probíhat i nezávisle na přítomnosti Tie receptorů a to prostřednictvím integrinů  $\alpha 5\beta 1$  a  $\alpha v\beta 5$  (Carlson et al., 2001; Dallabrida et al., 2005; Ward et al., 2005). Tyto integriny ale také mohou velmi často synergicky spolupracovat s Tie receptory a tím odpověď na ANG signály značně modulovat. Tento poznatek je důležitý především pro porozumění nádorové angiogenezi (Cascone et al., 2005). Nejlépe popsánymi angiopoetiny jsou ANG-1 a ANG-2. ANG1 se váže na Tie-2 receptor a stimuluje jeho kinasovou aktivitu, zatímco ANG-2 působí na Tie-2 receptor různě v závislosti na situaci (Procopio et al., 1999; Davis et al., 2003). Při nízkých koncentracích se chová jako antagonist, zatímco při vysokých koncentracích jako agonista (Kim et al., 2000). ANG-1 je produkován převážně buňkami hladkého svalstva a pericyty a je nezbytný pro správné zrání cév, adhezi, migraci, přežití endotelových buněk a začlenění pericytů do nově vznikající cévy. Naproti tomu hlavním producentem ANG-2 jsou endotelové „tip“ buňky. ANG-2 podporuje buněčnou smrt a narušuje tkáňovou vaskularizaci. Působí-li ale ve spojení s vaskulárními endotelovými růstovými faktory, může i on podporovat neo-vaskularizaci (Scharpfenecker et al., 2005; Fagiani & Christofori, 2013).

K dalším faktorům, které se uplatňují v angiogenní kaskádě patří i faktor nekrotizující nádory TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor). Během angiogeneze se uvolňuje z aktivovaných monocytů a makrofágů a způsobuje degradaci bazální membrány a aktivaci MMP. Podílí se i na výdeji některých cytokinů (IL-1) a adhezivních molekul (ICAM-1; Klener, 2002).

Hepatocytární růstový faktor HGF (hepatocyte growth factor) je produkován buňkami mezodermálního původu, jako jsou fibroblasty, makrofágy a endotelové buňky. Stimuluje proliferaci hepatocytů, keratinocytů a endotelových buněk. Je nezbytný pro správnou morfogenezi nově vznikající cévy (Börset et al., 1996).

Matrix metaloproteázy (MMP) jsou enzymy (stromelysin, kolagenasy a další), které působí svojí proteolytickou aktivitou na bazální membránu endotelových buněk a na extracelulární matrix, a tím podporují proces angiogeneze. Zvětšují cévní permeabilitu a vytváří prostor pro nově vznikající cévy. Zásadní úlohu mají i pro nádorové metastazování, neboť umožňují proniknutí nádorových buněk do lumenu cévy (Raza & Cornelius, 2000).

TGF- $\alpha$  (transforming growth factor) a EGF (epidermal growth factor) působí na angiogenezi nepřímo. Ovlivňují výdej VEGF a FGF.

Kromě výše zmíněných faktorů se se v angiogenezi uplatňují i některé cytokiny. Zejména pak interleukin IL-1, který zvyšuje expresi endotelových receptorů a stimuluje



mitogenezi a IL-6, který má vliv na migraci endotelových buněk (Klener, 2002; Otrock et al., 2007).

## **5.6. Hlavní antiangiogenní faktory**

Za normálních podmínek je působení angiogenních faktorů kompenzováno působením antiangiogenních faktorů. Potlačení exprese antiangiogenních faktorů umožňuje angiogenezi, zatímco jejich nadměrná exprese angiogenezi znemožňuje.

K hlavním a dobře popsáním antiangiogenním faktorům patří trombospondiny (TSP), angiostatin a endostatin (Klener, 2002).

Rodina TSP glykoproteinů zahrnuje pět členů TSP-1, -2, -3, -4 a TSP-5/COMP. Váží se na matrixové proteiny, plazmatické bílkoviny a cytokiny a mají nejrůznější funkce (Mosher, 1990; Frazier, 1991; Bornstein, 1995; Hogg et al., 1997). Antiangiogenní účinky byly popsány u TSP-1 a -2. TSP-1 inhibuje angiogenezi přímým působením tak, že potlačuje migraci a indukuje apoptózu endotelových buněk nebo nepřímým působením, kterým inhibuje mobilizaci proangiogenních faktorů a blokuje jejich přístup k příslušným receptorům na povrchu endotelových buněk (Lawler, 2002). TSP-2 má podobné funkce jako TSP-1 (DiPietro, 1997).

Angiostatin je 38 kDa velký štěpný produkt plasminogenu. Blokuje migraci a proliferaci endotelových buněk a vyvolává u nich apoptózu. Podobné účinky jako angiostatin má i vazostatin (O'Reilly et al., 1994; Harris, 1998) a 20 kDa velký štěpný produkt kolagenu XVII endostatin (O'Reilly et al., 1997).

Kromě výše zmíněných faktorů se jako antiangiogenní faktory uplatňují i interferon  $\alpha$ , interferon  $\beta$ , TGF- $\beta$ , PF-4 (platelet factor 4; Klener, 2002) a vnitřní inhibitor vazohibin, který zpětnovazebným mechanismem potlačuje transkripci VEGFR (Watanabe et al., 2004; Kern et al., 2009).

## **6. Inhibice angiogeneze**

Jak už bylo v této práci zmíněno v kapitole č. 1, angiogeneze je nejen nezbytná pro správný vývoj organismu, ale účastní se i celé řady patologických poruch a onemocnění. Objasnění jejího působení při růstu nádoru a jeho metastazování proto přirozeně vedlo k otázce, zda je možné angiogenezi zcela zastavit, popřípadě alespoň částečně omezit. V tomto směru se celosvětový výzkum zaměřil na různé etapy angiogenního procesu a využívá dvou základních přístupů: použití přirozených

antagonistů angiogeneze nebo blokády angiogenních faktorů (Kruger et al., 2001; Harris, 2003).

### **6.1. Použití přirozených antagonistů angiogeneze**

Tato strategie se zatím v klinické praxi moc neuplatňuje. Nejlépe popsáný je rekombinantně připravený antagonist ABT-510 (thrombospondin mimetic peptid; TSP-1), který má vlastnosti přirozeného trombospondinu 1. Blokuje odpověď na angiogenní podněty, inhibuje aktivitu endotelových buněk a podporuje jejich apoptózu (Rusk et al., 2006). Další rekombinantně připravení antagonisté angiostatin, endostatin a destičkový faktor 4 (PF 4) se v praktické antiangiogenní terapii prozatím také neosvědčily (O'Reilly et al., 1997; Dell'Eva et al., 2002; Lippi & Favaloro, 2010).

### **6.2. Blokáda angiogenních faktorů**

Tento terapeutický přístup je daleko efektivnější než použití přirozených antagonistů angiogeneze a využívá inhibice angiogenní kaskády (především signální dráhy VEGF-VEGFR), inhibice proliferace endotelových buněk, disrupce nádorových buněk (VDA) a stabilizace bazální membrány endotelových buněk (Gastl et al., 1997; Deplanque & Harris, 2000; Hagedorn & Bikfalvi, 2000; Klener, 2002).

#### **6.2.1. Inhibice signální dráhy VEGF-VEGFR**

Signální dráha VEGF-VEGFR je jednou z nejdůležitějších signálních kaskád, které se uplatňují při procesu angiogeneze (viz kapitola č. 5.1.). Její inhibice je jedna z nejlépe prostudovaných a nejčastěji používaných terapeutických metod. Angiogenní účinek VEGF lze blokovat hned na několika úrovních: neutralizací ligandu VEGF, použitím blokační monoklonální protilátky proti vazebné doméně příslušných receptorů anebo blokádu tyrosinkinasové domény intracelulární části receptoru (Neufeld et al., 1999; Klener, 2002). Do klinických studií také vstoupily metody využívající ribozymů namířených proti VEGF mRNA (Sandberg et al., 2000; Weng & Usman, 2001).

Neutralizace ligandu VEGF využívá neutralizačních protilátek, které se vážou na konkrétní sekvence aminokyselin VEGF a tím zamezují jeho interakci s příslušnými receptory. Protilátka MV833 byla vyvinuta pro blokaci signální dráhy VEGF-A (Presta et

al., 1997; Asano et al., 1998; Ferrara & Alitalo, 1999). Monoklonální protilátky 2C3 (Brekken et al., 2000), DC101 (Prewett et al., 1999), a IMC-1C11 (Hunt, 2001) zamezují navázání VEGF na VEGFR-2, nikoli však na VEGFR-1. Nejvíce zkušeností je ale zatím s humanizovanou monoklonální protilátkou bevacizumabem (komerčně prodáváným pod názvem Avastin), který se váže na volný VEGF-A, VEGF-B i VEGF-C a účinně tak blokuje novotvorbu cév. Používá se výhradně v kombinaci s chemoterapií (Zondor & Medina, 2004; Klener, 2008).

Další možností je eliminace VEGF ligandu použitím solubilního VEGF receptoru, který bývá označován názvem VEGF-trap (Aflibercept) a působí jako kompetitivní inhibitor VEGF receptorů (Chu, 2009).

Jako nejslibnější strategie se však jeví blokáda tyrozinkinasové domény intracelulární části receptorů pro angiogenní faktory (VEGF, FGF, PDGF a další). Využívá nízkomolekulárních látek označovaných jako tyrozinkinasové inhibitory (TKI). Oproti neutralizačním protilátkám, které mají vysoce selektivní účinek, působí TKI na větší počet receptorových tyrozinkinas (Schlaeppli & Wood, 1999). Mezi TKI patří např. silný inhibitor VEGFR-2 semaxanib (SU5146; Fong et al., 1999; O'Donnell et al., 2005), inhibitor VEGFR1-3 cediranib (AZD-2171; obchodní název Recentin; Lindsay et al., 2009), inhibitory VEGFR1-3 a PDGFR sunitinib (SU11248; obchodní název Sutent; Roskoski, 2007) a sorafenib (obchodní název Nexavar; Wilhelm et al., 2008).

### **6.2.2. Axitinib (AG-013736) – inhibitor VEGF signalizace**

Axitinib, substituovaný derivát indazolu, je silný inhibitor tyrosinkinasových receptorů, který v subnanomolárních koncentracích selektivně inhibuje VEGFR1, 2, 3 a v nanomolárních koncentracích PDGFR $\alpha$  a c-kit (Rugo et al., 2005; Hu-Lowe et al., 2008). Jeho protinádorová aktivita je založena především na významných antiangiogenních účincích (Kim et al., 2005; Wilmes et al., 2007). In vitro inhibuje VEGF signalizaci, což vede k potlačení růstu, proliferace a omezení přežití endotelových buněk (Hu-Lowe et al., 2008). Axitinib je podstatně účinnější než jiné dostupné inhibitory VEGFR. Inhibiční koncentrace (IC<sub>50</sub>) axitinibu je minimálně 100x nižší než u sorafenibu, sunitinibu, nebo pazopanibu. Na rozdíl od sunitinibu a sorafenibu však nevykazuje téměř žádnou afinitu k FLT3 a RET (Mendel et al., 2003; Kumar et al., 2007; Hu-Lowe et al., 2008).

Axitinib se prodává pod komerčním názvem Inlyta a je indikován pro léčbu pacientů s metastatickým renálním karcinomem.

### **6.3. Inhibice proliferace endotelových buněk**

K látkám, které způsobují inhibici proliferace endotelových buněk, patří např. fumagillin, který se získává z extraktu houby *Aspergillus fumigatus*. Nicméně se pro svou velkou toxicitu on ani jeho syntetický analog TNP 470 (AGM-1470) v klinické praxi nepoužívají (Wang et al., 2000). Uplatnění při léčbě jaterních metastáz našla až netoxická pegylovaná forma TNP-470 nazvaná Lodamin (Gervaz et al., 2000; Benny et al., 2008).

Inhibice proliferace endotelových buněk byla popsána i u terbinafinu (Ho et al., 2004), sildenafilu (Erdogan et al., 2007), orlistatu (Browne et al., 2006) thalidomidu a jeho analogů (Moreira et al., 1999), bortezomibu (Belloni et al., 2010), tranilastu (Isaji et al., 1997) a celecoxibu (Lin et al., 2004).

Pro svůj antiproliferační efekt se jako inhibitory proliferace používají i interferony  $\alpha$ ,  $\beta$  (Jiménez-Hernández et al., 2008) a některé imunomodulační látky jako jsou talidomid (Arrieta et al., 2002) a jeho deriváty lenalidomid (Dong et al., 2015) a pomalidomid (Richardson et al., 2013).

### **6.4. Disrupce nádorových buněk**

Alternativním přístupem, jak omezit cévní zásobení nádoru, je použití látek, které mají cytotoxický účinek na již vytvořené nádorové cévy. Tyto látky se označují VDA (vascular disruption agents) a ve většině případů cílí na mikrotubulární síť cytoskeletu nádorových buněk, kde procesem depolymerace destabilizují mikrotubuly a vyvolají apoptózu (Siemann et al., 2005; Cai, 2007).

K nejsilnějším VDA patří ketopiperazinový analog NPI-2358 (plinabulin; Bertelsen et al., 2011), combrestatin A4-fosfát (fosbretabulin – Zybrestat), který se v endotelových buňkách přeměňuje na aktivní combrestatin (West & Price, 2004), dále TZT-1027 (soblidotin; Watanabe et al., 2006) a flavonoid DMXAA (vadimezan; Buchanan et al., 2012).

### **6.5. Stabilizace bazální membrány endotelových buněk**

K tomu, aby mohla vzniknout nová céva, musí na začátku angiogenního procesu nejprve dojít k narušení bazální membrány endotelových buněk existující cévy. Použitím inhibitorů metaloproteáz (enzymů zodpovědných za toto narušení, viz

kapitola č. 5.5.), dochází ke stabilizaci bazální membrány a snížení její permeability (Nelson et al., 2000; Rydlova et al., 2008). Jako inhibitory MMP se využívají např. AG-3340 (prinomastat; Hande et al., 2004), BB-94 (batimastat; Botos et al., 1996), BB-2516 (marimastat; Wojtowicz-Praga et al., 1998) a AE-941 (neovastat), u kterého byly kromě inhibice MMP zjištěny ještě další antiangiogenní účinky (Falardeau et al., 2001).

## **6.6. Hledání nových mechanismů inhibice angiogeneze**

V současné době jsou stále častěji hledány nové potencionální inhibitory angiogeneze i mezi přírodními látkami. Antiangiogenní účinek byl popsán například u aktivní složky chilli papriček kapsaicinu (Min et al., 2004), nízkomolekulárního produktu izolovaného z rostliny *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. erianinu (Gong et al., 2004), sloučeniny z extraktu semen *Magnolia grandiflora* L. honokiolu (Bai et al., 2003), rostlinného alkaloidu sanguinarinu (Eun & Koh, 2004), seskviterpenu izolovaného z plodů *Torilis japonica* (Houtt.) DC. torilinu (Kim et al., 2000), přírodního antioxidantu resveratrolu (Cao et al., 2005), extraktu z pelyňku ročního *Artemisia annua* L. artemisininu a jeho semisyntetického derivátu artesunatu (Soomro et al., 2011), přírodního barviva izolovaného především z kurkumy *Curcuma longa* L. curcuminu (Arbiser et al., 1998), extraktů z rostliny *Scutellaria baicalensis* Georgi. baicalinu a baicaleinu (Liu et al., 2003), flavonoidů izolovaných z plodů a semen ostropestřce mariánského *Silybum marianum* (L.) Gaertner silibininu a silymarinu (Yang et al., 2005) a přírodní produkt z mořských hub laulimalidu (Lu et al., 2006).

Velkou skupinou s prokázaným antiangiogenním účinkem představují brassinosteroidy (Rárová et al., 2012), rostlinné hormony vyskytující se zejména v květech, pylu a semenech rostlin (Müssig & Altmann, 2001). Vědeckou pozornost si brassinosteroidy zasloužily především díky objevu jejich cytotoxického účinku na nádorové buňky, bez toho aniž by ovlivnily proliferaci normálních buněk (Malíková et al., 2008). Kromě brassinosteroidů byl antiangiogenní účinek nedávno popsán i u dalších steroidních sloučenin (např. progestinu, 2-methoxyestradiolu, dexamethazonu a kortizonu; Pietras & Weinberg, 2005).

K živočišným produktům s prokázanou antiangiogenní aktivitou patří některé látky izolované ze žraločí chrupavky například SCF2 (shark cartilage factor 2) a skvalen (Liang Wong, 2000; Bargahi & Rabbani-Chadegani, 2008).

Mezi léčiva s antiangiogenním účinkem patří například bevacizumab (Shih & Lindley, 2006), sunitinib (Roskoski, 2007), sorafenib (Kim et al., 2007), pazopanib (Sleijfer et al., 2009) a evorolimus (Lane et al., 2009). Dále lze zmínit paclitaxel

(Pasquier et al., 2004), docetaxel (Hotchkiss et al., 2002), gemcitabin (Laquente et al., 2008) a vinblastin (Vacca et al., 1999). Na angiogenezi má také vliv vitamín D3 (Fujioka et al., 1998) a selen (Lu Jiang, 2001).

Stále častěji se v protinádorové terapii využívá spolupůsobení antiangiogenních látek s klasickými antiproliferačními látkami jako jsou např. inhibitory cyklin dependentních kinas, které byly především navrženy pro regulaci buněčného cyklu (Bar & Onn, 2008).

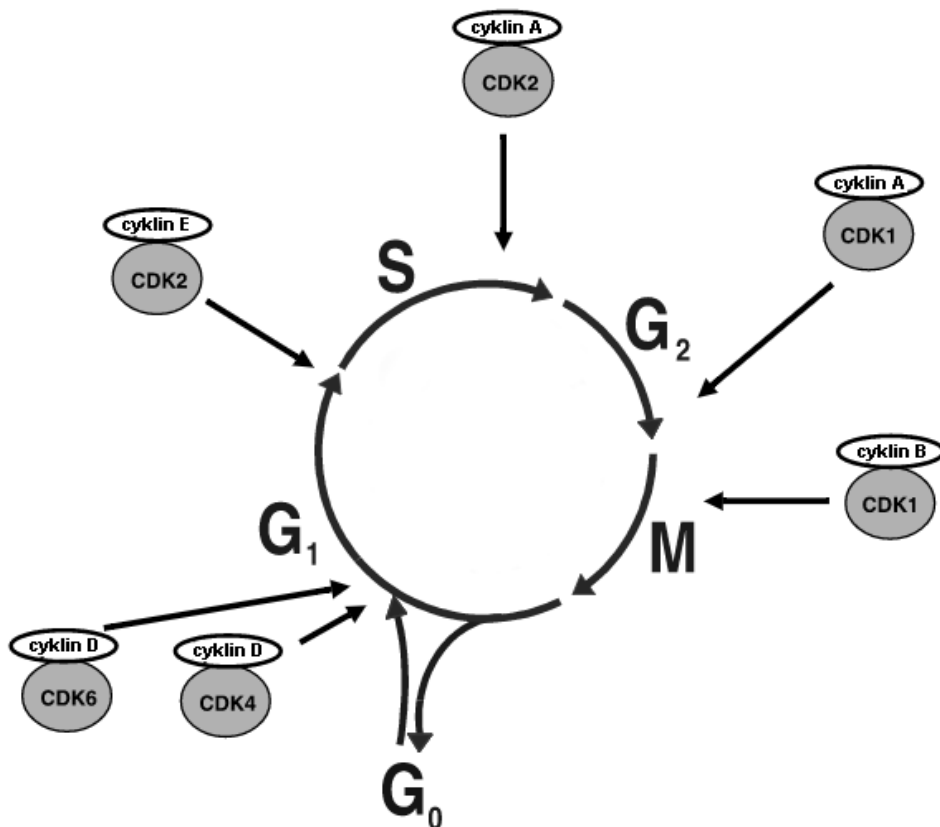
## **7. Cyklin dependentní kinasy**

Cyklin dependentní kinasy (CDK) jsou malé serin/threoninové proteinkinasy, které hrají významnou roli v regulaci buněčného cyklu. Uplatňují se ale také při transkripci a v procesech buněčné diferenciaci a buněčné smrti tzv. apoptóze (Malumbres & Barbacid, 2005). CDK byly poprvé charakterizovány během 70. let 20. století, kdy byl u štěpících se kvasinek objeven gen řídící vstup buněk do mitózy (cdc2 nebo CDK1; Nurse, 1975; Nurse & Bissett, 1981). V oocytech obojživelníků byl tou dobou také objeven MPF (mitosis/maturation promoting factor) komplex (Masui & Markert, 1971; Smith & Ecker, 1971).

CDK jsou aktivní pouze, pokud jsou vázány na jejich regulační podjednotky tzv. cykliny. Přítomnost nebo absence aktivačního cyklinu je velmi důležitá nejen pro činnost samotných CDK, ale i pro regulaci celého buněčného cyklu. Je známo nejméně 29 proteinů, které mají funkci cyklinů (obsahují cyklinovou doménu). Pro některé z nich však stále nebyl nalezen vazebný partner (Malumbres & Barbacid, 2005).

V současnosti je v lidských buňkách popsáno dvacet odlišných CDK (Cao et al., 2014), které zastávají různé funkce (hlavní jsou uvedeny v Tabulce č. 3). Evoluční studie naznačují, že lze CDK rozdělit do osmi podčeledí reprezentovaných CDK1, CDK4 a CDK5 (související s buněčným cyklem) a CDK7, CDK8, CDK9, CDK11 a CDK20, které fungují jako transkripční CDK. Regulace buněčného cyklu se účastní především CDK1, CDK2, CDK4 a CDK6 (viz Obrázek č. 5). Vážou se na cykliny typu A, B, D a E, jejichž exprese se mění v průběhu buněčného cyklu a tím regulují aktivitu příslušných CDK. CDK4 a CDK6 jsou v reakci na mitogenní podněty aktivovány cyklinem D a podporují vstup buněk do buněčného cyklu. Fosforylují a inaktivují retinoblastomový protein, který potlačuje transkripci mnoha genů nezbytných pro syntézu DNA a následnou mitózu. Aktivita CDK2 může tomuto procesu také přispívat, i když se tato kináza uplatňuje především při replikaci a reparaci DNA. Poté, co buňky zduplikují svou DNA, dochází vazbou cyklinů A a B k aktivaci CDK1, která podporuje

zrání a separaci centrosomu, kondenzaci chromozómů a zahájení mitózy po rozpadu jaderného obalu. Kromě tohoto zavedeného modelu, ale existuje i celá řada kompenzačních mechanismů. Například na cyklin E a D se při absenci CDK2 a CDK4 váže CDK1, která je schopna interakcí s různými cykliny zajistit všechny důležité přechody buněčného cyklu a je tedy pro savčí buněčný cyklus naprosto nezbytná. (Malumbres & Barbacid, 2009; Malumbres, 2014). CDK3 v komplexu s cyklinem C je také zapojena do regulace buněčného cyklu (přechod  $G_0/G_1$  fáze), nicméně je zatím jen velmi málo prostudována (Ren & Rollins, 2004). CDK5 tvoří komplex s proteiny p35 a p39 a má významnou roli v buněčné senescenci, migraci a životním cyklu neuronů (Dhavan & Tsai, 2001; Maccioni et al., 2001). CDK7 je společně s cyklinem H a stabilizačním proteinem MAT1 součástí komplexu CAK (CDK-activating kinase; Tassan et al., 1995; Fisher, 2005), který fosforylací aktivuje další CDK (Larochelle et al., 2007). Společně s CDK8, 9, 11, 12 a 13 se zapojuje (fosforylací podjednotky RNA polymerázy II) do regulace transkripce a sestřihu RNA (Pinhero et al., 2004; Malumbres & Barbacid, 2005; Blazek et al., 2011). CDK10 a CDK14 se podílí na regulaci buněčného cyklu (Kasten & Giordano, 2001; Shu et al., 2007).



Obr. č. 5: Buněčný cyklus a jeho regulace pomocí cyklin dependentních kinas. CDK 4 a CDK 6 se během  $G_1$  fáze vážou na cyklin D; CDK2 je v průběhu syntézy DNA aktivována cyklinem E a při přechodu S/ $G_2$  cyklinem A; CDK1 se spojuje s cyklinem A během  $G_2$  fáze a cyklinem B během  $G_2/M$  (převzato a upraveno z. Vermeulen et al., 2003).



Tab. č. 3: Přehled cyklin dependentních kinas, jejich vazebných partnerů a jejich biologické funkce v savčích buňkách (převzato a upraveno z Romano, 2013).

cyklin dependentní kinasa (CDK)	nejdůležitější vazební partneři	funkce komplexu CDK/cyklin v savčích buňkách
CDK2	cyklin A1, A2, E1, E2	G <sub>1</sub> -S (buněčný cyklus)
CDK3	cyklin E1, E2, A1, A2, C	G <sub>0</sub> -G <sub>1</sub> -S (buněčný cyklus)
CDK4	cyklin D1, D2, D3	G <sub>1</sub> -S (buněčný cyklus)
CDK5	p35, p39	senescence, životní funkce neuronů
CDK6	cyklin D1, D2, D3	G <sub>1</sub> -S (buněčný cyklus)
CDK7	cyklin H a MAT	regulace transkripce RNA pol II
CDK8	cyklin C	regulace transkripce RNA pol II
CDK9	cyklin T1, T2a, T2b, K	regulace transkripce RNA pol II
CDK10	neidentifikováno	G <sub>2</sub> -M (buněčný cyklus)
CDK11	cyklin L1, L2	regulace buněčného cyklu, transkripce, sestřihu pre-mRNA a duplikace centriol
CDK12	Cyklin L1, L2, K	regulace transkripce, regulace sestřihu RNA
CDK13	cyklin L1, L2, K	regulace transkripce, regulace sestřihu RNA
CDK14	cyklin D1, D2, D3, Y	regulace buněčného cyklu a proliferace

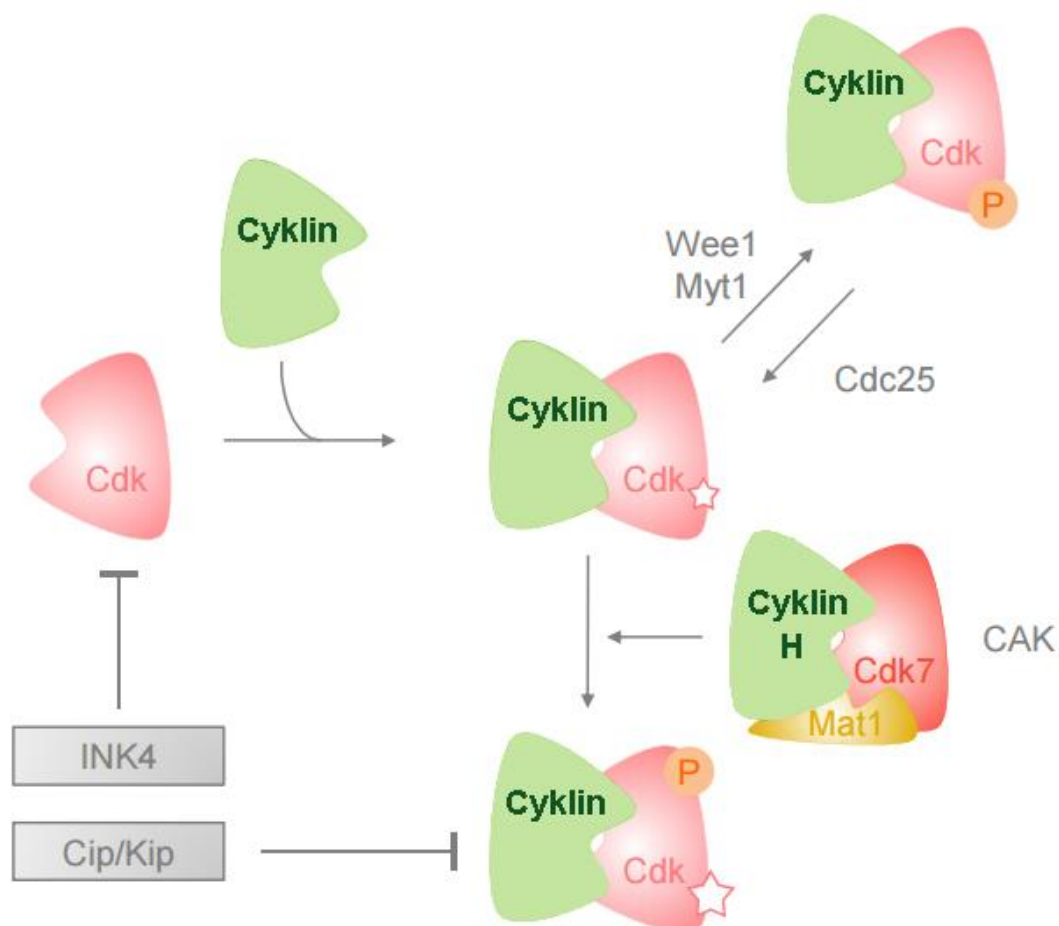
### 7.1. Regulace cyklin dependentních kinas

Aktivita CDK je regulována různými způsoby. Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, pro aktivaci monomerních CDK je nezbytná jejich vazba s cyklinem. Každá CDK interaguje s určitou podskupinou cyklinů (Morgan, 1995).

Na regulaci aktivity CDK se však nepodílí jen tvorba komplexů CDK/cyklin, ale významnou roli hraje i jejich fosforylace (Jeffrey et al., 1995). Ta může probíhat prostřednictvím kinas Wee1 a Myt1 na threoninu<sup>14</sup> a tyrosinu<sup>15</sup> a vede k inhibici komplexu CDK/cyklin (Mueller et al., 1995; Malumbres & Barbacid, 2001). Tento proces může být zvrácen fosfatázou Cdc25, která reaktivuje CDK defosforylací threoninu<sup>14</sup> a tyrosinu<sup>15</sup>. CAK fosforyluje mitotické CDK na threoninu<sup>160</sup> a tím výrazně zvyšuje jejich kinasovou aktivitu (Gu et al., 1992; Russo et al., 1996).

V regulaci aktivity CDK se uplatňují i dvě rodiny (INK4 a Cip/Kip) inhibičních proteinů (Sherr & Roberts, 1999). Do INK4 rodiny patří p16<sup>INK4A</sup>, p15<sup>INK4B</sup>, p18<sup>INK4C</sup> a

p19<sup>INK4D</sup>, které se specificky vážou na monomerní CDK a zabraňují tak navázání příslušných cyklinů. Zástupci rodiny Cip/Kip jsou p21<sup>Waf1/Cip1</sup>, p27<sup>kip1</sup> a p57<sup>Kip2</sup>, které inhibují komplex CDK/cyklin (Ekholm & Reed, 2000; Malumbres & Barbacid, 2005). Celý proces regulace CDK je znázorněn na Obrázku č. 6.



Obr. č. 6: Regulace buněčného cyklu pomocí CDK. (P: fosforylace; ☆ : kinasová aktivita; převzato a upraveno z Malumbres & Barbacid, 2005).

## 7.2. Význam cyklin dependentní kinasy 5 při angiogenezi

Přestože CDK5 sdílí vysokou sekvenční homologii s CDK1 a 2, není zapojena do kontroly buněčného cyklu (Ohshima et al., 1996). Od jejího objevu v roce 1992 (Hellmich et al., 1992) bylo zjištěno, že je vysoce exprimována především v centrální nervové soustavě, kde je nezbytná pro správný vývoj a funkci neuronů (Dhavan & Tsai, 2001; Barnett & Bibb, 2011; Cheung & Ip, 2012). Nicméně v posledních letech bylo

zjištěno, že se CDK5 exprimuje i v jiných tkáních (Liebl et al., 2011; Contreras-Vallejos et al., 2012) a je zapojena i do různých typů rakoviny: slinivky břišní (Feldmann et al., 2010), prostaty (Strock et al., 2006), štítné žlázy (Pozo et al., 2013), prsu (Liang et al., 2013), plic (Demelash et al., 2012) a řady dalších.

Exprese CDK5 byla prokázána i v endotelových buňkách, kde se účastní regulace buněčné migrace a procesu angiogeneze (Liebl et al., 2010). Inhibice CDK5 (např. roskovitinem) snižuje růst nádoru a zvyšuje citlivost na antiangiogenní léčbu. Mechanismus jakým CDK5 ovlivňuje vlastní angiogenezi zatím není přesně znám, avšak poslední studie naznačují, že zasahuje do Dll-4/Notch signální dráhy (Merk et al., 2016). Dále ovlivňuje aktivitu RhoA (Ras homolog family member A) a Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1), které představují nejvýznamnější regulátory aktinového cytoskeletu (Liebl et al., 2010). V jiných studiích bylo zjištěno, že CDK5 interaguje s HIF-1 $\alpha$ , fosforyluje ho na Ser-687, a tím zabraňuje jeho degradaci (Antoniou et al., 2011; Herzog et al., 2016)

### **7.3. Inhibitory cyklin dependentních kinas**

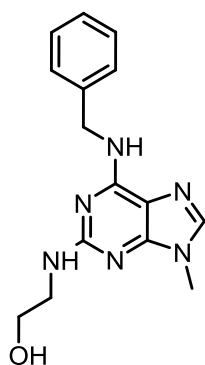
Nádorové buňky jsou charakterizovány neomezeným replikačním potenciálem, který je způsoben především změnami v regulaci buněčného cyklu (Hanahan & Weiberg, 2000). CDK jsou jeho hlavními regulátory a v nádorových buňkách vykazují značně deregulovanou aktivitu, která může být způsobena jejich nadměrnou expresí, ztrátou endogenních inhibitorů, ale také mutací samotných cyklinů a CDK (Hall & Peters, 1996; Malumbres & Barbacid, 2001). Z tohoto důvodu bylo v posledních letech zahájeno intenzivní hledání nových chemických látek, které by mohly sloužit jako potencionální inhibitory CDK a výrazně tak zasáhnout do protinádorové terapie (Kryštof & Uldrijan, 2010).

Inhibitory CDK lze podle jejich specifity rozdělit na inhibitory s širokým spektrem účinku a na inhibitory selektivní, které cílí pouze na omezený počet konkrétních CDK. První generace inhibitorů CDK byla charakteristická širokým působením. Aktivita druhé generace byla omezena jen na úzkou skupinu CDK a třetí generace má specifitu jen na konkrétní CDK a jejich kombinace. Nejslibnější strategie pro úspěšnou nádorovou terapii pomocí selektivních nebo kombinovaných CDK je však závislá na genetických změnách v samotném nádoru (Malumbres et al., 2008; Romano, 2013).

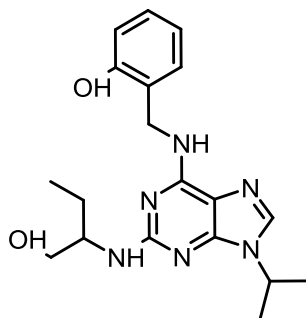
Inhibitory CDK se mohou strukturně značně lišit, nicméně většina z nich sdílí určité společné vlastnosti. Jedná se především o nízkomolekulární látky, které kompetují s molekulami adenosintrifosfátu (ATP) o volné vazebné místo na molekule

CDK, na kterou se váží prostřednictvím vodíkových můstků a hydrofobních vazeb (Knockaert et al., 2002). Vazba inhibitoru na CDK je schopna zablokovat buněčný cyklus a proliferaci (především inhibitory CDK1, 2, 4 a 6), blokovat transkripci proteinů s krátkým poločasem rozpadu (např. Mdm-2) a tím aktivně zvyšovat množství nádorového supresoru p53, který následně může vyvolat zahájení apoptózy nádorové buňky (Kryštof et al., 2005; Węsierska-Gądek et al., 2009; Kryštof & Uldrijan, 2010).

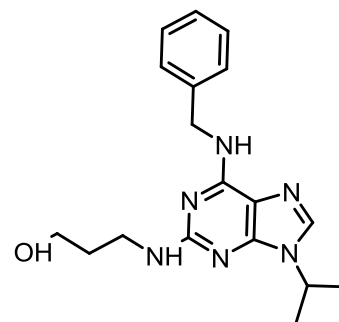
Prvními látkami, u kterých byl prokázán selektivní účinek na inhibici CDK, byly purinové sloučeniny (Veselý et al., 1994; De Azevedo et al., 1997; Fischer et al., 2003). K prvním objeveným látkám patřily inhibitory dimethylaminopurin a isopentenyladenin, jejichž účinnost ani specifita bohužel nebyla dostatečně velká (Senderowicz & Sausville, 2000). Dalším výzkumem se ukázalo, že silnými inhibitory CDK jsou především trisubstituované puriny v pozicích C2-, C6- a N9-. Olomoucín (6-(benzylamino)-2-[(2-hydroxyethyl)amino]-9-methyl-purin) byl první látkou tohoto typu s inhibičním efektem na CDK1 a CDK2 (Veselý et al., 1994). Jeho další modifikací byla připravena přibližně 20x účinnější a selektivnější látka triviálně nazvaná roskovitin (6-(benzylamino)-2-[(1-hydroxymethyl)propyl]amino]-9-isopropyl-purin), která inhibuje CDK1, CDK2 a CDK5 (Havlíček et al., 1997). Nicméně vědecký výzkum neustal pouze u těchto sloučenin a ve snaze zesílit inhibiční a antiproliferační účinek purinových sloučenin bylo připraveno velké množství substitučně odlišných derivátů např. Olomoucín II, bohemín, purvalanol A, CR8 a látky NU2058 a NU6102 (Veselý et al., 1994; Havlíček et al., 1997; Gray et al., 1998; Davies et al., 2002; Kryštof et al., 2005; Babu et al., 2007; Bettayeb et al., 2008). Struktury vybraných inhibitorů jsou zobrazeny na Obrázku č. 7. Modifikacemi substituentů na purinovém skeletu (purinové bioestery) jsou i nadále hledány a vytvářeny stále nové sloučeniny.



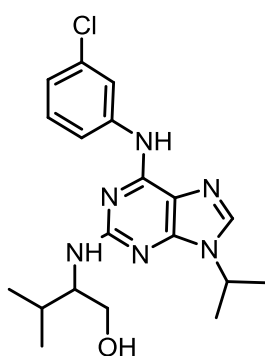
olomoucine



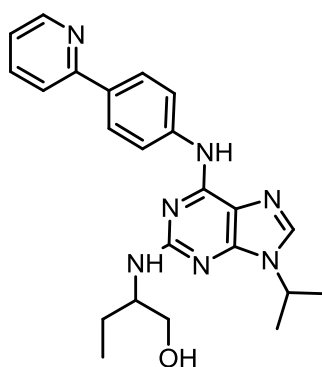
olomoucine II



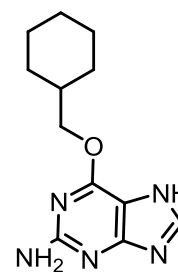
bohemin



purvalanol A



CR8



NU2058

Obr. č. 7: Struktury vybraných inhibitorů CDK.

#### 7.4. Inhibitory CDK a jejich vliv na angiogenezi

Bylo prokázáno, že některé inhibitory CDK inhibují angiogenezi *in vitro*. Patří mezi ně například flavopiridol, roskovitin a SNS-032 (Melillo et al., 1999; Radhakrishnan & Gartel, 2006; Ali et al., 2007; Stockwin et al., 2009; Liebl et al., 2010). Ačkoliv tyto inhibitory vykazují různou kinasovou selektivitu a jejich mechanismy inhibice angiogeneze se mohou lišit, sdílejí vysokou aktivitu proti CDK9. Inhibice CDK9 se projevuje v poklesu aktivity RNA polymerázy II, což vede k následnému snížení exprese hlavního angiogenního faktoru VEGF (Melillo et al., 1999; Ali et al., 2007). Vztah mezi angiogenezí, transkripcí RNA a CDK9 byl studován pomocí látek 4-amino-6-hydrazino-7- $\beta$ -D-ribofura-nosyl-7H-pyrrolo-pyrimidin-5-carboxamid (ARC) a 4-(4-hydroxyfenyl)azo-3,5-diamino-1H-pyrazol (CAN508). Obě tyto sloučeniny byly identifikovány jako inhibitory transkripce s antiangiogenní aktivitou *in vitro* (Kryštof et

al., 2006; Radhakrishnan & Gartel, 2006; Stockwin et al., 2009; Kryštof et al., 2011). Antiangiogenní potenciál inhibitorů CDK9 byl dále podpořen zjištěním, že mutace HEXIM1 (Hexamethylene bis-acetamide inducible 1), negativního regulátoru CDK9, vede ke zvýšené expresi VEGF a HIF-1 $\alpha$  v myších prsních žlázách (Ogba et al., 2010). V poslední době bylo objeveno, že důležitou roli v angiogenezi zastává kromě CDK9 i CDK5, se kterou některé z inhibitorů CDK také interagují (Liebl et al., 2010; Zahler et al. 2010).

#### **7.4.1. Roskovitin**

Roskovitin (Seliciclib, CYC202; viz. Obr. č. 8) patří do skupiny 2, 6, 9 trisubstituovaných purinů a je jedním z nejlépe popsaných inhibitorů CDK. Byl vyvinut v roce 1997 jako silnější a selektivnější analog středně silného inhibitoru CDK Olomoucínu (Havlíček et al., 1997; Meijer et al., 1997). Roskovitin inhibuje především CDK1, CDK2, CDK5, CDK7 a CDK9 a vykazuje antiproliferační a proapoptické účinky na široké spektrum nádorových buněk (Kryštof et al., 2005; Meijer et al., 2006). Roskovitin může blokovat buněčný cyklus v G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S a G<sub>2</sub>/M fázi v závislosti na délce jeho působení a použité koncentraci (Węsierska-Gądek et al., 2009). Způsobuje také pokles hladin některých cytokinů a zamezuje fosforylaci retinoblastomového proteinu Rb, čímž brání rozpadu komplexu Rb-E2F a znemožňuje transkripci genů nezbytných pro replikaci DNA (Whittaker et al., 2004).

Účinky nezávislé na ovlivnění buněčného cyklu vychází především z inhibice CDK5 a zahrnují antiangiogenní (Liebl et al., 2010) a protizánětlivé účinky (Berberich et al., 2011), inhibici buněčné migrace a motility (Tanaka et al., 2004; Strock et al., 2006) a ovlivnění metabolismu glukózy (Lilja et al., 2001). Inhibice CDK7 a 9 se projevuje v poklesu aktivity RNA polymerázy II, což vede k následné snížené transkripci proteinů s krátkým poločasem rozpadu. Jedná se především o antiapoptické proteiny jako jsou survivin, Mcl-1 a Mdm-2, jejichž snížené hladiny v buňce se projeví indukcí apoptózy (Ljungman & Paulsen, 2001; Raje et al., 2005). Kromě výše zmíněných účinků je roskovitin inhibitorem i celé řady dalších buněčných cílů, které ovlivňují buněčnou proliferaci (např. Erk1, Erk2 a pyridoxalkinasy; Whittaker et al., 2004; Bach et al., 2005).

Studie závislosti aktivity na struktuře zjistily, že (R)-stereoizomer roskovitinu je při inhibici komplexu CDK1/cyklin B 2x účinnější než (S)-stereoizomer (De Azevedo et al., 1997). (R)-Roskovitin se momentálně nachází ve fázi II klinického testování, kde se

jako léčivo prověřují jeho účinky na nosohltanový karcinom, nemalobuněčný karcinom plic a leukemii (Aldoss et al., 2009).

#### **7.4.2. Flavopiridol (Alvocidib, HMR1275)**

Jedná se o semisyntetický analog flavonu rohitukinu, alkaloidu izolovaného z rostliny *Dysoxylum binectariferum* Hook.f. Nejprve byl popsán jako inhibitor receptorů tyrozin-kinas (především epidermálního růstového faktoru) a protein kinasy A (Senderowicz et al., 1998; Dai & Grant, 2003). Na základě dalších studií byla nalezena jeho antiproliferační aktivita skrze inhibici CDK. Flavopiridol je panselektivní inhibitor CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, CDK7 a CDK9 a je schopen narušit progresi buněčného cyklu mezi přechody fází G<sub>1</sub>/S a G<sub>2</sub>/M (McInnes, 2008; Kryštof & Uldrijan, 2010). Inhibice CDK7 a CDK9 vede stejně jako u roskovitinu ke snížení exprese antiapoptotických proteinů a indukci apoptózy (Dai & Grant, 2003). Antiangiogenní účinky flavopiridolu spočívají především v blokaci produkce VEGF (Melillo et al., 1999). Dále bylo pozorováno, že flavopiridolem zprostředkovaná inhibice transkripčního faktoru P-TEFb, jehož součástí je komplex CDK9-cyklin T, vede k efektivní inhibici replikace viru HIV (Chao et al., 2000).

Flavopiridol se stal prvním inhibitorem CDK, který vstoupil do klinického testování pro léčbu různých typů nádorových onemocnění. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při léčbě chronické lymfocytární leukémie (Byrd et al 2007; Phelps et al., 2009) a akutní myeloidní leukémie, u které byl flavopiridol kombinován s dalšími cytostatiky (Karp et al., 2007).

#### **7.4.3. SNS-032 (BMS-387032)**

Tato látka je silným inhibitorem CDK2, CDK7 a CDK9 a ve vyšších koncentracích je schopna inhibovat i ostatní CDK (CDK1 a CDK4). Účastní se inhibice buněčného cyklu a transkripce (CDK7 a CDK9). *In vitro* vykazuje silný cytotoxický účinek proti buňkám různých nádorových linií, spojený se sníženou expresí Mcl-1 (Chen et al., 2009; Conroy et al., 2009). SNS-032 stejně jako flavopiridol limituje proces angiogeneze prostřednictvím inhibice produkce angiogenních faktorů VEGF (Ali et al., 2007). SNS-032 také silně inhibuje expresi cyklooxygenázy-2 (COX-2), indukovanou prozánětlivými cytokiny IL-1 $\beta$  (Mukhopadhyay et al., 2006), u které bylo prokázáno, že hraje důležitou roli při vývoji nádorové angiogeneze a metastáz (Tsujii et

al., 1998; Dempke et al., 2001; Wu et al., 2006). Inhibitory COX-2 mohou také inhibovat angiogenezi nádoru snížením produkce prostaglandinů v nádorových a endotelových buňkách (Jones et al., 1999; Saha et al., 1999; Williams et al., 2001). Některé studie naznačují, že COX-2 je důležitý i pro samotnou expresi VEGF (Form & Auerbach, 1983; Harada et al., 1994).

SNS-032 se nachází v I. fázi klinického testování pro léčbu solidních tumorů a  $\beta$ -lymfoidních malignit (Dickson & Schwartz, 2009; Malumbres & Barbacid, 2009).

#### **7.4.4. PD-0332991(Palbociclib)**

Palbociclib je orálně dostupný vysoce selektivní inhibitor CDK4 a CDK6. Již ve velmi nízkých koncentracích (nanomolárních) inhibuje buněčnou proliferaci a potlačuje DNA replikaci v řadě Rb-pozitivních nádorových buněk, včetně rakoviny prsu. U Rb negativních buněk tento efekt pozorován nebyl. V důsledku zamezení fosforylace proteinu Rb dochází k zablokování buněčného cyklu v G<sub>1</sub> fázi (Fry et al., 2004).

Specifičnost PD-0332991 ke komplexům CDK4/6-Cyklin D je velmi důležitá a umožňuje inhibici onkogenních událostí za současného ušetření zdravé tkáně, která je v relativním klidovém stavu (Dean et al., 2010). Ve fázi I klinického testování se palbociclib využívá v léčbě non-Hodgkinova lymfomu a mnohočetného myelomu (McInnes, 2008).

#### **7.4.5. Dinaciclib (BMS-387032)**

Jedná se o selektivní inhibitor CDK, který strukturně vychází z pyrazolo[1,5a]pyrimidinové kostry. Bylo zjištěno, že dinaciclib inhibuje CDK1, CDK2, CDK5 a CDK9 a v inhibici CDK2 a 5 je dokonce účinnější než flavopiridol (IC<sub>50</sub> < 5nM; Parry et al., 2010; Nemunaitis et al., 2013). Buněčný cyklus blokuje prostřednictvím inhibice CDK1 a 2 a transkripci potlačuje inhibicí CDK9, která je zodpovědná za fosforylaci RNA polymerázy II (Cai et al., 2006).

V současné době prochází III. fází klinických studií pro léčbu refrakterní chronické lymfocytární leukémie (Guha, 2012).



#### **7.4.6. DRB (5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazol)**

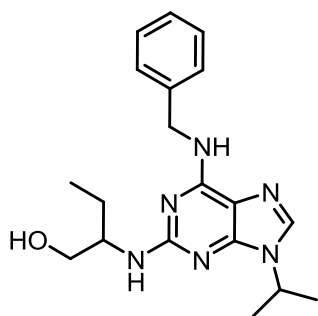
DRB patří k inhibitorům CDK s vysoce selektivním účinkem na CDK7 a CDK9, které fosforylují COOH-termínální doménu (COOH-terminal domain, CTD) největší podjednotky RNA polymerázy II (Marshall & Price, 1995; Yankulov et al., 1995). V koncentracích nad 40 μM dochází k více než 50% inhibici syntézy mRNA (Koumenis & Giaccia, 1997; Ljungman et al., 1999). Blokáda transkripce závislé na RNA polymeráze II vede ke spuštění signálů buněčné smrti (Ljungman et al., 1999; te Poele et al., 1998). Přesný mechanismus účinku DRB ale zatím stále není znám.

Kromě výše zmíněných CDK DRB inhibuje i jiné proteinové kinasy zapojené do buněčného metabolismu, jako jsou kaseinkinasa I (CK1) a II (CK2; Shugar, 1994).

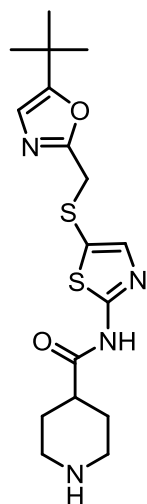
#### **7.4.7 AT-7519**

Jedná se o malou molekulu s multiCDK inhibiční aktivitou, která byla nasyntetizována s využitím rentgenové strukturní analýzy. AT-7519 je inhibitorem CDK1, CDK2, CDK4, CDK5, CDK6, CDK9 a GSK3-β (glykogen syntáza kinasa 3β) a má silnou antiproliferativní aktivitu proti široké škále lidských nádorových buněčných linií, včetně solidních nádorů a hematologických malignit (Wyatt et al., 2008; Squires et al., 2009). Kromě toho je schopna indukovat apoptózu inhibicí fosforylace RNA polymerázy II u buněk mnohočetného myelomu a jiných B-buněčných malignit (Santo et al., 2010; Squires et al., 2010).

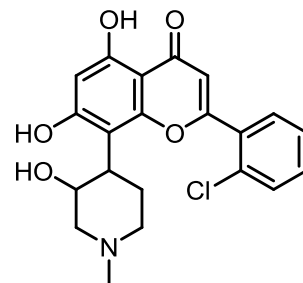
Látka AT-7519 je vyvíjena společností Astex Therapeutics ve spolupráci s Novartis a vstoupila do klinického testování u pacientů s metastazujícími solidními tumory nebo non-Hodgkinovým lymfomem (Malumbres et al., 2008).



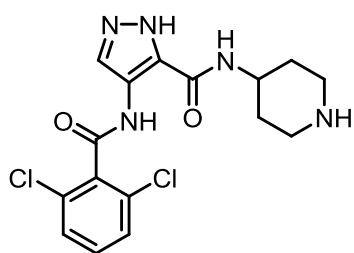
roskovitin



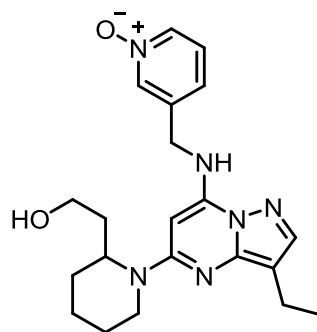
SNS-032



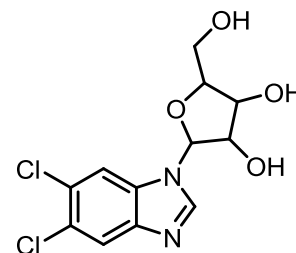
flavopiridol



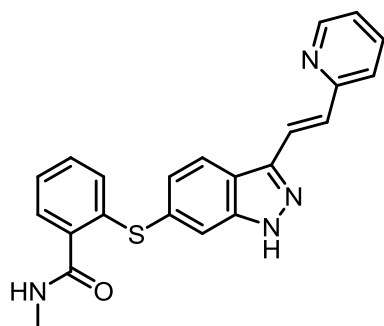
AT-7519



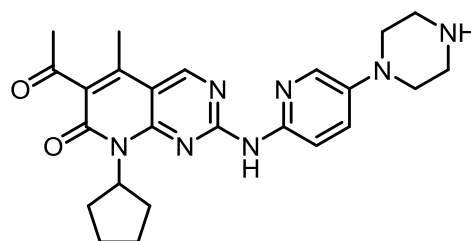
dinaciclib



DRB



axitinib



PD-0332991

Obr. č. 8: Struktury testovaných inhibitorů CDK a axitinibu.

# **Praktická část**

## **8. Materiál a přístroje**

### **8.1. Chemikálie**

2-merkaptoetanol (Serva); akrylamid (MP Biomedicals); aprotinin (Sigma-Aldrich); bromfenolová modř (Sigma-Aldrich); chlorid draselný (Fischer Scientific); chlorid sodný (Fischer Scientific); Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich); dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema); dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich); dithiotreitol (DTT; Sigma-Aldrich); dodecylsírán sodný (SDS; Lach-Ner); Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma-Aldrich); ECL reagent (Thermo Scientific); ECM Gel from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma (Sigma-Aldrich); Endothelial Cell Growth Medium (ECGM; Provitro); etanol (Fischer Scientific); etylendiamintetraoctová kyselina (EDTA; Sigma-Aldrich); ethylenglykoltetraoctová kyselina (EGTA; Sigma-Aldrich); fenylmetylsulfonyl fluorid (PMSF;); fetální sérum (FS; Invitrogen); fetální sérum GOLD (tepelně inaktivováno; PAA/Biotech); fluorid sodný (Sigma-Aldrich); formaldehyd (MP Biomedicals); fosforečná kyselina (Penta); glycerol (Lach-Ner); glycin (MP Biomedicals); hovězí sérový albumin (BSA; Invitrogen); calcein AM roztok (Molecular Probes); kolagen G (Biochrom AG/Baria); L-glutamin roztok (Sigma-Aldrich); leupeptin (Sigma-Aldrich); médium M199 (Sigma-Aldrich); metanol (Fischer Scientific); N, N'-metylenbisakrylamid (Sigma-Aldrich); Nonidet p 40 (Sigma-Aldrich); octová kyselina (Penta); penicilin-streptomycin roztok (Sigma-Aldrich); peroxidisírán amonný (APS; Sigma-Aldrich); Ponceau S (Serva); propidium jodid (Sigma-Aldrich); tetrametyletylendiamin (TEMED; Sigma-Aldrich); tris(hydroxymetyl)aminometan (TRIS; MP Biomedicals); trypsin (Sigma-Aldrich); Tween 20 (MP Biomedicals).

### **8.2. Protilátky**

Jako primární protilátky byly použity myší protilátka anti-RNA Polymeráza II (klon ARNA3; ředění 1:1000; Chemicon), králičí protilátka anti-RNA Polymeráza II Ser-2 (ředění 1:1000; Bethyl Laboratories), králičí protilátka anti-RNA Polymeráza II Ser-5 (ředění 1:1000; Bethyl Laboratories), králičí protilátka anti-FAK (ředění 1:1000; Cell Signaling Technology), králičí protilátka anti-fosfo-FAK Ser-732 (ředění 1:1000; Invitrogen), myší protilátka anti- $\beta$ -aktin (klon C4; ředění 1:5000; Santa Cruz Biotechnology), myší protilátka anti-Rb (klon 4H1; ředění 1:200; Cell Signaling

Technology), králičí protilátka anti-fosfo-Rb Ser-780 (ředění 1:500; Cell Signaling Technology), myšší protilátka anti-Noxa (ředění 1:250; Calbiochem) a králičí protilátka anti-mTOR (klon 7C10; ředění 1:1000; Cell Signaling Technology).

Jako sekundární protilátky značené křenovou peroxidázou byly použity králičí protilátka proti myším imunoglobulinům RAM/Px (ředění 1:5000) a prasečí protilátka proti králičím imunoglobulinům SWAR/Px (ředění 1:1000), obě od firmy Sigma Aldrich. Všechny použité protilátky byly ředěny v 5% BSA v TBS s 0,1% Tween 20.

### 8.3. Testované látky

V experimentální části diplomové práce byly testovány látky roskovitin (připravený dle publikované metodiky Havlíček et al., 1997 a Kryštof et al., 2002), DRB (Sigma Aldrich), flavopiridol (Sigma Aldrich), PD-033299 (Axon Medchem), AT-7519 (Axon Medchem), axitinib (Axon Medchem), SNS-032 (Selleck Chemicals), dinaciclib (Axon Medchem) a nepublikované deriváty inhibitorů CDK s kódovým označením LGR 2922 a LGR 2924 (obě látky poskytl pan doktor Mariusz Mojzych z Univerzity přírodních a humanitních věd v Siedlce v Polsku). Všechny testované látky byly rozpuštěny v DMSO a jako 100mM, 50mM a 10mM zásobní roztoky skladovány při teplotě 4 °C.

Na základě testu cytotoxicity, jehož výsledky jsou uvedeny v Tab. č. 4 byly pro experimenty zvoleny netoxické koncentrace testovaných látek.

Tab. č. 4: Hodnoty cytotoxicity testovaných látek na buňkách HUVEC. NT-netestováno.

[ $\mu$ M]	HUVEC 72 h	HUVEC 24 h
roskovitin	19,8 $\pm$ 2,5	>100
DRB	54,3 $\pm$ 4,7	70,3 $\pm$ 6,7
flavopiridol	0,2 $\pm$ 0,0	>5
PD-0332991	26,7 $\pm$ 3,3	25,3 $\pm$ 2,8
AT-7519	0,7 $\pm$ 0,0	>5
SNS-032	NT	>10
dinaciclib	NT	9,6 $\pm$ 0,6
axitinib	NT	>10
LGR 2922	NT	91,0 $\pm$ 1,3
LGR 2924	NT	>100

#### 8.4. Roztoky

**5x SDS vzorkovací pufr:** 0,3M TRIS (pH = 6,8); 10% SDS; 50% glycerol; 0,05% bromfenolová modř; 5% 2-merkaptoetanol.

**5% zaostřovací gel:** na 2 gely bylo potřeba 0,84 ml roztoku akrylamidu (30% akrylamid + 0,8% bisakrylamid); 0,63 ml 1M Tris (pH 6,8); 50 µl 10% SDS; 3,51 ml destilované H<sub>2</sub>O; 30 µl 10% APS; 5 µl TEMEDu.

**10% dělicí gel:** na 2 gely bylo potřeba 2,5 ml roztoku akrylamidu (30% akrylamid + 0,8% bisakrylamid); 2,8 ml 1M Tris (pH 8,8); 75 µl 10% SDS; 2,15 ml destilované H<sub>2</sub>O; 30 µl 10% APS; 5 µl TEMEDu.

**10% DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium; 100 U/ml penicilin; 100 µg/ml streptomycin; 10 % (v/v) fetální sérum; 2mM L-glutamin.

**12% ECGM:** Endothelial Cell Growth Medium; Supplement mix s 2% FS a růstovými faktory; 10 % (v/v) fetální sérum GOLD.

**barvicí roztok Coomasie Brilliant Blue G-250:** 1 g Coomasie Brilliant Blue G-250; 450 ml metanolu; 450 ml dest. vody; 100 ml kyseliny octové.

**barvicí roztok Ponceau S:** 0,2% Ponceau S v 1% kyselině octové.

**blokovací roztok:** 5% BSA v TBS s 0,1% Tween 20.

**blotovací pufr:** 25mM TRIS; 192mM glycin.

**Bradfordovo činidlo:** 0,01% Coomasie Brilliant Blue; 95% etanol; 85% kyselina fosforečná.

**elektroforetický pufr:** 25mM TRIS; 192 mM glycin; 0,1% SDS

**kolagen G v PBS:** 0,25% kolagen G v PBS.

**lyzační pufr (RIPA):** 20mM TRIS (pH = 7,4); 100mM NaCl; 2mM EGTA; 5mM EDTA; 2mM NaF; 0,2% Nonidet p 40; těsně před použitím byl přidán 1mM DTT; 1mM PMSF; 10 µg/ml leupeptin; 10 µg/ml aprotinin.

**PBS:** 137mM NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O; 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH = 7,4 – 7,5).

**TBS:** 137mM NaCl, 20 mM TRIS.

**trypsin/EDTA:** 0,1% trypsin; 0,5mM EDTA.

**roztok akrylamidu:** 30% akrylamid; 0,8% N, N'-metylenbisakrylamid.

#### 8.5. Přístrojové vybavení

Aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad, USA), blotovací aparatura Mini Trans-Blot Cell (BioRad, USA), centrifuga BR4i

s vyměnitelnými rotory (Jouan, FRA), chemiluminiscenční kamera LAS4000 (FujiFilm, JPN), CO<sub>2</sub> inkubátor (Sanyo, JPN), flowbox s vertikálním prouděním vzduchu Gelaire TC 48 (Gelairé, Flow Laboratories, AUS), fluorescenční mikroskop Olympus IX51 (Olympus, JPN) vybavený digitální kamerou (Photometrics, GB), Ibidi sklíčka (Ibidi GmbH, DEU), kývací třepačka (Biosan, LAT), membránová vývěva VM 40D (Lavat, CZE), průtokový cytometr Cell Lab Quanta™ SC-MPL (Beckman Coulter, USA), spektrofotometr UV-1800 (Shimadzu Scientific Instruments, USA), světelný mikroskop CK2 (Olympus, JPN), ultrazvukový homogenizátor Sonopuls HD2200 (Bandelin, DEU), vakuová pumpa KNF (Laboport, USA), vodní lázeň GFL 1032 (GFL®, DEU), vortex Heidolph Reax Top (Heidolph, DEU).

## **8.6. Biologický materiál**

Pro experimenty byly použity endotelové buňky z lidského pupečníku (HUVEC – Human Umbilical Vein Endothelial Cells) izolované metodou kolagenázové digesce (McGregor et al., 1994) na Ústavu lékařské chemie a biochemie Univerzity Palackého v Olomouci a poskytnuté prof. RNDr. Jitkou Ulrichovou, CSc.

## **9. Metody**

### **9.1. Stanovení životaschopnosti buněk**

Testy životaschopnosti buněk byly provedeny pomocí calcein AM roztoku. Fluorescence živých buněk byla měřena při 485/538 (ex/em) pomocí Fluoroskan Ascent Readeru (Thermo Labsystems, USA) podle zavedené metodiky Jorda et al., 2011.

### **9.2. Kultivace a pasážování buněk**

Buňky HUVEC byly kultivovány v CO<sub>2</sub> inkubátoru v kultivačních lahvích (75 cm<sup>2</sup>) ve standardním 12% ECGM médiu při teplotě 37 °C a obsahu CO<sub>2</sub> 5 %. Vnitřní plocha kultivačních lahví musí být vždy před samotnou kultivací min. 15 minut inkubována s roztokem kolagenu G v PBS při 37 °C, neboť buňky HUVEC jsou

adherentní a kolagen je nezbytný k jejich přisednutí na dno kultivační láhve. Takto kultivované buňky lze využívat pro experimenty maximálně do 6. pasáže.

Při pasážování bylo odsáto z kultivační nádoby staré médium a po opláchnutí buněk pomocí PBS byly přidány 2 ml trypsin/EDTA. Po dvouminutové inkubaci v CO<sub>2</sub> inkubátoru byly buňky spláchnuty do DMEM média a centrifugovány 5 minut při 1200 rpm. Pelet byl resuspendován v ECGM médiu, rozdělen do tří kultivačních lahví a doplněn na objem 10-15 ml.

### **9.3. In vitro migrační rýhový test (Scratch assay)**

Z kultivační nádoby bylo odstraněno staré médium a buňky byly po dvojitým promytí s PBS inkubovány 2 minuty při 37 °C v trypsin/EDTA. Po přidání DMEM média byly buňky centrifugovány 5 min při 1200 rpm a vzniklý pelet byl resuspendován v ECGM médiu. Následně byly buňky vysety do 24 jamkových desek, které byly předem inkubovány s roztokem kolagenu G. Do každé jamky bylo napipetováno 500 µl buněk.

Po 24 hodinách v CO<sub>2</sub> inkubátoru, kdy bylo dno pokryto souvislou vrstvou buněk, byla do středu každé jamky pomocí špičky zhotovena souvislá rovná rýha. Po odlití starého média a oplachu PBS byly aplikovány testované látky naředěné v ECGM médiu. Jako pozitivní kontrola sloužilo samotné ECGM médium a jako negativní kontrola bylo použito médium M199, které neobsahuje růstové faktory, a buňky v něm nemohou migrovat. Takto připravené 24 jamkové desky byly inkubovány 16 hodin při 37 °C. K propláchnutým buňkám bylo do každé jamky přidáno 300 µl 4% formaldehydu. Po jedné hodině fixace za pokojové teploty byly buňky obarveny roztokem Coomassie Brilliant Blue G-250 (300 µl/jamka), analyzovány pomocí světelného mikroskopu a pořízené fotografie vyhodnoceny v "in house" softwaru (Fürst & Rárová, 2011).

### **9.4. In vitro test kapilární formace (Tube formation assay)**

ECM gel byl přes noc rozmražen v lednici. Do každé jamky předem vychlazeného lbidi sklíčka bylo napipetováno 10 µl ECM gelu a poté následovala inkubace 30 minut při 37 °C. Mezitím byly připraveny testované látky, vždy 2x koncentrovanější než výsledná koncentrace v jamce. Buňky byly sklizeny trypsinizací stejně jako v kapitole č. 9.2., poté byly spočítány a naředěny ECGM médiem (12 000



buněk/50 µl). K přichystaným látkám bylo přidáno stejné množství naředěných buněk (poměr 1:1) a z takto vzniklé směsi bylo pipetováno vždy 50 µl do jedné jamky. Každá látka byla nanášena v triplicátu. Jako pozitivní kontrola sloužily buňky ošetřené 300nM axitinibem, a jako negativní, buňky v přítomnosti samotného ECGM média. Takto připravené Ibidi sklíčko bylo inkubováno 16 hodin při 37 °C a vyfoceno pod mikroskopem. Pořízené fotografie byly vyhodnoceny v "in house" softwaru (Fürst & Kryštof, 2011).

### **9.5. Analýza buněčného cyklu**

Po 24 hodinové kultivaci v petriho miskách bylo buňkám vyměněno staré kultivační médium ECGM za nové s rozpuštěnými testovanými látkami o příslušných koncentracích. Ke kontrolním buňkám bylo přidáno samotné ECGM. Takto ošetřené buňky byly inkubovány dalších 24 hodin v CO<sub>2</sub> inkubátoru při 37 °C a obsahu CO<sub>2</sub> 5 %.

Buňky byly sklizeny trypsinizací a přeneseny do 10ml zkumavek. Po centrifugaci (1200 g, 10 minut, 4 °C) byly buňky 2x promyty ve filtrovaném PBS a minimálně 30 minut fixovány na ledu vychlazeným 70% etanolem. Zafixované buňky byly centrifugovány 5 minut při 1200 g a 4 °C a opět promyty v PBS. Následně byly resuspendovány v PBS obsahujícím propidium jodid (10 µg/ml). Po 30 minutové inkubaci za pokojové teploty byl obsah zkumavek přepipetován do speciálních vialek a analyzován na průtokovém cytometru. Fluorescence DNA nabarvené propidium jodidem byla změřena při 536/617 (ex/em).

### **9.6. Lyzace buněk**

Pro analýzu vybraných proteinů metodou western blotting byly buňky po 24 nebo 2 hodinové inkubaci s testovanými látkami mechanicky seškrabány ze dna kultivačních misek, přeneseny do malých zkumavek a centrifugovány po dobu 10 minut při 1200 g a 4 °C. Následně byly 2x promyty PBS a přeneseny do 1,5ml mikrozkušavek. Supernatant byl opatrně odsát a mikrozkušavky s buňkami umístěny do mrazáku s teplotou -80 °C.

Rozmražené buňky byly 20 minut lyzovány na ledu v odpovídajícím množství lyzačního RIPA pufru. Poté následovala další lyzace pomocí ultrazvukového homogenizátoru a 30 minutová centrifugace při 14 000 x g a 4 °C. Supernatant byl odsát do nové mikrozkušavky a pomocí Bradfordovy metody (Bradford, 1976) byla

zjištěna koncentrace proteinů v buněčném lyzátu. Všechny vzorky byly naředěny RIPA puřrem tak, aby v každém vzorku bylo stejné množství proteinů. Ke vzorkům bylo přidáno odpovídající množství 5x SDS a po 2 minutové denuraci při 95 °C, byly vzorky pro následnou elektroforézu uschovány v hlubokomrazícím boxu při teplotě – 80 °C.

### **9.7. SDS-PAGE a western blotting**

Vzorky byly rozeřřáty (3 minuty při 95 °C) a naneseny do jamek elektroforetického gelu. Diskontinuální elektroforéza ve vertikálním uspořřádání probíhala v 5% zaostřovacím gelu v kombinaci s 10% dělicím gelem. Pro fokusaci proteinů bylo napětí nastaveno na 80 V a po přechodu proteinů do gelu dělicího bylo zvýšeno na 120 V.

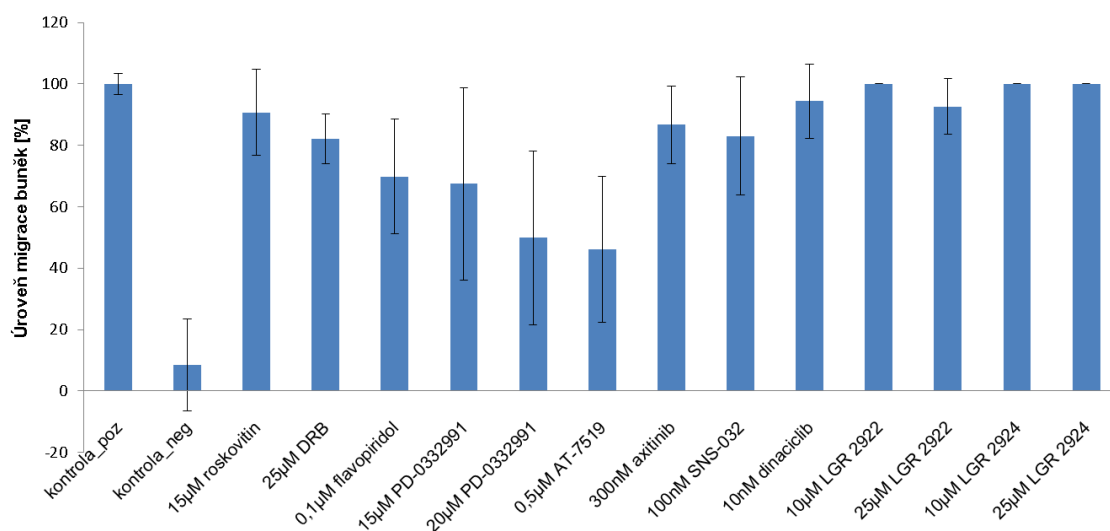
Po separaci byl gel vložen do aparatury pro Western blotting. Přenos proteinů na nitrocelulózovou membránu probíhal 2 hodiny při 270 mA za stálého chlazení ledem. Následně byla membrána barvena 5 minut v roztoku Ponceau S a opláchnuta destilovanou vodou. Vysušená membrána byla nařezána na proužky podle markeru v místech odpovídajících velikostem detekovaných proteinů.

Proužky byly odbarveny v TBS a inkubovány 2 hodiny v blokovacím roztoku na kývačce při laboratorní teplotě, během čehož se zablokovaly nespecifické vazby. Po promytí s TBS byly na proužky naneseny primární protilátky, se kterými byly inkubovány přes noc při 4 °C ve vlhké komůrce. Následující den byly proužky postupně promývány 5 minut v TBS, 5 minut v TBS s Tweenem, 5 minut v TBS a 10 minut v TBS. Následovala dvouhodinová inkubace s naředěnými sekundárními protilátkami při laboratorní teplotě. Po zopakování promývacího procesu byly proužky převrstveny roztokem luminolu a peroxidu z ECL kitu v poměru 1:1. Detekce chemiluminiscence proběhla pomocí CCD kamery LAS4000.

## 10. Výsledky

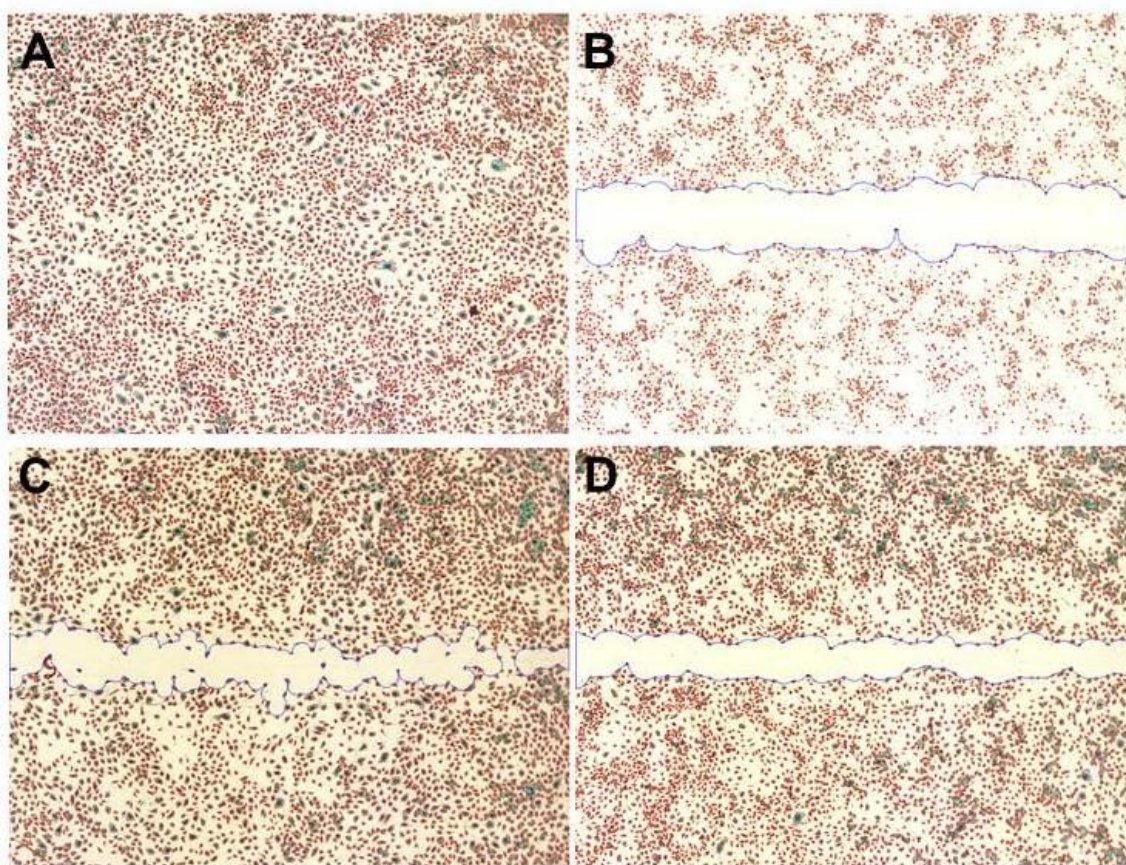
### 10.1. Účinek testovaných látek na migraci endotelových buněk

Schopnost migrace endotelových buněk představuje jeden ze základních kroků procesu angiogeneze. Sledování její inhibice je tedy jedním z hlavních testů jak hodnotit látky pro potencionální antiangiogenní účinek. Principem migračního testu je vytvoření souvislé rýhy pomocí pipetovací špičky do konfluentní kultury buněk, což vede k odstranění definované plochy buněk HUVEC. Po 16 hodinové inkubaci s testovanými látkami se sleduje migrace endotelových buněk do vytvořené rýhy. Buňky pozitivní kontroly byly inkubovány v samotném ECGM médiu s dostatkem růstových faktorů a simulují tak migraci endotelových buněk za přirozených podmínek (viz Obr. č. 9). Buňky negativní kontroly byly inkubovány s médiem M199, které neobsahuje růstové faktory a buňky HUVEC v něm nemigrují (viz Obr. č. 9). Podmínky experimentu byly zvoleny tak, aby buňky pozitivní kontroly uzavřely rýhu téměř dokonale. Velikost nepokryté oblasti byla kvantifikována analýzou obrazu v "in house" softwaru a získané hodnoty byly vztaženy k pozitivní kontrole, která představovala 100 %. Všechny testované látky o daných koncentracích byly testovány v triplikátech a získané výsledky jsou zobrazeny v Grafu č. 1.



Graf č. 1: Úroveň migrace buněk HUVEC po 16 hodinové inkubaci s testovanými látkami. Kontrola\_neg – médium M199.

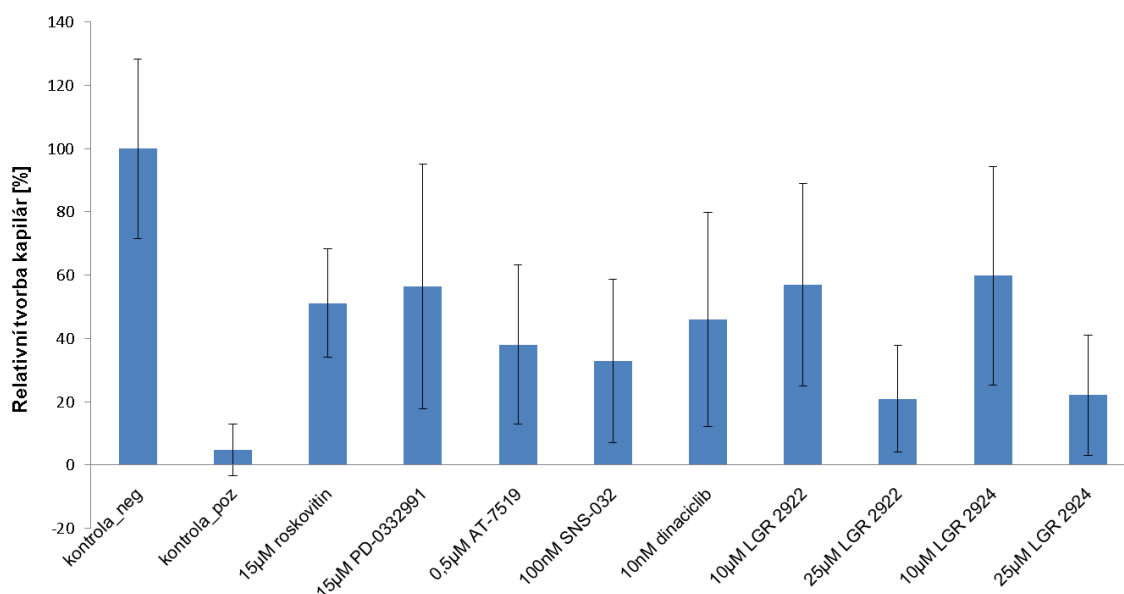
Z testovaných látek je neúčinnější látka AT-7519, která v koncentraci 0,5  $\mu$ M inhibovala migraci o 54 %. Slabší účinek na potlačení migrace vykazovala látka PD-0332991, která v koncentraci 20  $\mu$ M inhibovala migraci o 50% a v koncentraci 15  $\mu$ M o 33 %. Flavopiridol o koncentraci 0,1  $\mu$ M inhiboval migraci o 30 %. Velmi mírná inhibice migrace byla pozorována i u buněk ošetřených látkami DRB (o 18 %), SNS-032 (o 17 %), axitinib (o 13 %) a roskovitín (o 9 %). Účinek zbývajících látek na migraci byl buď zanedbatelný v rámci směrodatné odchylky (u dinaciclibu o 6 % a u 25 $\mu$ M LGR 2922 o 7 %), anebo žádný, jako je tomu u 10 $\mu$ M LGR 2922 a 10 a 25 $\mu$ M LGR 2924 (u všech o 0 %).



Obr. č. 9: Vliv testovaných látek na migraci buněk HUVEC po 16 hodinové inkubaci. Fotografie po vyhodnocení v "in house" softwaru (zvětšení 40x). **A** – pozitivní kontrola, **B** – negativní kontrola (médium M199), **C** – 20 $\mu$ M PD-0332991, **D** – 0,5 $\mu$ M AT-7519.

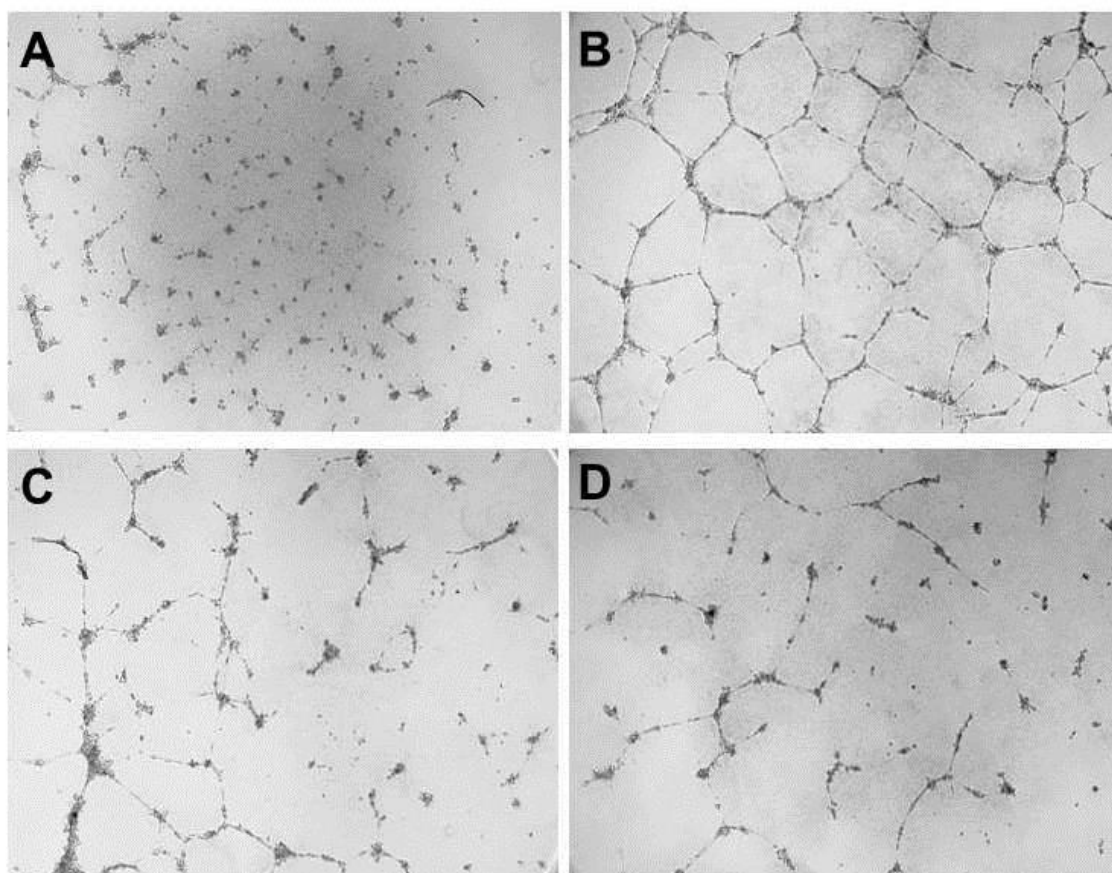
## 10.2. Kapilární formace *in vitro* po ovlivnění testovanými látkami

Jako druhý experiment byl zvolen test kapilární formace *in vitro*, který slouží k hodnocení inhibičního vlivu biologicky aktivních látek na diferenciaci lidských endotelových buněk. V tomto testu jsou endotelové buňky nanесeny do jamek Ibidi sklíčka pokrytých gelem z mezibuněčné matrix, který je tvořen směsí proteinů bazální membrány (kolageny, glykoproteiny a proteoglykany) a růstových faktorů. Buňky vyseté na povrchu gelu v přítomnosti angiogenních faktorů invadují do nižších vrstev substrátu, kde vytváří kapilárám podobné struktury. Buňky negativní kontroly byly inkubovány v samotném ECGM médiu a simulují tak tvorbu kapilár za přirozených podmínek (viz Obr. č. 10). Buňky pozitivní kontroly byly ošetřeny 300nM axitinibem a kapilární síť nevytváří (viz Obr. č. 10). Axitinib totiž inhibuje VEGF signalizaci. Podmínky experimentu byly zvoleny tak, aby buňky negativní kontroly vytvářely síť kapilár. Úroveň tvorby kapilár byla kvantifikována analýzou obrazu v "in house" softwaru a vyhodnocena jako procento negativní kontroly, u níž celková délka kapilár představuje 100 %. Látky DRB a flavopiridol byly po prvním provedení testu kapilární formace neúčinné, nebyly dále v diplomové práci testovány ani opakovány a nejsou ve výsledcích uvedeny. Ostatní látky o daných koncentracích byly testovány v triplicátech a získané výsledky jsou zobrazeny v Grafu č. 2.



Graf č. 2: Relativní účinek testovaných látek na tvorbu kapilár u buněk HUVEC po 16 hodinové inkubaci. Kontrola\_poz – 300nM Axitinib.

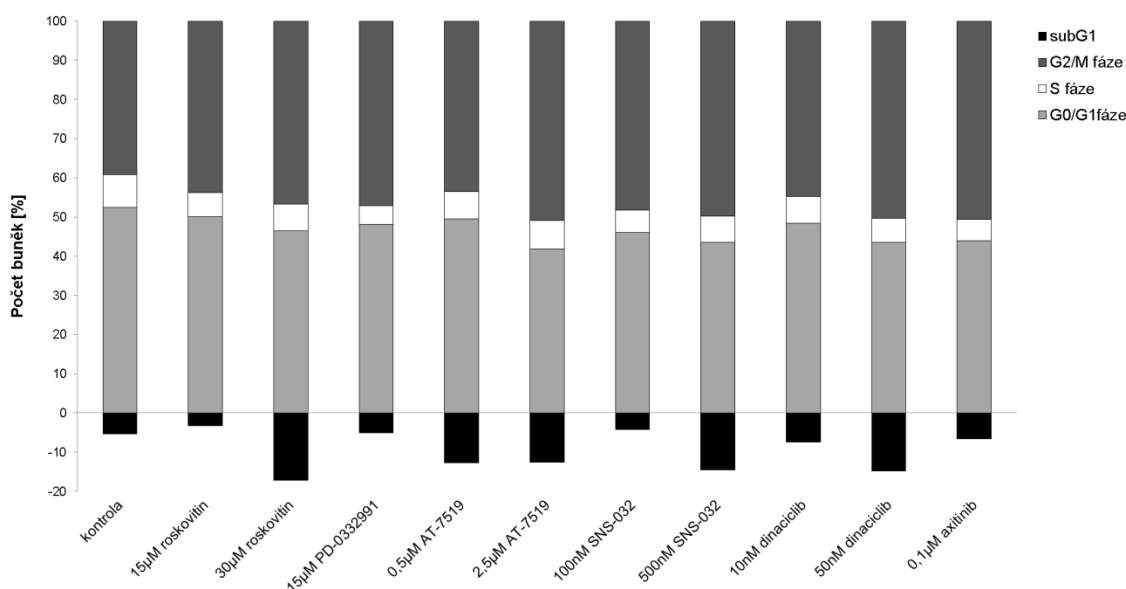
U všech testovaných látek byl v různé míře prokázán inhibiční efekt na diferenciaci endotelových buněk v kapiláry. Největší pokles relativní tvorby kapilární sítě byl zjištěn u látek LGR 2922 a LGR 2924 o koncentraci 25  $\mu$ M, u nichž došlo ke snížení tvorby kapilár o 79 a 78 %. V nižších koncentracích (10  $\mu$ M) již ale takových výsledků nedosahovaly (u LGR 2922 o 43 % a u LGR 2924 o 40 %). Látka SNS-032 inhibovala tvorbu tubulů o 67 % a AT-7519 o 62 %. Efekt dinaciclibu byl v rámci testovaných látek průměrný (o 54 %). Roskovitin (o 49 %) a PD-0332991 (o 44 %) měly na endotelové buňky velmi podobný účinek a nebyly mezi nimi zjištěny žádné signifikantní rozdíly.



Obr. č. 10: Vliv testovaných látek na diferenciaci buněk HUVEC po 16 hodinové inkubaci. Fotografie před vyhodnocením v "in house" softwaru (zvětšení 40x). **A** – pozitivní kontrola (300nM axitinib), **B** – negativní kontrola, **C** – 15 $\mu$ M PD-0332991, **D** – 0,5 $\mu$ M AT-7519.

### 10.3. Vliv testovaných látek na buněčný cyklus endotelových buněk

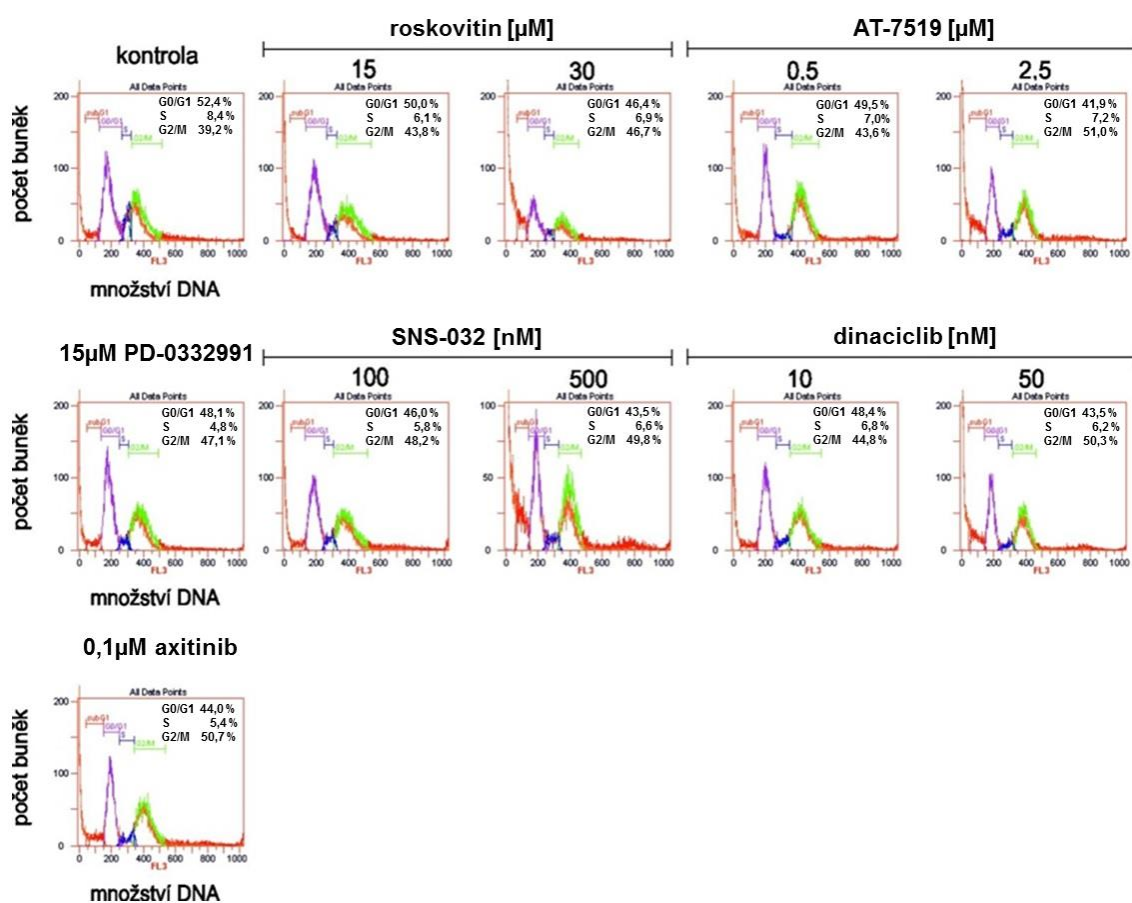
Buňky HUVEC byly ovlivněny testovanými látkami o daných koncentracích a po 24 hodinové inkubaci zafixovány. Celková DNA byla nabarvena propidium jodidem (PI) a analyzována na průtokovém cytometru. Na základě rozdílného obsahu DNA v průběhu buněčného cyklu byla detekována rozdílná intenzita signálu PI, která odpovídá jednotlivým fázím buněčného cyklu. Frakce subG<sub>1</sub> je tvořena apoptotickými buňkami a jejich fragmenty. Kontrolní buňky nebyly ovlivněny žádnými testovanými látkami a byly inkubovány pouze v ECGM médiu. Látky LGR 2922 a LGR 2924 nebyly v tomto ani v dalších experimentech této diplomové práce testovány, neboť jako jediné nevykazovaly účinek současně na migraci a tvorbu kapilární sítě. Zbylé látky o daných koncentracích byly testovány v triplikátech a naměřená data jsou zobrazena v Grafu č. 3.



Graf č. 3: Kvantifikace analýzy buněčného cyklu buněk HUVEC po 24 hodinové inkubaci s testovanými látkami pomocí průtokové cytometrie.

Z naměřených dat vyplývá, že testované látky nezpůsobily blok buněčného cyklu, nicméně ovlivňovaly jeho jednotlivé fáze. U kontroly bylo procentuální zastoupení buněk v G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fázi 52,4 %, v S fázi 8,4 % a G<sub>2</sub>/M fázi 39,2 %. K největšímu 10,5% poklesu G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fázových buněk došlo u 2,5µM AT-7519 (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> = 41,9 %). Největší úbytek S-fázových buněk byl pozorován u 15µM PD-0332991 (S = 4,8 %) a 0,1µM axitinibu (S = 5,4 %). Počet buněk v G<sub>2</sub>/M fázi se nejvíce zvýšil u buněk ošetřených 2,5µM AT-7519 (G<sub>2</sub>/M = 50 %), 0,1µM axitinibem (G<sub>2</sub>/M = 50,7 %) a 50nM

dinaclicibem ( $G_2/M = 50,3\%$ ) S rostoucí koncentrací testovaných látek byl pozorován nárůst počtu buněk v sub $G_1$  fázi, která odpovídá apoptotickým buňkám.



Obr. č. 11: Procentuální zastoupení jednotlivých fází buněčného cyklu buněk HUVEC po 24 hodinové inkubaci s testovanými látkami.

#### 10.4. Vliv testovaných látek na hladiny vybraných proteinů

Pro zjištění, zda testované látky inhibují CDK v buňkách HUVEC, byla použita metoda western blotting, pomocí níž je možné sledovat hladiny vybraných proteinů a jejich posttranslačních modifikací. Vzhledem k předpokládaným mechanismům účinku byly sledovány hladiny RNA polymerázy II a to jak celkového proteinu, tak jeho dvou fosforylovaných forem na Ser-2 a Ser-5. Kromě RNA polymerázy II byla sledována i hladina fokální adhezivní kinasy (FAK) a její fosforylované formy na Ser-732. Detekce  $\beta$ -aktinu sloužila jako kontrola rovnoměrné koncentrace proteinů ve vzorcích. Kontrolní buňky byly inkubovány pouze v samotném ECGM médiu. Výsledky 2 a 24 hodinové

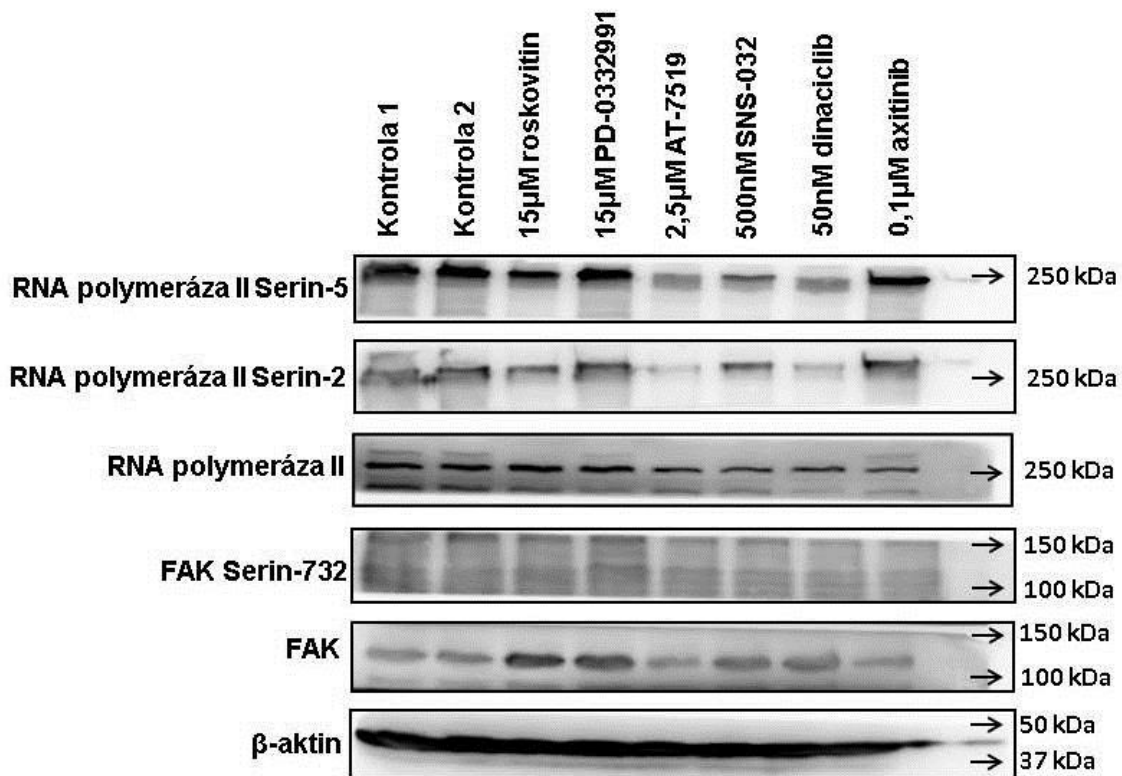


inkubace s testovanými látkami o daných koncentracích jsou zobrazeny na Obr. č. 12 a 13.

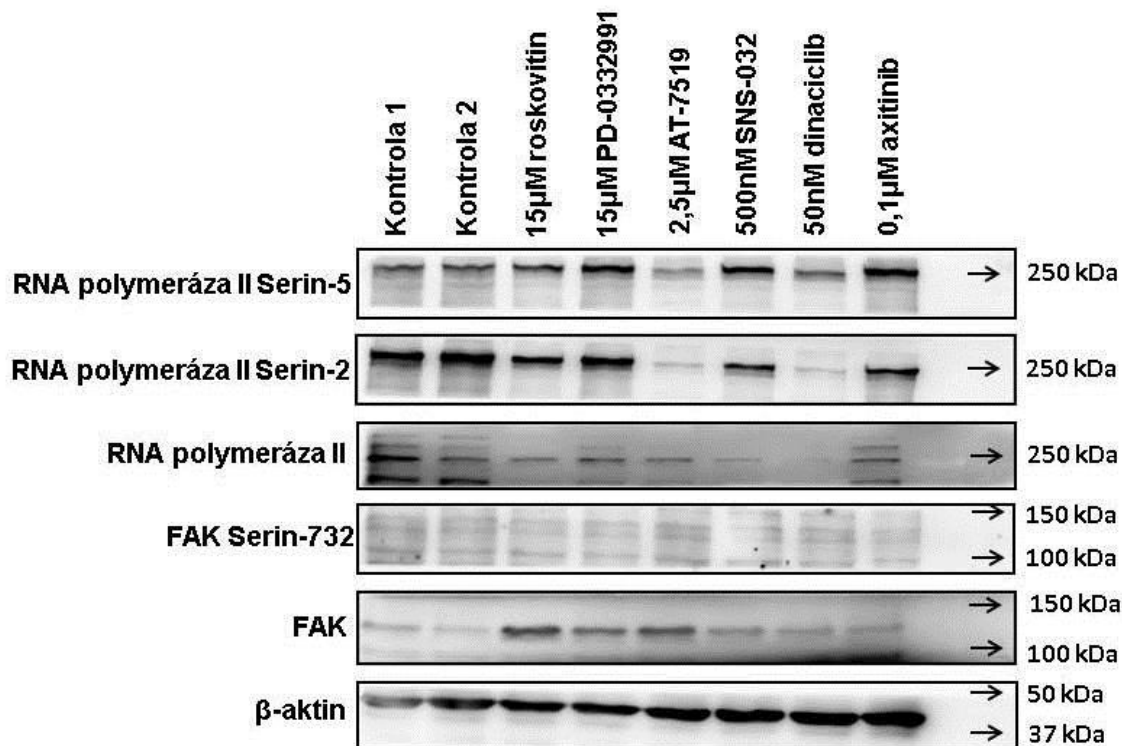
RNA polymeráza II je enzym eukaryotických buněk, který je nezbytný pro transkripci DNA v mRNA. Aktivita RNA polymerázy II je ovlivněna celou řadou regulačních proteinů, mezi které patří i transkripční CDK. Transkripční CDK reversibilně fosforylují C-koncovou doménu největší podjednotky (RPB1) RNA polymerázy II, a tím regulují jednotlivé fáze transkripce od její iniciace, přes elongaci, až po její terminaci (Egloff et al., 2012). CTD je tvořena několika opakujícími se heptapeptidovými repetičemi 1-Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser-7, jejichž počet se liší v závislosti na typu organismu (v rozmezí 26 repetič u kvasinek až po 52 repetič u savců). Fosforylovány mohou být Ser-2, Ser-5, Ser-7, Thr-4 a Tyr-1 (Bösken et al., 2014). K hlavním transkripčním CDK patří CDK7, 8 a 9. CDK7 je jednou z podjednotek obecného transkripčního faktoru TFIIH, který fosforyluje RNA polymerázu II na Ser-5 a Ser-7 během iniciace transkripce (Egry & Coin, 2011; Larochelle et al., 2012). CDK8 je součástí mediátorového komplexu regulujícího RNA polymerázu II v průběhu transkripce (Carlsten et al., 2013). CDK9 v komplexu s cyklinem T je součástí pozitivního transkripčního elongačního faktoru P-TEFb, který fosforylací na Ser-2 stimuluje elongaci (Brès et al., 2008).

FAK je cytoplazmatická tyrosinkinasa, která zastává důležitou roli během embryonálního vývoje a v patogenezi řady onemocnění, včetně rakoviny (Golubovskaya et al., 2009). FAK se výrazně uplatňuje i při migraci buněk. Aktivuje se četnými stimuly, jako jsou integriny a růstové faktory. Aktivita FAK je závislá na fosforylaci šesti tyrozinových zbytků (Tyr-397, Tyr-407, Tyr-576, Tyr-577, Tyr-861 a Tyr-925). K fosforylaci však může dojít i na serinových zbytcích (Ser-722, Ser-723, Ser-843, Ser-910, Parsons et al., 2000). Ukázalo se, že fosforylace FAK na Ser-732 prostřednictvím CDK5 reguluje organizaci mikrotubulů, jaderný pohyb a neuronální migraci, nikoli však katalytickou aktivitu FAK (Xie et al., 2003). Dále bylo zjištěno, že fosforylace FAK na Ser-732 prostřednictvím ROCK (Rho-associated protein kinase) má zásadní vliv na fosforylaci FAK na Tyr-407 a podporuje buněčnou migraci (Le Boeuf et al., 2006).

Kromě výše uvedených proteinů byla provedena i western blotová analýza celkového retinoblastomového proteinu včetně jeho fosforylované formy na Ser-780, dále proteinů mTOR (mammalian target of rapamycin) a Noxa. Tyto výsledky však v diplomové práci nejsou uvedeny, neboť nevyšly podle předpokladů. Například u retinoblastomového proteinu nebyl pozorován kýžený účinek testovaných inhibitorů CDK na fosforylaci Ser-780 a ani hladina celkového proteinu, která by v ideálním případě byla konstantní, nevyšla podle předpokladů.



Obr. č. 12: Hladiny vybraných proteinů v buňkách HUVEC po 2 hodinové inkubaci s testovanými látkami.



Obr. č. 13: Hladiny vybraných proteinů v buňkách HUVEC po 24 hodinové inkubaci s testovanými látkami.

Z výsledků je patrné, že u buněk ošetřených 2,5 $\mu$ M AT-7519 a 50nM dinaciclibem dochází oproti kontrolním buňkám k výraznému poklesu hladin RNA polymerázy II fosforylované na Ser-2 i Ser-5, a to jak po 2 hodinové, tak po 24 hodinové inkubaci s testovanými látkami. Velmi mírný pokles lze pozorovat i u SNS-032, nicméně po 24 hodinové inkubaci je jeho hladina shodná s kontrolními buňkami. U zbývajících látek k žádným výrazným změnám nedošlo. Hladina celkové RNA polymerázy II se po 2 hodinové inkubaci u žádné z testovaných látek nemění, avšak u delší 24 hodinové inkubace lze pozorovat i její pokles, a to u 50nM dinaciclibu a 500nM SNS-032. Výsledky u látek AT-7519, dinaciclibu a SNS-032 odpovídají očekávání, neboť tyto látky jsou prokázanými inhibitory transkripčních CDK (viz kapitoly 7.4.7.; 7.4.5. a 7.4.3). PD-0332991 ani axitinib nepotlačovaly fosforylaci RNA polymerázy II, neboť ani jedna z těchto látek transkripční CDK neinhibuje. PD-0332991 je selektivním inhibitorem CDK4 a CDK6 a axitinib je inhibitorem VEGF signalizace, nikoli CDK (viz kapitoly 7.4.4. a 6.2.2.) U roskovitinu nebyla pozorována inhibice fosforylace, i když je prokázaným inhibitorem transkripčních CDK (viz kapitola 7.4.1.). Tento výsledek může být dán jeho nízkou testovanou koncentrací, rozdílným časem ovlivnění nebo typem použitých buněk.

Detekce fosforylované FAK na serinu-732 je sice ve výsledcích uvedena, ale není reprezentativní, neboť hladiny se u jednotlivých vzorků nedají odečíst, a to i přesto, že byl experiment několikrát opakován s delší inkubací v koncentrovanější primární protilátce. Jak je patrné z výsledků, zvýšenou expresi celkového FAK lze pozorovat u 15 $\mu$ M roskovitinu a 15 $\mu$ M PD-0332991, a to jak po 2 hodinové, tak po 24 hodinové inkubaci. Velmi mírné zvýšení hladiny FAK je možné vidět i u 500nM SNS-032 a 50nM dinaciclibu, ale pouze po 2 hodinové inkubaci. U látky AT-7519 lze s delší dobou inkubace pozorovat nárůst hladiny celkové FAK. U axitinibu nedošlo k žádným změnám. Cílem tohoto experimentu bylo, u buněk ošetřených testovanými inhibitory CDK, detekovat změny ve fosforylaci FAK na Ser-732, za kterou je zodpovědná CDK5. Hladina celkové FAK by se od kontrolních buněk neměla lišit. Získané výsledky, však tomuto předpokladu neodpovídají.

## 11. Diskuze

Cílem praktické části diplomové práce bylo porovnat účinek známých inhibitorů CDK na lidských endotelových buňkách HUVEC, se kterými lze simulovat angiogenní proces *in vitro*. Inhibitory CDK byly navrženy pro regulaci buněčného cyklu a jejich mechanismy účinku jsou popsány především na nádorových buněčných liniích. U nenádorových buněk ale není jejich úloha zatím zcela pochopena a to především díky skutečnosti, že většina jejich buněčných cílů ještě nebyla nalezena. V poslední době však přibývá značné množství studií popisujících antiangiogenní účinek inhibitorů CDK i na nenádorových buňkách (jako je tomu například u SNS-032 a roskovitinu, Ali et al., 2007; Zahler et al., 2010).

Pro experimentální část diplomové práce byly vybrány inhibitory CDK odlišné chemické struktury a lišící se svou specifičností. Tyto látky byly použity pro detekci angiogeneze *in vitro* v buňkách HUVEC, jelikož inhibice nádorové vaskularizace představuje velmi účinnou terapeutickou možnost léčby mnoha druhů nádorů.

První testovanou látkou byl inhibitor CDK1, CDK2, CDK5, CDK7 a CDK9 roskovitin vykazující antimitotický a proapoptotický účinek na širokou škálu nádorových buněk (Kryštof et al., 2005; Meijer et al., 2006). Jeho vliv na migraci endotelových buněk HUVEC byl v rámci testovaných inhibitorů spíše slabší, protože potlačoval migraci o 9 %. K inhibici migrace ale přece jen dochází, ačkoli s menší účinností než je uvedeno ve výsledcích studie Liebl et al., 2010. V této studii potlačoval roskovitin migraci o 20 % v koncentraci 10  $\mu\text{M}$  a o 67 % v koncentraci 30  $\mu\text{M}$  po 16 hod. inkubaci. Nově připravené bioestery roskovitinu v práci Weitensteiner et al., 2013 dosahovaly ještě lepších výsledků a to o 30-50 % v koncentraci 10  $\mu\text{M}$ . V rámci této diplomové práce bylo zjištěno, že 15 $\mu\text{M}$  roskovitin snižuje tvorbu tubulární sítě o 49 % a to opět potvrzuje výsledky v Liebl et al., 2010 (10 $\mu\text{M}$  roskovitin potlačil tvorbu kapilární sítě o 30 % a 30 $\mu\text{M}$  roskovitin o 60 % po 16 hod. inkubaci). Účinek roskovitinu na migraci a formování kapilár u buněk HUVEC lze nálezt i v práci Rárová et al. 2012, kde 30 $\mu\text{M}$  roskovitin inhiboval migraci o 75,6 % a kapilární síť byla zredukována o 76,5 % po 20 hod. inkubaci.

Na rozdíl od nádorových linií, u kterých může roskovitin blokovat buněčný cyklus v  $G_0$ ,  $G_1$ , S a  $G_2/M$  fázi v závislosti na délce jeho působení a použité koncentraci (Węsierska-Gądek v et al., 2009), nebyl u roskovitinu stejně jako u ostatních testovaných látek prokázán zásadní vliv na buněčný cyklus buněk HUVEC. Velmi podobná data byla publikována i v práci Zahler et al., 2010, kde roskovitin neovlivňoval buněčný cyklus endotelových buněk HMEC-1 (Human microvascular endothelial cells).

Ve stejné práci byl testován i vliv roskovitinu na inhibici proliferace HMEC-1 po 72 hod. inkubaci a efektivního výsledku bylo dosaženo až při koncentraci 30  $\mu\text{M}$ . Z western blotové analýzy lze u roskovitinu pozorovat pouze nárůst celkového FAK a to jak po 2 tak 24 hodinové inkubaci. V práci Liebl et al., 2010 byl v důsledku inhibice CDK5 roskovitinem pozorován pokles hladiny fosforylované FAK na Ser-732. Účinek na adhezi však pozorován nebyl, což lze vysvětlit tím, že fosforylace na Ser-732 nesouvisí s vlastní aktivitou FAK (Xie et al., 2003). Tato data však v této diplomové práci nelze ověřit, neboť fosforylovaná forma FAK na Ser-732 nebyla vyhodnocena. Mechanismus, jakým roskovitin inhibuje migraci endotelových buněk, byl popsán ve studiích (Liebl et al., 2010; Merk et al., 2016 a Herzog et al., 2016;) a je založen především na inhibici CDK5 viz kapitola č. 7.2. Jinou studií, ve které byl roskovitin testován na buňkách HUVEC, bylo zjištěno, že roskovitin blokuje diapedézu bílých krvinek přes cévní stěnu kapilár prostřednictvím inhibice CDK5 a CDK9 (Berberich et al., 2011).

Účinek roskovitinu na nádorových buněčných liniích probíhá převážně díky jeho inhibiční aktivitě k CDK1 a CDK2, které jsou zapojeny do regulace buněčného cyklu. Inhibice CDK7 a CDK9 se projevuje v poklesu aktivity RNA polymerázy II, což vede k následné snížené transkripci antiapoptotických proteinů a indukci buněčné apoptózy (Ljungman & Paulsen, 2001).

Další testovanou látkou byl inhibitor CDK2, CDK7, a CDK9 SNS-032 (Chen et al., 2009), který v koncentraci 0,1  $\mu\text{M}$  potlačoval migraci endotelových buněk o 17 % a velikost kapilární sítě zmenšil o 67 %. Buněčný cyklus nebyl stejně jako u roskovitinu nijak výrazně ovlivněn. Vlivem SNS-032 na buňky HUVEC a glioblastomové buňky U87MG se zabývali i v práci Ali et al., 2007. Zjistili, že 0,1  $\mu\text{M}$  SNS-032 po 72 hodinové inkubaci výrazně inhibuje růst obou testovaných typů buněk téměř o polovinu. Koncentrace 0,5  $\mu\text{M}$  (72 hod.) dokonce vyvolala u buněk HUVEC výraznou apoptózu (>60 %). Pozorovali také významný efekt na migraci a tvorbu kapilární sítě. Při koncentracích 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,3  $\mu\text{M}$  a 0,5  $\mu\text{M}$  a 8 hod. inkubaci byla migrace buněk HUVEC potlačena o 36 %, 50% a 60 % a kapilární síť se zmenšila o 27 %, 65 % a > 90 %. Při hledání mechanismu, který by mohl být zodpovědný za výše zmíněné výsledky se zaměřili na detekci hladin hlavních angiogenních faktorů a zjistili, že SNS-032 výrazně snižuje expresi VEGF.

Z nádorových buněk je účinek SNS-032 dobře popsán především na buňkách chronické lymfatické leukemie (CLL), viz studie Chen et al., 2009, ve které zjistili, že SNS-032 v koncentračním rozmezí 0,1 - 1  $\mu\text{M}$  efektivně zabíjí CLL buňky. V důsledku inhibice CDK7 a CDK9 došlo k výraznému poklesu fosforylace RNA polymerázy II na Ser-2 a Ser-5, následkem čehož došlo k narušení procesu transkripce a snížení množství antiapoptotických proteinů Mcl-1 a XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis

protein). Překvapivé však bylo, že aktivita SNS-032 byla reversibilní a po jeho odebrání došlo k velmi rychlé reaktivaci RNA polymerázy II a opětovné syntéze antiapoptotických proteinů. V této diplomové práci byl po 2 hodinové inkubaci pozorován velmi mírný pokles RNA polymerázy Ser-2 a Ser-5, který ale po 24 hodinách již nebyl detekován. Naproti tomu došlo k poklesu celkové RNA polymerázy II. Tento odlišný výsledek mohl vzniknout kvůli tomu, že účinek SNS-032 byl v této diplomové práci testován na nenádorových buňkách HUVEC. Velmi podobný mechanismus účinku SNS-032, který byl zveřejněn v práci Chen et al., 2009, byl také popsán na nádorových buňkách odvozených od karcinomu tlustého střeva HCT-116 (Conroy et al., 2009).

Látky DRB a flavopiridol potlačovaly migraci o 18 a 30 %. Po prvním provedení testu kapilární formace však byly neúčinné a nebyly dále v diplomové práci testovány. V práci Melillo et al., 1999 zjistili, že flavopiridol inhibuje hypoxií indukovanou expresi VEGF v lidských monocytech. Podobný výsledek byl pozorován i ve studii Newcomb et al., 2005 na glioblastomových buňkách U87MG, u kterých po inhibici HIF-1 $\alpha$  také docházelo k potlačení exprese VEGF. Navíc bylo prokázáno i výrazné snížení exprese MMP-2 a snížení hypoxií indukované migrace buněk o 33 %. Výsledky týkající se migrace jsou velmi podobné s výsledky v této diplomové práci, i když se jedná o jiný typ buněk. Účinek flavopiridolu na buňky HUVEC byl publikován v práci Brüsselbach et al., 1998. Flavopiridol vyvolal apoptózu nezávislou na buněčném cyklu ( $IC_{50}$  = 94 nM po 72 hod.). Tato hodnota se blíží  $IC_{50}$  = 200 nM po 72 hod. uvedené v této diplomové práci.

Pro látku DRB zatím neexistují přímé studie možného antiangiogenního potenciálu na endotelových buňkách. Nicméně je prokázáno, že u nádorových buněk inhibicí CDK7 a CDK9 potlačuje fosforylaci RNA polymerázy II a výrazně tak snižuje syntézu RNA (Dubois et al., 1994; te Poele et al., 1999; Turinetti et al., 2009).

AT-7519 a PD-0332991 vykazovaly v rámci testovaných inhibitorů CDK dobrý účinek jak na migraci endotelových buněk, tak na formování kapilární sítě. 0,5  $\mu$ M AT-7519 potlačoval migraci o 54 % a kapilární síť se zmenšila o 62 %, zatímco u PD-0332991 se migrace snížila o 50 % (20 $\mu$ M) a vytvořená kapilární síť o 44 % (15 $\mu$ M). U 2,5  $\mu$ M AT-7519 došlo k největšímu úbytku G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fázových buněk a to o 10,5 % oproti kontrolním buňkám. Western blotová analýza dopadla podle očekávání (Squires et al., 2010). AT-7519, který je inhibitorem transkripční CDK9, inhiboval fosforylaci RNA polymerázy II na Ser-2 i Ser-5 a to již po 2 hodinové inkubaci. Naopak u PD-0332991, který je vysoce selektivním inhibitorem CDK4 a CDK6 k poklesu fosforylace nedošlo ani po 24 hodinové inkubaci. Dále bylo zjištěno, že vlivem PD-0332991 dochází

k zvýšení hladin FAK a to jak po 2, tak 24 hodinách. Po 24 hodinové inkubaci, lze tento nárůst pozorovat i u AT-7519.

Z dostupné literatury je známo, že AT-7519 inhibicí CDK9 výrazně potlačuje transkripci především antiangiogenních proteinů v lidských nádorových buňkách, a tím vyvolává jejich apoptózu (Squires et al., 2009). V práci Squires et al., 2010 byla pozorována v buňkách HL-60 (Human promyelocytic leukemia cells) ošetřených 400nM AT-7519 kompletní inhibice fosforylace RNA polymerázy II na Ser-2 i Ser-5 s následnou redukcí hladiny proteinu Mcl-1. Podobný efekt byl pozorován i v této diplomové práci, avšak až při vyšší použité koncentraci a po delší době inkubace. Lze to vysvětlit tím, že buněčné procesy v nádorových buňkách jsou, oproti buňkám nenádorovým, daleko rychlejší a nádorové buňky tak mohou být k testované látce citlivější než například buňky HUVEC. Ve studii Alessandri et al., 2011 byl prokázán apoptotický účinek AT-7519 na lidské eozinofily.

Studie, které by se zabývaly vlivem látky PD-0332991 na endotelové buňky, zatím nebyly publikovány, nicméně její účinek je dobře popsán na nádorových buněčných liniích. V pracích Fry et al., 2004 a Yang et al., 2015 zjistili, že PD-0332991 inhibicí CDK4 a CDK6 snižuje fosforylaci Ser-780 a Ser-795 retinoblastomového proteinu v Rb pozitivních nádorových buňkách, což vedlo k výraznému G<sub>1</sub> bloku buněčného cyklu. V této diplomové práci žádný blok v G<sub>1</sub> fázi pozorován nebyl. Tento odlišný výsledek může být způsoben rozdílným mechanismem působení PD-0332991 na buňky HUVEC, nebo nízkou použitou koncentrací či krátkou dobou inkubace. Podle očekávání PD-0332991 nezpůsobil pokles hladiny fosforylované formy RNA polymerázy II, neboť není inhibítozem ani jedné z transkripčních CDK.

Dinaciclib o koncentraci 10 nM inhiboval migraci pouze o 6 %. Lepších výsledků dosáhl v testu kapilární formace, která se zmenšila o 54 %. Stejně jako u ostatních testovaných inhibitorů CDK nebylo pozorováno narušení buněčného cyklu. Vzhledem k tomu, že dinaciclib inhibuje CDK9, byl u něj pozorován podobný účinek na fosforylaci RNA polymerázy II jako u AT-7519. Její hladina se zmenšila již při 2 hodinové inkubaci, zatímco celková RNA polymeráza II zůstala nezměněna. Stejně jako u PD-0332991, byl účinek dinaciclibu popsán především na nádorových buňkách. Ve studii Brooher et al., 2014 byl u buněk lidského ovariálního karcinomu (A2780) ošetřených 100nM dinaciclibem také pozorován výrazný pokles hladiny RNA polymerázy Ser-2 a to již po 5 hodinové inkubaci. Hladina RNA polymerázy Ser-5 se s rostoucím časem snižovala také, nicméně ne tak markantně jako u Ser-2. Jinými experimenty na melanomových buněčných kulturách bylo zjištěno, že dinaciclib výrazně napomáhá přechodu těchto buněk do apoptózy zastavením buněčného cyklu v G<sub>2</sub>/M fázi. Působením dinaciclibu na lidský melanom indukovaný v myších, docházelo k regresi

tumoru, která byla spojená se sníženou fosforylací Rb proteinu a sníženou expresí Bcl-2 (B-cell lymphoma 2; Desai et al., 2013).

Látky LGR 2922 a LGR 2924 nevykazovaly účinek současně na migraci a tvorbu kapilární sítě a po těchto experimentech byly z dalších testů vyřazeny. Tyto látky zatím nebyly publikovány.

Axitinib byl do diplomové práce zařazen jako pozitivní kontrola inhibice kapilární formace. Jedná se o silný selektivní inhibitor VEGF signalizace, jak je popsáno ve studiích Kelly & Rixe, 2009 a Zhang et al., 2014. Jeho účinek na formování kapilární sítě v endotelových buňkách HUVEC byl publikován např. v práci Lu et al., 2015, ve které 30nM axitinib inhiboval tvorbu kapilární formace o 65 -70 %. Axitinib byl zařazen i do ostatních experimentů této diplomové práce, ale podle očekávání neměl vliv na buněčný cyklus ani na hladinu fosforylované nebo celkové RNA polymerázy II.

## **12. Závěr**

Angiogeneze je přísně regulovaný proces novotvorby krevních cév, který se kromě embryogeneze uplatňuje v celé řadě dalších fyziologických pochodů. Deregulaci angiogenního procesu lze však najít v patogenezi mnoha závažných chorob, včetně nádorových onemocnění. Stimulace buněk v okolí nádoru angiogenními faktory podporuje jeho růst a metastazování do dalších tkání. Z tohoto důvodu se v posledních letech velmi zintenzivnil výzkum látek, které by mohly sloužit jako potencionální inhibitory nádorové angiogeneze. Kromě již známých a dobře popsaných inhibitorů VEGF signalizace se v antiangiogenní terapii stále častěji využívá spolupůsobení antiangiogenních látek s klasickými antiproliferačními látkami, mezi které patří i inhibitory cyklin dependentních kinas.

V praktické části této diplomové práce byl testován a porovnán účinek vybraných inhibitorů CDK na lidské endotelové buňky HUVEC. Kromě migračního testu a testu kapilární formace, které představují hlavní experimenty pro hodnocení potencionálního antiangiogenního účinku testovaných látek, byla provedena i analýza buněčného cyklu a detekce hladin vybraných buněčných proteinů. Z testovaných inhibitorů CDK se jako velmi efektivní ukázaly látky AT-7519 a PD-0332991, které výrazně potlačovaly jak migraci endotelových buněk, tak tvorbu kapilární formace. 0,5  $\mu$ M AT-7519 inhiboval migraci o 54 % a kapilární formaci o 62 %, zatímco u PD-0332991 se migrace snížila o 50 % (20  $\mu$ M) a vytvořená kapilární síť o 44 % (15  $\mu$ M). V nádorových buněčných liniích jsou inhibitory CDK schopny zablokovat buňky v různých



fázích buněčného cyklu, u endotelových buněk však tento efekt pozorován nebyl. Výsledky z western blotové analýzy potvrdili, že látky AT-7519 a PD-0332991 mají odlišný mechanismus působení. Zatímco u látky AT-7519, která je inhibitorem transkripční CDK9, došlo ke snížení hladiny fosforylované RNA polymerázy II na Ser-2 i Ser-5, u PD-0332991 tento pokles podle očekávání detekován nebyl. PD-0332991 je vysoce selektivním inhibitorem CDK4 a CDK6 a do aktivity transkripční CDK9 nezasahuje. Podobný výsledek jako u AT-7519 byl pozorován u dalšího inhibitoru CDK9 dinaciclibu.

Žádný z antiangiogenních účinků inhibitorů CDK není způsoben vlivem pouze na jednu konkrétní kinasu, ale souhrnným účinkem na více kinas. Pro experimentální studie není toto zjištění příliš příznivé, neboť nalezení všech mechanismů působení bývá velmi zdlouhavé. Na druhou stranu jsou ale tyto látky schopny zasahovat do většího množství signálních kaskád, což může velmi přispět k jejich budoucímu klinickému uplatnění. Pro hlubší pochopení mechanismů účinku testovaných inhibitorů CDK na angiogenezi endotelových buněk by bylo vhodné provést další experimenty zaměřené například na detekci klíčových angiogenních proteinů či substrátů CDK. Nicméně už teď lze říci, že inhibitory CDK, popřípadě jejich deriváty, představují velmi slibný směr, kterým se může vědecká společnost ubírat při hledání nových inhibitorů angiogeneze.

## 13. Seznam použitých zkratk

<b>A2780</b>	Human ovarian carcinoma cell lines (Buňky lidského ovariálního karcinomu)
<b>aFGF</b>	Acidic FGF (Kyselý fibroblastový růstový faktor)
<b>ANG</b>	Angiopoetin
<b>ATP</b>	Adenosine triphosphate (Adenosintrifosfát)
<b>APS</b>	Ammonium Persulfate (Peroxodisíran amonný)
<b>Bcl-2</b>	B-cell lymphoma 2
<b>bFGF</b>	Basic FGF (Zásaditý fibroblastový růstový faktor)
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin (Hovězí sérový albumin)
<b>CAK</b>	CDK-activating kinase (CDK aktivační kinasa)
<b>Cdc25</b>	Cell division cycle 25
<b>CDK</b>	Cyclin-dependent kinase (Cyklin dependentní kinasa)
<b>Cip/Kip</b>	CDK interacting protein/kinase inhibitory protein
<b>CK1/2</b>	Casein kinase 1/2 (Kaseinkinasa 1/2)
<b>COX-2</b>	Cyclooxygenase 2 (Cyklooxygenáza 2)
<b>CTD</b>	C-terminal domain (C-terminální doména)
<b>DLL</b>	Delta like ligand
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	Dimethyl sulfoxide (Dimetylsulfoxid)
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid (Deoxyribonukleová kyselina)
<b>DTT</b>	Dithiotreitol
<b>ECGM</b>	Endothelial Cell Growth Medium (Endotelové růstové médium)
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid (Etylendiamintetraoctová kyselina)
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor (Epidermální růstový faktor)
<b>EGTA</b>	Ethylenglycoltetraacetic acid (Ethylenglykoltetraoctová kyselina)
<b>Erk</b>	Extracellular-signal-regulated kinase
<b>FAK</b>	Focal adhesion kinase (Fokální adhezivní kinasa)
<b>FGF</b>	Fibroblast growth factor (Fibroblastový růstový faktor)
<b>FGFR</b>	Fibroblast growth factor receptor (Receptor pro fibroblastový růstový faktor)
<b>Flk-1</b>	Fetal liver tyrosin kinase 1 (Fetální jaterní kinasa 1)
<b>Flt-1</b>	FMS-like tyrosine kinase 1 (Tyrosin kinasa 1 podobná FMS)
<b>FS</b>	Fetal serum (Fetální sérum)
<b>GSK3-β</b>	Glycogen synthase kinase 3β (glykogen syntáza kinasa 3β)

<b>HEXIM1</b>	Hexamethylene bis-acetamide inducible 1
<b>HGF</b>	Hepatocyte growth factor (Hepatocytární růstový faktor)
<b>HIF</b>	Hypoxia inducible factor (Hypoxií indukovaný faktor)
<b>HIV</b>	Human immunodeficiency virus (Virus lidské imunitní nedostatečnosti)
<b>HL-60</b>	Human promyelocytic leukemia cells (Buňky odvozené od akutní promyelocytární leukémie)
<b>HMEC-1</b>	Human microvascular endothelial cells (Lidské mikrovaskulární endotelové buňky)
<b>HRE</b>	Hypoxia response element (Hypoxii responzivní element)
<b>HSPG</b>	Heparan sulfate proteoglykan (Heparan sulfát proteoglykan)
<b>HUVEC</b>	Human umbilical vein endothelial cells (Endotelové buňky z lidského pupečníku)
<b>IC50</b>	50% inhibitory concentration (50% inhibiční koncentrace)
<b>IL</b>	Interleukin
<b>INF</b>	Interferon
<b>JAG 1</b>	Jagged (Proteinový ligand Jagged 1)
<b>LGR</b>	Laboratory of growth regulators (Laboratoř růstových regulátorů)
<b>Mcl-1</b>	Myeloid cell leukemia 1
<b>MDM-2</b>	Murine double minute 2
<b>MMP</b>	Matrix metalloproteinase (Matrix metaloproteináza)
<b>mRNA</b>	Messenger ribonucleic acid (Mediátorová ribonukleová kyselina)
<b>mTOR</b>	Mammalian target of rapamycin
<b>Myt1</b>	Myelin transcription factor 1
<b>NP</b>	Neuropilin
<b>PA</b>	Plasmin-plasminogen activating system (Plasmin-plasminogenní aktivační systém)
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PD-ECGF</b>	Platelet derived endothelial cell growth factor (Endotelový růstový faktor odvozený od krevních destiček)
<b>PDGF</b>	Platelet derived growth factor (Růstový faktor odvozený od krevních destiček)
<b>PDGFR</b>	Platelet derived growth factor receptor (Receptor pro růstový faktor odvozený od krevních destiček)
<b>PF-4</b>	Platelet factor 4 (Faktor krevních destiček 4)
<b>PI</b>	Propidium iodide (Propidium jodid)
<b>PLGF</b>	Placental growth factor (Placentární růstový faktor)
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonyl fluoride (Fenylmetylsulfonyl fluorid)

<b>P-TEFb</b>	Pozitive transcription elongation factor b (Pozitivní transkripční elongační faktor b)
<b>Rac1</b>	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
<b>RAM/Px</b>	Rabbit anti-mouse imunoglobuline horseradish peroxidase conjugated (Králičí sekundární protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná křenovou peroxidázou)
<b>RAS</b>	Rat sarcoma
<b>Rb</b>	Retinoblastoma protein (Retinoblastomový protein)
<b>RhoA</b>	Ras homolog family member A
<b>RIPA</b>	Radioimmunoprecipitation buffer
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid (Ribonukleová kyselina)
<b>ROCK</b>	Rho-associated protein kinase
<b>SCF2</b>	Shark cartilage factor 2
<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulfate (Dodecylsírán sodný)
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza)
<b>SWAR/Px</b>	Swine anti-rabbit imunoglobuline horseradish reoxidase conjugated (Prasečí sekundární protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná křenovou peroxidázou)
<b>TBS</b>	Tris-buffered saline
<b>TEMED</b>	Tetramethylethylenediamine (Tetrametyletylendiamin)
<b>TGF-<math>\alpha/\beta</math></b>	Transforming growth factor $\alpha/\beta$ (Transformující růstový faktor $\alpha/\beta$ )
<b>Tie</b>	Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains
<b>TIMP</b>	Tissue inhibitor of matrixmetalloproteinase (Tkáňový inhibitor metaloproteináz)
<b>TKI</b>	Tyrosine kinase inhibitor (Tyrozinkinasový inhibitor)
<b>TRIS</b>	Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris(hydroxymetyl)aminometan)
<b>TSP</b>	Thrombospondin (Trombospondin)
<b>uPA</b>	Urokinase plasminogen activator
<b>VDA</b>	Vascular disrupting agent (Látky způsobující disrupci cév)
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor (Vaskulární endotelový růstový faktor)
<b>VEGFR</b>	Vascular endothelial growth factor receptor (Receptor pro vaskulární endotelový růstový faktor)
<b>VPF</b>	Vascular permeability factor (Vaskulární permeabilní faktor)
<b>Wee1</b>	Wee1-like protein kinase
<b>XIAP</b>	X-linked inhibitor of apoptosis protein

## 14. Seznam použité literatury

Adini A., Kornaga T., Firoozbakht F., Benjamin L. E. (2002) Placental growth factor is a survival factor for tumor endothelial cells and macrophages. *Cancer Research*. 62 (10): 2749-2752.

Aldoss I. T., Tashi T., Ganti A. K. (2009) Seliciclib in malignancies. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 18 (12): 1957-1965.

Alessandri A. L., Duffin R., Leitch A. E., Lucas C. D., Sheldrake T. A., Dorward D. A., Hirani N., Pinho V., de Sousa L. P., Teixeira M. M., Lyons J. F., Haslett C., Rossi A. G. (2011) Induction of eosinophil apoptosis by the cyclin-dependent kinase inhibitor AT7519 promotes the resolution of eosinophil-dominant allergic inflammation. *PLoS One*. 6 (9):e25683.

Ali M. A., Choy H., Habib A. A., Saha D. (2007) SNS-032 prevents tumor cell-induced angiogenesis by inhibiting vascular endothelial growth factor. *Neoplasia*. 9 (5): 370-81.

Antoniou X., Gassmann M., Ogunshola O. O. (2011) Cdk5 interacts with Hif-1 $\alpha$  in neurons: a new hypoxic signalling mechanism? *Brain Research*. 1381: 1-10.

Arbiser J. L., Klauber N., Rohan R., van Leeuwen R., Huang M. T., Fisher C., Flynn E., Byers H. R. (1998) Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis. *Molecular Medicine*. 4 (6): 376-383.

Arrieta O., Guevara P., Tamariz J., Rembao D., Rivera E., Sotelo J. (2002) Antiproliferative effect of thalidomide alone and combined with carmustine against C6 rat glioma. *International Journal of Experimental Pathology*. 83 (2): 99-104.

Asano M., Yukita A., Matsumoto T., Hanatani M., Suzuki H. (1998) An anti-human VEGF monoclonal antibody, MV833, that exhibits potent anti-tumor activity in vivo. *Hybridoma*. 17 (2): 185-190.

Augustin H. G., Young K. G., Thurston G., Alitalo K. (2009) Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin Tie system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 10 (3): 165-177.

Ausprunk D. H., Folkman J. (1977) Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvascular Research*. 14 (1): 53-56.

Babu P. A., Narasu M. L., Srinivas, K. (2007) Pyridines, pyridazines and guanines as CDK2 inhibitors: a review. *Archive for Organic Chemistry ARKIVOC* 2007: 247-265.

Bach S., Knockaert M., Reinhardt J., Lozach O., Schmitt S., Baratte B., Koken M., Coburn S. P., Tang L., Jiang T., Liang D. C., Galons H., Dierick J. F., Pinna L. A., Meggio F., Totzke F., Schächtele C., Lerman A. S., Carnero A., Wan Y., Gray N., Meijer L. (2005) Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 280 (35): 31208-31219.

Bai X., Cerimele F., Ushio-Fukai M., Waqas M., Campbell P. M., Govindarajan B., Der C. J., Battle T., Frank D. A., Ye K., Murad E., Dubiel W., Soff G., Arbiser J. L. (2003) Honokiol, a small molecular weight natural product, inhibits angiogenesis in vitro and tumor growth in vivo. *Journal of Biological Chemistry*. 278 (37): 35501-35507.

Baish J. W., Jain R. K. (2000) Fractals and cancer. *Cancer Research*. 60 (14): 3683-3688.

Bar J., Onn A. (2008) Combined anti-proliferative and anti-angiogenic strategies for cancer. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 9 (5):701-715.

Bargahi A., Rabbani-Chadegani A. (2008) Angiogenic inhibitor protein fractions derived from shark cartilage. *Bioscience Reports*. 28 (1): 15-21.

Barnett D. G., Bibb J. A. (2011) The role of Cdk5 in cognition and neuropsychiatric and neurological pathology. *Brain Research Bulletin*. 85 (1-2): 9-13.

Belloni D., Veschini L., Foglieni C., Dell'Antonio G., Caligaris-Cappio F., Ferrarini M., Ferrero E. (2010) Bortezomib induces autophagic death in proliferating human endothelial cells. *Experimental Cell Research*. 316 (6):1010-1018.

Benny O., Fainaru O., Adini A., Cassiola F., Bazinet L., Adini I., Pravda E., Nahmias Y., Koirala S., Corfas G., D'Amato R. J., Folkman J. (2008) An orally delivered small-

molecule formulation with antiangiogenic and anticancer activity. *Nature Biotechnology*. 26 (7): 799-807.

Berberich N., Uhl B., Joore J., Schmerwitz U. K., Mayer B. A., Reichel C. A., Krombach F., Zahler S., Vollmar A. M., Fürst R. (2011) Roscovitine blocks leukocyte extravasation by inhibition of cyclin-dependent kinases 5 and 9. *British Journal of Pharmacology*. 163 (5): 1086-1098.

Bergers G., Benjamin L. E. (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer*. 3 (6):401-410.

Bergsten E., Uutela M., Li X., Pietras K., Ostman A., Heldin C. H., Alitalo K., Eriksson U. (2001) PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nature Cell Biology*. 3: 512–516.

Bertelsen L. B., Shen Y. Y., Nielsen T., Stødkilde-Jørgensen H., Lloyd G. K., Siemann D. W., Horsman M. R. (2011) Vascular effects of plinabulin (NPI-2358) and the influence on tumour response when given alone or combined with radiation. *International Journal of Radiation Biology*. 87 (11): 1126-1134.

Betscholtz C. (2003) Biology of platelet-derived growth factors in development. *Birth Defects Research*. 69: 272–285.

Bettayeb K., Oumata N., Echalié A., Ferandin Y., Endicott J. A., Galons H., Meijer L. (2008) CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Oncogene*. 27 (44): 5797-5807.

Blažek D., Kohoutek J., Bartholomeeusen K., Johansen E., Hulinková P., Luo Z., Cimermancic P., Ule J., Peterlin B. M. (2011) The Cyclin K/Cdk12 complex maintains genomic stability via regulation of expression of DNA damage response genes. *Genes and Development*. 25 (20): 2158-2172.

Bornstein P. (1995) Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *The Journal of Cell Biology*. 130 (3): 503-506.

Börset M., Hjorth-Hansen H., Seidel C., Sundan A., Waage A. (1996) Hepatocyte growth factor and its receptor c-met in multiple myeloma. *Blood*. 88 (10): 3998–4004.

Bösken C. A., Farnung L., Hintermair C., Merzel Schachter M., Vogel-Bachmayr K., Blažek D., Anand K., Fisher R. P., Eick D., Geyer M. (2014) The structure and substrate specificity of human Cdk12/Cyclin K. *Nature Communications*. 5: 3505.

Botos I., Scapozza L., Zhang D., Liotta L. A., Meyer E. F. (1996) Batimastat, a potent matrix metalloproteinase inhibitor, exhibits an unexpected mode of binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93 (7): 2749–2754.

Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.

Bray S. J. (2006) Notch signaling: a simple pathway becomes complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 7 (9): 678–689.

Breier G. (2000) Angiogenesis in Embryonic Development-A Review. *Placenta*. 21: 11-15.

Breier G., Albrecht U., Sterrer S., Risau W. (1992) Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development*. 114 (2): 521-532.

Brekken R. A., Overholser J. P., Stastny V. A., Waltenberger J., Minna J. D., Thorpe P. E. (2000) Selective inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (KDR/Fik-1) activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice. *Cancer Research*. 60 (18): 5117-5124.

Brès V., Yoh S. M., Jones K. A. (2008) The multi-tasking P-TEFb complex. *Current Opinion in Cell Biology*. 20 (3): 334-340.

Browne C. D., Hindmarsh E. J., Smith J. W. (2006) Inhibition of endothelial cell proliferation and angiogenesis by orlistat, a fatty acid synthase inhibitor. *The FASEB Journal*. 20 (12): 2027-2035.

Brüsselbach S., Nettelbeck D. M., Sedláček H. H., Müller R. (1998) Cell cycle-independent induction of apoptosis by the anti-tumor drug Flavopiridol in endothelial cells. *International Journal of Cancer*. 77 (1): 146-152.



Buchanan C. M., Shih J. H., Astin J. W., Rewcastle G. W., Flanagan J. U., Crosier P. S., Shepherd P. R. (2012) DMXAA (Vadimezan, ASA404) is a multi-kinase inhibitor targeting VEGFR2 in particular. *Clinical Science*. 122 (10): 449-457.

Burgess W. H., Maciag T. (1989) The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annual Review of Biochemistry*. 58: 575-606.

Burri P. H. (1974) The postnatal growth of the rat lung. III. *The Anatomical Record*. 180 (1): 77-98.

Burri P. H., Hlushchuk R., Djonov V. (2004) Intussusceptive angiogenesis: It's emergence, it's characteristics, and it's significance. *Developmental Dynamics*. 231 (3): 474-488.

Byrd J. C., Lin T. S., Dalton J. T., Wu D., Phelps M. A., Fischer B., Moran M., Blum K. A., Rovin B., Brooker-McEldowney M., Broering S., Schaaf L. J., Johnson A. J., Lucas D. M., Heerema N. A., Lozanski G., Young D. C., Suarez J. R., Colevas A. D., Grever M. R. (2007) Flavopiridol administered using a pharmacologically derived schedule is associated with marked clinical efficacy in refractory, genetically high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 109 (2): 399-404.

Caduff J. H., Fischer L. C., Burri P. H. (1986) Scanning electron microscopic study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. *The Anatomical Record*. 216 (2): 154-164.

Cai D, Latham V. M. Jr., Zhang X., Shapiro G. I. (2006) Combined depletion of cell cycle and transcriptional cyclin-dependent kinase activities induces apoptosis in cancer cells. *Cancer Research*. 66 (18): 9270-9280.

Cai S. X. (2007) Small molecule vascular disrupting agents: potential new drugs for cancer treatment. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*. 2 (1): 79-101.

Cao L., Chen F., Yang X., Xu W., Xie J., Yu L. (2014) Phylogenetic analysis of CDK and cyclin proteins in premetazoan lineages. *BMC Evolutionary Biology*. 14:10.

Cao Y. (2010) Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*. 9 (2): 107-115.

Cao Y., Fu Z. D., Wang F., Liu H. Y., Han R. (2005) Anti-angiogenic activity of resveratrol, a natural compound from medicinal plants. *Journal of Asian Natural Products Research*. 7 (3): 205-213.

Carlson T. R., Feng Y., Maisonpierre P. C., Mrksich M., Morla A. O. (2001) Direct cell adhesion to the angiopoietins mediated by integrins. *The Journal of Biological Chemistry*. 276 (28): 26516-26525.

Carlsten J. O., Zhu X., Gustafsson C. M. (2013) The multitasking Mediator complex. *Trends in Biochemical Sciences*. 38 (11): 531-537.

Carmeliet P. (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine*. 6 (4): 389-395.

Carmeliet P., Jain R. K. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407 (6801), 249-257.

Carmeliet P., Ferreira V., Breier G., Pollefeyt S., Kieckens L., Gertsenshtein M., Fahrig M., Vandenhoek A., Harpal K., Eberhardt C., Declercq C., Pawling J., Moons L., Collen D., Risau W., Nagy A. (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 380 (6573): 435-439.

Carmeliet P., Moons L., Luttun A., Vincenti V., Compernelle V., De Mol M., Wu Y., Bono F., Devy L., Beck H., Scholz D., Acker T., DiPalma T., Dewerchin M., Noel A., Stalmans I., Barra A., Blacher S., VandenDriessche T., Ponten A., Eriksson U., Plate K. H., Foidart J. M., Schaper W., Charnock-Jones D. S., Hicklin D. J., Herbert J. M., Collen D., Persico M. G. (2001) Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nature Medicine*. 7 (5): 575-583.

Cascone I., Napione L., Maniero F., Serini G., Bussolino F. (2005) Stable interaction between  $\alpha_5\beta_1$  integrin and Tie2 tyrosine kinase receptor regulates endothelial cell response to Ang-1. *The Journal of Cell Biology*. 170 (6): 993–1004.

Claxton S., Fruttiger M. (2004) Periodic Delta-like 4 expression in developing retinal arteries. *Gene Express Patterns*. 5 (1): 123-127.

Colville-Nash P. R.; Willoughby D. A. (1997) Growth factors in angiogenesis: Current interest and therapeutic potential. *Molecular Medicine Today*. 3 (1): 14-23.

Connolly D. T., Heuvelman D. M., Nelson R., Olander J. V., Eppley B. L., Delfino J. J., Siegel N. R., Leimgruber R. M., Feder J. (1989) Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*. 84 (5): 1470-1478.

Conroy A., Stockett D. E., Walker D., Arkin M. R., Hoch U., Fox J. A., Hawtin R. E. (2009) SNS-032 is a potent and selective CDK 2, 7 and 9 inhibitor that drives target modulation in patient samples. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 64 (4): 723-732.

Contreras-Vallejos E., Utreras E., Gonzalez-Billault C. (2012) Going out of the brain: non-nervous system physiological and pathological functions of Cdk5. *Cellular Signalling*. 24 (1): 44-52.

Costa C., Incio J., Soares R. (2007) Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis*. 10 (3):149-166.

Dai Y., Grant S. (2003) Cyclin-dependent kinase inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology*. 3 (4): 362-370.

Dallabrida S. M., Ismail N., Oberle J. R., Himes B. E., Rupnick M. A. (2005) Angiopoietin-1 promotes cardiac and skeletal myocyte survival through integrins. *Circulation Research*. 96 (4): 8-24.

Darland D. C., Massingham L. J., Smith S. R., Piek E., Saint-Geniez M., D'Amore P. A. (2003) Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Developmental Biology*. 264 (1):275-288.

Davies T. G., Pratt D. J., Endicott J. A., Johnson L. N., Noble M. E. (2002) Structure-based design of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics*. 93 (2-3): 125-133.

Davis S., Papadopoulos N., Aldrich T. H., Maisonpierre P. C., Huang T., Kovac L., Xu A., Leidich R., Radziejewska E., Rafique A., Goldberg J., Jain V., Bailey K., Karow

M., Fandl J., Samuelsson S. J., Ioffe E., Rudge J. S., Daly T. J., Radziejewski C., Yancopoulos G. D. (2003) Angiopoietins have distinct modular domains essential for receptor binding, dimerization and superclustering. *Nature Structural Biology*. 10 (1): 38-44.

De Azevedo W. F., Leclerc S., Meijer L., Havlicek L., Strnad M., Kim S. H. (1997) Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *European Journal of Biochemistry*. 243 (1-2): 518-526.

Dean J. L., Thangavel C., McClendon A. K., Reed C. A., Knudsen E. S. (2010) Therapeutic CDK4/6 inhibition in breast cancer: key mechanisms of response and failure. *Oncogene*. 29 (28): 4018-4032.

Dell'Eva R., Pfeffer U., Indraccolo S., Albini A., Noonan D. (2002) Inhibition of tumor angiogenesis by angiostatin: from recombinant protein to gene therapy. *Endothelium*. 9 (1): 3-10.

Demelash A., Rudrabhatla P., Pant H. C., Wang X., Amin N. D., McWhite C. D., Naizhen X., Linnoila R. I. (2012) Achaete-scute homologue-1 (ASH1) stimulates migration of lung cancer cells through Cdk5/p35 pathway. *Molecular Biology of the Cell*. 23 (15): 2856-2866.

Dempke W., Rie C., Grothey A., Schmoll H. J. (2001) Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 127 (7): 411-417.

Deplanque G., Harris A. L. (2000) Anti-angiogenic agents: clinical trial design and therapies in development. *European Journal of Cancer*. 36 (13): 1713-1724.

Desai B. M., Villanueva J., Nguyen T. T., Lioni M., Xiao M., Kong J., Krepler C., Vultur A., Flaherty K. T., Nathanson K. L., Smalley K. S., Herlyn M. (2013) The anti-melanoma activity of dinaciclib, a cyclin-dependent kinase inhibitor, is dependent on p53 signaling. *PLoS One*. 8 (3): e59588.

Deveza L., Choi J., Yang F. (2012) Therapeutic angiogenesis for treating cardiovascular diseases. *Theranostics*. 2 (8): 801-814.

- Dhavan R., Tsai L. H. (2001) A decade of CDK5. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2 (10): 749-59.
- Dickson M. A., Schwartz G. K. (2009) Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy. *Current Oncology.* 16 (2): 36-43.
- DiPietro L. A. (1997) Thrombospondin as a regulator of angiogenesis. *Experientia Supplementum.* 79: 295-314.
- Dong L. F., Yao J., Wang X. Q., Shan K., Yang H., Yan B., Jiang Q. (2015) Lenalidomide, an anti-tumor drug, regulates retinal endothelial cell function: Implication for treating ocular neovascular disorder. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 465 (4): 678-684.
- Dubois M. F., Nguyen V. T., Bellier S., Bensaude O. (1994) Inhibitors of transcription such as 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole and isoquinoline sulfonamide derivatives (H-8 and H-7) promote dephosphorylation of the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II largest subunit. *The Journal of Biological Chemistry.* 269 (18): 13331-13336.
- Egloff S., Dienstbier M., Murphy S. (2012) Updating the RNA polymerase CTD code: adding gene-specific layers. *Trends in Genetics.* 28 (7): 333-341.
- Egly J. M., Coin F. (2011) A history of TFIIH: two decades of molecular biology on a pivotal transcription/repair factor. *DNA Repair.* 10 (7): 714-721.
- Eilken H. M., Adams R. H. (2010) Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Current Opinion in Cell Biology.* 22 (5): 617-625.
- Ekholm S. V., Reed S. I. (2000) Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Current Opinion in Cell Biology.* 12 (6): 676-684.
- Ellis L. M., Hicklin D. J. (2008) VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nature Reviews Cancer.* 8 (8): 579-591.
- Erdogan A., Luedders D. W., Muenz B. M., Schaefer C. A., Tillmanns H., Wiecha J., Kuhlmann C. R. (2007) Sildenafil inhibits the proliferation of cultured human endothelial cells. *International Journal of Biomedical Science.* 3 (2): 93-96.

Eun J. P., Koh G. Y. (2004) Suppression of angiogenesis by the plant alkaloid, sanguinarine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 317 (2): 618-624.

Fagiani E., Christofori G. (2013) Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer Letters*. 328 (1): 18-26.

Falardeau P., Champagne P., Poyet P., Hariton C., Dupont E. (2001) Neovastat, a naturally occurring multifunctional antiangiogenic drug, in phase III clinical trials. *Seminars in Oncology*. 28 (6): 620-625.

Feldmann G., Mishra A., Hong S. M., Bisht S., Strock C. J., Ball D. W., Goggins M., Maitra A., Nelkin B. D. (2010) Inhibiting the cyclin-dependent kinase CDK5 blocks pancreatic cancer formation and progression through the suppression of Ras-Ral signaling. *Cancer Research*. 70 (11): 4460-4469.

Ferrara N. (1999) Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney International*. 56 (3): 794-814.

Ferrara N. (2004) Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews*. 25 (4): 581-611.

Ferrara N., Alitalo K. (1999) Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nature Medicine*. 5 (12): 1359-1364.

Ferrara N., Carver-Moore K., Chen H., Dowd M., Lu L., O'Shea K. S., Powell-Braxton L., Hillan K. J., Moore M. W. (1996) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 380 (6573): 439-442.

Findlay J. K. (1986) Angiogenesis in reproductive tissues. *Journal of Endocrinology*. 111 (3): 357-366.

Fisher R. P. (2005) Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. *Journal of Cell Science*. 118 (22): 5171-5180.

Fischer C., Jonckx B., Mazzone M., Zacchigna S., Loges S., Pattarini L., Chorianopoulos E., Liesenborghs L., Koch M., De Mol M., Autiero M., Wyns

S., Plaisance S., Moons L., van Rooijen N., Giacca M., Stassen J. M., Dewerchin M., Collen D., Carmeliet P. (2007) Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell*. 2007, 131 (3): 463-475.

Fischer P. M., Endicott J., Meijer L. (2003) Cyclin-dependent kinase inhibitors. *Progress in Cell Cycle Research*. 5: 235-248.

Flaumenhaft R., Moscatelli D., Rifkin D. B. (1990) Heparin and heparan sulfate increase the radius of diffusion and action of basic fibroblast growth factor. *The Journal of Cell Biology*. 111 (4): 1651-1659.

Folkman J, Shing Y. (1992) Angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 267 (16): 10931-10934.

Folkman J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England Journal of Medicine*. 285 (21): 1182-1186.

Folkman J., Klagsburn M. (1987) Angiogenic factors. *Science*. 235: 442-447.

Fong G. H., Rossant J., Gertsenstein M., Breitman M. L. (1995) Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 376 (6535): 66-70.

Fong T. A., Shawver L. K., Sun L., Tang C., App H., Powell T. J., Kim Y. H., Schreck R., Wang X., Risau W., Ullrich A., Hirth K. P., McMahon G. (1999) SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Research*. 59 (1): 99-106.

Form D. M., Auerbach R. (1983) PGE<sub>2</sub> and angiogenesis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 172 (2): 214-218.

Frazier W. A. (1991) Thrombospondins. *Current Opinion in Cell Biology*. 3 (5): 792-799.

Fry D. W., Harvey P. J., Keller P. R., Elliott W. L., Meade M., Trachet E., Albassam M., Zheng X., Leopold W. R., Pryer N. K., Toogood P. L. (2004) Specific inhibition of

cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics*. 3 (11): 1427-1438.

Fujioka T., Hasegawa M., Ishikura K., Matsushita Y., Sato M., Tanji S. (1998) Inhibition of tumor growth and angiogenesis by vitamin D3 agents in murine renal cell carcinoma. *The Journal of Urology*. 160 (1): 247-251.

Fürst T., Kryštof V. (2011) Software for Quantitative Analysis of Endothelial Cell Tube Formation.

Fürst T., Rárová L. (2011) Software for Endothelial Cell Migration Analysis and Quantification.

Gale N. W., Dominguez M. G., Noguera I., Pan L., Hughes V., Valenzuela D. M., Murphy A. J., Adams N. C., Lin H. C., Holash J., Thurston G., Yancopoulos G. D. (2004) Haploinsufficiency of delta-like-4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development. *Proceedings of the National Academy of Science*. 101 (45): 15949-15954.

Gastl G., Hermann T., Steurer M., Zmija J., Gunsilius E., Unger C., Kraft A. (1997) Angiogenesis as a target for tumor treatment. *Oncology*. 54 (3): 177-184.

Genové G., Mollick T., Johansson K. (2014) Photoreceptor degeneration, structural remodeling and glial activation: a morphological study on a genetic mouse model for pericyte deficiency. *Neuroscience*. 279: 269-284.

Gerhardt H., Betsholtz C. (2003) Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell and Tissue Research*. 314 (1): 15-23.

Gerhardt H., Golding M., Fruttiger M., Ruhrberg C., Lundkvist A., Abramsson A., Jeltsch M., Mitchell C., Alitalo K., Shima D. (2003) VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of Cell Biology*. 161 (6): 1163-1177.

Gervaz P., Scholl B., Padrun V., Gillet M. (2000) Growth inhibition of liver metastases by the anti-angiogenic drug TNP-470. *Liver*. 20 (2): 108-113.



Geudens I., Gerhardt H. (2011) Coordinating cell behavior during blood vessel formation. *Development*. 138 (21): 4569-4583.

Goldie L. C., Nix M. K., Hirschi K. K. (2008) Embryonic vasculogenesis and hematopoietic specification. *Organogenesis*. 4 (4): 257-263.

Golubovskaya V. M., Kweh F. A., Cance W. G. (2009) Focal adhesion kinase and cancer. *Histology and Histopathology*. 24 (4): 503-510.

Gong Y. Q., Fan Y., Wu D. Z., Yang H., Hu Z. B., Wang Z. T. (2004) In vivo and in vitro evaluation of erianin, a novel anti-angiogenic agent. *European Journal of Cancer*. 40 (10): 1554-1565.

Gordon J. D., Shifren J. L., Foulk R. A. *et al.* (1995) Angiogenesis in the human female reproductive tract. *Obstetrical & Gynecological Survey*. 50 (9): 688-697.

Gray N. S., Wodicka L., Thunnissen A. M., Norman T. C., Kwon S., Espinoza F. H., Morgan D. O., Barnes G., LeClerc S., Meijer L., Kim S. H., Lockhart D. J., Schultz P. G. (1998) Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors. *Science*. 281 (5376): 533-538.

Gu Y., Rosenblatt J., Morgan D. O. (1992) Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15. *The EMBO Journal*. 11 (11): 3995-4005.

Guha M. (2012) Cyclin-dependent kinase inhibitors move into Phase III. *Nature Reviews Drug Discovery*. 11 (12): 892-894.

Hagedorn M., Bikfalvi A. (2000) Target molecules for anti-angiogenic therapy: from basic research to clinical trials. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 34 (2): 89-110.

Hall M., Peters G. (1996) Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Advances in Cancer Research*. 68: 67-108.

Hanahan D., Weinberg R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*. 100 (1): 57-70.

Hande K. R., Collier M., Paradiso L., Stuart-Smith J., Dixon M., Clendeninn N., Yeun G., Alberti D., Binger K., Wilding G. (2004) Phase I and pharmacokinetic study of prinomastat, a matrix metalloprotease inhibitor. *Clinical Cancer Research*. 10 (3): 909-915.

Harada S., Nagy J. A., Sullivan K. A., Thomas K. A., Endo N., Rodan G. A., Rodan S. B. (1994) Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. *The Journal of Clinical Investigation*. 93 (6): 2490-2496.

Harris A. L. (1998) Are angiostatin and endostatin cures for cancer? *The Lancet*. 351 (9116): 1598–1599.

Harris A. L. (2003) Angiogenesis as a new target for cancer control. *European Journal of Cancer Supplements*. 1 (2): 1-12.

Havlíček L., Hanuš J., Veselý J., Leclerc S., Meijer L., Shaw G., Strnad M. (1997) Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *Journal of Medicinal Chemistry*. 40 (4): 408-412.

Heldin C. H., Eriksson U., Ostman A. (2002) New members of the platelet-derived growth factor family of mitogens. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 398 (2): 284–290.

Heldin C. H., Westermark M. (1999) Mechanisms of action an *in vivo* role of platelet-derived growth factor. *Physiological Reviews*. 79 (4): 1283–1316.

Hellmich M. R., Pant. C., Wada E., Battey J. F. (1992) Neuronal cdc2-like kinase: a cdc2-related protein kinase with predominantly neuronal expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89 (22): 10867-10871.

Hellstrom M., Phng L. K., Hofmann J. J., Wallgard E., Coultas L., Limblom P., Alva J., Nilsson A. K., Karlsson L., Gaiano N., Yoon K., Rossant J., Iruela-Arispe M. I., Kalén M., Gerhardt H., Betsholtz C. (2007) Dll4 signalling through notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature*. 445 (7129): 776-780.

Hertig A. T. (1935) Angiogenesis in the early human chorion and in the primary placenta of the macaque monkey. *Contributions to Embryology*. 25: 37-38.

Herzog J., Ehrlich S. M., Pfitzer L., Liebl J., Fröhlich T., Arnold G. J., Mikulits W., Haider C., Vollmar A. M., Zahler S. (2016) Cyclin-dependent kinase 5 stabilizes hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ : a novel approach for inhibiting angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 1-14.

Hessig B., Hattori K., Friedrich M., Rafii S., Werb Z. (2003) Angiogenesis: vascular remodeling of extracellular matrix involves metalloproteinases. *Current Opinion in Hematology*. 10 (2): 136-141.

Hiraoka N., Allen E., Apel I. J., Gyetko M. R., Weiss S. J. (1998) Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins *Cell*. 95 (3): 365-377.

Ho P. Y., Liang Y. C., Ho Y. S., Chen C. T., Lee W. S. (2004) Inhibition of human vascular endothelial cells proliferation by terbinafine. *International Journal of Cancer*. 111 (1): 51-59.

Hogg P. J., Hotchkiss K. A., Jimenez B. M., Stathkis P., Chesterman C. N. (1997) Interaction of platelet-derived growth factor with thrombospondin 1. *Biochemical Journal*. 326 (3): 709-716.

Holmes K., Roberts O. L., Thomas A. M., Cross M. J. (2007) Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cellular Signalling*. 19 (10): 2003-2012.

Hotchkiss K. A., Ashton A. W., Mahmood R., Russell R. G., Sparano J. A., Schwartz E. L. (2002) Inhibition of endothelial cell function in vitro and angiogenesis in vivo by docetaxel (Taxotere): association with impaired repositioning of the microtubule organizing center. *Molecular Cancer Therapeutics*. 1 (13): 1191-1200.

Huang Z., Bao S. D. (2004) Roles of main pro and antiangiogenic factors in tumor angiogenesis. *World Journal of Gastroenterology*. 10 (4): 463-470.

Hu-Lowe D. D., Zou H. Y., Grazzini M. L., Hallin M. E., Wickman G. R., Amundson K., Chen J. H., Rewolinski D. A., Yamazaki S., Wu E. Y., McTigue M. A., Murray B. W., Kania R. S., O'Connor P., Shalinsky D. R., Bender S. L. (2008) Nonclinical antiangiogenesis and antitumor activities of axitinib (AG-013736), an oral, potent, and selective inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases 1, 2, 3. *Clinical Cancer Research*. 14 (22): 7272-7283.

Hunt S. (2001) Technology evaluation: IMC-1C11, ImClone Systems. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*. 3 (4): 418-424.

Chao S. H., Fujinaga K., Marion J. E., Taube R., Sausville E. A., Senderowicz A. M., Peterlin B. M., Price D. H. (2000) Flavopiridol inhibits P-TEFb and blocks HIV-1 replication. *The Journal of Biological Chemistry*. 275 (37): 28345-28348.

Chen R., Wierda W. G., Chubb S., Hawtin R. E., Fox J. A., Keating M. J., Gandhi V., Plunkett W. (2009) Mechanism of action of SNS-032, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 113 (19): 4637-4645.

Cheung Z. H., Ip N. Y. (2012) Cdk5: a multifaceted kinase in neurodegenerative diseases. *Trends Cell Biol*. 22 (3): 169-175.

Chu Q. S. (2009) Aflibercept (AVE0005): an alternative strategy for inhibiting tumour angiogenesis by vascular endothelial growth factors. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 9 (2): 263-271.

Chung A. S., Lee J., Ferrara N. (2010) Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*. 10 (7): 505-514.

Isaji M., Miyata H., Ajisawa Y., Takehana Y., Yoshimura N. (1997) Tranilast inhibits the proliferation, chemotaxis and tube formation of human microvascular endothelial cells in vitro and angiogenesis in vivo. *British Journal of Pharmacology*. 122 (6): 1061-1066.

Isogai S., Lawson N. D., Torrealday S., Horiguchi M., Weinstein B. H. (2003) Angiogenic network formation in the developing vertebrate trunk. *Development*. 130 (21): 5281-5290.

Italiano J. E. jr., Richardson J. L., Patel-Hett S., Battinelli E., Zaslavsky A., Short S., Ryeom S., Folkman J., Klement G. L. (2008) Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet  $\alpha$  granules and differentially released. *Blood*. 111 (3): 1227-1233.

Itoh N., Ornitz D. M. (2004) Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends in Genetics*. 20 (11): 563-569.

Jain R. K. (1994) Barriers to drug delivery in solid tumors. *Scientific American*. 271 (1): 58-65.

Jain R. K. (1998) The next frontier of molecular medicine: delivery of therapeutics. *Nature Medicine*, 4 (6): 655-657.

Javerzat S., Auguste P., Bikfalvi A. (2002) The role of fibroblast growth factors in vascular development. *Trends in Molecular Medicine*. 8 (10): 483-489.

Jeffrey P. D., Russo A. A., Polyak K., Gibbs E., Hurwitz J., Massagué J., Pavletich N. P. (1995) Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature*. 376 (6538): 313-320.

Jiménez-Hernández E., Dueñas-González M. T., Quintero-Curiel J. L., Velásquez-Ortega J., Magaña-Pérez J. A., Berges-García A., Arellano-Galindo J. (2008) Treatment with interferon-alpha-2b in children with life-threatening hemangiomas. *Dermatologic Surgery*. 34 (5): 640-647.

Johnson D. E., Williams L. T. (1993) Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Advances in Cancer Research*. 60: 1-41.

Jones M. K., Wang H., Peskar B. M., Levin E., Itani R. M., Sarfeh I. J., Tarnawski A.S. (1999) Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nature Medicine*. 5 (12): 1418-1423.

Jorda R., Havlíček L., McNae I. W., Walkinshaw M. D., Voller J., Sturc A., Navrátilová J., Kuzma M., Mistrík M., Bártek J., Strnad M., Kryštof V. (2011) Pyrazolo[4,3-d]pyrimidine bioisostere of roscovitine: evaluation of a novel selective inhibitor of cyclin-

dependent kinases with antiproliferative activity. *Journal of Medicinal Chemistry*. 54 (8): 2980-2993.

Karkkainen M. J., Petrova T. V. (2000) Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene*. 19 (49): 5598–5605.

Karp J. E., Smith B. D., Levis M. J., Gore S. D., Greer J., Hattenburg C., Briel J., Jones R. J., Wright J. J., Colevas A. D. (2007) Sequential flavopiridol, cytosine arabinoside, and mitoxantrone: a phase II trial in adults with poor-risk acute myelogenous leukemia. *Clinical Cancer Research*. 13 (15): 4467-4473.

Kasten M., Giordano A. (2001) Cdk10, a Cdc2-related kinase, associates with the Ets2 transcription factor and modulates its transactivation activity. *Oncogene*. 20 (15): 1832-1838.

Keck P. J., Hauser S. D., Krivi G., Sanzo K., Warren T., Feder J., Connolly D. T. (1989) Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*. 246 (4935): 1309-1312.

Kelly R. J., Rixe O. (2009) Axitinib--a selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor. *Targeted Oncology*. 4 (4): 297-305.

Kerbel R. S. (2008) Tumor Angiogenesis. *The New England Journal of Medicine*. 358 (19): 2039-2049.

Kern J., Steurer M., Gastl G., Gunsilius E., Untergasser G. (2009) Vasohibin inhibits angiogenic sprouting in vitro and supports vascular maturation processes in vivo. *BMC Cancer*. 9: 284.

Kim I., Kim J. H., Moon S. O., Kwak H. J., Kim N. G., Koh G. Y. (2000) Angiopoietin-2 at high concentration can enhance endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *Oncogene*. 19 (39): 4549-4552.

Kim M. S., Lee Y. M., Moon E. J., Kim S. E., Lee J. J., Kim K. W. (2000) Anti-angiogenic activity of torilin, a sesquiterpene compound isolated from *Torilis japonica*. *International Journal of Cancer*. 87 (2): 269-275.

- Kim S., Yazici Y. D., Calzada G., Wang Z. Y., Younes M. N., Jasser S. A., El-Naggar A. K., Myers J. N. (2007) Sorafenib inhibits the angiogenesis and growth of orthotopic anaplastic thyroid carcinoma xenografts in nude mice. *Molecular Cancer Therapeutics*. 6 (6):1785-1792.
- Kim Y. R., Yudina A., Figueiredo J., Reichardt W., Hu-Lowe D., Petrovsky A., Kang H. W., Torres D., Mahmood U., Weissleder R., Bogdanov A. A. Jr. (2005) Detection of early antiangiogenic effects in human colon adenocarcinoma xenografts: in vivo changes of tumor blood volume in response to experimental VEGFR tyrosine kinase inhibitor. *Cancer Research*. 65 (20): 9253-9260.
- Klener P. (2002) Angiogeneze a nádorová onemocnění. *Remedia*. 1: 1-8.
- Klener P. (2005) Význam inhibice angiogeneze v protinádorové léčbě. *Remedia*. 15: 384-389.
- Klener P. (2008) Nové možnosti využití bevacizumabu v proti-nádorové léčbě. *Remedia*. 18: 57–62.
- Klener P., Klener P. jr. (2009) Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii. *Grada*. 116.
- Knighton D. R., Silver I. A., Hunt T. K. (1981) Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. *Surgery*. 90 (2): 262-270.
- Knockaert M., Greengard P., Meijer L. (2002) Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends in Pharmacological Sciences*. 23 (9): 417-425.
- Koch A. E. (2003) Angiogenesis as a target in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 62 (2): 60-67.
- Koumenis C., Giaccia A. (1997) Transformed cells require continuous activity of RNA polymerase II to resist oncogene-induced apoptosis. *Molecular Cell Biology*. 17 (12): 7306-7316.

Kruger E. A., Duray P. H., Price D. K., Pluda J. M., Figg W. D. (2001) Approaches to preclinical screening of antiangiogenic agents. *Seminars in Oncology*. 28 (6): 570-576.

Kryštof V., Cankar P., Frysová I., Slouka J., Kontopidis G., Džubák P., Hajdúch M., Srovnal J., de Azevedo W. F. Jr., Orság M., Paprskářová M., Rolčík J., Látr A., Fischer P. M., Strnad M. (2006) 4-aryloxy-3,5-diamino-1H-pyrazole CDK inhibitors: SAR study, crystal structure in complex with CDK2, selectivity, and cellular effects. *Journal of Medicinal Chemistry*. 49 (22): 6500-6509.

Kryštof V., Lenobel R., Havlíček L., Kuzma M., Strnad M. (2002) Synthesis and biological activity of olomoucine II. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 12 (22): 3283-3286.

Kryštof V., McNae I. W., Walkinshaw M. D., Fischer P. M., Müller P., Vojtěšek B., Orság M., Havlíček L., Strnad M. (2005) Antiproliferative activity of olomoucine II, a novel 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 62 (15): 1763-1771.

Kryštof V., Rárová L., Liebl J., Zahler S., Jorda R., Voller J., Cankař P. (2011) The selective P-TEFb inhibitor CAN508 targets angiogenesis. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 46 (9): 4289-4294.

Kryštof V., Uldrijan S. (2010) Cyclin-dependent kinase inhibitors as anticancer drugs. *Current Drug Targets*. 11 (3): 291-302.

Kumar R., Knick V. B., Rudolph S. K., Johnson J. H., Crosby R. M., Crouthamel M. C., Hopper T. M., Miller C. G., Harrington L. E., Onori J. A., Mullin R. J., Gilmer T. M., Truesdale A. T., Epperly A. H., Bolor A., Stafford J. A., Luttrell D. K., Cheung M. (2007) Pharmacokinetic-pharmacodynamic correlation from mouse to human with pazopanib, a multikinase angiogenesis inhibitor with potent antitumor and antiangiogenic activity. *Molecular Cancer Therapeutics*. 6 (7): 2012-2021.

Kume T. (2009) Novel insights into the differential functions of Notch ligands in vascular formation. *Journal of Angiogenesis Research*. 1: 8.

Kurz H., Burri P. H., Djonov G. V. (2003) Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: From form to function. *News in Physiological Sciences*. 18: 65-70.



Lane H. A., Wood J. M., McSheehy P. M., Allegrini P. R., Boulay A., Brueggen J., Littlewood-Evans A., Maira S. M., Martiny-Baron G., Schnell C. R., Sini P., O'Reilly T. (2009) mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) has antiangiogenic/vascular properties distinct from a VEGFR tyrosine kinase inhibitor. *Clinical Cancer Research*. 15 (5): 1612-1622.

Laquente B., Lacasa C., Ginestà M. M., Casanovas O., Figueras A., Galán M., Ribas I. G., Germà J. R., Capellà G., Viñals F. (2008) Antiangiogenic effect of gemcitabine following metronomic administration in a pancreas cancer model. *Molecular Cancer Therapeutics*. 7 (3): 638-647.

Larochelle S., Amat R., Glover-Cutter K., Sansó M., Zhang C., Allen J. J., Shokat K. M., Bentley D. L., Fisher R. P. (2012) Cyclin-dependent kinase control of the initiation-to-elongation switch of RNA polymerase II. *Nature Structural & Molecular Biology*. 19 (11): 1108-1115.

Larochelle S., Merrick K. A., Terret M. E., Wohlbold L., Barboza N. M., Zhang C., Shokat K. M., Jallepalli P. V., Fisher R. P. (2007) Requirements for Cdk7 in the assembly of Cdk1/cyclin B and activation of Cdk2 revealed by chemical genetics in human cells. *Molecular Cell*. 25 (6): 839-850.

Lawler J. (2002) Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 6 (1): 1-12.

Le Boeuf F., Houle F., Sussman M., Huot J. (2006) Phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) on Ser732 is induced by rho-dependent kinase and is essential for proline-rich tyrosine kinase-2-mediated phosphorylation of FAK on Tyr407 in response to vascular endothelial growth factor. *Molecular Biology of the Cell*. 17 (8): 3508-2520.

Lee P. L., Johnson D. E., Cousens L. S, Fried V. A., Williams L. T. (1989) Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. *Science*. 245 (4913): 57-60.

Leung D. W., Cachianes G., Kuang W. J., Goeddel D. V., Ferrara N. (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 246 (4935): 1306-1309.

Li X., Ponten A., Aase K., Karlsson L., Abramsson A., Uutela M., Bäckström G., Hellström M., Boström H., Li H., Soriano P., Betsholtz C., Heldin C. H., Alitalo K., Ostman A., Eriksson U. (2000) PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor. *Nature Cell Biology*. 2 (5): 302–309.

Liang J. H., Wong K. P. (2000) The characterization of angiogenesis inhibitor from shark cartilage. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 476: 209-223.

Liang Q., Li L., Zhang J., Lei Y., Wang L., Liu D. X., Feng J., Hou P., Yao R., Zhang Y., Huang B., Lu J. (2013) CDK5 is essential for TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. *Scientific Reports*. 3: 2932.

Liebl J., Füst R., Vollmar A. M., Zahler S. (2011) Twice switched at birth: cell cycle-independent roles of the "neuron-specific" cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) in non-neuronal cells. *Cellular Signalling*. 23 (11): 1698-1707.

Liebl J., Weitensteiner S. B., Vereb G., Takács L., Füst R., Vollmar A. M., Zahler S. (2010) Cyclin-dependent kinase 5 regulates endothelial cell migration and angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 285 (46): 35932-35943.

Lilja L., Yang S. N., Webb D. L., Juntti-Berggren L., Berggren P. O., Bark C. (2001) Cyclin-dependent kinase 5 promotes insulin exocytosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 276 (36): 34199-34205.

Limbourg F. P., Yakeshita K., Radtke F., Bronson R. T., Chin M. T., Liao J. K. (2005) Essential role of endothelial Notch1 in angiogenesis. *Circulation*. 111 (14): 1826-1832.

Lin H. P., Kulp S. K., Tseng P. H., Yang Y. T., Yang C. C., Chen C. S. (2004) Growth inhibitory effects of celecoxib in human umbilical vein endothelial cells are mediated through G1 arrest via multiple signaling mechanisms. *Molecular Cancer Therapeutics*. 3 (12): 1671-1680.

Lin S. Y., Craythorn R. G., O'Connor A. E., Matzuk M. M., Girling J. E., Morrison J. R., de Kretser D. M. (2008) Female infertility and disrupted angiogenesis are actions of specific follistatin isoforms. *Molecular Endocrinology*. 22 (2): 415-429.

Lindsay C. R., MacPherson I. R., Cassidy J. (2009) Current status of cediranib: the rapid development of a novel anti-angiogenic therapy. *Future Oncology*. 5 (4): 421-432.

Liotta L. A., Steeg P. S., Stetler-Stevenson W. G. (1991) Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell*. 64 (2): 327-336.

Lippi G., Favaloro E. J. (2010) Recombinant platelet factor 4: a therapeutic, anti-neoplastic chimera? *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 36 (5): 558-569.

Liu J. J., Huang T. S., Cheng W. F., Lu F. J. (2003) Baicalein and baicalin are potent inhibitors of angiogenesis: Inhibition of endothelial cell proliferation, migration and differentiation. *International Journal of Cancer*. 106 (4): 559-565.

Ljungman M., Paulsen M. T. (2001) The cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine inhibits RNA synthesis and triggers nuclear accumulation of p53 that is unmodified at Ser15 and Lys382. *Molecular Pharmacology*. 60 (4): 785-789.

Ljungman M., Zhang F., Chen F., Rainbow A. J., McKay B. C. (1999) Inhibition of RNA polymerase II as a trigger for the p53 response. *Oncogene*. 18 (3): 583-592.

Lu H., Murtagh J., Schwartz E. L. (2006) The microtubule binding drug laulimalide inhibits vascular endothelial growth factor-induced human endothelial cell migration and is synergistic when combined with docetaxel (taxotere). *Molecular Pharmacology*. 69 (4): 1207-1215.

Lu J., Jiang C. (2001) Antiangiogenic activity of selenium in cancer chemoprevention: metabolite-specific effects. *Nutrition and Cancer*. 40 (1): 64-73.

Maas J. W., Groothuis P. G., Dunselman G. A., de Goeij A. F., Struyker Boudier H. A., Evers J. L. (2001) Endometrial angiogenesis throughout the human menstrual cycle. *Human Reproduction*. 16 (8): 1557-1561.

Maccioni R. B., Otth C., Concha II., Muñoz J. P. (2001) The protein kinase Cdk5. Structural aspects, roles in neurogenesis and involvement in Alzheimer's pathology. *European Journal of Biochemistry*. 268 (6): 1518-1527.

Maglione D., Guerriero V., Viglietto G., Delli-Bovi P., Persico M. G. (1991) Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 88 (20): 9267-9271.

Maglione D., Guerriero V., Viglietto G., Ferraro M. G., Aprelikova O., Alitalo K., Del Vecchio S., Lei K. J., Chou J. Y., Persico M. G. (1993) Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene*. 8 (4): 925-931.

Magnusson P. U., Looman C., Ahgren A., Wu Y., Claesson-Welsh L., Heuchel R. L. (2007) Platelet-derived growth factor receptor-beta constitutive activity promotes angiogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 27 (10): 2142-2149.

Malíková J., Swaczynová J., Kolár Z., Strnad M. (2008) Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids. *Phytochemistry*. 69 (2): 418-426.

Malumbres M. (2014) Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology*. 15 (6): 122.

Malumbres M., Barbacid M. (2001) To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 1 (3): 222-231.

Malumbres M., Barbacid M. (2005) Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences*. 30 (11): 630-641.

Malumbres M., Barbacid M. (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*. 9 (3): 153-166.

Malumbres M., Pevarello P., Barbacid M., Bischoff J. R. (2008) CDK inhibitors in cancer therapy: what is next? *Trends in Pharmacological Sciences*. 29 (1): 16-21.

Marshall N. F., Price D. H. (1995) Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation. *The Journal of Biological Chemistry*. 270 (21): 12335-12338.

Martin A., Komada M. R., Sane, D. C. (2003) Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. *Medical Research Reviews*. 23 (2): 117-145.

Masui Y., Markert C. L. (1971) Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *Journal of Experimental Zoology*. 177 (2): 129-145.

Maton A., Hopkins J., Johnson S., LaHart S., McLaughlin C. W., Warner M. Q., Wright J. D. (1994) *Human Biology and Health*. Englewood Cliffs. 167-185.

Maxwell P. H., Wiesener M. S., Chang G. W., Clifford S. C., Vaux E. C., Cockman M. E., Wykoff C. C., Pugh C. W., Maher E. R., Ratcliffe P. J. (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 399 (6733): 271-275.

McGregor P. E., Agrawal D. K., Edwards J. D. (1994) Technique for assessment of leukocyte adherence to human umbilical vein endothelial cell monolayers. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 32 (2): 73-77.

McInnes C. (2008) Progress in the evaluation of CDK inhibitors as anti-tumor agents. *Drug Discovery Today*. 13 (19-20): 875-881.

McKeehan W. L., Wang F., Kan M. (1998) The heparan sulfate-fibroblast growth factor family: diversity of structure and function. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 59: 135-176.

Meijer L., Bettayeb K., Galons H. (2006) (R)-Roscovitine (CYC202, Seliciclib). In: Smith P. J., Yue E. W. eds. *Inhibitors of cyclin-dependent kinases as anti-tumor agents*. Boca Raton, FL: CRC Press. (9) 187-226.

Meijer L., Borgne A., Mulner O., Chong J. P., Blow J. J., Inagaki N., Inagaki M., Delcros J. G., Moulinoux J. P. (1997) Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *European Journal of Biochemistry*. 243 (1-2): 527-536.

Melillo G., Sausville E. A., Cloud K. Lahusen T., Varesio L., Senderowicz A. M. (1999) Flavopiridol, a protein kinase inhibitor, down-regulates hypoxic induction of vascular

endothelial growth factor expression in human monocytes. *Cancer Research*. 59 (21): 5433-5437.

Mendel D. B., Laird A. D., Xin X., Louie S. G., Christensen J. G., Li G., Schreck R. E., Abrams T. J., Ngai T. J., Lee L. B., Murray L. J., Carver J., Chan E., Moss K. G., Haznedar J. O., Sukbuntherng J., Blake R. A., Sun L., Tang C., Miller T., Shirazian S., McMahon G., Cherrington J. M. (2003) In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clinical Cancer Research*. 9 (1): 327-337.

Merk H., Zhang S., Lehr T., Müller C., Ulrich M., Bibb J. A., Adams R. H., Bracher F., Zahler S., Vollmar A. M., Liebl J. (2016) Inhibition of endothelial Cdk5 reduces tumor growth by promoting non-productive angiogenesis. *Oncotarget*. 7 (5): 1-17.

Meyer M., Clauss M., Lepple-Wienhues A., Waltenberger J., Augustin H. G., Ziche M., Lanz C., Büttner M., Rziha H. J., Dehio C. (1999) A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *The EMBO Journal*. 18 (2): 363-374.

Migdal M., Huppertz B., Tessler S., Comforti A., Shibuya M., Reich R., Baumann H., Neufeld G. (1998) Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 273 (35): 22272-22278.

Miki T., Bottaro D. P., Fleming T. P., Smith CL, Burgess W. H., Chan A. M., Aaronson S. A. (1992) Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89 (1): 246-250.

Min J. K., Han K. Y., Kim E. C., Kim Y. M., Lee S. W., Kim O. H., Kim K. W., Gho Y. S., Kwon Y. G. (2004) Capsaicin inhibits in vitro and in vivo angiogenesis. *Cancer Research*. 64 (2): 644-651.

Moreira A. L., Friedlander D. R., Shif B., Kaplan G., Zagzag D. (1999) Thalidomide and a thalidomide analogue inhibit endothelial cell proliferation in vitro. *Journal of Neuro-oncology*. 43 (2): 109-114.

- Morgan D. O. (1995) Principles of CDK regulation. *Nature*. 374 (6518): 131-134.
- Moscattelli D. (1987) High and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factor on cultured cells: absence of a role for low affinity binding in the stimulation of plasminogen activator production by bovine capillary endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology*. 131 (1): 123-130.
- Mosher D. F. (1990) Physiology of thrombospondin. *Annual Review of Medicine*. 41: 85-97.
- Mueller P. R., Coleman T. R., Kumagai A., Dunphy W. G. (1995) Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science*. 270 (5233): 86-90.
- Mukhopadhyay P., Ali M. A., Nandi A., Carreon P., Choy H., Saha D. (2006) The cyclin-dependent kinase 2 inhibitor down-regulates interleukin-1beta-mediated induction of cyclooxygenase-2 expression in human lung carcinoma cells. *Cancer Research*. 66 (3) :1758-1766.
- Müssig C., Altmann T. (2001) Brassinosteroid signaling in plants. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 12 (9): 398-402.
- Naňka O., Grim M. (2009) Utváření cévního řečiště: přehled molekulárních mechanismů a možností terapeutického ovlivnění. *Časopis Lékařů Českých* 148: 158-162.
- Nelson A. R., Fingleton B., Rothenberg M. L., Matrisian L. M. (2000) Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *Journal of Clinical Oncology*. 18 (5): 1135-1149.
- Nemunaitis J. J., Small K. A., Kirschmeier P., Zhang D., Zhu Y., Jou Y. M., Statkevich P., Yao S. L., Bannerji R. (2013) A first-in-human, phase 1, dose-escalation study of dinaciclib, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, administered weekly in subjects with advanced malignancies. *Journal of Translational Medicine*. 11: 259.
- Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S., Poltorak Z. (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal*. 13 (1): 9-22.

Newcomb E. W., Ali M. A., Schnee T., Lan L., Lukyanov Y., Fowkes M., Miller D. C., Zagzag D. (2005) Flavopiridol downregulates hypoxia-mediated hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression in human glioma cells by a proteasome-independent pathway: implications for in vivo therapy. *Neuro-Oncology*. 7 (3): 225-235.

Nurse P. (1975) Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature*. 256 (5518): 547-551.

Nurse P., Bissett Y. (1981) Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature*. 292 (5823): 558-560.

O'Donnell A., Padhani A., Hayes C., Kakkar A. J., Leach M., Trigo J. M., Scurr M., Raynaud F., Phillips S., Aherne W., Hardcastle A., Workman P., Hannah A., Judson I. (2005) A Phase I study of the angiogenesis inhibitor SU5416 (semaxanib) in solid tumours, incorporating dynamic contrast MR pharmacodynamic end points. *British Journal of Cancer*. 93 (8): 876-883.

Ogba N., Doughman Y. Q., Chaplin L. J., Hu Y., Gargasha M., Watanabe M., Montano M. M. (2010) HEXIM1 modulates vascular endothelial growth factor expression and function in breast epithelial cells and mammary gland. *Oncogene*. 29 (25) :3639-3649.

Ohshima T., Ward J. M, Huh C. G., Longenecker G., Veeranna, Pant H. C., Brady R. O., Martin L. J., Kulkarni A. B. (1996) Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93 (20): 11173-11178.

O'Reilly M. S., Boehm T., Shing Y., Fukai N., Vasios G., W. S. Lane, Flynn E., Birkhead J. R., Olsen B. R., Folkman J. (1997) Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth. *Cell*. 88 (2): 277-228.

O'Reilly M. S., Holmgren L., Shing Y., Chen C., Rosenthal R. A., Moses M. Lane W. S., Cao Y., Sage E. H., Folkman J. (1994) Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a lewis lung carcinoma. *Cell*. 79 (2): 315-328.

Ornitz D. M. (2000) FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays*. 22 (2): 108-112.



Ortiz-Barahona A., Villar D., Pescador N., Amigo J., del Peso L. (2010) Genome-wide identification of hypoxia-inducible factor binding sites and target genes by a probabilistic model integrating transcription-profiling data and in silico binding site prediction. *Nucleic Acids Research*. 38 (7): 2332-2345.

Otrock Z. K., Mahfouz R. A., Makarem J. A., Shamseddine A. I. (2007) Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells, Molecules and Diseases*. 39 (2): 212-220.

Papetti M., Herman I. M. (2002) Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *The American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 282 (5): 947-970.

Parry D., Guzi T., Shanahan F., Davis N., Prabhavalkar D., Wiswell D., Seghezzi W., Paruch K., Dwyer M. P., Doll R., Nomeir A., Windsor W., Fischmann T., Wang Y., Oft M., Chen T., Kirschmeier P., Lees E. M. (2010) Dinaciclib (SCH 727965), a novel and potent cyclin-dependent kinase inhibitor. *Molecular Cancer Therapeutics*. 9 (8): 2344-2353.

Parsons J. T., Martin K. H., Slack J. K., Taylor J. M., Weed S. A. (2000) Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene*. 19 (49): 5606-5613.

Pasquier E., Carré M., Pourroy B., Camoin L., Rebaï O., Briand C., Braguer D. (2004) Antiangiogenic activity of paclitaxel is associated with its cytostatic effect, mediated by the initiation but not completion of a mitochondrial apoptotic signaling pathway. *Molecular Cancer Therapeutics*. 3 (10): 1301-1310.

Patan S., Alvarez M. J., Schittny J. C., Burri P. H. (1992) Intussusceptive microvascular growth: a common alternative to capillary sprouting. *Archives of Histology and Cytology*. 55: 65-75.

Pearce J. M. (2007) Malpighi and the discovery of capillaries. *European Neurology*. 58 (4): 253-255.

Peichev M., Naiyer A. J., Pereira D., Zhu Z., Lane W. J., Williams M., Oz M. C., Hicklin D. J., Witte L., Moore M. A., Rafii S. (2000) Expression of VEGFR-2 and AC133 by

circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 95 (3): 952-958.

Phelps M. A., Lin T. S., Johnson A. J., Hurh E., Rozewski D. M., Farley K. L., Wu D., Blum K. A., Fischer B., Mitchell S. M., Moran M. E., Brooker-McEldowney M., Heerema N. A., Jarjoura D., Schaaf L. J., Byrd J. C., Grever M. R., Dalton J. T. (2009) Clinical response and pharmacokinetics from a phase 1 study of an active dosing schedule of flavopiridol in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 113 (12): 2637-2645.

Phng L. K., Gerhardt H. (2009) Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Developmental Cell*. 16 (2): 196-208.

Pietras R. J., Weinberg P. K. (2005) Antiangiogenic Steroids in Human Cancer Therapy. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2 (1): 49-57.

Pinedo H. M., Slamon D. J. (2000) Translational research: The role of VEGF in tumor angiogenesis. *Oncologist*. 5 (1): 1-2.

Pinhero R., Liaw P., Bertens K., Yankulov K. (2004) Three cyclin-dependent kinases preferentially phosphorylate different parts of the C-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II. *European Journal of Biochemistry*. 271 (5): 1004-1014.

Pozo K., Castro-Rivera E., Tan C., Plattner F., Schwach G., Siegl V., Meyer D., Guo A., Gundara J., Mettlach G., Richer E., Guevara J. A., Ning L., Gupta A., Hao G., Tsai L. H., Sun X., Antich P., Sidhu S., Robinson B. G., Chen H., Nwariaku F. E., Pfragner R., Richardson J. A., Bibb J. A. (2013) The role of Cdk5 in neuroendocrine thyroid cancer. *Cancer Cell*. 24 (4): 499-511.

Presta L. G., Chen H., O'Connor S. J., Chisholm V., Meng Y. G., Krummen L., Winkler M., Ferrara N. (1997) Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Research*. 57 (20): 4593-4599.

Prewett M., Huber J., Li Y., Santiago A., O'Connor W., King K., Overholser J., Hooper A., Pytowski B., Witte L., Bohlen P., Hicklin D. J. (1999) Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis

and growth of several mouse and human tumors. *Cancer Research*. 59 (20): 5209-5218.

Procopio W. N., Pelavin P. I., Lee W. M., Yeilding N. M. (1999) Angiopoietin-1 and -2 coiled coil domains mediate distinct homo-oligomerization patterns, but fibrinogen-like domains mediate ligand activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 274 (42): 30196–30201.

Radhakrishnan S. K., Gartel A. L. (2006) A novel transcriptional inhibitor induces apoptosis in tumor cells and exhibits antiangiogenic activity. *Cancer Research*. 66 (6): 3264-3270.

Rafii S., Lyden D., Benezra R., Hattori K., Heissig B. (2002) Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for antiangiogenesis therapy? *Nature Reviews Cancer*. 2 (1): 826–835.

Raje N., Kumar S., Hideshima T., Roccaro A., Ishitsuka K., Yasui H., Shiraishi N., Chauhan D., Munshi N. C., Green S. R., Anderson K. C. (2005) Seliciclib (CYC202 or R-roscovitine), a small-molecule cyclin-dependent kinase inhibitor, mediates activity via down-regulation of Mcl-1 in multiple myeloma. *Blood*. 106 (3): 1042-1047.

Rárová L., Zahler S., Liebl J., Kryštof V., Sedlák D., Bartůněk P., Kohout L., Strnad M. (2012) Brassinosteroids inhibit in vitro angiogenesis in human endothelial cells. *Steroids*. 77 (13): 1502-1509.

Raza S. L., Cornelius L. A. (2000) Matrix metalloproteinases: pro- and anti-angiogenic activities. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 5 (1): 47-54.

Ren S., Rollins B. J. (2004) Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell*. 117 (2): 239-251.

Ribatti D., Vacca A., Iurlaro M., Ria R., Roncali L., Dammacco F. (1996) Human recombinant interferon alpha-2a inhibits angiogenesis of chick area vasculosa in shell-less culture. *International Journal of Microcirculation, Clinical and Experimental*. 16 (4): 165-169.

Richardson P. G., Mark T. M., Lacy M. Q. (2013) Pomalidomide: new immunomodulatory agent with potent antiproliferative effects. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 88 (1): 36-44.

Risau W., Flamme I. (1995) Vasculogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 11: 73-91.

Romano G. (2013) Deregulations in the cyclin-dependent kinase-9-related pathway in cancer: implications for drug discovery and development. *ISRN Oncology*. 2013: 1-13.

Roskoski R. Jr. (2007) Sunitinib: a VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 356 (2): 323-328.

Rugo H. S., Herbst R. S., Liu G., Park J. W., Kies M. S., Steinfeldt H. M., Pithavala Y. K., Reich S. D., Freddo J. L., Wilding G. (2005) Phase I trial of the oral antiangiogenesis agent AG-013736 in patients with advanced solid tumors: pharmacokinetic and clinical results. *Journal of Clinical Oncology*. 23 (24): 5474-5483.

Rusk A., McKeegan E., Haviv F., Majest S., Henkin J., Khanna C. (2006) Preclinical evaluation of antiangiogenic thrombospondin-1 peptide mimetics, ABT-526 and ABT-510, in companion dogs with naturally occurring cancers. *Clinical Cancer Research*. 12 (24): 7444-7455.

Rusnati M., Dell'Era P., Urbinati C., Tanghetti E., Massardi M. L., Nagamine Y., Monti E., Presta M. (1996) A distinct basic fibroblast growth factor (FGF-2)/FGF receptor interaction distinguishes urokinase-type plasminogen activator induction from mitogenicity in endothelial cells. *Molecular Biology of the Cell*. 7 (3): 369–381.

Russo A. A., Jeffrey P. D., Pavletich N. P. (1996) Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nature Structural Biology*. 3 (8): 696-700.

Rydlova M., Holubec L. Jr., Ludvikova M. Jr., Kalfert D., Franekova J., Povysil C., Ludvikova M. (2008) Biological activity and clinical implications of the matrix metalloproteinases. *AntiCancer Research*. 28 (2): 1389-1397.

Saha D., Datta P. K., Sheng H., Morrow J. D., Wada M., Moses H. L., Beauchamp R. D. (1999) Synergistic induction of cyclooxygenase-2 by transforming growth factor-beta1 and epidermal growth factor inhibits apoptosis in epithelial cells. *Neoplasia*. 1 (6): 508-517.

Sakly N., Mirshahi P., Ducros E., Soria J., Ghedira I., Mirshahi M. (2009) Angiogenic activity in sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 18 (8): 705-712.

Sandberg J. A., Parker V. P., Blanchard K. S., Sweedler D., Powell J. A., Kachensky A., Bellon L., Usman N., Rossing T., Borden E., Blatt L. M. (2000) Pharmacokinetics and tolerability of an antiangiogenic ribozyme (ANGIOZYME) in healthy volunteers. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 40 (12): 1462-1469.

Santo L., Vallet S., Hideshima T., Cirstea D., Ikeda H., Pozzi S., Patel K., Okawa Y., Gorgun G., Perrone G., Calabrese E., Yule M., Squires M., Ladetto M., Boccadoro M., Richardson P. G., Munshi N. C., Anderson K. C., Raje N. (2010) AT7519, A novel small molecule multi-cyclin-dependent kinase inhibitor, induces apoptosis in multiple myeloma via GSK-3beta activation and RNA polymerase II inhibition. *Oncogene*. 29 (16): 2325-2336.

Semenza G. L. (2000) HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *Journal of Applied Physiology*. 88 (4): 1474-1480.

Semenza G. L. (2004) Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology*. 19: 176-182.

Senderowicz A. M., Headlee D., Stinson S. F., Lush R. M., Kalil N., Villalba L., Hill K., Steinberg S. M., Figg W. D., Tompkins A., Arbuck S. G., Sausville E. A. (1998) Phase I trial of continuous infusion flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with refractory neoplasms. *Journal of Clinical Oncology*. 16 (9): 2986-2999.

Senderowicz A. M., Sausville E. A. (2000) Preclinical and clinical development of cyclin-dependent kinase modulators. *Journal of the National Cancer Institute*. 92 (5): 376-387.

Senger D. R., Galli S. J., Dvorak A. M., Perruzzi C. A., Harvey V. S., Dvorak H. F. (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 219 (4587): 983-985.

Shalaby F., Ho J., Stanford W. L., Fischer K. D., Schuh A. C., Schwartz L., Bernstein A., Rossant J. (1997) A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell*. 89 (6): 981-990.

Sherr C. J., Roberts J. M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes and Development*. 13 (12): 1501-1512.

Shih T., Lindley C. (2006) Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. *Clinical Therapeutics*. 28 (11): 1779-1802.

Shinkaruk S., Bayle M., Laïn G., Délérís G. (2003) Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy. *Current Medicinal Chemistry. Anti-Cancer Agents*. 3 (2): 95-117.

Shu F., Lv S., Qin Y., Ma X., Wang X., Peng X., Luo Y., Xu B. E., Sun X., Wu J. (2007) Functional characterization of human PFTK1 as a cyclin-dependent kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104 (22): 9248-9253.

Shugar D. (1994) Development of inhibitors of protein kinases CKI and CKII and some related aspects, including donor and acceptor specificities and viral protein kinases. *Cellular & Molecular Biology Research*. 40 (5-6): 411-419.

Shweiki D., Itin A., Soffer D., Keshet E. (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 359 (6398): 843-845.

Scharpfenecker M., Fiedler U., Reiss Y., Augustin H. G. (2005) The Tie-2 ligand angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism. *Journal of Cell Science*. 118 (4): 771-780.

Schlaeppli J. M., Wood J. M. (1999) Targeting vascular endothelial growth factor (VEGF) for anti-tumor therapy, by anti-VEGF neutralizing monoclonal antibodies or by

VEGF receptor tyrosine-kinase inhibitors. *Cancer and Metastasis Reviews*. 18 (4): 473-481.

Schmidt T., Kharabi Masouleh B., Loges S., Cauwenberghs S., Fraisl P., Maes C., Jonckx B., De Keersmaecker K., Kleppe M., Tjwa M., Schenk T., Vinckier S., Fragoso R., De Mol M., Beel K., Dias S., Verfaillie C., Clark R. E., Brümmendorf T. H., Vandenberghe P., Rafii S., Holyoake T., Hochhaus A., Cools J., Karin M., Carmeliet G., Dewerchin M., Carmeliet P. (2011) Loss or inhibition of stromal-derived PIGF prolongs survival of mice with imatinib-resistant Bcr-Abl1(+) leukemia. *Cancer Cell*. 19 (6): 740-753.

Siemann D. W., Bibby M. C., Dark G. G., Dicker A. P., Eskens F. A., Horsman M. R., Marmé D., Lorusso P. M. (2005) Differentiation and definition of vascular-targeted therapies. *Clinical Cancer Research*. 11 (2): 416-420.

Skobe M., Hawighorst T., Jackson D. G., Prevo R., Janes L., Velasco P., Riccardi L., Alitalo K., Claffey K., Detmar M. (2001) Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nature Medicine*. 7 (2): 192-198.

Skopińska-Rózewska E., Chorostowska-Wynimko J., Krotkiewski M., Rogala E., Sommer E., Demkow U., Skurzak H. (2003) Inhibitory effect of Greenland shark liver oil combined with squalen and arctic birch ashes on angiogenesis and L-1 sarcoma growth in Balb/c mice. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 6 (3): 54-56.

Sleijfer S., Ray-Coquard I., Papai Z., Le Cesne A., Scurr M., Schöffski P., Collin F., Pandite L., Marreaud S., De Brauwier A., van Glabbeke M., Verweij J., Blay J. Y. (2009) Pazopanib, a multikinase angiogenesis inhibitor, in patients with relapsed or refractory advanced soft tissue sarcoma: a phase II study from the European organisation for research and treatment of cancer-soft tissue and bone sarcoma group (EORTC study 62043). *Journal of Clinical Oncology*. 27 (19): 3126-3132.

Smith L. D., Ecker R. E. (1971) The interaction of steroids with *Rana pipiens* Oocytes in the induction of maturation. *Developmental Biology*. 25 (2): 232-247.

Soomro S., Langenberg T., Mahringer A., Konkimalla V. B., Horwedel C., Holenya P., Brand A., Cetin C., Fricker G., Dewerchin M., Carmeliet P., Conway E. M., Jansen

H., Efferth T. (2011) Design of novel artemisinin-like derivatives with cytotoxic and anti-angiogenic properties. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 15 (5): 1122-1135.

Squires M. S., Cooke L., Lock V., Qi W., Lewis E. J., Thompson N. T., Lyons J. F., Mahadevan D. (2010) AT7519, a cyclin-dependent kinase inhibitor, exerts its effects by transcriptional inhibition in leukemia cell lines and patient samples. *Molecular Cancer Therapeutics*. 9 (4): 920-928.

Squires M. S., Feltell R. E., Wallis N. G., Lewis E. J., Smith D. M., Cross D. M., Lyons J. F., Thompson N. T. (2009) Biological characterization of AT7519, a small-molecule inhibitor of cyclin-dependent kinases, in human tumor cell lines. *Molecular Cancer Therapeutics*. 8 (2): 324-332.

Stockwin L. H., Yu S. X., Stotler H., Hollingshead M. G., Newton D. L. (2009) ARC (NSC 188491) has identical activity to Sangivamycin (NSC 65346) including inhibition of both P-TEFb and PKC. *BMC Cancer*. 9: 63.

Strock C. J., Park J. I., Nakakura E. K., Bova G. S., Isaacs J. T., Ball D. W., Nelkin B. D. (2006) Cyclin-dependent kinase 5 activity controls cell motility and metastatic potential of prostate cancer cells. *Cancer Research*. 66 (15): 7509-7515.

Suchting S., Freitas C., Le Noble F., Benedito R., Breant C., Duarte A., Eichmann A. (2007) The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proceedings of the National Academy of Science*. 104 (9): 3225-3230.

Sun B., Chen B., Zhao Y., Sun W., Chen K., Zhang J., Wei Z., Xiao Z., Dai J. (2009) Crosslinking heparin to collagen scaffolds for the delivery of human platelet-derived growth factor. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 91 (1): 366-372.

Sundberg C., Friman T., Hecht L. E., Kuhl C., Solomon K. R. (2009) Two Different PDGF  $\beta$ -Receptor Cohorts in Human Pericytes. Mediate Distinct Biological Endpoints. *The American Journal of Pathology*. 175 (1): 171-189.

Suto K., Yamazaki Y., Morita T., Mizuno H. (2005) Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms: insight into selective VEGF



binding to kinase insert domain-containing receptor but not to fms-like tyrosine kinase-1. *The Journal of Biological Chemistry*. 280 (3): 2126-2131.

Swift M. E., Kleinman H. K., DiPietro L. A. (1999) Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. *Laboratory Investigation*. 79 (12): 1479-1487.

Šimíčková M., Zdražilová L., Kocáková I., Nekulová M., Nenutil R., Demlová R., Valík D. (2006) Angiogeneze a anti-angiogenní terapie u nádorových onemocnění se zaměřením na cirkulující vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF). *Klinická onkologie*. 19 (4): 212-216.

Takahashi T., Kalka C., Masuda H., Chen D., Silver M., Kearney M., Magner M., Isner J. M., Asahara T. (1999) Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nature Medicine*. 5 (4): 434-438.

Tanaka T., Serneo F. F., Tseng H. C., Kulkarni A. B., Tsai L. H., Gleeson J. G. (2004) Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration. *Neuron*. 41 (2): 215-227.

Taraboletti G., D'Ascenzo S., Borsotti P., Giavazzi R., Pavan A., Dolo V. (2002) Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *The American Journal of Pathology*. 160 (2): 673-680.

Tassan J. P., Jaquenoud M., Fry A. M., Frutiger S., Hughes G. J., Nigg E. A. (1995) In vitro assembly of a functional human CDK7-cyclin H complex requires MAT1, a novel 36 kDa RING finger protein. *EMBO Journal*. 14 (22): 5608-5617.

te Poele R. H., Okorokov A. L., Joel S. P. (1999) RNA synthesis block by 5, 6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) triggers p53-dependent apoptosis in human colon carcinoma cells. *Oncogene*. 18 (42): 5765-5772.

Terranova V. P., DiFlorio R., Lyall R. M., Hic S., Friesel R., Maciag T. (1985) Human endothelial cells are chemotactic to endothelial cell growth factor and heparin. *The Journal of Cell Biology*. 101 (6): 2330-2334.

Thurston G., Kitajewski J. (2008) VEGF and delta-Notch: interacting signaling pathways in tumor angiogenesis. *British Journal of Cancer*. 99 (8): 1204-1209.

Tsuji M., Kawano S., Tsuji S., Sawaoka H., Hori M., DuBois R. N. (1998) Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*. 93 (5): 705-716.

Turinetto V., Porcedda P., Orlando L., De Marchi M., Amoroso A., Giachino C. (2009) The cyclin-dependent kinase inhibitor 5, 6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole induces nongenotoxic, DNA replication-independent apoptosis of normal and leukemic cells, regardless of their p53 status. *BMC Cancer*. 9: 281.

Vacca A., Iurlaro M., Ribatti D., Minischetti M., Nico B., Ria R., Pellegrino A, Dammacco F. (1999) Antiangiogenesis is produced by nontoxic doses of vinblastine. *Blood*. 94 (12): 4143-4155.

Veikkola T., Alitalo K. (1999) VEGFs, receptors and angiogenesis. *Seminars in Cancer Biology*. 9 (3): 211-220.

Vermeulen K., Van Bockstaele D. R., Berneman Z. N. (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*. 36 (3): 131-149.

Vesely J., Havlíček L., Strnad M., Blow J. J., Donella-Deana A., Pinna L., Letham D. S., Kato J., Detivaud L., Leclerc S. (1994) Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *European Journal of Biochemistry*. 224 (2): 771-786.

Wacker A., Gerhardt H. (2011) Endothelial development taking shape. *Current Opinion in Cell Biology*. 23 (6): 1-10.

Wang J., Lou P., Henkin J. (2000) Selective inhibition of endothelial cell proliferation by fumagillin is not due to differential expression of methionine aminopeptidases. *Journal of Cellular Biochemistry*. 77 (3): 465-473.

Ward N. L., Putoczki T., Mearow K., Ivanco T. L., Dumont D. J. (2005) Vascular-specific growth factor angiopoietin 1 is involved in the organization of neuronal processes. *Journal of Comparative Neurology*. 482 (3): 244-256.

Watanabe J., Minami M., Kobayashi M. (2006) Antitumor activity of TZT-1027 (Soblidotin). *AntiCancer Research*. 26 (3): 1973-1781.

Watanabe K., Hasegawa Y., Yamashita H., Shimizu K., Ding Y., Abe M., Ohta H., Imagawa K., Hojo K., Maki H., Sonoda H., Sato Y. (2004) Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*. 114 (7): 898-907.

Weitensteiner S. B., Liebl J., Krystof V., Havlíček L., Gucký T., Strnad M., Fürst R., Vollmar A. M., Zahler S. (2013) Trisubstituted pyrazolopyrimidines as novel angiogenesis inhibitors. *PLoS One*. 8 (1): e54607.

Weng D. E., Usman N. (2001) Angiozyme: a novel angiogenesis inhibitor. *Current Oncology Reports*. 3 (2): 141-146.

Węsierska-Gądek J., Chamrád I., Kryštof V. (2009) Novel potent pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors. *Future Medicinal Chemistry*. 1 (9): 1561-1581.

West C. M., Price P. (2004) Combretastatin A4 phosphate. *Anticancer Drugs*. 15 (3): 179-187.

Whittaker S. R., Walton M. I., Garrett M. D., Workman P. (2004) The Cyclin-dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine) inhibits retinoblastoma protein phosphorylation, causes loss of Cyclin D1, and activates the mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Research*. 64 (1): 262-272.

Wilhelm S. M., Adnane L., Newell P., Villanueva A., Llovet J. M., Lynch M. (2008) Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Molecular Cancer Therapeutics*. 7 (10): 3129-3140.

Williams C. S., Sheng H., Brockman J. A., Armandla R., Shao J., Washington M. K., Elkahloun A. G., DuBois R. N. (2001) A cyclooxygenase-2 inhibitor (SC-58125)

blocks growth of established human colon cancer xenografts. *Neoplasia*. 3 (5): 428-436.

Wilmes L. J., Pallavicini M. G., Fleming L. M., Gibbs J., Wang D., Li K. L., Partridge S. C., Henry R. G., Shalinsky D. R., Hu-Lowe D., Park J. W., McShane T. M., Lu Y., Brasch R. C., Hylton N. M. (2007) AG-013736, a novel inhibitor of VEGF receptor tyrosine kinases, inhibits breast cancer growth and decreases vascular permeability as detected by dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Magnetic Resonance Imaging*. 25 (3): 319-327.

Wojtowicz-Praga S., Torri J., Johnson M., Steen V., Marshall J., Ness E., Dickson R., Sale M., Rasmussen H. S., Chiodo T. A., Hawkins M. J. (1998) Phase I trial of Marimastat, a novel matrix metalloproteinase inhibitor, administered orally to patients with advanced lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 16 (6): 2150-2156.

Wu G., Luo J., Rana J. S., Laham R., Sellke F. W., Li J. (2006) Involvement of COX-2 in VEGF-induced angiogenesis via P38 and JNK pathways in vascular endothelial cells. *Cardiovascular Research*. 69 (2): 512-519.

Wyatt P. G., Woodhead A. J., Berdini V., Boulstridge J. A., Carr M. G., Cross D. M., Davis D. J., Devine L. A., Early T. R., Feltell R. E., Lewis E. J., McMenamin R. L., Navarro E. F., O'Brien M. A., O'Reilly M., Reule M., Saxty G., Seavers L. C., Smith D. M., Squires M. S., Trewartha G., Walker M. T., Woolford A. J. (2008) Identification of N-(4-piperidiny)-4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxamide (AT7519), a novel cyclin dependent kinase inhibitor using fragment-based X-ray crystallography and structure based drug design. *Journal of Medicinal Chemistry*. 51 (16): 4986-4999.

Xie Z., Sanada K., Samuels B. A., Shih H., Tsai L. H. (2003) Serine 732 phosphorylation of FAK by Cdk5 is important for microtubule organization, nuclear movement, and neuronal migration. *Cell*. 114 (4): 469-482.

Yang C., Boyson C. A., Di Liberto M., Huang X., Hannah J., Dorn D. C., Moore M. A., Chen-Kiang S., Zhou P. (2015) CDK4/6 Inhibitor PD 0332991 Sensitizes Acute Myeloid Leukemia to Cytarabine-Mediated Cytotoxicity. *Cancer Research*. 75 (9): 1838-1845.

Yang S. H., Lin J. K., Huang C. J., Chen W. S., Li S. Y., Chiu J. H. (2005) Silibinin inhibits angiogenesis via Flt-1, but not KDR, receptor up-regulation. *Journal of Surgical Research*. 128 (1): 140-146.

Yankulov K., Yamashita K., Roy R., Egly J. M., Bentley D. L. (1995) The transcriptional elongation inhibitor 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole inhibits transcription factor IIH-associated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 270 (41): 23922-23925.

Yonemura Y., Endo Y., Tabata K., Kawamura T., Yun H. Y., Bandou E., Sasaki T., Miura M. (2005) Role of VEGF-C and VEGF-D in lymphangiogenesis in gastric cancer. *International Journal of Clinical Oncology*. 10 (5): 318-327.

Zahler S, Liebl J, Fürst R, Vollmar A. M. (2010) Anti-angiogenic potential of small molecular inhibitors of cyclin dependent kinases in vitro. *Angiogenesis*. 13 (3): 239-249.

Zhang X., Fang X., Gao Z., Chen W., Tao F., Cai P., Yuan H., Shu Y., Xu Q., Sun Y., Gu Y. (2014) Axitinib, a selective inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor, exerts an anticancer effect in melanoma through promoting antitumor immunity. *Anticancer Drugs*. 25 (2): 204-211.

Ziche M., Maglione D., Ribatti D., Morbidelli L., Lago C. T., Battisti M., Paoletti I., Barra A., Tucci M., Parise G., Vincenti V., Granger H. J., Viglietto G., Persico M. G. (1997) Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic. *Laboratory Investigation*. 76 (4): 517-531.

Zondor S. D., Medina P. J. (2004) Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor with efficacy in colorectal and other malignancies. *Annals of Pharmacotherapy*. 38 (7-8): 1258-1264.