



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

Charakterizace nových inhibitorů cyklin-
dependentních kinas v modelu hepatocelulárního
karcinomu

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Kristýna Schenková
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Radek Jorda, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2018

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Kristýna Schenková
Název práce	Charakterizace nových inhibitorů cyklin-dependentních kinas v modelu hepatocelulárního karcinomu
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Radek Jorda, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018
Abstrakt	<p>Pacienti s diagnostikovaným hepatocelulárním karcinomem mají zpravidla těžkou prognózu, protože běžná terapie ještě nedosahuje příliš pozitivních výsledků. U pacientů s hepatocelulárním karcinomem byly prokázány časté deregulace v cyklin-dependentních kinasach, a proto předmětem této práce bylo otestování čtyř nových inhibitorů cyklin-dependentních kinas na buněčných liniích HepG2 a PRF/PLC/5 a zjištění jejich účinku na maligní buňky. Všechny testované látky indukovaly u rakovinných buněk apoptózu a byl prokázán blok v G2/M fázích buněčného cyklu. Tyto efekty jsou v souladu s inhibicí cyklin-dependentních kinas na buněčné úrovni, které byly navíc prokázány imunodetekcí příslušných substrátů. Prezentované výsledky naznačují, že testované látky v některých svých vlastnostech překonávají jiné vyvíjené inhibitory a mohly by v budoucnu znamenat příslib v možnostech léčby pokročilého hepatocelulárního karcinomu nebo i dalších malignit.</p>
Klíčová slova	Hepatocelulární karcinom, cyklin-dependentní kinasa, inhibitor, buněčný cyklus, imunodetekce proteinů, léčba
Počet stran	76
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and Surname	Kristýna Schenková
Title of thesis	Characterization of novel inhibitors of cyclin-dependent kinases in hepatocellular carcinoma
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Radek Jorda, Ph.D.
The year of presentat.	2018
Abstract	<p>Patients with hepatocellular carcinoma have bad prognosis, because the regular treatment has not reached for sufficient results yet. Deregulations in cyclin-dependent kinases are common phenomenon in patients with hepatocellular carcinoma and due to this reason, appropriate inhibitors are still developing. In this thesis we describe biological characterization of four new inhibitors of cyclin-dependent kinases on cell lines HepG2 and PLC/PRF/5. All tested compounds induced apoptosis in cancer cells and blocked G2/M phases of the cell cycle. These effects are in accordance with the inhibition of cyclin-dependent kinases in cells that have been further proven by immunodetection of the CDK substrates. We showed that tested inhibitors overcame biological effects of previously described CDK inhibitors and therefore their further testing could help to successful treatment of patients with advanced stage of hepatocellular carcinoma or other malignancies in the future.</p>
Keywords	Hepatocellular carcinoma, cyclin-dependent kinase, inhibitor, cell cycle, protein immunodetection, treatment
Number of pages	76
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

Poděkování:

„Touto cestou bych chtěla poděkovat svému vedoucímu práce Mgr. Radku Jordovi, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce a za cenné rady při provádění experimentů. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Evě Řezníčkové, Ph.D., Janě Hudcové a celému kolektivu Laboratoře růstových regulátorů za spolupráci při získávání cenných dat v experimentální části práce.“

Obsah

Seznam zkratek	8
1. Úvod	11
2. Cyklin-dependentní kinasy.....	12
2.1 Inhibitory kinas - potencionální terapie	13
3. Hepatocelulární karcinom	17
3.1 Vznik a vývoj HCC.....	18
3.2 Deregulace v molekulárních dráhách u HCC	19
3.2.1 Deregulace komplexu CDK/cyklin u HCC	21
3.3 Možnosti léčby HCC	23
3.3.1 Chirurgická léčba	25
3.3.2 Transarteriální chemoembolizace (TACE)	26
3.3.3 Subkutánní alkoholizace	27
3.3.4 Kryoterapie a radiofrekvenční ablace (RFA).....	27
3.3.5 Terapie založená na fyzikálním záření (LITT, PMCT).....	28
3.3.6 Radioembolizace	29
3.3.7 Systémová chemoterapie	30
3.3.8 Cílená systémová terapie - molekulární cíle	32
3.3.8.1 Inhibitory CDKs v modelu HCC	33
4. Cíle práce.....	37
5. Metody	39
5.1 Přístrojové vybavení	39
5.2 Chemikálie.....	39
5.3 Roztoky	40
5.4 Protilátky.....	40
5.5 Buněčné linie.....	41

5.6 Testované látky	41
5.7 Kultivace buněk a sklizení	42
5.8 Lyzace	42
5.9 Cytometrické techniky	43
5.10 SDS-PAGE a western blotting.....	44
6. Výsledky.....	45
6.1 Jednparametrová analýza buněčného cyklu	45
6.2. Dvoupparametrová analýza buněčného cyklu	50
6.3. Imunodetekce proteinů účastnících se buněčného cyklu a transkripce..	51
6.4. Imunodetekce proteinů účastnících se apoptózy.....	56
7. Závěr.....	62
Seznam použité literatury.....	63

Seznam zkratek

ABC – ATP-binding cassette

Akt – proteinkinase B

AFP – α -fetoprotein

APC – adenomatous polyposis coli

APS – amonium peroxodisulfate

ATP – adenosine triphosphate

Bax – Bcl-2 associated X protein

Bcl-2 – B-cell CLL/lymphoma 2

BRAF – human gen that encodes protein B-Raf

BrdU – 5-bromo-2'-deoxyuridine

BSA – bovine serum albumin

CAK – CDK-activating kinase

Cdc – cell division cycle

CDC2L – cell division cycle 2-like

CDK(s) – cyclin-dependent kinase(s)

CDKI – CDK inhibitor

c-Fos – protooncogen c-Fos

Cip/Kip – CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein

CK1 – casein kinase 1

c-Met – hepatocyte growth factor receptor

c-Myc – homolog of v-Myc myelocytomatosis viral oncogene

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – dimethylsulfoxide

DNA – deoxyribonucleic acid

DTT – dithiothreitol

E – glutamic acid

E2F – E2F transcription factor

EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA – ethylenglycoltetraacetic acid

EMEM – Eagle's Minimum Essential Medium

Erk – extracellular-signal-regulated kinase

EVOLVE-1 – Everolimus for Liver Cancer Evaluation 1
FITC – fluorescein isothiocyanate
Fzd – frizzled class receptor
GI₅₀ – 50% growth inhibition
GSK3 – glycogen synthase kinase 3
HBV – hepatitis B virus
HCC – hepatocellular carcinoma
HCMV – human cytomegalovirus
HCV – hepatitis C virus
HGF – hepatocellular growth factor
HIV – human immunodeficiency virus type 1
HPV – human papilloma virus
HSP – heat shock protein
HSV – herpes simplex virus
INK4 – inhibitor of cyclin-dependent kinase 4
INR – international normalized ratio
L – leucine
LITT – laser-induced thermotherapy
MAPK – mitogen-activated protein kinase
Mat1 – ménage-à-trois 1
Mcl-1 – myeloid-cell leukemia 1
MDM-2 – murine double minute-2
MDR1 – multidrug resistance protein 1
MEK – mitogen-activated protein kinase
mTOR – mammalian target of rapamycin
NP-40 – nonyl phenoxyethoxyethanol
P – proline
p28^{gankyrin} – proteasome 26S subunit
p16, p53 – tumor suppressors – protein p16, protein p53
PAGE – polyacrylamide gel electrophoresis
PARP – poly(ADP-ribose) polymerase
PBS – phosphate buffered saline
PDGF(R) – platelet-derived growth factor (receptor)
PEI – percutaneous ethanol injection

PI3K – phosphatidylinositol 3-kinase
PI – propidium iodide
PMCT – percutaneous microwave coagulation therapy
PMSF – phenylmethylsulfonyl fluoride
PST – performance status
PTEN – phosphatase and tensin homolog
Q – glutamine
R – arginine
Raf – proto-oncogene serine/threonine-protein kinase
Ras – protein family member belong to a class of small GTPase
(p)Rb – (phospho) retinoblastoma protein
RFA – radiofrequency ablation
RNA – ribonucleic acid
(p)RNAPol. II – (phospho) RNA polymerase II
S – serine
SDS – sodium dodecyl sulphate
shRNA – short hairpin ribonucleic acid
SHARP – Study of Heart and Renal Protection
sp. – species
Stat – signal transducer and transcription activator
T – Tween 20
TACE – transarterial chemoembolization
TBS – TRIS-buffered saline
TEMED – tetramethylethylenediamine
TERT – telomerase reverse transcriptase
TNM – tumor-nodule-metastasis
TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethane
UV – ultraviolet
VEGF(R) – vascular endothelial growth factor (receptor)
VIS – visible
Wee1 – Wee1 G2 checkpoint kinase in human
Wnt – wingless-type MMTV integration site family
XIAP – X-linked inhibitor of apoptosis
ZHX2 – zinc fingers and homeoboxes 2 gene in human

1. Úvod

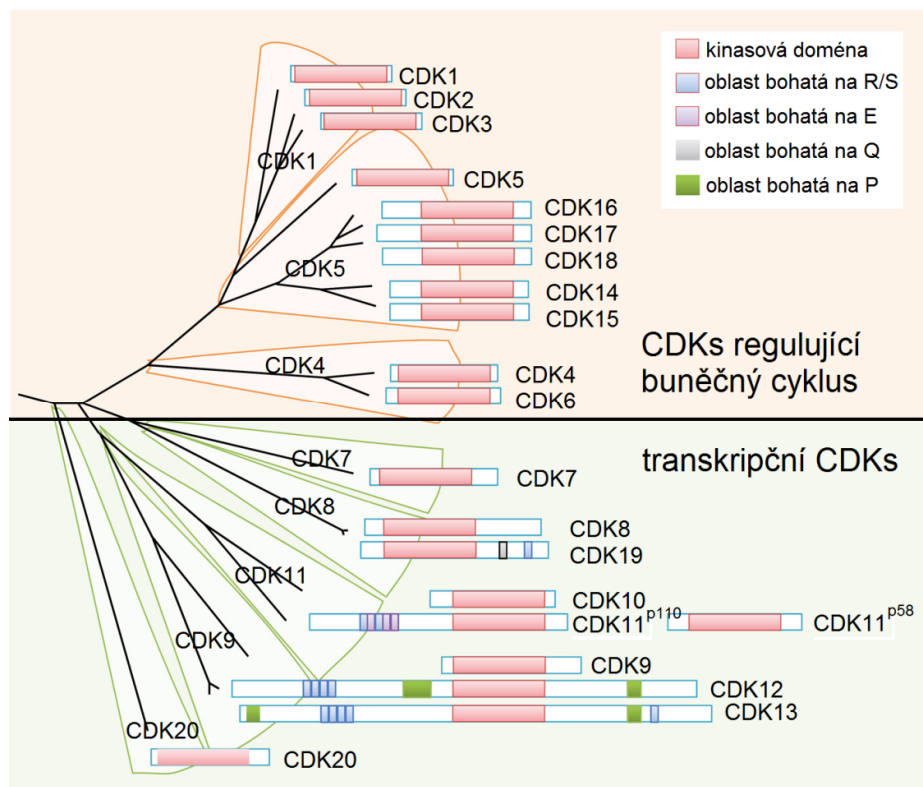
Průkopový objev zaznamenali v 50. letech minulého století vědci E. Krebs a E. Fischer, kteří jako první dali světu vědět o fosforylaci proteinů a proteinkinas. Tento objev vedl k lepšímu pochopení funkce proteinů a jejich regulace v buňkách. Dnes je již známo, že fosforylace tyrosinu, threoninu a serinu hrají významnou roli v molekulárních pochodech všech živých organismů a při deregulaci těchto aminokyselin může docházet k fatálním změnám v organismu. Známa je především souvislost mezi deregulací kinas u rakovinných onemocnění, u virových onemocnění (HIV, HCMV, HSV), u neurodegenerativních onemocnění (Alzheimerova choroba, náhlá mozková příhoda), kardiovaskulárních onemocnění (ateroskleróza), anebo např. u parazitárních onemocnění (*Leishmania sp.*, *Plasmodium sp.*). Proto jsou tyto enzymy v poslední době hlavním cílem farmakologického výzkumu a je do nich vkládána velká naděje jako do potencionální terapie (Knockaert a kol., 2002; Galons a kol., 2010).

Tato práce pojednává konkrétně o problematice hepatocelulárního karcinomu, který je v žebříčku jednou z nejčastějších příčin úmrtí pacientů, jak ve vyspělých zemích, tak v rozvojových zemích. Dále jsou popsány nynější možnosti léčby HCC, kde jsou nastíněna i potencionální léčiva cílící na cyklin-dependentní kinasy. Nechybí taktéž obecná zmínka o cyklin-dependentních kinasach, o inhibitech těchto kinas a o jejich deregulacích v molekulárních drahách u HCC.

2. Cyklin-dependentní kinasy

Cyklin-dependentní kinasy (CDKs) jsou serin-threoninové kinasy, jejichž enzymatická funkce závisí na vazbě cyklinu, což je malá, volně se vyskytující podjednotka, se kterou CDK tvoří heterodimerní komplex. Cyklin-dependentní kinasa v tomto komplexu zastává funkci katalytickou a cyklin funkci regulační. Po vytvoření komplexu CDK/cyklin se změní konformace kinasy a dojde k její částečné aktivaci. Aby došlo k celkové aktivaci komplexu, je zapotřebí ještě přítomnost specifického enzymu CAK (cyklin-aktivační kinasa), který fosforyluje T-smyčku kinasy, a díky tomu získává kinasa svoji enzymatickou aktivitu. V dnešní době je známo nejméně 29 proteinů, které mají ve své struktuře cyklinovou doménu a zastávají tak funkci cyklinů. Pro některé z nich však stále nebyl nalezen vazebný partner (Malumbres, 2014). Aktivita CDKs může být mimo jiné kladně ovlivněna také dalšími kinasami a fosfatasami (Wee1, Cdc25), anebo naopak inhibována CDK rodinami Cip/Kip a INK4 (Carnero, 2002).

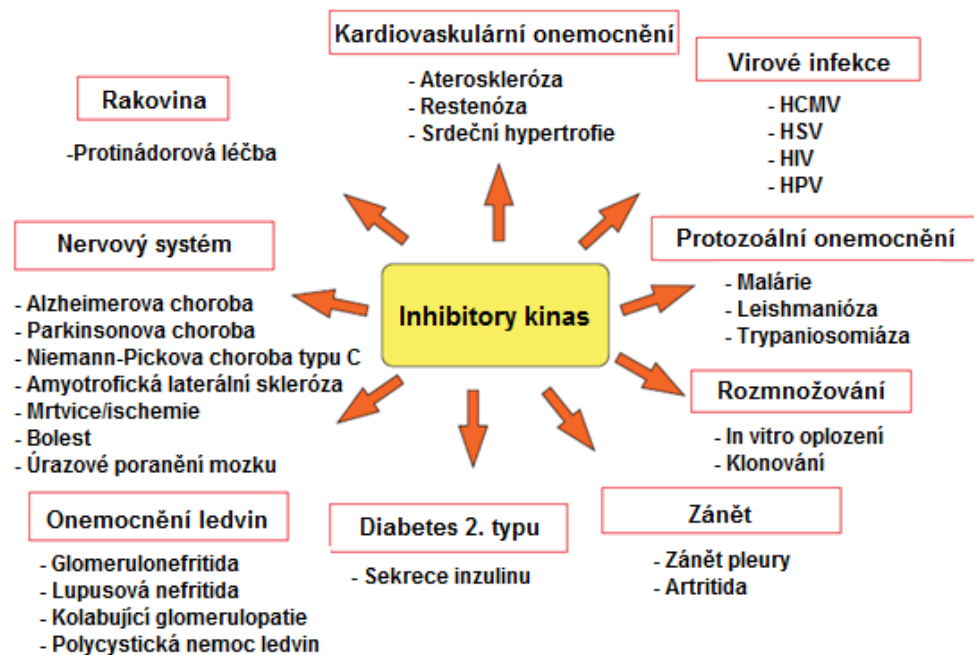
V současnosti je v lidských buňkách popsáno dvacet odlišných cyklin-dependentních kinas, které zastávají různé funkce (Cao a kol., 2014). Uplatňují se především při řízení buněčného cyklu, při transkripčních a translačních procesech, při apoptóze a také mají svoji funkci při diferenciaci, neurogenezi a spermatogenezi. Lidský genom obsahuje 21 genů kódujících CDK1-CDK20 (CDK11 je kódována 2 geny: *CDC2L1* a *CDC2L2*). Z hlediska evolučního vývoje můžeme CDKs rozdělit do osmi podskupin (**obr. 1**).



Obr. 1: Fylogenetický vývoj CDKs (převzato a upraveno podle Malumbres, 2014).

2.1 Inhibitory kinas - potencionální terapie

Inhibitory proteinkinas představují významnou a stále se rozvíjející skupinu cílených léčiv. Během posledních deseti let vstoupilo přes sto různých nízkomolekulárních proteinkinasových inhibitorů do klinických studií (Fabro a kol., 2015). Tyto inhibitory mají uplatnění nejen v protinádorové léčbě, ale také v léčbě řady dalších nemocí (**obr. 2**). Terapeutické inhibitory proteinkinas jsou v klinické fázi testování také proti nemocem, jako jsou revmatoidní artritida, různé kardiovaskulární choroby nebo diabetes (Knockaert a kol., 2002; Galons a kol., 2010).



Obr. 2: Možnosti potencionálního využití inhibitorů proteinkinas (převzato a upraveno podle Galons a kol., 2010).

Další skupinou inhibitorů jsou inhibitory cyklin-dependentních kinas (CDKI), které nachází uplatnění při léčbě pacientů s pokročilým nálezem rakoviny. Jejich hlavní předností je lepší příjem pacienty, než je léčba klasickou systémovou chemoterapií s širokou škálou vedlejších účinků. Mechanismus účinku CDK inhibitorů je založen na bránění schopnosti proteinkinas fosforylovat příslušné proteiny (Knockaert a kol., 2002). Pokud tedy působí inhibitor na nádorovou buňku, může dojít k zastavení jejího dělení, či dokonce k indukci apoptózy. To záleží na tom, jestli je pouze snížena hladina CDKs (cytostatický efekt), nebo jsou kiny inaktivovány, což navozuje apoptózu u rakovinných buněčných linií (Cai a kol., 2006).

Během posledních 20 let se dostalo minimálně 24 inhibitorů do klinických fází testování (Asghar a kol., 2015). Postupně však docházelo k jejich úpravě a vývoji. První generace inhibitorů CDKs zahrnovala především přírodní látky odvozené od flavonů, purinů a alkaloidů. Konkrétně se jednalo o flavopiridol, staurosporin, roskovitin, olomoucín, butyrolakton atd. (Knockaert a kol., 2002). Tato skupina inhibitorů byla později označována jako pan-selektivní inhibitory kinas, a to především kvůli jejich

nízké selektivitě k CDKs (např. flavopiridol cílí současně na CDK1/2/4/6/9 a roskovitin na CDK1/2/5/7/9). Na základě této zkušenosti byla druhá generace inhibitorů navržena podle krystalických struktur jednotlivých kinas, na které měla látka cílit. Výsledkem byla lepší selektivita a také vyšší účinnost inhibitorů při testování. Příkladem druhé generace inhibitorů kinas jsou např. EXEL-8647, BS-181, SNS-032 a PD 0332991 (Kryštof a Uldrijan, 2010; Misra a kol., 2004; Shapiro, 2006).

Navzdory velké rozmanitosti ve stavbě, všechny CDKI mají některé společné vlastnosti: 1. mají nízkou molekulovou hmotnost (<600), 2. stavbou se jedná o planární hydrofobní heterocykly, 3. kompetují s molekulou ATP o vazbu v ATP-vazebném místě kinasy, 4. pro vazbu s kinasami využívají hydrofobních a vodíkových vazeb a 5. karbonylový a aminovýpostranní řetězec L83 působí jako akceptor i donor H-vazby pro inhibitory, zatímco karbonylový řetězec E81 působí pouze jako akceptor H-vazby (Knockaert a kol., 2002).

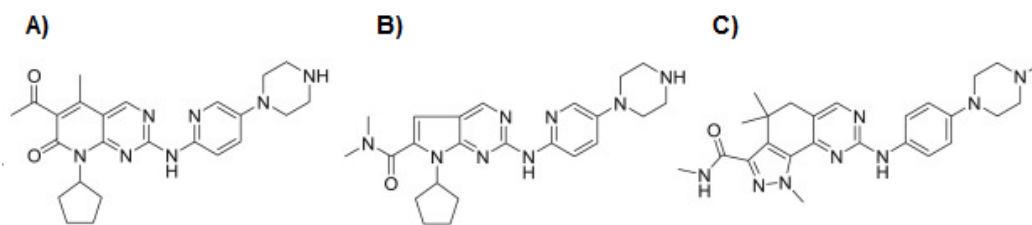
V dnešní době jsou schváleny jako léčivější inhibitory CDKs proti metastazujícímu nádoru prsu (palbociclib, abemaciclib, ribociclib). Nyní u všech zmíněných inhibitorů probíhají klinické studie i na pacientech s pokročilým stádiem hepatocelulárního karcinomu.

Prvním inhibitorem je palbociclib (IBRANCE[®], Pfizer Inc., **obr. 3A**), který selektivně inhibuje CDK4/6 (Beaver a kol., 2015). V preklinických studiích proti HCC byla prokázána významná inhibice růstu nádorových buněk, jak u buněčných linií (Bollard a kol., 2017), tak na zvířecích modelech i na lidských nádorových xenograftech a konečné výsledky byly prokazatelně lepší, než v případě sorafenibu, který se v dnešní době běžně používá k léčbě pokročilého HCC. V klinickém testování byla poté studována toxicita palbociclibu a také bylo léčivo perorálně podáváno pacientům, kteří špatně odpovídali na standardní léčbu sorafenibem. Výsledky studií by měly být uveřejněny v příštím roce (Littman a kol., 2013; clinicaltrials.gov).

Dalším inhibitorem kinas, který již je v klinickém testování, je ribociclib (Kisqali[®], Novartis, **obr. 3B**). Účinkem ribociclibu je inhibice CDK4/6, jako u předchozího zmíněného inhibitoru. Tyto kinasy v buňce zodpovídají za přechod z G1 fáze buněčného cyklu do S fáze vlivem fosforylace proteinu Rb (Lim a Kaldis, 2013). V roce 2016 ribociclib vstoupil do druhé fáze

klinického testování, kdy je studován účinek kombinace inhibitoru s chemoembolizací u pacientů s pokročilým nálezem HCC (Syed, 2017; clinicaltrials.gov).

Posledním klinicky testovaným inhibitorem kinas u pacientů s HCC je milciclib (**obr. 3C**). Jedná se o malou molekulu, která inhibuje CDK1/4/5/7. Nyní je ve II. fázi klinického testování a studie je prováděna na pacientech s neresekovatelným hepatocelulárním karcinomem, příp. s metastazujícím karcinomem v pokročilém stádiu rakoviny. Momentálně se zjišťuje toxicita látky při podávání pacientům perorálně a také je v blízké budoucnosti v plánu otestovat látku v kombinaci se sorafenibem (Nexavar[®], Bayer Germany) a také s nivolumabem (Opdivo[®], Bristol Myers Squibb; Aspeslagh a kol., 2017; clinicaltrials.gov).



Obr. 3: Chemická struktura inhibitorů CDKs, kde je A) palbociclib, B) ribociclib a C) milciclib.

3. Hepatocelulární karcinom

Hepatocelulární karcinom (HCC) je komplexní heterogenní nádor jater, který se řadí celosvětově mezi prvních 6 nejčastějších rakovinných onemocnění a je v žebříčku třetím nejčastějším nádorovým onemocněním způsobující smrt pacienta (Bupathi a kol., 2015). Co do primárních malignit jater, tvoří HCC více než 70 % ze všech (Bisteau a kol., 2014).

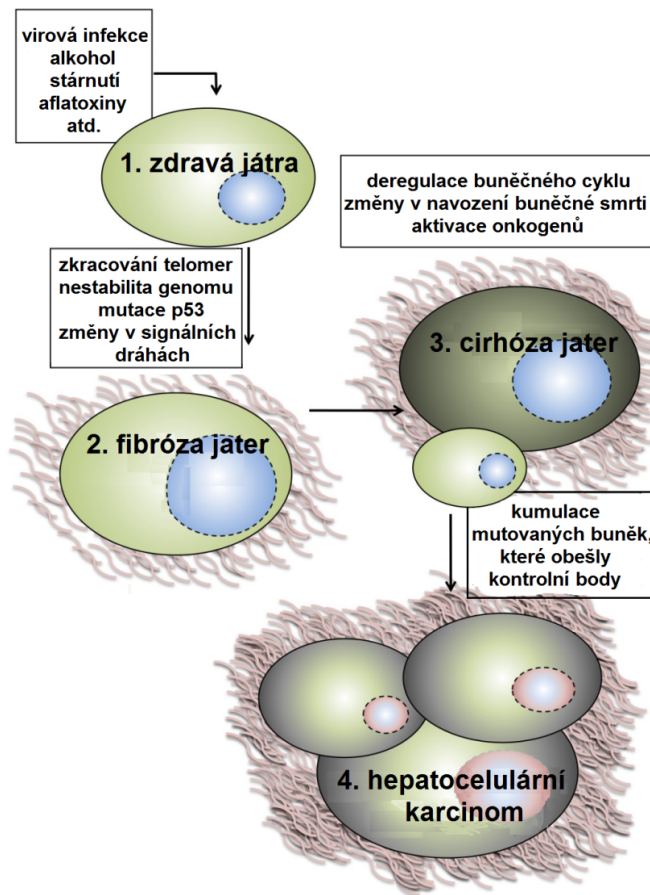
Roli při rozvoji rakoviny hraje jak věk, pohlaví a etnikum lidí, tak především prodělání virového onemocnění, užívání léků, kouření a alkoholismus (McGlynn a London, 2005). Dalším rizikovým faktorem vzniku HCC může být působení aflatoxinů, což jsou toxiny produkované houbami rodu *Aspergillus* (El-Serag, 2011). Ve vyspělých zemích světa se HCC často objevuje u pacientů trpících cirhózou jater a jaterní steatózou. Ovšem největší incidence choroby je zaznamenána v oblastech východní Asie a na africkém kontinentě, vzhledem k častému výskytu virových hepatitid, především HBV, HCV. Konkrétně u žloutenky typu B dochází k začlenění virové DNA do intronové oblasti genu pro cyklin A, což zapříčiní deregulaci buněčného cyklu a je zahájena tumorogeneze (Venook a kol., 2010).

Obecně všechny výše popsané rizikové faktory mohou u HCC způsobit chybnou regulaci buněčného cyklu, čímž dojde k neustálému dělení buněk, které se nemohou zastavit v kontrolních bodech, kde by případně mohlo dojít k jejich opravě. Dále často není možné navodit apoptózu a také mají tyto deregulace přímý vliv na invazivitu tumoru a schopnost metastázovat (Bisteau a kol., 2014).

U lidí s časným stádiem hepatocelulárního karcinomu nedochází k žádnému výraznému projevu při této nemoci, proto její diagnóza bývá určena až v pozdějších stádiích vývoje rakoviny a je obtížné najít účinnou formu léčby. Pacienti často k lékaři přichází s nespecifickými obtížemi, jako je větší váhový úbytek, bolesti v břišní oblasti, přetrvávající nechutenství, zvracení, průjem, případně je jejich kůže a sliznice zažloutlá a moč má nahnědlou barvu (Kaiser a kol., 2014).

3.1 Vznik a vývoj HCC

Hepatokarcinogeneze je vícestupňový proces, zapříčiněný genetickými změnami v signalizačních kaskádách, který se projevuje nekontrolovaným růstem hepatocytů. Tento proces je závislý na několika různých faktorech, které byly popsány v předchozí kapitole. U HCC dochází k opakování několika cyklů při vývoji hepatocytů. Zdravý hepatocyt může být poškozen a poté buď zaniká, anebo se zregeneruje, což vede k akumulaci kolagenu v játrech, a tím ke vzniku fibrotických jater. Po delší době může dojít k vyvolání jaterní cirhózy a k vytvoření dysplastických uzlin, čímž se jaterní tkáň dostává do tzv. pre-maligního stádia rakoviny (Uehara a kol., 2013). Tyto uzliny se mohou později vyvinout v hepatocelulární karcinom, který napadá okolní jaterní tkáň a může přejít do maligního stádia, jak je znázorněno na **obr. 4** (Borzio a kol., 1995). Při přechodu z pre-maligního stádia do maligního dochází ke ztrátě kontrolního bodu v buněčném cyklu, je aktivována telomerasa a také je zvýšená aktivita telomerasové reverzibilní transkriptasy (TERT), čímž si hepatocyt zajišťuje neomezenou proliferaci (El-Serag a Rudolph, 2007).



Obr. 4: Vznik a vývoj tumoru (převzato a upraveno podle Bisteau a kol., 2014).

3.2 Deregulace v molekulárních dráhách u HCC

Transkripční analýzy nádoru jater odhalily některé změny v molekulárních cestách během vývoje rakoviny, které se účastní procesu proliferace buněk, apoptózy, regulace buněčného cyklu, angiogeneze, buněčné signalizace, metabolismu a imunitní odpovědi (Hanahan a Weinberg, 2011).

Aktivace dráhy Wnt je nejčastější pozorovanou změnou u HCC vyvolanou viry HBV a HCV (Nishida a Goel, 2011). V nepřítomnosti ligandu Wnt, který ve zdravé tkáni reguluje aktivaci a deaktivaci Wnt dráhy, se fosforyluje a degraduje β -catenin komplexem (GSK3, CK1- α , APC a Axin). Vazba ligandu Wnt na Fzd receptory se objevuje po fosforylační kaskádě, která vede k akumulaci β -catenin v cytoplazmě. Následně je β -

catenin translokován do jádra a iniciuje transkripci cílových genů, jako je gen pro cyklin D1 (Pez a kol., 2013).

Další důležitou dráhou v problematice HCC je c-Myc, která bývá deregulována u pacientů užívající alkohol a také u pacientů, kteří v minulosti prodělali virové hepatitidy (Schlaeger a kol., 2008). Trvalá aktivace c-Myc může způsobit hepatokarcinogenezi, protože má za úkol regulovat spoustu procesů v buňce jakými jsou biosyntéza a metabolismus sacharidů, lipidů a aminokyselin a také regulace buněčného cyklu (Lin a kol., 2010).

Často deregulovaným protoonkogenem je c-Met dráha, která je u HCC také trvale aktivována. Bývá stimulována hepatocytárním růstovým faktorem (HGF) a ovlivňuje několik důležitých kaskád (PI3K, Stat, Ras/Erk). Tyto dráhy zodpovídají za přežívání a proliferaci buněk, a také přidělují nádorovým buňkám schopnost invazivity do okolí (Breuhahn a kol., 2006).

U mnoha typů HCC je abnormálně exprimován retinoblastomový protein (Rb). Často dochází k úplnému potlačení jeho exprese díky tzv. ztrátě heterozygotnosti (Nakamura a kol., 1991). Hladina Rb proteinu může být změněna i nepřímo, a to deregulací komplexů, které ho aktivují nebo inhibují. U HCC jsou známy zvýšené hladiny HGF, c-Met, Ras nebo BRAF, které ovlivňují MAPK kinasu a dále zvyšují aktivitu c-Fos. Protoonkogen c-Fos poté zajišťuje fosforylaci Rb a exprimuje gen pro cyklin D1 (Parekh a Rao, 2007). Podle nejrůznějších studií byla prokázána souvislost se zvýšenou hladinou cyklinu D1 a se špatnou diferenciací a zvýšenou agresivitou hepatocelulárního karcinomu (Joo a kol., 2001). Zvýšená hladina cyklinu D1 se také podílí na chromozomálních abnormalitách, na změnách modifikace mitotického vřeténka a na znásobování počtu centrozomů (Nelsen a kol., 2005).

Problém vzniku HCC může obecně nastat v okamžiku hypermetylace v okolí promotorů důležitých genů, díky čemuž nedochází k jejich expresi. Může dojít také k delecím nebo k jiným mutacím, které způsobují nefunkčnost např. p16, který nemůže vytvořit komplex s CDK2 (Biden a kol., 1997). V posledních letech bylo také prokázáno, že HBV virus způsobuje hypermetylacii promotorů u HCC, čímž vyvolává tumorigenezi (Zhu a kol., 2010). Virus HCV naopak způsobuje změnu v kaskádě Rb proteinu a způsobuje tak degradaci retinoblastomového proteinu a také bylo zjištěno,

že podporuje expresi p28^{gankyrinu}. Tento protein se podílí na proliferaci, angiogenezi, apoptóze, invazi nádoru a schopnosti tvořit metastáze a při interakci s ubikvitin ligasou MDM-2 způsobuje ubikvitinylaci proteinu Rb a p53 (Dawson a kol., 2006).

Gen pro ZHX2 je u více než tří čtvrtin pacientů s HCC deregulován taktéž kvůli hypermetylací promotoru. Tento komplex ve zdravé tkáni negativně reguluje hladinu cyklinů A a E a tím je udržuje v rovnováze a zajišťuje správný chod buněčného cyklu. Pokud je snížena jeho hladina, dochází k rapidnímu zvýšení hladin cyklinů a k proliferaci buněk (Yue a kol., 2012). Deregulace exprese cyklinů E a A může také způsobit genomovou nestabilitu. Navíc bylo prokázáno, že tyto cykliny, pokud jsou exprimovány nadměrně, indukují štěpení dvouřetězcové DNA v savčích buňkách. Správná časovaná regulace aktivit cyklinů E a A je kritická, protože předčasná exprese cyklinu A vede k poškození replikace DNA (Wheeler a kol., 2008).

3.2.1 Deregulace komplexu CDK/cyklin u HCC

Na řízení buněčného cyklu se přímo podílí cyklin-dependentní kinasy, jejichž hladiny u HCC bývají výrazně pozměněny oproti normálu. Hlavní rozdíly byly zjištěny v hladinách CDK1, CDK2, CDK4, což jsou kinasy, které pozitivně ovlivňují proliferaci nádorových buněk (Masaki a kol., 2003). Ve zdravých játrech dospělého člověka je málo dělících se buněk a tedy exprese CDK1 je velmi nízká oproti játrům s HCC, kde rakovinné buňky rychle a nekontrolovatelně proliferují a hladina CDK1 je vysoká (Bisteau a kol., 2014). Zvýšená hladina byla také zaznamenána u CDK5, CDK13 a CDK14, které se přímo podílí na progresi nádoru, kdy indukce genu pro CDK5 také způsobuje nekontrolovatelnou proliferaci hepatocytů a způsobuje progresi hepatocelulárního nádoru (Ehrlich a kol., 2015). Zvýšená exprese CDK13 naopak ovlivňuje růst nádoru v rané fázi jeho vzniku, čímž podporuje jeho další vývoj a také má vliv na migraci buněk (Kim a kol., 2012). Enzym CDK14 se poté uplatňuje v pozdější fázi nádorového bujení a pozitivně ovlivňuje především schopnost šířit se do okolních tkání a schopnost metastázování, a to skrze fosforylací transgelinu 2, díky čemuž dochází k polymeraci aktinu a tedy ke zvýšené migraci nádorových buněk (Leung

a kol., 2011). U všech zmíněných enzymů byly zaznamenány zvýšené hladiny v nádorové tkáni oproti té zdravé. Opačným případem je však pokles hladiny CDK10 v jaterním karcinomu. Cyklin-dependentní kinasa 10 přispívá také k proliferaci buněk a dále se podílí na chemorezistenci nádoru vůči chemoterapeutické léčbě (Zhong a kol., 2012). U hepatocelulárního karcinomu byla také v některých případech zaznamenána zvýšená hladina transkripční kinasy CDK7. U pacientů s vyšší expresí CDK7 byla celková doba dožití menší, než u pacientů s nízkou expresí CDK7 (Wang a kol., 2018).

Jak bylo v dřívější kapitole o kinasach zmíněno, cyklin-dependentní kinasy jsou regulovány pomocí malých podjednotek, kterými jsou cykliny. Tyto podjednotky jsou také v nádorové tkáni deregulovány, a to všechny druhy (A, B, D a E), které se podílí na regulaci buněčného cyklu. Vlivem amplifikace genů kódujících tyto cykliny, dochází k trvalému zvýšení jejich hladin v hepatocytech, a tím je zaručena nekontrolovaná proliferace buněk (Bisteau a kol., 2014).

Díky těmto poznatkům jsou vkládány velké naděje do studia buněčného cyklu a jednotlivých kinas, kvůli značnému potenciálu v léčbě různých typů rakoviny včetně HCC. Příkladem může být specifická inhibice CDK1, která brání dělení buněk bez znemožnění regenerace nebo normální funkce jater. Dřívějšími experimenty bylo prokázáno, že při testování inhibitoru CDK1 *in vivo* na myších, které měly mutaci v genu pro CDK1, nedocházelo k rozvoji rakoviny jater vyvolané aktivitou Ras nebo ztrátou proteinu p53 (Diril a kol., 2012). To z CDK1 činí potencionální terapeutický cíl při léčbě HCC. Jiné kinasy by mohly být také vhodným terapeutickým terčem, např. inhibicí CDK4/6 lze potlačit nekontrolovatelnou proliferaci rakovinných buněk. Dále inhibitory CDK2, jako jsou roskovitín nebo jeho druhá generace CR-8, by mohly být použity u nádorů vykazujících nadměrnou expresi cyklinu E, se změnami v pRb dráze a s intaktním p53, způsobující také nekontrolovatelný růst hepatocytů (Rivadeneira a kol., 2010).

Problémem při léčbě rakoviny pomocí inhibitorů kinas však může být schopnost hepatocytů vstoupit do klidové fáze, nedělit se a být polyploidní. Takové hepatocyty mohou vytvořit „spící“ skupinu karcinogenních buněk,

keré by pro pacienta do budoucná znamenaly recidivu onemocnění. Řešením by v tomhle případě mohla být kombinace inhibitorů kinas s běžně užívanými chemoterapeutiky nebo s radioizotopy, které ovlivňují i buňky v klidové fázi (Gentric a kol., 2012).

3.3 Možnosti léčby HCC

V dnešní době je léčba pokročilého HCC směřována především k systémové terapii pacientů a vývoj chemoterapeutických léčiv je zaměřen na jednotlivé dráhy signalizačních kaskád a na jejich deregulované oblasti. Zacílením na tyto molekulární dráhy, které ovlivňují především růst a vývoj rakovinných buněk, by mohlo pro pacienty přinést lepší výsledky, než jaké vykazuje nynější běžná léčba (Raza a Sood, 2014). Je potřeba však ke každému pacientovi přistupovat individuálně, vzhledem k jeho stavu a rozsahu nádoru, takže pro všechny není vhodná každá metoda léčby.

Důležitou součástí při rozhodování se o léčbě, je řada prognostických faktorů. Ze séra lze neinvazivní metodou stanovit hladinu tumorového markeru, a to α -1 fetoproteinu (AFP), jehož zvýšená hladina často koreluje se stádiem tumoru. Dalším prognostickým faktorem je velikost tumoru a stádium fibrózy jaterní tkáně. Pro zjištění více informací a pro prognózu je nutné provést biopsii tkáně a CT, které nám dávají povědomí o příp. vaskulární invazi, multiplicitě nádoru, anebo gradingu tumoru. Dále je důležité zhodnotit základní morfologické charakteristiky nádoru pomocí tzv. TNM klasifikace (**tab. 1**) a také stav jaterního parenchymu dle Child-Pugha v **tab. 2** (Sobin a kol., 2010).

Tab. 1: TNM klasifikace u hepatocelulárního karcinomu, 7. vydání.

stádium	primární nádor	regionální mízní uzliny	vzdálené metastázy
stádium I	T1	N0	M0
stádium II	T2	N0	M0
stádium IIIA	T3a	N0	M0

stádium IIIB	T3b	N0	M0
stádium IIIC	T4	N0	M0
stádium IVA	jakékoliv T	N1	M0
stádium IVB	jakékoliv T	jakékoliv N	M1

T1 -solitární nádor bez cévní invaze, T2 - solitární nádor s invazí do cév nebo vícečetné nádory do 5 cm, T3a - vícečetné nádory větší než 5 cm, T3b - vícečetné nádory zasahující hlavní větve porty či jaterní žíly, T4 - nádory invadující do okolních orgánů (kromě žlučníku) nebo nádory s prorůstáním do viscerálního peritonea; Reference k tab. 1: Sobin a kol., 2010.

Tab. 2: Child-Pughova klasifikace pokročilosti jaterní cirhózy.

body	1	2	3
bilirubin (μmol/l)	<35	35 - 50	>50
albumin (g/l)	>35	28 - 35	<28
ascites	0	reverzibilní	ireverzibilní
encefalopatie	0	mírná	Zřetelná
INR	<1,7	1,71 - 2,20	>2,20

INR je mezinárodní normalizovaný poměr, který se vypočítá z poměru protrombinového času u pacienta s kontrolním protrombinovým časem. Zhodnocení Ch.-P. klasifikace: třída A (5-6 bodů), třída B (7-9 bodů), třída C (10-15 bodů); Reference k tab. 2: Bruha a kol., 2012.

Dalším důležitým kritériem, při výběru nejideálnější léčby pro pacienta s jaterním karcinomem a s cirhózou, je staging tumoru, který blíže popisuje tzv. barcelonská klasifikace (**tab. 3**). Tato klasifikace je v dnešní době nejpoužívanější, protože popisuje nejnovější trendy a průlomky v léčbě HCC (Bruix, 2011).

Tab. 3: Barcelonská klasifikace (staging) pacientů s HCC a jaterní cirhózou.

stádium HCC	charakteristika nádoru
stádium 0 - velmi časně	(Child-Pugh A, 1 ložisko do 2 cm, PST 0)
stádium A - časně	(Ch.-P. A/B, 1 - 3 ložiska do 3 cm, PST 0)

stádium B - středně pokročilé	(Ch.-P. A/B, vícečetná ložiska, PST 0)
stádium C - pokročilé	(Ch.-P. A/B, invaze do porty, N1, M1, PST 1, 2)
stádium D - terminální	(Ch.-P. C, PST>2)

PST - celkový stav nemocného (0 - dobrý, 1, 2 - zhoršený, >2 výrazně zhoršený), N - regionální mizní uzliny, M - vzdálené metastázy; Reference k tab. 3: Brůha a kol., 2012.

3.3.1 Chirurgická léčba

Chirurgické metody léčby HCC, mezi které se řadí resekce a ortotopická transplantace jater, zaznamenávají nejlepší výsledky a pacienti po jejich provedení mají vůbec největší naději na přežití. V dnešní době jsou tyto metody brány jako jediná potenciálně kurativní metoda. Avšak méně než 30 - 40 % pacientů je pouze možno léčit tímto způsobem, a to z důvodu pozdní diagnózy nemoci. Kvůli tomu je léčba hepatocelulárního karcinomu velmi obtížná (Taniguchi, 2012).

Transplantace jater je doporučována pouze pacientům s HCC při splnění určitých podmínek, tzv. „milánských kritérií“ a ta jsou splněna pouze v případě, že se v těle vyskytuje jedno karcinogenní ložisko do průměru 5 cm, nebo 3 karcinomy do velikosti 3 cm. Dále nesmí být zasažena žádná lymfatická uzlina a rakovinné buňky nesmí přijít do styku s krevním řečištěm (Mazzaferro a kol., 2011). Druhou možností je posuzování nádoru dle „san-franciských kritérií“, kdy se k transplantaci jater může přistoupit, pokud má pacient 1 nádor do velikosti 6,5 cm, anebo 2 - 3 nádory do celkové velikosti 8 cm, kdy největší z nich musí mít maximálně 4,5 cm v průměru. V takových případech je pacient zařazen do transplantačního programu a čeká na vhodného dárce (Yao a kol., 2008). Transplantace má pro pacienta nejen pozitivní vliv při léčbě HCC, ale zároveň jsou tímto odstraněny i další jaterní onemocnění, jako cirhóza a steatóza jater. Proto bývá doporučována pro pacienty se sníženou jaterní funkcí (Child-Pughova klasifikace B/C). Při provedení transplantace u pacientů s HCC je dosaženo 75% pravděpodobnosti přežití pacientů

po následujících 5 let od transplantace, s tím, že u 15 % z nich, dojde k recidivě rakovinného bujení (Mazzaferro a kol., 2011).

Další variantou chirurgické léčby je vyoperování nádoru, tedy resekce jater. Opět i tato varianta léčby má určité podmínky pro pacienty. Je doporučována pouze pacientům v časném stádiu onemocnění, s jedním solidním nádorem, bez snížené funkce jater (Child-Pughova klasifikace A) a bez jaterní cirhózy (Bhoori a kol., 2007). Pro pacienty nesplňující tato kritéria je resekce jater velmi nebezpečná kvůli jaterní nedostatečnosti. Výsledky operativního odstranění HCC se odvíjí především od velikosti odebrané jaterní tkáně, od funkce zbylé části jater a od zvýšeného tlaku v jaterní žíle. Hypertenze v portě může způsobovat pacientům komplikace v podobě jícnových varixů a splenomegalie (Ruzzenente a kol., 2011).

Po radikální resekcí přežívá 5 let 30 - 50 % pacientů s hepatocelulárním karcinomem, s tím, že k recidivě onemocnění dochází do 5 let až u 70% z nich (Wong a Lo, 2013).

3.3.2 Transarteriální chemoembolizace (TACE)

Principem TACE je obstrukce vyživujících tepen v okolí nádoru a blokáce porty, kvůli zvýšení koncentrace používaných chemoterapeutik v krevním řečišti. Tato metoda je vhodná pro pacienty s neoperovatelným karcinomem a s jaterní cirhózou, kdy ledviny musí být zcela zdravé a nesmí být ucpaná portální žíla. Pokud je omezena funkce jater a sérová hladina bilirubinu je vyšší než 3 mg/dl, pacienti bývají často vyřazováni z léčebné TACE skupiny (Golfieri a kol., 2011).

TACE lze provádět dvěma způsoby. Buď je chemoterapeutikum smícháno s jodizovaným olejem a tato emulze je vpravena do cévního zásobení v okolí nádoru, nebo je chemoterapeutikum navázáno na nosič, kterým bývají nejčastěji částice želatiny, polyvinylalkoholu nebo mikrosféry a také jsou umístěny do krevního řečiště (Matsui a kol., 1993).

V ideálním případě by touto metodou měla být udržena konstantní hladina chemoterapeutika v blízkém místě nádoru, s minimálním systémovým ovlivněním organismu, čehož nebylo v dnešní době ještě

dosaženo. Proto je důležité provést sérii studií na pacientech s různým stádiem nemoci a optimalizovat metodu i z hlediska užívaných chemoterapeutik (nebo jejich kombinací).

Nejblíže stanoveným cílům je v dnešní době varianta chemoterapeutik navázaných na hydrogel, jejichž výhodou je postupné dlouhodobé uvolňování léčiva v místě ložiska. Konkrétně byla tato varianta studována na doxorubicinu ve formě hydrochloridu, který byl kontinuálně uvolňován z roztoku do cévního zásobení nádoru. Tímto bylo sníženo množství použitého léčiva a především snížení celkové koncentrace v systému (Song a kol., 2012).

3.3.3 Subkutánní alkoholizace

Další metodou, která je v praxi využívána, je lokální subkutánní alkoholizace nádorového ložiska (PEI), která je založena na injekční aplikaci 96% ethanolu do místa nádoru. Výsledkem je téměř 100% nekróza ošetřené tkáně. Tato metoda je aplikována pacientům s více nádory o velikosti do 3 cm v průměru. Bývá často doporučována pacientům, kteří jsou zařazeni do seznamu čekatelů na transplantaci jater, pro udržení stavu a velikosti nádoru a splnění tzv. „milánských kritérií“. Tato metoda bývá aplikována v kombinaci s metodou TACE (Cho a kol., 2009).

3.3.4 Kryoterapie a radiofrekvenční ablace (RFA)

Významnými dvěma metodami, využívající zavedení sondy do tumoru a následnou změnu teploty v oblasti nádoru jsou kryoterapie a radiofrekvenční ablace (RFA). U kryoterapie je do místa ložiska vpravena sonda s tekutým dusíkem, která zapříčiní zmražení buněk a jejich nekrózu. Takhle metoda je prováděna pouze u nádorů do velikosti 3 cm v průměru. Naopak podstatou RFA je zvýšení teploty v místě tumoru díky zavedené radiofrekvenční sondě. Princip RFA spočívá v tom, že se mezi elektrodami vytvoří vysokonapěťový střídavý proud (400 MHz), který se přemění na teplo vyšší než 90 °C. Díky tomu je odpařena intracelulární tekutina a opět dochází k nekróze tkáně, jako u předchozí metody. Rozdílem oproti první

zmíněné metodě je možnost aplikace léčby i u větších nádorů, standardně do velikosti cca 5 cm, může se však použít i u větších ložisek. Rozsah nekrózy postižené tkáně se odvíjí především od stavby, velikosti a umístění elektrod (Delis a kol., 2006).

RFA bývá často používána jako doplňující metoda po jaterní resekci u nádorů, které byly zhodnoceny jako neoperatibilní. Rozdílem kryoterapie oproti RFA je vyšší pravděpodobnost recidivy nádoru při použití první zmíněné metody, více komplikací spojených s aplikací a s průběhem léčby a celkové nižší přežití pacientů. Obecně se jedná o metody, které v dnešní době zaznamenaly velký rozvoj. Jedna sonda je schopna způsobit nekrózu tkáně do průměru cca 3 cm, kdy ve 2 cm dochází k úplné ablacii tkáně a v okolí 0,5 - 1 cm z každé strany jsou vytvořeny okraje, kde je nádor zlikvidován. Díky tomuto je dosaženo podobných výsledků jako v případě chirurgické resekce. Podle patientských studií byla tato metoda nejúčinnější v případě pacientů s tumory do 2 cm v průměru, kdy míra přežití v následujících 5 letech byla 90 % a míra recidivy 1 % (Livraghi a kol., 2008).

Do budoucna se uvažuje o upřednostnění RFA nad resekci jater, a to především z důvodu menší finanční zátěže a lepšímu pooperačnímu zotavování a kratší době, kterou musí pacient strávit v nemocničním zařízení. Bohužel se v dnešní době ještě k této metodě nemůže plně přistoupit jako k první volbě, kvůli nedostatečným studiím na pacientech i s pokročilým nálezem HCC. Uvažuje se také o možné kombinaci s metodou TACE, kdy v prvních provedených testech byly prokázány lepší výsledky, než v případě samotného RFA (Morimoto a kol., 2010).

3.3.5 Terapie založená na fyzikálním záření (LITT, PMCT)

V Asii je pro léčbu HCC nově používaná laserová terapie (LITT), která je založena na absorpci infračerveného záření postiženou tkání. Záření je do tumoru přenášeno pomocí tenkých optických vláken. Podobná je pak metoda, která také využívá léčebné vlastnosti fyzikálního záření, a tou je perkutánní mikrovlnná koagulační terapie (PMCT). Výsledkem u obou těchto metod je nekróza postižené tkáně.

Po srovnání těchto metod s metodou RFA byly zaznamenány obdobné terapeutické výsledky, komplikace i míra recidivy. Nevýhodou LITT a PMCT je však potřeba vícekrát metodu aplikovat na pacienta, kdy je po ozáření zasažena menší plocha nádorové tkáně (Shibata a kol., 2002).

V klinické praxi se k těmto metodám zatím moc nepřistupuje jako k první volbě, jelikož je stále upřednostňována spíše resekce jater. Tyto metody jsou doporučovány pro pacienty s jedním ložiskem do 5 cm, nebo s více ložisky do velikosti 3 cm. V případě nádoru do 3 cm, studie ukázala účinnost léčby až u 80 % případů (Sala a kol., 2004).

3.3.6 Radioembolizace

V minulosti byla využívána radioterapie v akutních případech, ale později, kvůli špatné toleranci jater, od ní bylo upuštěno. Dnes se však opět zařadila do běžného lékařského postupu při léčbě pacientů s pokročilým HCC. Lze provádět jak zevní radioterapii, tak vnitřní. Zevní využívá buď protonového záření, nebo lineárního urychlovače a vnitřní radioterapie funguje na principu radioembolizace (Golfieri a kol., 2013).

U radioembolizace je do místa nádoru aplikován radionuklid na nosiči, nejčastěji yttrium⁹⁰-mikrosféra, nebo jód¹³¹-lipiodol, příp. rhenium¹⁸⁸-lipiodol. Rozdílem, oproti TACE na nosičích, je velikost aplikovaných částic. U metody TACE je velikost částic 100 - 500 μm , zatímco u radioembolizace je velikost částic obvykle menší než 35 μm . Mikročástice jsou poté dopraveny cévním zásobením nádoru do jeho centra, kde dochází k vyzařování radionuklidu, který likviduje nádorové buňky. Dalším rozdílem oproti TACE je, že u TACE dochází k ischemii nádoru a jeho blízkého okolí, včetně zdravé jaterní tkáně, zatímco při radioembolizaci k ischemii nedochází (Mazzaferro a kol., 2013).

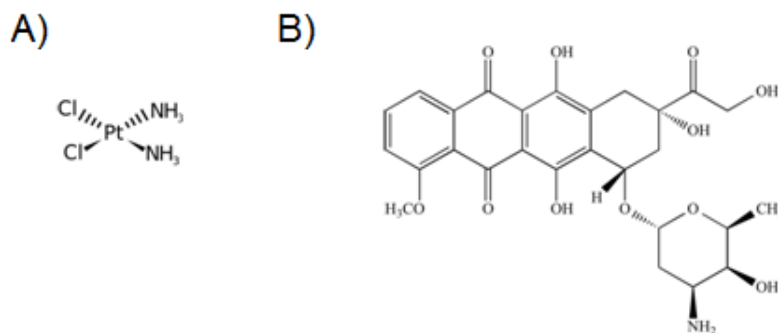
Dalším důležitým aspektem této metody je využitelnost u HCC ve středně pokročilém stádiu, kdy je diagnostikován větší počet nádorových ložisek menšího vzrůstu i se zasažením uzlin a tudíž není možné provést chirurgický zákrok. Tím, že jsou částice s radionuklidem drobné a putují cévním řečištěm, nezáleží na tom, kolik jednotlivých ložisek se v játrech nachází a dojde k zasažení všech. Co se týká bezpečnosti radionuklidů,

momentálně probíhá dokumentace bezpečnosti u radionuklidu yttrium⁹⁰ v I. a II. fázi klinického testování.

Podle nejnovějších studií je míra přežití u pacientů léčených touto metodou závislá na funkci jater a na stádiu rakoviny při její diagnóze. Dále bylo zjištěno, že je míra přežití ovlivněna trombózou portální žíly. Tyto výsledky byly však prováděny pouze orientačně a na malé skupině pacientů, takže pro přesnější statistické údaje bude potřeba zajistit větší a variabilnější skupinu pacientů s HCC léčených touto metodou (Salem a kol., 2010).

3.3.7 Systémová chemoterapie

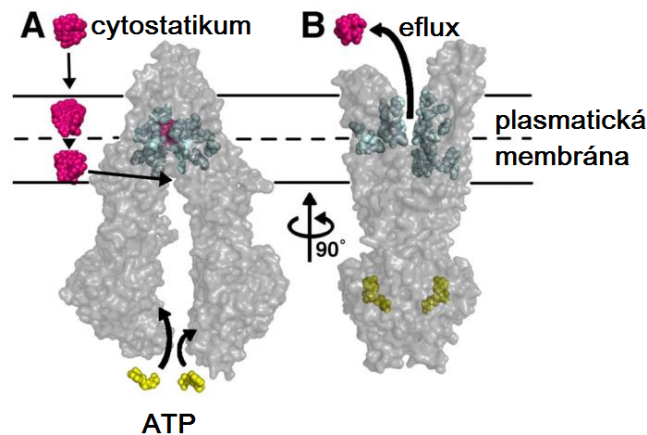
Další možností léčby, používanou výhradně u pacientů s pokročilým nálezem HCC a s metastázemi je systémová chemoterapie. Často se užívá v kombinaci s transarteriální chemoembolizací (TACE), která je popsána výše. Díky spojení těchto dvou metod se zvyšuje koncentrace použitého chemoterapeutika přímo v místě ložiska. Typickými chemoterapeutiky, používanými při léčbě HCC je např. cisplatina (**obr. 5A**), adriamycin, mitomycin A, doxorubicin (**obr. 5B**), 5-fluorouracil, etoposid a další. I přesto, že byla použita nejrůznější cytostatika a jejich kombinace, nebyl prozatím zaznamenán příliš pozitivní efekt při léčbě HCC, oproti chirurgickým metodám (Raza a Sood, 2014).



Obr. 5: Chemická struktura cisplatiny (A) a doxorubicinu (B).

Hlavním problémem používání chemoterapeutik v léčbě HCC je zvýšená pravděpodobnost metabolismu léčiv v játrech, dřív než se dostanou

k ložisku nádoru a také zvýšená exprese genů zapříčiňující rezistenci k běžně používaným léčivům (Fukuda a kol., 2010). Dalším problémem, jak bylo zjištěno v případě doxorubicinu, je zvýšená exprese ABC transportérů (ATP-binding cassette), které zajišťují transport léčiva ven z hepatocytu a tedy menší akumulaci látky v jaterních buňkách (**obr. 6**). Za tento děj zodpovídá zvýšení exprese jednoho z členů ABC transportérů, a to MDR1, který kóduje P-glykoprotein, což je transmembránový protein, fungující jako pumpa.



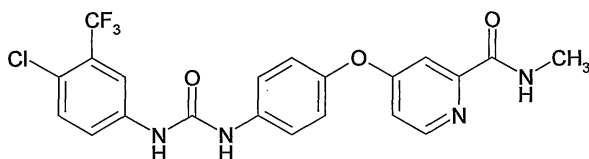
Obr. 6: Stavba P-glykoproteinu, kde žlutě je označeno ATP, růžově cytostatikum. První část obrázku (A) znázorňuje navázání cytostatika a druhá část (B) znázorňuje navázání ATP do ATP vazebné domény a následnou změnu konformace proteinu, která zapříčiní transport léčiva ven z buňky (převzato a upraveno podle Aller a kol., 2009).

Obecným cílem chemoterapeutik jsou rychle se dělící buňky, bez ohledu na to, zda jsou zdravé, nebo rakovinné. Jedná se tedy o nespecifický účinek těchto léčiv, což je v praxi velkou nevýhodou. Typickým projevem u pacientů léčených touto metodou bývá vypadávání vlasů, nechutenství, zvracení a další zažívací problémy, dále pak oslabení imunity, únava, chudokrevnost atd. (Registr HCC, ©2005-2017).

3.3.8 Cílená systémová terapie- molekulární cíle

Jak už bylo zmíněno, hepatokarcinogeneze je proces, kdy dochází k nekontrolovatelnému růstu hepatocytů vlivem deregulace signalizačních kaskád. Patogeneze nádoru jater souvisí mimo jiné také se zvýšenou expresí vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF), epidermálního růstového faktoru (PDGF), Ras mitogenu aktivovaným protein kinasou (MAPK), růstového faktoru insulinového receptoru, hepatocytárního růstového faktoru c-Met, PI3K, PTEN/Akt a také Wnt/ β -cateninových drah. Cílená systémová terapie právě využívá při léčbě HCC chemoterapeutika, která blokují tyto molekulární cíle (Breuhahn a kol., 2006; Chiang a kol., 2008).

V současné době je hojně používané chemoterapeutikum při nálezu pokročilého stádia HCC sorafenib, který funguje jako multikinasový inhibitor receptorových tyrosinových kinas ovlivňujících růst a vývoj nádoru (**obr. 7**).



Obr. 7: Chemická struktura sorafenibu.

Známa je jeho inhibice receptorů VEGFR a PDGFR, čímž blokuje novou tvorbu cévního zásobení v místě nádoru, tzv. angiogenezi. Angiogeneze zajišťuje nádoru neustálý přísun energeticky bohatých látek a také má za následek rychlejší invazi nádoru do okolních tkání. Dalším molekulárním cílem sorafenibu je Raf kinasa, která po inhibici blokuje signální dráhu MEK/Erk a tím dochází ke snížení hladiny cyklinu D, jehož nedostatečné množství přispívá k zabránění další proliferace buňky. V neposlední řadě také inhibuje apoptotické proteiny Mcl-1 a survivin a navozuje tak smrt buňky (Cervello a kol., 2012).

Na sorafenibu byly prováděny rozsáhlé studie SHARP (Study of Heart and Renal Protection) ve III. fázi klinického testování, které zahrnovaly jak skupinu pacientů léčených sorafenibem, tak placebo skupinu. V průměru

bylo přežití pacientů léčených sorafenibem o 2,5 - 3 měsíce delší, než v případě placebo skupiny. Obecně je toto léčivo dobře pacienty tolerováno, vyskytovaly se však občasné nežádoucí účinky, jako jsou žaludeční nevolnosti, průjem, kožní vyrážky (Llovet a kol., 2008).

Do klinického testování se dostaly i další látky, které byly v průběhu testů z různých důvodů vyloučeny, nebo ještě čekají na další testování, než budou schváleny. Jedním z příkladů je multikinasový blokátor sunitinib, který cílí na VEGF a PDGF dráhy. Byl však ve III. fázi klinických testů vyloučen, kvůli častým vedlejším účinkům (Cheng a kol., 2011). Na stejné růstové faktory se zaměřuje další léčivo, a to linifanib, jehož bezpečnostní profil je přijatelný, takže se může přejít ke III. fázi testování (Toh a kol., 2013). Dalším testovaným léčivem je brivanib, který byl v konečném výsledku také vyřazen z klinických studií po neúspěšné III. fázi, a to z důvodu velkého množství nežádoucích účinků a také se ukázalo, že délka přežití pacientů nebyla statisticky významná oproti neléčené skupině. Cílem byla opět dráha VEGF a také fibroblastový růstový faktor (Park a kol., 2011). Do III. fáze klinického testování se dostal i tivantinib, u kterého je potřeba pořádně posoudit jeho účinek a jeho případné nežádoucí účinky. Tato látka inhibuje receptorovou kinasu Met a je testována u pacientů s pokročilým nálezem HCC, kde není možné chirurgicky zasáhnout (Santoro a kol., 2013).

Pokud pacienti špatně odpovídají na léčbu sorafenibem, je možné zvolit léčbu everolimem, který se zaměřuje na molekulární dráhu mTOR. Míra přežití pacientů v I. a II. fázi klinických testů byla stanovena na 8,5 měsíců. Momentálně probíhá studie EVOLVE-1 (Everolimus for Liver Cancer Evaluation 1) ve III. fázi klinických testů, která se především zaměřuje na pacienty s neresekovatelným pokročilým karcinomem a se špatnou odezvou na léčbu sorafenibem (Zhu a kol., 2011).

3.3.8.1 Inhibitory CDKs v modelu HCC

V roce 2010 proběhla studie nového inhibitoru CDKs xylocidinu (**obr. 8A**), na buněčné linii odvozené od hepatocelulárního karcinomu. Výsledky ukázaly, že látka nevykazuje zcela specifický účinek na jednu kinasu, ale cílí na mnoho z nich. U CDK1 a CDK2 byla aktivita snížena a buněčný cyklus byl

inhibován už při koncentraci 50 μM (Cho a kol., 2010). Dále byla snížena hladina u RNAPol. II fosforylované v S2 i S5 místě, což je typickým projevem inhibice CDK7/9. Po expozici xylocidinem došlo k navození apoptotického stavu u HCC buněk. Průkazem apoptózy bylo stanovení změn v hladinách apoptotických a anti-apoptotických proteinů jako jsou survivin, XIAP, Bcl-2, které byly značně sníženy a naopak hladiny p53 a Bax byly na základě této skutečnosti zvýšeny. Při těchto výsledcích byl xylocidin dále testován na myších a účinky byly podobné jako v buněčných experimentech. Převážně došlo k navození apoptózy u napadených buněk, s tím, že nebyla prokázána toxicita u zdravé tkáně (Cho a kol., 2010).

V návaznosti na tento inhibitor, stejná skupina vědců přišla s novou látkou, kterou je ibulocydin (**obr. 8B**). Ibulocydin zasahuje CDK7, CDK9, Mat1 a cykliny H a T. Inhibice růstu HCC buněk byla mnohem větší, než v případě známých inhibitorů (olomoucín, roskovitin). Naopak nebyly zaznamenány žádné toxické účinky na růst zdravých hepatocytů. Inhibicí CDK7/9 je zamezena fosforylace velké podjednotky RNA polymerasy II v S2 a S5 místě, což bylo prokázáno imunoblottingem. Hladina fosforylovaných forem RNAPol. II v S2 a v S5 místě postupně klesala od koncentrace ibulocydinu 1 $\mu\text{mol/l}$. Podobně jako u xylocidinu byly detekovány snížené hladiny Mcl-1, survivinu a XIAP, což je typickým příznakem navození apoptotického stavu (Cho a kol., 2011).

V roce 2015 vyšla studie od Shi a kol., která popisuje inhibiční účinky už známého léčiva fluspirilenu (**obr. 8C**). Tato látka se běžně užívá k léčbě schizofrenie a nyní by se mohla uplatnit také v případě léčby HCC. Testy byly prozatím provedeny na 2 buněčných liniích odvozených od hepatocelulárního karcinomu (Huh-7 a HepG2) a dále *in vivo* na myších. Výsledkem byl značný antiproliferační účinek, kdy cílem léčiva je pravděpodobně CDK2 kinasa, která má za úkol regulovat přechod buňky z G1 do S fáze. Při použití fluspirilenu došlo k akumulaci buněk v G1 fázi a ke zpomalení přechodu do další fáze cyklu. V molekulárních dráhách došlo k zamezení fosforylace CDK2 a Rb proteinu a dále ke snížení hladiny cyklinu E. Při testech na myších bylo prokázáno zpomalení růstu tumoru při aplikaci samotného fluspirilenu a také byly provedeny experimenty v kombinaci této sloučeniny s dosud používaným chemoterapeutikem 5-fluorouracilem.

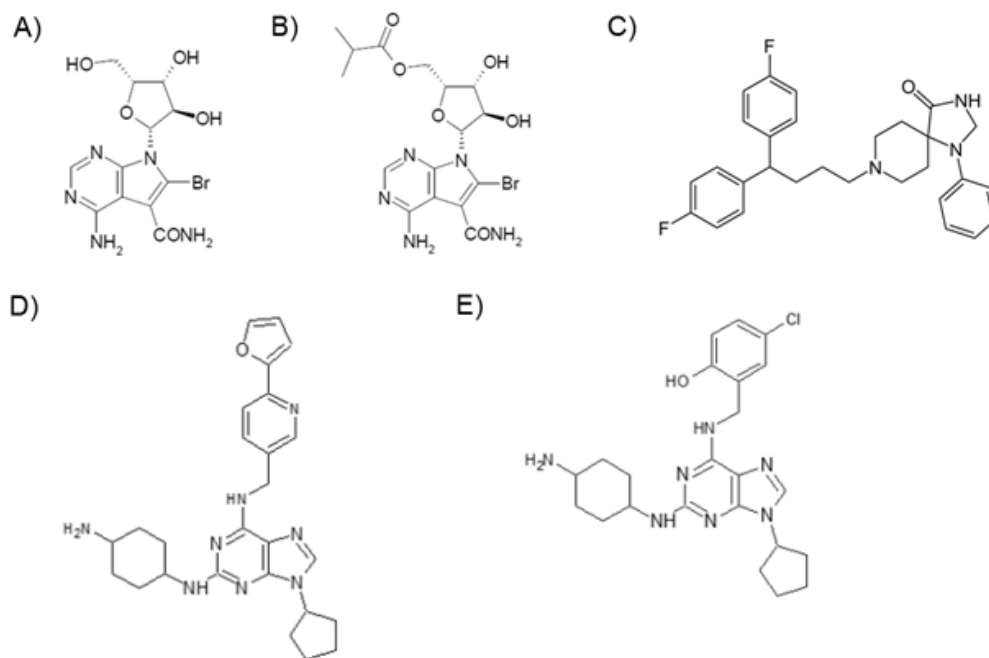
Výsledky byly při zkombinování obou látek lepší, než při použití vždy jedné z nich. Velkým kladem do budoucího užití jsou známé dlouhodobé účinky fluspirilenu, kvůli už nynějšímu běžnému užívání v klinické praxi.

Dalšími inhibitory cyklin-dependentních kinas testované na HCC jsou látky BP-14 a BA-12 (**obr. 8D, E**). Tyto sloučeniny jsou deriváty pan-selektivního inhibitoru kinas roskovitinu. V průběhu let byly látky testovány jak na buněčných liniích odvozených od HCC, tak *in vivo* na myších modelech a lidských nádorových xenograftech, kdy byla prokázána jejich inhibiční aktivita vůči CDK1/2/5/7/9. Inhibicí těchto kinas došlo u buněk k zastavení buněčného cyklu v S/G2 a G2/M fázích buněčného cyklu a k indukci apoptózy. Imunoblottingem byly analyzovány hladiny celkové RNA polymerasy II i fosforylované polymerasy v místech S2 a S5, kdy byla snížena jejich hladina, což značí inhibici CDK7 a CDK9. Při detekci fosforylovaného Rb proteinu v místě S807/S811 došlo také k nižší detekci hladiny proteinu, který je zase typickým projevem inhibice CDK2. Při použití xenograftů lidských hepatocelulárních karcinomů se po ošetření látkami BP-14 a BA-12 dospělo k závěru, že potlačují vznik a růst nádoru (Haider a kol., 2013).

V další práci, od Huang a kol., byla pozornost zaměřena na inhibici CDK9, která v buňce ovlivňuje proliferaci, navození apoptózy a transkripci (Wang a kol., 2012). Cyklin-dependentní kinasa 9 byla inhibována pomocí malých molekul z knihovny shRNA a výsledkem inhibice byl silný protinádorový účinek, který koreloval se snížením hladiny transkripčního faktoru c-Myc. Je známo, že onkogen MYC způsobuje při nadměrné expresi HCC u lidí (Shachaf a kol., 2004) a tato práce potvrdila, že CDK9 podporuje zvýšení exprese transkripčního faktoru c-Myc. Do budoucna se plánuje spojit tuto léčbu společně s běžně užívaným multikinasovým inhibitorem sorafenibem, pro lepší účinek a také je snaha o nalezení inhibitoru přímo pro transkripční faktor c-Myc, což by mohlo mít ještě lepší efekt než v případě inhibice CDK9 (Huang a kol., 2014).

Editací genomu pomocí CRISPR/Cas9 endonukleas bylo provedeno umlčení genu pro CDK7 na buněčných liniích odvozených od HCC (Wang a kol., 2018). Analýzami bylo totiž zjištěno, že u pacientů, kteří měli zvýšenou hladinu CDK7 docházelo k rychlejšímu úmrtí, než u pacientů, kteří

měli hladinu CDK7 sniženou, proto se výzkum zaměřil právě na tuto konkrétní kinasu. Experimenty byly prováděny na buněčných liniích odvozených od HCC, kdy společně k nim byly přidány dvě CDK7 shRNA, které snížily hladinu CDK7 v buňkách. Jak lze předpokládat, inhibicí CDK7 byla narušena proliferace buněk (Wang a kol., 2018). Dále byl v rámci této práce testován inhibitor THZ1, který taktéž inhibuje CDK7 a zároveň i CDK9. Inhibice byla prokázána snížením hladiny fosforylované RNA polymerasy II v místě S2 (CDK9) a S5 (CDK7). U této látky byl již dříve prokázán terapeutický účinek na různé typy maligních onemocnění (Chipumuro a kol., 2014; Wang a kol., 2015), nicméně nově byla zjištěna citlivost inhibitoru k buněčným liniím experimentující zvýšenou hladinou onkogenu Myc. U buněčných linií se zvýšenou hladinou (Huh-7, HepG2, Hep3B, SNU398, JHH1) byla indukována apoptóza, ale u jiných, které mají jen bazální hladinu exprese onkogenu (PLC/PRF/5, MHCC97H, SNU387, SNU449, SNU475) nikoli. Tyto výsledky naznačují, že ne všechny buněčné linie odvozené od HCC mají stejnou závislost na CDK7 a CDK9 a této informace by se dalo využít při léčbě HCC (Wang a kol., 2018).



Obr. 8: Chemické struktury CDKI, kde je A) xylocidin, B) ibulocydin, C) fluspirilen, D) BP-14 a E) BA-12.

4. Cíle práce

1. Zpracování literární rešerše na téma hepatocelulárního karcinomu, možností jeho léčby. Dále také nastínění tématu cyklin-dependentních kinas a jejich inhibitorů, jako potenciálních léčiv HCC.
2. Detekce rozložení jednotlivých fází buněčného cyklu s využitím průtokového cytometru.
3. Imunodetekce a vyhodnocení vybraných apoptotických proteinů a proteinů charakterizujících buněčný cyklus a transkripci pomocí metody western blotting a SDS-PAGE.
4. Zpracování a vyhodnocení výsledků v experimentální části práce.

Experimentální část

5. Metody

5.1 Přístrojové vybavení

V rámci předložené diplomové práce byly použity tyto laboratorní přístroje: CO₂ inkubátor (Sanyo), termostat Thermomixer Comfort (Eppendorf), flowbox s vertikálním prouděním vzduchu TC 48 (Gelaire), centrifuga BR4i (Jouan), centrifuga Minispin (Eppendorf), malá centrifuga EPP 5702 (Eppendorf), mikroskop Nikon TMS (Nikon), aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad), elektroforetický zdroj EC 105 (E-C Aparatus Corporation), blotovací aparatura Mini Trans-Blot Cell (BioRad), ultrazvukový homogenzátor Sonoplus HD2200 (Bandelin), UV-VIS spektrofotometr UV-1800 (Shimadzu), chemiluminiscenční kamera LAS4000 (FujiFilm), průtokový cytometr Cell Lab QuantaTM SC-MPL (Beckman Coulter), vodní lázeň, třepačka s kývavým pohybem Mini Rocket MR-1 (BioSan).

5.2 Chemikálie

Na experimentální část práce byly využity následující chemikálie: trypsin, penicilin, streptomycin, L-glutamin, inhibitory proteas - leupeptin a aprotinin, ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), ethylenglykoltetraoctová kyselina (EGTA), dimethylsulfoxid (DMSO), dithiothreitol (DTT), fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), N,N'-methylenbisakrylamid, tetramethylethylendiamin (TEMED), kultivační médium Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), kultivační médium Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), peroxodisíran amonný (APS), 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU), propidium jodid (PI), fluorid sodný, vanadičnan trisodný, Triton X-100, bromfenolová modř, pyruvát sodný, Coomassie brilliant blue, NP-40, n-butanol od firmy Sigma Aldrich; fetální telecí sérum, hovězí sérový albumin (BSA) od firmy Invitrogen; akrylamid, Tween 20, tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) a glycin od firmy MP Biomedicals; marker molekulových hmotností Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, chemiluminiscenční substráty luminol a peroxid (ECL kit) od firmy Thermo Scientific; Ponceau S a 2-

merkptoethanol od firmy Serva; kyselina chlorovodíková, chlorid draselný, chlorid sodný, kyselina fosforečná, dodecyl síran sodný (SDS) a glycerol od firmy Lach-Ner; KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ od firmy Chemapol; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, ethanol, chlorid draselný, kyselina octová od firmy Penta.

5.3 Roztoky

V experimentech byly využity tyto roztoky:

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2 mM KH_2PO_4 (pH = 7,4 – 7,5)

TBS: 137 mM NaCl, 20 mM TRIS (pH = 6,8)

Lyzační pufr vídeňský: 1% NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM TRIS/HCl (pH = 8), před použitím přidán: 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM, Na_3VO_4 , 1 mM NaF, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin

Bradfordovo činidlo: 0,01% Coomassie brilliant blue, 95% ethanol, 85% kyselina fosforečná

Promývací roztoky pro cytometrické techniky: 1% BSA v PBS, 1% BSA v PBS s 0,1% Tween 20, 0,5% BSA v PBS a 2 M HCl s 0,5% Triton X-100

Elektroforetický pufr: 25 mM TRIS, 192 mM glycin, 0,1% SDS

Blotovací pufr: 25 mM TRIS, 192 mM glycin

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

Blokační roztok: 3% BSA v TBS s 0,1% Tween 20

Ponceau S: 0,2% v 1% kyselině octové

5.4 Protilátky

V rámci experimentální části byly pro imunodetekci zvolených proteinů použity tyto specifické primární protilátky: celkový Rb protein (1:200), fosforylovaný Rb protein v místě S807/S811 (1:250), PARP (1:500), Mcl-1 (1:500), kaspasa 7 zymogen (1:500), kaspasa 7 fragment (1:500), HSP70 (1:500), fosforylovaná RNA polymerasa II v místě S2 (1:1000) od firmy Cell Signaling; p53 (1:10) klon

DO-1 od Dr. B. Vojtěška z Masarykova onkologického ústavu v Brně; celková RNAPol. II (1:1000) od firmy Millipore; α -tubulin (1:1000) od firmy Sigma. K detekci primárních protilátek byly použity následující sekundární protilátky značené křenovou peroxidasou RAM/Px (rabbit anti-mouse 1:1000) a SWAR/Px (swine anti-rabbit 1:1000) od firmy Sigma Aldrich. Pro cytometrii byla použita primární protilátka značená fluorescenční značkou anti-BrdU-FITC klon PRB1 (1:50) od firmy eBioscience. Za názvem protilátky je v závorce uvedeno její ředění a případně klon.

5.5 Buněčné linie

Adherentní buněčné linie PLC/PRF/5 (PLC5) a HepG2 jsou linie odvozené od hepatocelulárního karcinomu. Buňky linie PLC5 byly kultivovány v DMEM médiu s přidavkem 10% fetálního bovinního séra, streptomycinu (0,1 mg/ml), penicilinu (0,1 U/ml) a L-glutaminu (0,3 mg/ml). Kultivace probíhala v inkubátoru při teplotě 37 °C v atmosféře 5 % CO₂. Linie PLC5 je mutantní pro p53 vlivem mutace v *p53* genu záměnou thyminu za guanin v oblasti 3. nukleotidu v kodonu 249, což způsobí snížení hladiny p53 v buňce. Oproti tomu, druhá buněčná linie HepG2 normálně exprimuje gen pro protein p53 a jedná se tedy o wild-type (Puisieux a kol., 1993). Buňky linie HepG2 byly kultivovány v EMEM médiu s přidavkem 10% fetálního bovinního séra, streptomycinu (0,1 mg/ml), penicilinu (0,1 U/ml) a L-glutaminu (0,3 mg/ml) a 100 mM pyruvátu sodného. Kultivace probíhala v inkubátoru při teplotě 37 °C v atmosféře 5 % CO₂.

5.6 Testované látky

Ve druhé části diplomové práce byly testovány čtyři nové deriváty roscovitinu BP117, BP21, BP2024 a BP2025, kdy byly zjišťovány jejich biologické účinky na buněčné linie odvozené od hepatocelulárního karcinomu. Látky byly syntetizovány Laboratoří růstových regulátorů, Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Všechny inhibitory CDKs byly připraveny Mgr. Tomášem Guckým, Ph.D.

Testované látky byly připraveny ve formě 100 mM zásobních roztoků rozpuštěných v DMSO, kdy byly později dále ředěny DMSO do příslušných koncentračních řad. Finální koncentrace DMSO nikdy v experimentech nepřekročila hodnotu 0,1 %.

5.7 Kultivace buněk a sklizení

Buňky linie PLC/PRF/5 a HepG2 byly vysety na Petriho misku a kultivovány v médiu při 37 °C, v atmosféře 5 % CO₂ po dobu 24 h. Pro analýzu na průtokovém cytometru bylo použito 350 tisíc buněk v 5 ml média v případě PLC5 buněk a 750 tisíc buněk v 5 ml média v případě linie HepG2. Následující den, po adherenci buněk, byly do média přidány roztoky testovaných látek (BP117, BP21, BP2024 a BP2025), které byly rozpuštěny v DMSO. Do kontrolních vzorků bylo taktéž přidáno DMSO, a to o celkové koncentraci do 0,1 % objemu vzorku. Takto ovlivněné buňky byly opět kultivovány při 37 °C, v atmosféře 5 % CO₂ po dobu 24 h. Pro cytometrickou analýzu byl 30 min před sklizením k buňkám přidán roztok 5-bromo-2'-deoxyuridinu (BrdU) při ředění 1000x.

Z důvodu zamezení degradace vzorku bylo sklizení buněk prováděno na ledu. Vzorky byly sklizeny trypsinizací, a to tak, že původní médium bylo odsáto a buňky byly promyty roztokem EDTA. Dále byl na buňky přidán trypsin, díky čemuž bylo zajištěno uvolnění adherovaných buněk ze dna misek. Poté byly buňky s trypsinem opláchnuty médiem a roztok byl přenesen do zkumavky. Buňky byly centrifugovány (2500 rpm, 4 °C, 8 min), 2x promyty 1% roztokem PBS a fixovány pomocí vychlazeného 70% ethanolu při -20 °C.

5.8 Lyzace

Získaný buněčný pelet byl rozsuspendován v příslušném objemu lyzačního vídeňského pufru, kdy objem pufru byl dvojnásobný oproti množství peletu a samotná lýze probíhala 30 minut na ledu. Poté byly vzorky sonikovány pomocí ultrazvukového homogenizátoru (10 sekund, 3 cykly, 40 % max.)

a centrifugovány 20 minut při 14000 rpm a 4 °C. Vzorky byly dále přeneseny do nových zkumavek pro lepší detekci koncentrace proteinů v jednotlivých zkumavkách. Detekce probíhala spektrofotometrickou Bradfordovou metodou při 595 nm a příslušný koncentrační rozdíl byl vyrovnán vhodným ředěním lyzačním pufrům. Ke všem zbylým vzorkům byl poté přidán 5x SDS vzorkovací pufr a následovala denaturace v termobloku při 95 °C po dobu 5 minut.

5.9 Cytometrické techniky

Poté byl pelet promyt v PBS a po centrifugaci rozsuspendován v malém objemu PBS. K suspenzi byl přidán po kapkách roztok 2 M HCl. Po 30min inkubaci byly buňky opět centrifugovány (1000 g, 4 °C, 8 min) a rozsuspendovány v roztoku 0,1 M Na₂B₄O₇·10 H₂O. Po centrifugaci byl pelet rozsuspendován v roztoku PBS/BSA-T, aby došlo k propustnosti membrány buněk pro protilátky. K peletu byla následně přidána protilátka anti-BrdU-FITC a poté roztok PBS/BSA-T. Následně byla přidána protilátka a vzorek se nechal za občasného vortexování 1 h za tmy inkubovat. Poté byl roztok centrifugován (1000 g, 4 °C, 8 min) a promyt v roztoku PBS/BSA-T. K peletu byl na závěr přidán PBS a propidium jodid (PI), který se vmezeřil do dvoušroubovice DNA. Na základě vazby PI s DNA bylo možné stanovit obsah DNA v buňkách a tedy i detekovat fáze buněčného cyklu. Detekce buněk na průtokovém cytometru je založena na ozáření buněk laserem a následné excitaci při vlnové délce 488 nm, kdy propidium jodid emituje světlo o vlnové délce >560 nm, jež je zachyceno detektorem průtokového cytometru spojeným s filtrem FL3, kdy naměřená hodnota fluorescenčního signálu odpovídá obsahu DNA v jádře. Stejně byl kvantifikován fluorescenční signál značky FITC odpovídající přesnému množství inkorporovaného BrdU v buňkách díky konjugaci FITC s protilátkou anti-BrdU. Přidaný BrdU má schopnost vázat se do nově syntetizovaného řetězce DNA, který vzniká v průběhu S fáze. Díky tomu lze přesněji vyhodnotit rozložení jednotlivých fází buněčného cyklu, speciálně S fázových buněk. Maximální intenzita naměřeného emisního spektra fluorescenční značky FITC je 510 nm a byla zachycena detektorem s filtrem FL1.

5.10 SDS-PAGE a western blotting

Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu probíhala za denaturujících podmínek v 5% zaostřovacím gelu a v 10%, 12,5% a 15% dělicím gelu. Separace proteinů probíhala při napětí 80 V po dobu přibližně 30 minut a po přechodu proteinů do dělicího gelu, bylo napětí zvýšeno na 120 V.

Po dokončení elektroforetické separace byly proteiny přeneseny z gelu na nitrocelulóзовou membránu metodou western blotting. Přenos probíhal při proudu 270 mA za stálého chlazení ledem po dobu 3 hodin. Proteiny na membráně byly obarveny roztokem Ponceau S pro ověření vyrovnané koncentrace proteinů ve vzorcích a zviditelnění proteinů na membráně. Pozadí membrány bylo následně odbarveno v roztoku TBS a blokováno v 5% roztoku TBS/BSA-T po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Následně byla nanesena primární protilátka, která se nechala inkubovat po dobu 24 h při 4 °C. Druhý den byla několikrát promyta v roztoku TBS a TBS-T a 1 h inkubována s příslušnou sekundární protilátkou při laboratorní teplotě. Poté byla membrána opět několikrát promyta v TBS a TBS-T. Jelikož byla sekundární protilátka značená křenovou peroxidasou byl pro kvantifikaci proteinů použit roztok peroxidu a luminolu v poměru 1:1. Signál byl detekován přístrojem LAS4000 (FujiFilm).

6. Výsledky

Laboratoř růstových regulátorů se dlouhodobě zabývá vývojem inhibitorů cyklin-dependentních kinas (Zatloukal a kol., 2013; Gucký a kol., 2013). Nedávno se ukázalo, že tyto pan-selektivní nanomolární inhibitory s purinovým skeletem (Gucký a kol., 2013) vykazují značný antiproliferační a protinádorový efekt na modelu hepatocelulárního karcinomu *in vitro* a *in vivo* (Haider a kol., 2013) a proto byly nasyntetizovány nové látky se snahou dál vylepšit vlastnosti stávajících látek. Následující kapitoly popisují nejnovější poznatky o nových pan-selektivních inhibitech CDKs na modelových nádorových liniích PLC/PRF/5 a HepG2 odvozených od HCC.

6.1 Jednparametrová analýza buněčného cyklu

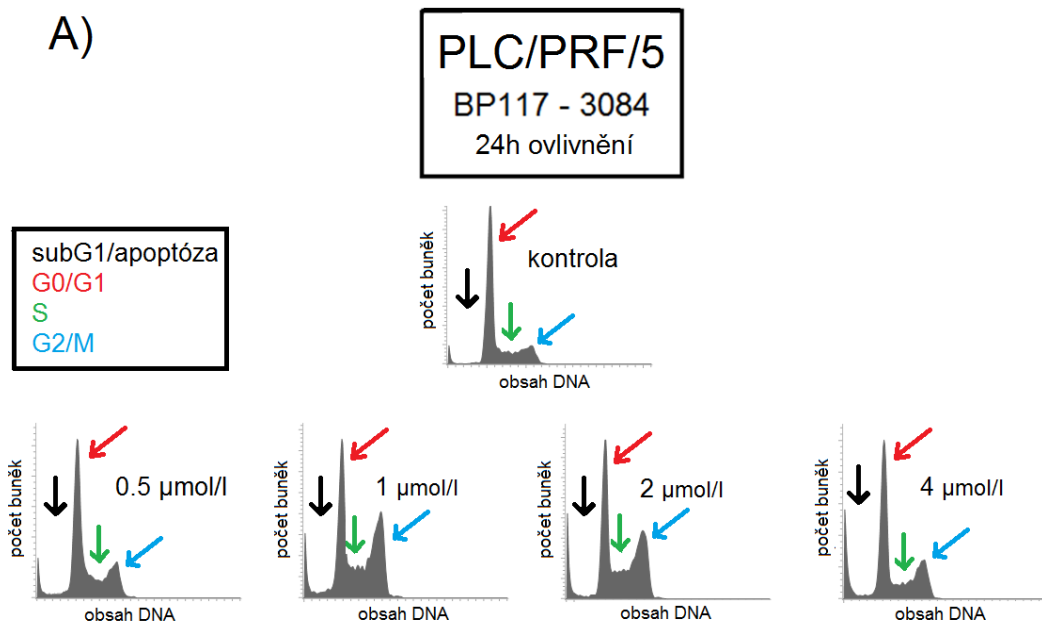
Buňky linie PLC/PRF/5 a HepG2 byly po dobu 24 h inkubovány s testovanými látkami BP117, BP21, BP2024 a BP2025. Obsah DNA ovlivněných buněk byl stanoven pomocí průtokové cytometrie na základě kvantitativního barvení DNA propidium jodidem. Pro látku BP117 byla určena koncentrace v rozmezí 0,5 - 4 $\mu\text{mol/l}$, pro BP21 0,1 - 0,8 $\mu\text{mol/l}$, pro BP2024 0,25 - 2 $\mu\text{mol/l}$ a pro látku BP2025 nejnižší koncentrační řada 15,6 - 125 nmol/l dle předem stanovené GI_{50} (**obr. 10 - 13**).

Jak jde vidět z přiložených histogramů, u kontrolních vzorků převažuje většina buněk v G1 fázi, příp. v G0 a druhý největší signál byl detekován ve fázích G2/M, což je běžné pro tyto buněčné linie. U ošetřených buněk obou linií došlo k nárůstu buněk v G2/M fázích buněčného cyklu při použití všech testovaných inhibitorů CDKs, což potvrzuje majoritní inhibici CDK1 a CDK2 testovanou látkou. Dále je zřetelné, že od koncentrace 2 $\mu\text{mol/l}$ postupně narůstá počet buněk v subG1 fázi buněčného cyklu (apoptóza).

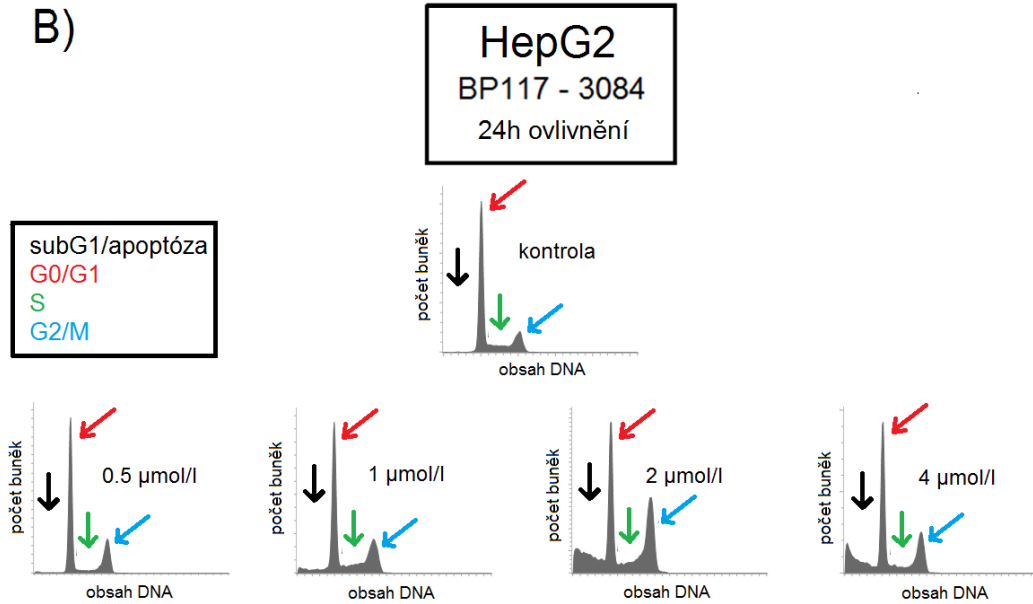
Z dosažených výsledků vyplývá, že došlo k zastavení proliferace buněk v pozdní S fázi a v G2/M fázích cyklu a došlo k navození buněčné smrti. Tento projev je typický pro cytotoxické látky, které inhibují syntézu DNA v S fázi a také inhibují transkripci. Za tyto děje a přechod z jednotlivých fází buněčného cyklu do druhého jsou zodpovědné CDK1, CDK2 a CDK4/6 (Shapiro, 2006), což

potvrzuje známé inhibiční účinky těchto inhibitorů vůči CDK1/2/5/7/9 (interní data). Pokud je některá z kinas inhibována, dojde k zástavě buněčného cyklu a buňka nemůže pokračovat v dělení. Může se však i stát, že dojde k navození apoptózy a buňka umírá, proto se zvyšuje i počet apoptotických buněk v histogramech. Průběh změn v buněčném cyklu u ošetřených buněk je stejný u obou testovaných linií, tak lze předpokládat i stejný účinek testovaných inhibitorů na obě zmíněné buněčné linie odvozené od HCC.

Podobné účinky byly v minulosti zaznamenány i u známého pan-selektivního inhibitoru CDKs roskovitinu a jeho derivátu CR8, kdy oba také vykazují inhibiční účinky na CDK1, CDK2, CDK5 a na transkripční kinasy CDK7 a CDK9 (Bettayeb a kol., 2010; MacCallum a kol., 2005). Na stejném buněčném modelu byly zkoumány i jiné deriváty roskovitinu, kdy vědecká skupina z Vídně testovala látky BP-14 a BA-12. Výsledkem byla akumulace buněk v S-G2-M fázích cyklu se zablokováním proliferace vlivem inhibice replikace DNA (Haider a kol., 2013). Obdobné výsledky byly zaznamenány při testování selektivních inhibitorů CDK1/2, kdy u nádorových buněk došlo k celkovému snížení proliferujících buněk, k indukci apoptózy a k akumulaci buněk v G1 a G2 fázích cyklu (Payton a kol., 2006).

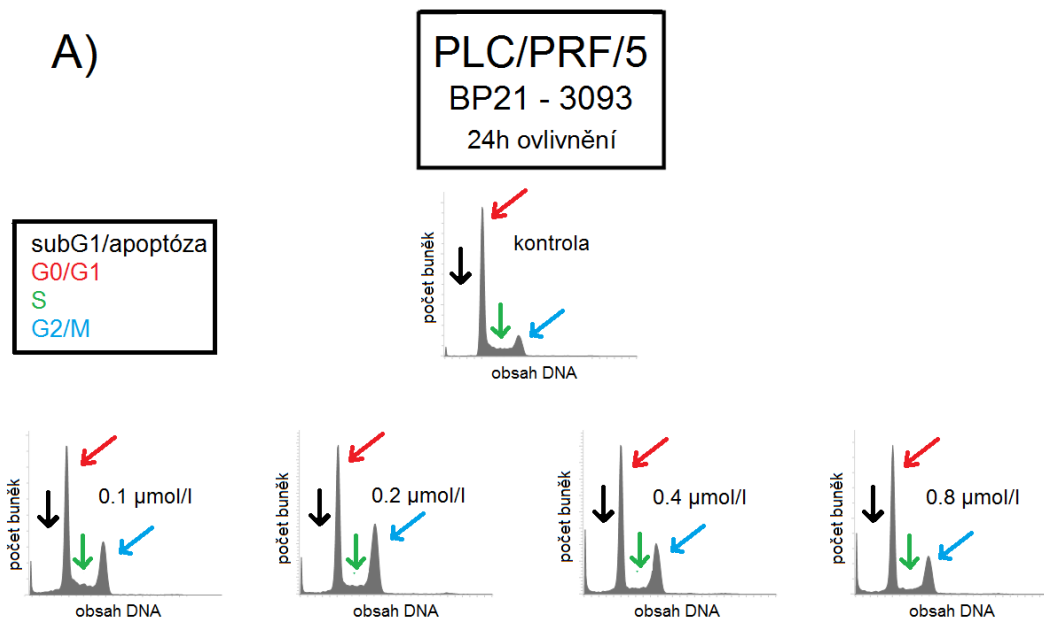


B)



Obr. 10: Analýza buněčného cyklu za využití průtokové cytometrie. Buňky linie PLC/PRF/5 a HepG2 byly inkubovány s látkou BP117-3084 po dobu 24 h. Propidium jodid byl využit jako fluorescenní sonda pro nabarvení DNA ovlivněných buněk. Interkalovaný propidium jodid představuje relativní obsah DNA.

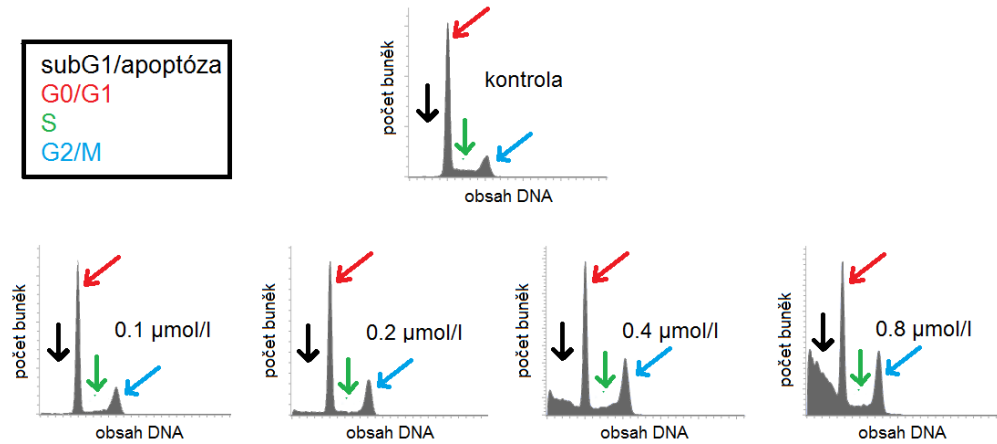
A)



B)

HepG2
BP21 - 3093
24h ovlivnění

subG1/apoptóza
G0/G1
S
G2/M

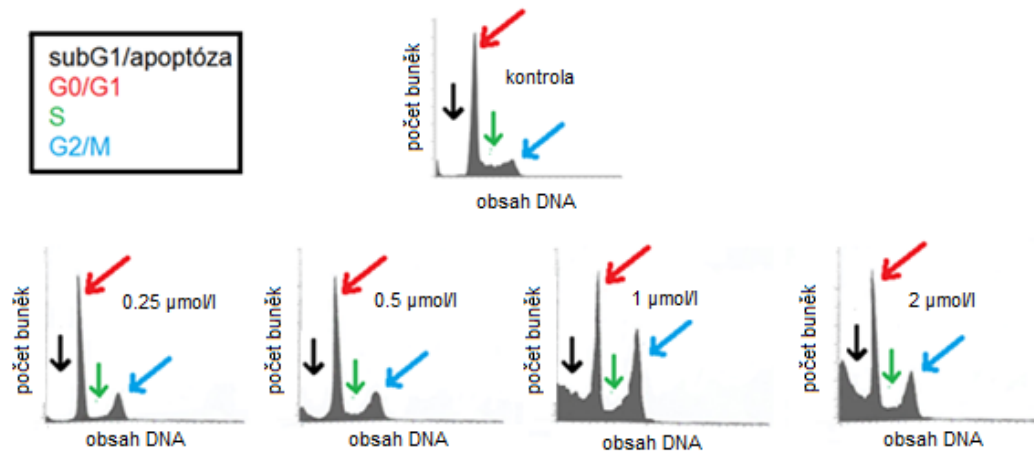


Obr. 11: Analýza buněčného cyklu za využití průtokové cytometrie. Buňky linie PLC/PRF/5 a HepG2 byly inkubovány s látkou BP21-3093 v koncentračním rozpětí 0,1 - 0,8 $\mu\text{mol/l}$ po dobu 24 h. Buňky byly poté obarveny PI, pro lepší vizualizaci jednotlivých fází cyklu. Interkalovaný propidium jodid představuje relativní obsah DNA.

A)

PLC/PRF/5
BP2024 - 6358
24h ovlivnění

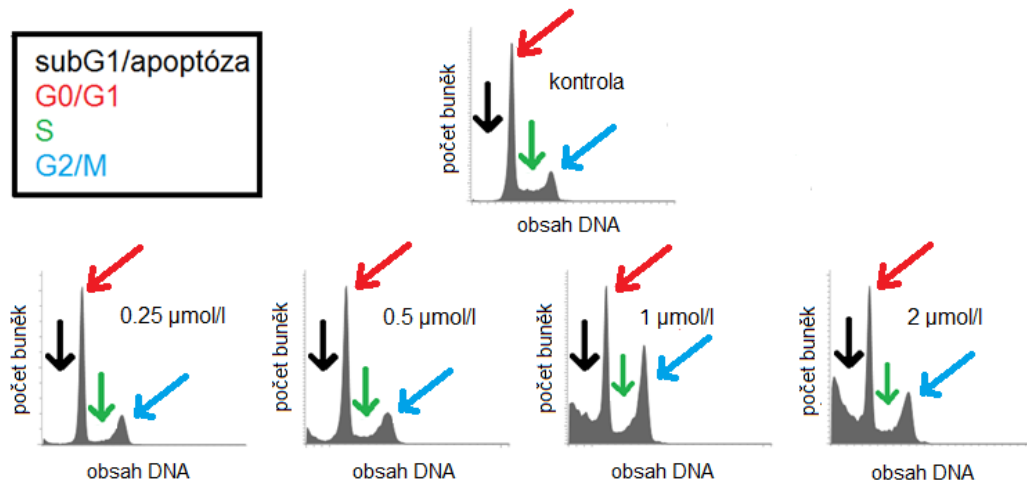
subG1/apoptóza
G0/G1
S
G2/M



B)

HepG2
BP2024 - 6358
24h ovlivnění

subG1/apoptóza
G0/G1
S
G2/M

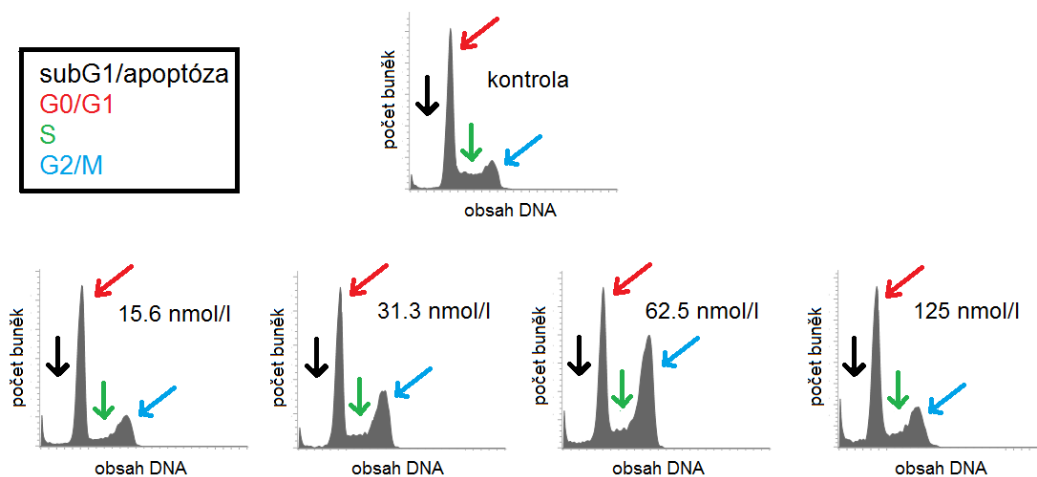


Obr. 12: Analýza rozložení fází buněčného cyklu za využití průtokové cytometrie. Buňky linií PLC/PRF/5 a HepG2 byly inkubovány s látkou BP2024-6358 po dobu 24 h. Buňky byly poté obarveny PI, pro lepší vizualizaci jednotlivých fází cyklu. Interkalovaný propidium jodid představuje relativní obsah DNA.

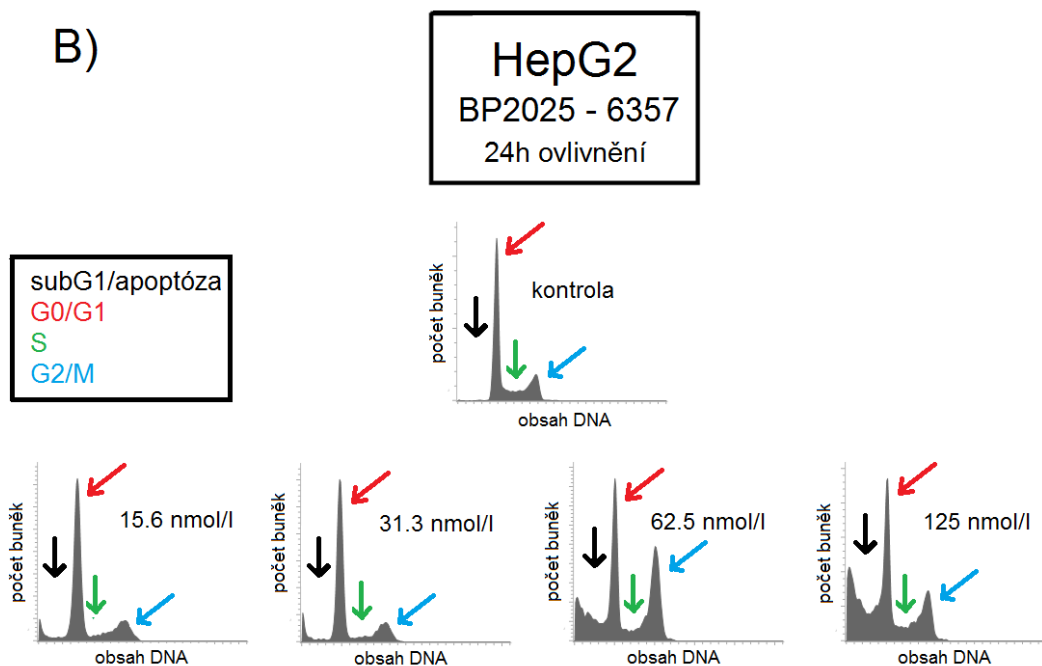
A)

PLC/PRF/5
BP2025 - 6357
24h ovlivnění

subG1/apoptóza
G0/G1
S
G2/M



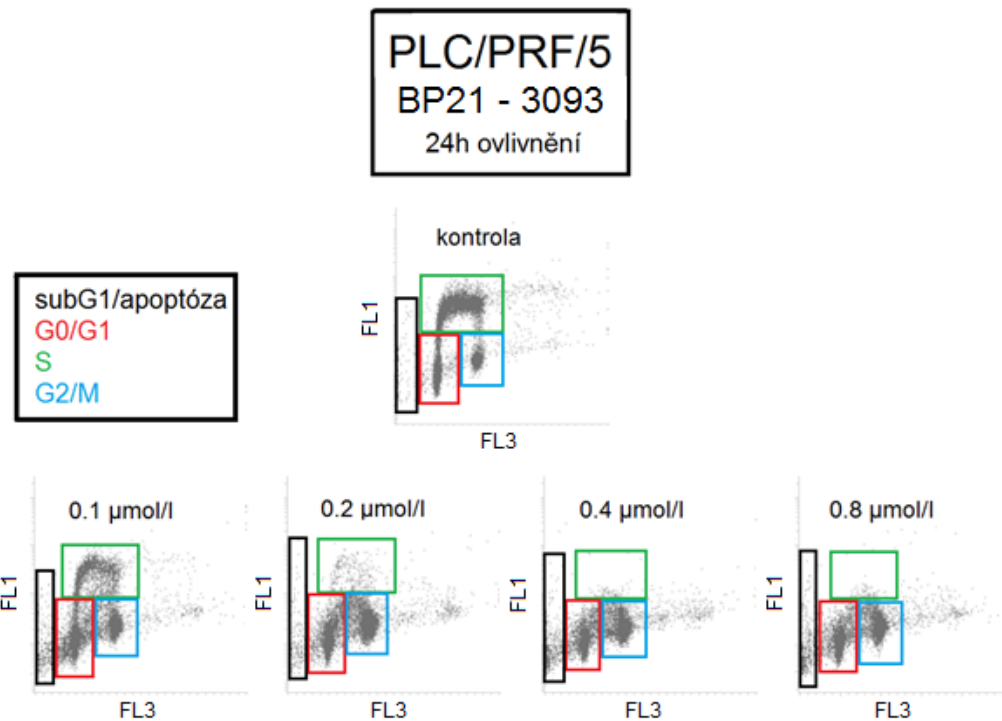
B)



Obr. 13: Analýza buněčného cyklu za využití průtokové cytometrie. Buňky linie PLC/PRF/5 a HepG2 byly inkubovány s látkou BP2025-6357 po dobu 24 h. Buňky byly poté obarveny PI, pro lepší vizualizaci jednotlivých fází cyklu. Interkalovaný propidium jodid představuje relativní obsah DNA.

6.2. Dvoupametrová analýza buněčného cyklu

Pro srovnání předchozích výsledků byla provedena i dvoupametrová analýza buněčného cyklu. Pro představu je v práci uveden pouze jeden příklad analýzy, a to u linie PLC/PRF/5 po ošetření látkou BP21 (**obr. 14**). Prvním parametrem zde bylo barvení buněk propidium jodidem jako v předchozím případě a druhým parametrem bylo barvení 5-bromo-2'-deoxyuridinem (BrdU). Pomocí této sloučeniny můžeme detekovat buňky v S fázi a rozlišovat BrdU pozitivní a negativní buňky a zjišťovat tak jejich replikační potenciál a také nám umožňuje přesnější stanovení a rozlišení jednotlivých fází buněčného cyklu. Opět byly použity stejné koncentrace látky BP21, a to 0,1 - 0,8 $\mu\text{mol/l}$. Od koncentrace 0,2 $\mu\text{mol/l}$ byl vidět nepatrný blok a úbytek buněk v S fázi a naopak nárůst počtu buněk v G2/M fázi. Dále už od první koncentrace 0,1 $\mu\text{mol/l}$ lze pozorovat zvýšený počet apoptotických buněk, což koreluje s předchozí jednopametrovou analýzou buněčného cyklu.



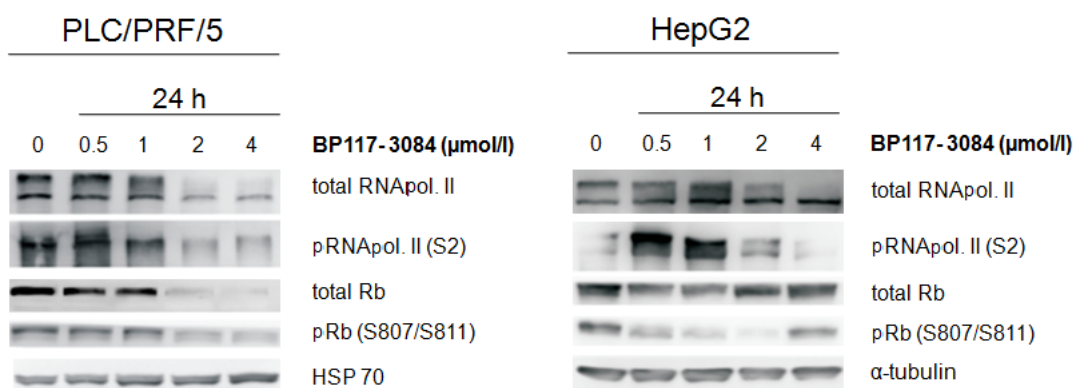
Obr. 14: Dvouparametrová cytometrická analýza buněčného cyklu provedená na buněčné linii PLC/PRF/5 po 24h ovlivnění látkou BP21. K buňkám byl před sklízením přidán 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU). Dot-plots představují inkorporovaný BrdU a detekci jeho fluorescence pomocí protilátky anti-BrdU-FITC. FL3 odpovídá signálu inkorporovaného propidium jodidu. FL1 odpovídá fluorescenčnímu signálu značky FITC, jež byla konjugována s protilátkou anti-BrdU.

6.3. Imunodetekce proteinů účastnících se buněčného cyklu a transkripce

V následujícím experimentu byly pro stanovení exprese studovaných proteinů využity metody SDS-PAGE a western blotting, a to opět na modelu nádorových buněčných linií PLC/PRF/5 a HepG2 po 24h ovlivnění látkami BP117, BP21, BP2024 a BP2025.

Po ošetření látkou BP117 v koncentračním rozmezí 0,5 - 4 µM u linie PLC/PRF/5, lze ve výsledcích pozorovat výrazné snížení hladin proteinů od koncentrace 2 µM (**obr. 15**). U celkové RNA polymerasy II lze pozorovat dva pruhy, kde rychlejší představuje nefosforylovanou formu RNAPol. II a pomalejší její fosforylovanou formu. Hladina fosforylované varianty polymerasy

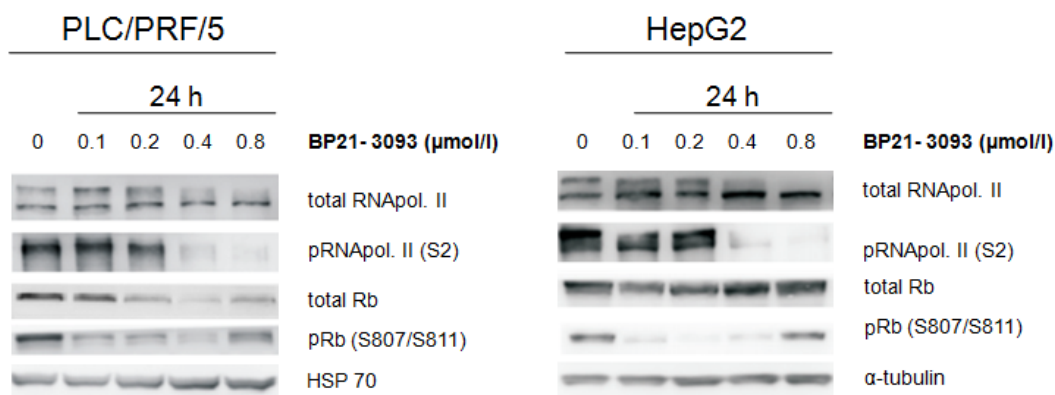
se postupně se zvyšující se koncentrací snižuje a od koncentrace 2 μM není téměř detekovatelná. Stejný trend snížení exprese byl zaznamenán i u dalšího proteinu, a to u fosforylované RNApol. II v S2 místě. Dalšími detekovanými proteiny byly celkový Rb protein a jeho fosforylovaná forma v oblasti S807/S811, kde lze pozorovat u obou buněčných linií postupné snížení hladiny proteinu obzvláště od koncentrace látky 2 μM . U druhé testované linie HepG2 došlo také k poklesu hladin u celkové RNApol. II i její fosforylované varianty v S2 místě od koncentrace 2 μM . U celkového Rb proteinu byla hladina mírně snižena u koncentrací 0,5 - 1 μM , jinak byla hladina proteinu vyrovnaná. U fosforylovaného Rb proteinu v oblasti S807/S811 lze vidět postupný pokles hladiny se zvyšující se koncentrací látky, ale v nejvyšší koncentraci 4 μM opět došlo k nárůstu hladiny fosforylovaného proteinu.



Obr. 15: Imunodetekce proteinů podílejících se v buňce na regulaci buněčného cyklu a transkripci. Experimenty byly provedeny po 24h inkubaci s látkou BP117-3084 v koncentracích 0,5 - 4 μM na buněčných liniích PLC/PRF/5 a HepG2 odvozených od hepatocelulárního karcinomu. Proteiny HSP70 a α -tubulin zde byly detekovány jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorku.

Při testování inhibitoru BP21 byla provedena také analýza proteinů podílejících se na regulaci buněčného cyklu a transkripce. Experimenty probíhaly na buněčných liniích odvozených od HCC, konkrétně na PLC/PRF/5 a HepG2 po 24h inkubaci s látkou BP21 v koncentracích 0,1 - 0,8 $\mu\text{mol/l}$ (obr. 16).

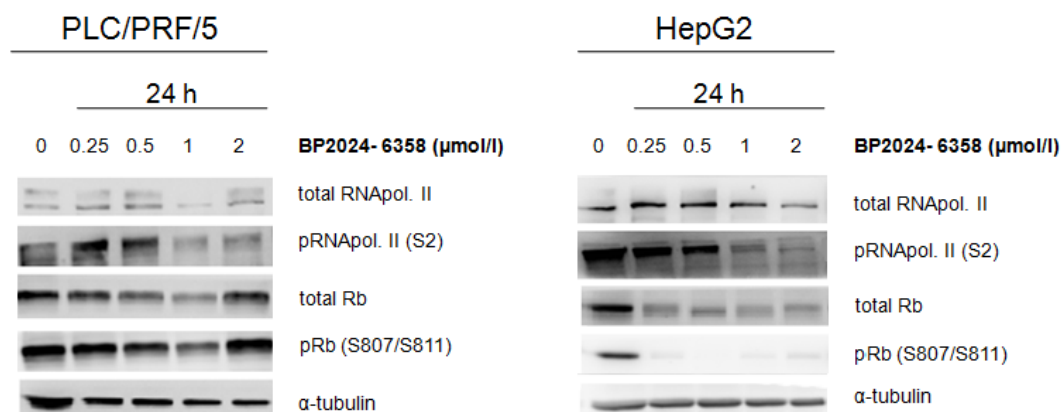
Z výsledků vyplývá, že u obou buněčných linií dochází k poklesu hladin celkové i fosforylované RNA polymerasy II (S2) od koncentrace látky 0,4 $\mu\text{mol/l}$, což je koncentrace 5x menší, než u předchozí testované látky. U celkové polymerasy pozorujeme pokles především její fosforylované formy (horní pruh). Posledním stanovovaným proteinem byl retinoblastomový protein (Rb), kdy byla stanovována jeho celková exprese a také exprese jeho fosforylované formy v S807/S811 místě. U PLC/PRF/5 došlo u obou variant Rb proteinu k postupnému snižování hladiny Rb proteinu v buňce už od první koncentrace. V koncentraci 0,8 $\mu\text{mol/l}$ došlo naopak k mírnému zvýšení hladiny Rb, oproti předešlé koncentraci. U druhé testované buněčné kultury HepG2 lze pozorovat mírné snížení hladiny celkového Rb proteinu v koncentraci 0,1 $\mu\text{mol/l}$ a 0,2 $\mu\text{mol/l}$, jinak je detekovatelné množství Rb proteinu vyrovnané s kontrolní variantou. U fosforylovaného Rb proteinu (S807/S811) rapidně poklesla exprese tohoto proteinu v koncentracích 0,1 - 0,4 $\mu\text{mol/l}$.



Obr. 16: Imunodetekce proteinových markerů podílejících se na regulaci buněčného cyklu a transkripci. Experimenty byly provedeny po 24h inkubaci s látkou BP21-3093 v různých koncentracích na buněčných liniích PLC/PRF/5 a HepG2 odvozených od hepatocelulárního karcinomu. Proteiny α -tubulin a HSP70 zde byly detekovány jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorku.

Imunoblottingem byly sledovány změny v expresi a fosforylaci vybraných proteinů také u látky BP2024, která byla inkubována 24 h s buněčnými liniemi odvozenými od HCC. Koncentrace inhibitoru byly zvoleny v koncentrační řadě 0,25 - 2 $\mu\text{mol/l}$ (**obr. 17**).

U prvního proteinu, celkové RNA polymerasy II, byla hladina u linie PLC5 vyrovnaná, kromě koncentrace 1 μM , kde nebyl detekován fosforylovaný fragment polymerasy (horní pruh). U linie HepG2 došlo k výraznějšímu poklesu enzymu od koncentrace 1 μM . Oproti předešlé linii byla pouze slabá detekce fosforylovaného fragmentu RNAPol. II, která nebyla téměř viditelná, pravděpodobně z důvodu špatného provedení western blotu. V případě linie PLC5 nastal mírný pokles hladiny celkového Rb proteinu v koncentracích 0,5 μM a 1 μM , kdy došlo také k poklesu ve stejných koncentracích látky BP2024 u fosforylované formy Rb proteinu. U linie HepG2 lze vidět větší pokles hladiny u celkového Rb proteinu už od první testované koncentrace a téměř nulovou detekci hladiny fosforylovaného Rb proteinu v místě S807/S811.

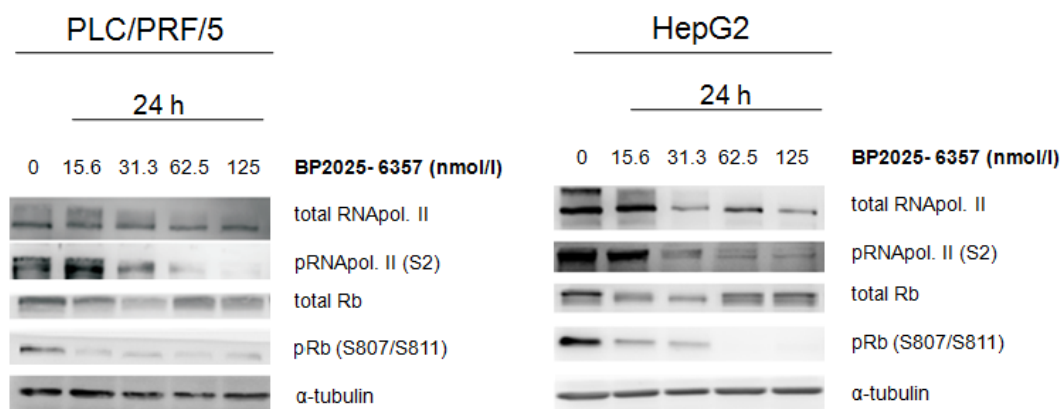


Obr. 17: Imunodetekce proteinových markerů podílejících se na regulaci buněčného cyklu a na transkripci. Experimenty byly provedeny po 24h inkubaci s látkou BP2024-6358 v koncentracích 0,25 - 2 $\mu\text{mol/l}$ na buněčných liniích PLC/PRF/5 a HepG2 odvozených od hepatocelulárního karcinomu. Protein α -tubulin zde byl detekován jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorku.

I u poslední testované látky BP2025 byly detekovány vybrané proteiny podílející se na regulaci buněčného cyklu a transkripci jako v předchozích experimentech. Koncentrační řada inhibitoru byla zvolena v nejnižší, nanomolární koncentrační řadě 15,6 - 125 nM (**obr. 18**).

U RNA polymerasy II vidíme pokles exprese proteinu jak u celkové polymerasy, tak i u její fosforylované formy v S2 místě od koncentrace 31,3 nM. Dále byla detekována hladina celkového retinoblastomového proteinu. Byl

zaznamenán pouze mírný pokles u celkového Rb proteinu, a to u koncentrace 15,6 nM a 31,3 nM u obou testovaných linií. U fosforylované formy Rb proteinu v místě S807/S811 lze však pozorovat rapidní pokles hladiny už od první koncentrace látky BP2025. U buněčné linie HepG2 nejde fosfo forma Rb proteinu v posledních dvou koncentracích vůbec detekovat.



Obr. 18: Imunodetekce proteinových markerů podílejících se na regulaci buněčného cyklu a na transkripci. Experimenty byly provedeny po 24h inkubaci s látkou BP2025-6357 v koncentracích 15,6 - 125 nmol/l na buněčných liniích PLC/PRF/5 a HepG2 odvozených od hepatocelulárního karcinomu. Protein α -tubulin zde byl detekován jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorku.

Pokles hladiny RNA polymerasy II fosforylované v S2 místě má přímou spojitost s inhibicí CDK9. Tato kinasa se uplatňuje především při regulaci transkripce, ale zasahuje také do procesů růstu buňky, do replikace a do apoptózy (Romano a Giordano, 2008). Na základě této skutečnosti lze považovat látku za cytotoxickou, jelikož cytotoxicita inhibitorů CDKs bývá způsobena inhibicí transkripčních kinas (např. CDK7 a CDK9).

Klíčovým faktorem pro přechod z G1 do S fáze cyklu je míra fosforylace tumorového supresoru Rb proteinu (Lim a Kaldis, 2013). Snížení hladiny fosforylovaného Rb proteinu v místě S807/S811 si lze vysvětlit inhibicí CDK2 a neschopností kinasy fosforylovat protein Rb a tím ho aktivovat. Pokles hladiny Rb proteinu je také způsoben indukci apoptózy, která byla prokázána sérií experimentů uvedených níže v této práci. Je zřejmé, že pro posouzení přesné dynamiky působení inhibitorů, by bylo potřeba provádět experimenty při kratší

době ovlivnění u jedné zvolené koncentrace látek nebo obecně zvolit kratší dobu působení látek, např. 8 h nebo 16 h.

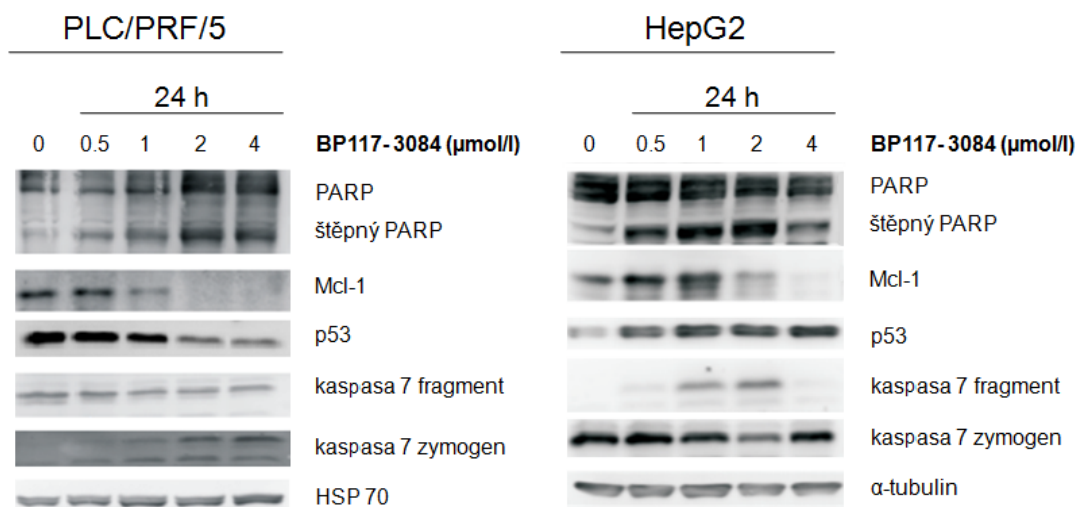
Naše dosažené výsledky se shodují s dříve dosaženými výsledky při testování roskovitinu a flavopiridolu, kdy zástava buněčného cyklu bývá spojována právě s defosforylací Rb proteinu (MacCallum a kol., 2005; Law a kol., 2015).

6.4. Imunodetekce proteinů účastnících se apoptózy

Dále byly imunoblottingem detekovány apoptotické a anti-apoptotické proteiny, a to opět u nádorových linií PLC/PRF/5 a HepG2 po 24h ovlivnění novými inhibitory kinas BP117, BP21, BP2024 a BP2025 (**obr. 19 - 22**).

Prvním testovaným inhibitorem byl BP117, který byl aplikován ve stejných koncentracích, jako v předchozích experimentech (0,5 - 4 $\mu\text{mol/l}$). U buněčné linie PLC/PRF/5 lze pozorovat trend změny v hladinách některých proteinů od první zvolené koncentrace 0,5 μM , a to konkrétně u PARP (110 kDa) a jeho štěpného fragmentu (89 kDa), jehož exprese vlivem rostoucí koncentrace látky vzrůstala (**obr. 19**). Paralelně s hladinou PARP rostla také hladina fragmentu kaspasy 7 (18 kDa). Dalším proteinem, který byl v tomto experimentu detekován, byl anti-apoptotický protein Mcl-1, jehož hladina s narůstající koncentrací látky klesala. V případě zymogenu kaspasy 7 (35 kDa) nebyla zaznamenána žádná výrazná změna exprese v ošetřených buňkách, lze pozorovat jen nepatrný pokles od koncentrace 1 μM . Posledním studovaným proteinem byl p53, kdy u linie PLC5 lze vidět pokles hladiny p53 u vyšších koncentrací látky, zatímco u HepG2 tato hladina se zvyšující se koncentrací postupně vzrůstala. U druhé buněčné linie HepG2 také došlo ke zvyšování hladiny PARP proteinu s největším signálem v koncentracích 1 - 2 μM , kdy taktéž v těchto koncentracích byla zaznamenána nejvyšší hladina aktivního fragmentu kaspasy 7 (18 kDa). Neaktivní forma kaspasy 7 - zymogen (35 kDa) zůstala po celou dobu poměrně vyrovnaná, ale v koncentraci 1 a 2 μM lze vidět pokles hladiny proteinu, což koresponduje se zvýšením hladiny fragmentu kaspasy 7 v těchto koncentracích. Následně byla detekována hladina anti-apoptotického proteinu Mcl-1, jehož hladina se naopak se zvyšující koncentrací látky začala snižovat, kdy u linie PLC/PRF/5 byla snížena v koncentraci 1 μM

a v koncentracích 2 - 4 μM nebyla vůbec detekována. U linie HepG2 byla snížena až od koncentrace 2 μM .

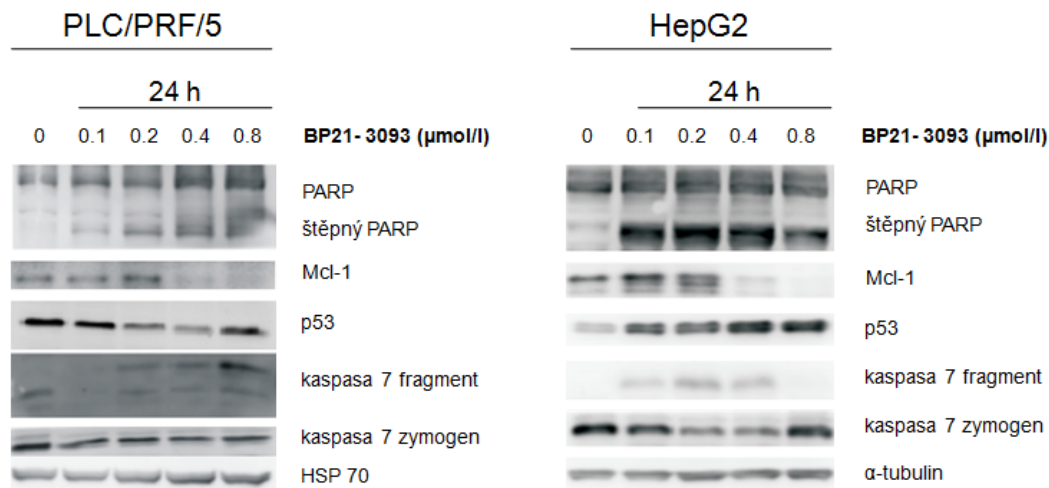


Obr. 19: Analýza exprese apoptotických proteinů provedená na hepatokarcinogenních buněčných liniích PLC/PRF/5 a HepG2 po 24h inkubaci s látkou BP117-3084 v různých koncentracích. Proteiny α -tubulin a HSP70 zde byly detekovány jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorku.

Další experiment byl proveden jako průkaz a ověření, zda testovaná látka BP21 dokáže indukovat apoptózu. Immunoblottingem byly analyzovány proteiny související s buněčnou smrtí. Koncentrace látky i v tomto případě zůstaly stejné jako u předchozích experimentů, a to 0,1 - 0,8 $\mu\text{mol/l}$ (**obr. 20**).

V našem případě byl detekován PARP (110 kDa) a jeho fragment (89 kDa), u kterých byla zaznamenána zvyšující se hladina při nárůstu koncentrace inhibitoru u obou testovaných buněčných linií. V poslední koncentraci látky 0,8 μM u linie HepG2 došlo ovšem k mírnému snížení hladiny PARP oproti předchozí koncentraci. Dále byla studována hladina inaktivní kaspasy 7 (35 kDa), která je v apoptotických buňkách proteolyticky štěpena za vzniku jejího aktivního štěpného fragmentu (18 kDa), kdy zvýšení hladiny fragmentu by mělo korelovat s hladinou štěpného PARP, což se v našem případě potvrdilo (Cohen, 1997). Exprese inaktivní formy kaspasy 7 - zymogen (35 kDa), byla u linie PLC5 vyrovnaná, ale u linie HepG2 došlo k poklesu

u dvou koncentrací 0,2 μM a 0,4 μM . Dalším proteinem, který byl stanovován, byl anti-apoptotický protein Mcl-1. Exprese tohoto proteinu výrazně klesla u obou studovaných buněčných linií od koncentrace 0,4 μM . Posledním proteinem, který byl stanovován, byl p53, kdy u linie HepG2 jde vidět jeho postupný nárůst se vzrůstající koncentrací a u linie PLC/PRF/5 vidíme přibližně vyrovnanou hladinu s poklesem v koncentracích 0,2 a 0,4 $\mu\text{mol/l}$.



Obr. 20: Analýza exprese apoptotických proteinů provedená na hepatokarcinogenní buněčné linii PLC/PRF/5 a HepG2 po 24h inkubaci s látkou BP21-3093 v různých koncentracích. Proteiny α -tubulin a HSP70 zde byly detekovány jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorku.

Látka BP2024 byla také testovaná a byl zjišťován její vliv na indukci buněčné smrti. K analýze byly vybrány proteiny ze skupin jak pro-apoptotických, tak anti-apoptotických. Inhibitor byl na buňky aplikován v koncentraci 0,25 - 2 $\mu\text{mol/l}$ (**obr. 21**).

Celkově byly studovány hladiny 6 proteinů u dvou buněčných linií PLC/PRF/5 a HepG2, jako u ostatních látek. U první zmíněné linie lze pozorovat postupný nárůst štěpného fragmentu PARP (89 kDa), který vzniká po rozštěpení celkového PARP proteinu (110 kDa) kaspasou 7. U linie HepG2 také dochází ke zvýšení hladiny štěpného PARP fragmentu kromě poslední, nejvyšší koncentrace látky 2 $\mu\text{mol/l}$, kdy lze vidět stejnou hladinu proteinu jako u kontroly. Hladina Mcl-1 jako anti-apoptotického proteinu se, se vzrůstající

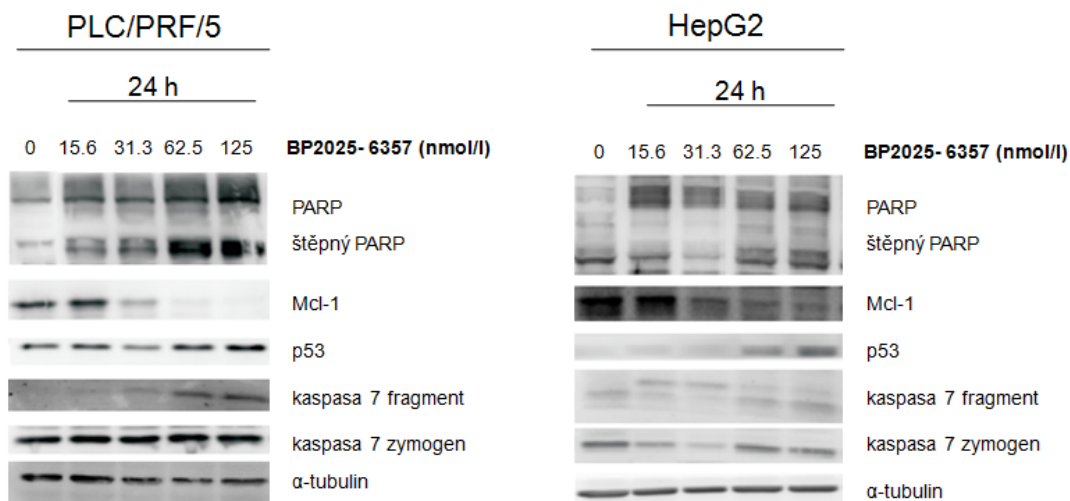
koncentrací látky, postupně snižovala, jak šlo předpokládat. U obou testovaných buněčných linií lze vidět nárůst hladiny u fragmentu kaspasy 7 (18 kDa) od koncentrace 0,25 - 1 μM a hladinu neaktivního zymogenu kaspasy 7 (35 kDa) celkem vyrovnanou, až na mírný pokles u linie HepG2 v 0,5 μM koncentraci. Protein p53 byl ve všech koncentracích u linie PLC5 vyrovnaný a u HepG2 došlo k jeho nárůstu oproti kontrolnímu vzorku s maximální intenzitou v koncentraci 1 μM .



Obr. 21: Analýza exprese apoptotických proteinů provedená na hepatokarcinogenní buněčné linii PLC/PRF/5 a HepG2 po 24h inkubaci s látkou BP2024-6358 v různých koncentracích. Protein α -tubulin zde byl detekován jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorku.

Inhibitor BP2025 byl zkoumán také kvůli zjištění jeho vztahu k apoptóze. Koncentrace byly zvoleny v nejnižších koncentracích 15,6 - 125 nM (**obr. 22**). Při detekci hladiny proteinu PARP (110 kDa) a jeho štěpného fragmentu (89 kDa), došlo u obou buněčných linií ke zvyšování hladiny PARP už od první zvolené koncentrace látky BP2025. Oproti tomu, při detekci proteinu Mcl-1 docházelo k postupnému poklesu hladiny proteinu v buňce především od koncentrace 31,3 nM testované sloučeniny (**obr. 20**). Dalším proteinem, který byl detekován, byla kaspasa 7 v neaktivní formě zymogenu (35 kDa) a jeho aktivní fragment (18 kDa). Výskyt těchto proteinů souvisí se štěpením PARP proteinu na jeho aktivní fragment a lze tedy pozorovat trend

rovnoměrného nárůstu hladin u štěpného PARP proteinu se současným nárůstem hladiny u aktivního fragmentu kaspasy 7 (18 kDa). Expze proteinu p53 byla u linie HepG2 v posledních dvou koncentracích inhibitoru zvýšená, což v tomto případě platí i pro linii PLC/PRF/5.



Obr. 22: Analýza expze apoptotických a anti-apoptotických proteinů, provedená na hepatokarcinogenní buněčné linii PLC/PRF/5 a HepG2 po 24h inkubaci s látkou BP2025-6357 v různých koncentracích. Protein α -tubulin zde byl detekován jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorku.

PARP je protein, který se v buňkách účastní jak reparací poškozené DNA tak apoptotických procesů, kdy dokáže navodit programovanou buněčnou smrt. PARP je častým apoptotickým markerem, který se stanovuje, protože je součástí vnitřní apoptotické kaskády a pokud je tedy indukována apoptóza, hladina PARP proteinu v buňkách vzrůstá, tak jako tomu bylo v našem případě. Některé enzymy jako kaspasy a katepsiny umí PARP štěpit, za vzniku fragmentu, který díky tomu můžeme detekovat (Gobeil a kol., 2001). V našem případě byl PARP štěpen pomocí kaspas, jelikož velikost fragmentu byla 89 kDa, což je typické při štěpení kaspasou. Dále byla pro průkaz detekována hladina kaspasy 7 - její aktivní formy (fragment), tak zymogenu. Výsledkem byl stejný průběh nárůstu a poklesu hladiny fragmentu kaspasy 7 (18 kDa) jako u PARP proteinu. Aktivní fragment kaspasy 7 je detekován pouze v případě spuštění apoptotické dráhy, čímž byla potvrzena indukce apoptózy testovanými inhibitory (Cohen, 1997).

Mcl-1 se řadí mezi anti-apoptotické proteiny a jeho snížení v buňce potvrdilo výsledek při detekci pro-apoptotických proteinů, kterým byla indukce apoptózy vlivem inhibice transkripčních CDKs. Protein Mcl-1 má krátký poločas rozpadu, a dochází k jeho časně degradaci. Při blokaci transkripce nedochází k tvorbě nového proteinu, proto můžeme brzy pozorovat pokles jeho hladiny v buňce (Polier a kol., 2011; Tong a kol., 2017). Transkripce byla zastavena z důvodu inhibice transkripčních kinas (CDK7/9) testovanými inhibitory (Gojo a kol., 2002). V návaznosti na tuto skutečnost bylo v minulosti prokázáno, že podstatou protinádorového účinku známých inhibitorů kinas - flavopiridol, BP-14, BA-12, je právě inhibice CDK7 a CDK9 (Gucký a kol., 2013, Haider a kol., 2013).

Posledním studovaným proteinem byl p53, který spojuje jak transkripční procesy, tak proces apoptózy. Díky inhibici transkripce dochází k poklesu hladiny proteinu MDM-2, který má krátký poločas rozpadu a v buňkách zastává funkci negativního regulátoru p53 (Kryštof a kol., 2006). Na základě toho byl pozorován rapidní nárůst hladiny p53 a jeho kumulace v buňkách s postupným zvýšením koncentrací inhibitorů především u linie HepG2. U druhé linie k tomuto trendu nedošlo a naopak jsme mohli pozorovat vyrovnané hladiny po celou dobu, případně snížení hladin p53 v některých koncentracích. Tento rozdíl mezi dvěma testovanými liniemi neznamenal rozdíl v účinku inhibitorů na dané linie, nýbrž byl způsoben mutací v genu kódující p53 u linie PLC/PRF/5, jak bylo popsáno v kapitole metody (Puisieux a kol., 1993). Protein p53 je tedy nepřímým důsledkem bloku transkripce (Kryštof a Uldrijan, 2010). Tento výsledek koreluje s výsledkem při analýze buněčného cyklu, kdy při použití dvou různých metod byl potvrzen stejný účinek testovaných inhibitorů na navození apoptózy a také byl potvrzen inhibiční účinek látek na transkripční kinasy.

Při detekci těchto proteinů bylo dosaženo obdobných výsledků, jako při testování selektivního inhibitoru SNS-032 v práci Chen a kol. z roku 2009, kdy důvodem apoptózy byla inhibice transkripčních CDKs, jako tomu bylo i v našem případě.

7. Závěr

S využitím několika nezávislých metod byl studován účinek čtyř nových inhibitorů cyklin-dependentních kinas BP117, BP21, BP2024 a BP2025 na buněčné linie PLC/PRF/5 a HepG2 odvozené od hepatocelulárního karcinomu. Všechny látky byly strukturně odvozené od roskovitinu, který se řadí mezi 2,6,9 - trisubstituované puriny.

Pomocí průtokové cytometrie i imunoanalýzy vybraných proteinů lze potvrdit výrazné proapoptotické účinky všech testovaných sloučenin, které sílily se zvyšující se koncentrací látek. Nejlepší účinky, byly zaznamenány u poslední testované látky BP2025 nejen vzhledem k použité nízké koncentraci inhibitoru (15,6 - 125 nM), ale zároveň i díky pozorovaným konzistentním biologickým účinkům přesně závislých na koncentraci inhibitoru, které naopak chyběly u ostatních látek. Dále byly imunoblottingem analyzovány proteiny účastníci se regulace buněčného cyklu a procesu transkripce, kdy u obou testovaných buněčných linií došlo k poklesu hladin celkové RNAPol. II i její fosforylované formy v místě S2, což je typické pro inhibici CDK9. Dále byla detekována exprese Rb proteinu a také jeho fosforylované formy v místě S807/S811, kdy lze předpokládat inhibici CDK2, protože došlo k typickému poklesu hladiny fosforylovaného Rb proteinu v místě S807/S811. Cyklin-dependentní kinasa 2 fosforyluje právě zmíněný Rb protein a umožní tak přechod buňky z G1 fáze do S fáze. V tomto případě se tak neděje a buňka nepokračuje v dělení a v růstu. Při detekci apoptotických proteinů bylo prokázáno, že všechny testované inhibitory CDKs mají schopnost indukovat apoptózu. Tento fakt byl potvrzen také v případě analýzy buněčného cyklu průtokovým cytometrem, tedy dvěma nezávislými metodami, kdy se vzrůstající koncentrací inhibitorů rapidně stoupl počet buněk v subG1 fázi, čili v apoptóze.

Do budoucna by bylo dobré otestovat látky podrobněji a zjistit jejich přesný mechanismus účinku na nádorové buněčné linie a také otestovat jejich cytotoxicitu na primárních hepatocytech. Dále by se mohlo přejít k podrobnému testování *in vivo* na myších modelech s lidskými nádorovými xenografty, kdy nedávno byly zahájeny první takové testy našich inhibitorů ve spolupráci s laboratoří ve Vídni a prozatimní dosažené výsledky ukazují dobrý efekt inhibitorů v boji proti hepatocelulárnímu karcinomu.

Seznam použité literatury

Aller, S.G.; Yu, J.; Ward, A.; Weng, Y.; Chittaboina, S.; Zhuo, R.; Harrell, P.M.; Trinh, Y.T.; Zhang, Q.; Urbatsch, I.L.; Chang, G. 2009. Structure of P-glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding. *Science*. 323(5922), 1718-1722.

Asghar, U.; Witkiewicz, A.K.; Turner, N.C.; Knudsen, E.S. 2015. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 14(2), 130-146.

Aspeshlagh, S.; Shailubhai, K.; Bahleda, R. a kol. 2017. Phase I dose-escalation study of Milciclib in combination with gemcitabine in patients with refractory solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 79, 1257-1265.

Bettayeb, K.; Baunbæk, D.; Delehouze, C.; Loaëc, N.; Hole, A.J.; Baumli, S.; Endicott, J.A. a kol. 2010. CDK Inhibitors Roscovitine and CR8 Trigger Mcl-1 Down-Regulation and Apoptotic Cell Death in Neuroblastoma Cells. *Genes Can.* 1(4), 369-380.

Bhoori, S.; Schiavo, M.; Russo, A.; Mazzaferro, V. 2007. First-line treatment for hepatocellular carcinoma: resection or transplantation? *Transplant. Proc.* 39, 2271-2273.

Biden, K.; Young, J.; Buttenshaw, R.; Searle, J.; Cooksley, G.; Xu, D.B.; Leggett, B. 1997. Frequency of mutation and deletion of the tumor suppressor gene CDKN2A (MTS1/p16) in hepatocellular carcinoma from an Australian population. *Hepatology.* 25, 593-597.

Bisteau, X.; Caldez, M.J.; Kaldiz, P. 2014. The Complex Relationship between Liver Cancer and the Cell Cycle: A Story of Multiple Regulations. *Cancers.* 6, 79-111.

Bollard, J.; Miguela, V.; Ruiz de Gallareta, M.; Venkatesh, A., Bian, C.B.; Roberto, M.P. a kol. **2017**. Palbociclib (PD-0332991), a selective CDK4/6 inhibitor, rescripts tumour growth in preclinical models of hepatocellular carcinoma. *Gut*. 66(7), 1286-1296.

Borzio, M.; Bruno, S.; Roncalli, M.; Mels, G.C.; Ramella, G.; Borzio, F.; Leandro, G.; Servida, E.; Podda, M. **1995**. Liver cell dysplasia is a major risk factor for hepatocellular carcinoma in cirrhosis: A prospective study. *Gastroent*.108, 812-817.

Breuhahn, K.; Longrich, T.; Schirmacher, P. **2006**. Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*.25, 3787-3800.

Bruix, J. **2011**. Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology*. 53, 1020-1022.

Brůha, R.; Šperl, J.; Urbánek, P.; Špičák, J.; Kiss, I.; Válek, V.; Mejzlík, V.; Oliverius, M.; Honsová, E.; Husa, P. **2012**. Doporučený postup pro léčbu a diagnostiku hepatocelulárního karcinomu. *Gastroent. Hepatol*. 66(2), 83-92.

Bupathi, M.; Kaseb, A.; Meric-Bernstam, F.; Naing, A. **2015**. Hepatocellular carcinoma: Where there is unmet need. *Mol. Oncol*. 9, 1501-1509.

Cai, D.; Latham, V.M.; 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, 9270-9280.

Cao, L.; Chen, F.; Yang, X.; Xu, W.; Xie, J.; Yu, L. **2014**. Phylogenetic analysis of CDK and cyclin proteins in premetazoan lineages. *BioMed Central Evolutionary Biol*. 14, 10.

Carnero, A. **2002**. Targeting the cell cycle for cancer therapy. *Br. J. Cancer*. 87, 129-133.

Cervello, M.; Bachvarov, D.; Lampiasi, N.; Cusimano, A.; Azzolina, A.; McCubrey, J.A.; Montalto, G. **2012**. Molecular mechanisms of sorafenib action in liver cancer cells. *Cell Cycle*. 11, 2843-2855.

Cohen, G. M. **1997**. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326(1), 116.

Dawson, S.; Higashitsuji, H.; Wilkinson, A.J.; Fujita, J.; Mayer, R.J. **2006**. Gankyrin: A new oncoprotein and regulator of pRb and p53. *Trends Cell Biol.* 16, 229-233.

Delis, S.; Bramis, I.; Triantopoulou, C.; Madariaga, J.; Dervenis, C. **2006**. The imprint of radiofrequency in the management of hepatocellular carcinoma. *HPB (Oxford)*. 8(4), 255-263.

Diril, M.K.; Ratnacaram, C.K.; Padmakumar, V.C.; Du, T.; Wasser, M.; Coppola, V.; Tessarollo, L.; Kaldis, P. **2012**. Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) is essential for cell division and suppression of DNA re-replication but not for liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 109, 3826-3831.

Ehrlich, S.M.; Liebl, J.; Ardelt, M.A.; Lehr, T.; De Toni, E.N.; Mayr, D.; Brandl, L.; Kirchner, T.; Zahler, S.; Gerbes, A.L.; Vollmar, A.M. **2015**. Targeting cyclin dependent kinase 5 in hepatocellular carcinoma - A novel therapeutic approach. *J. Hepatol.* 63, 102-113.

El-Serag, H.B. **2011**. Hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 365, 1118-1127.

El-Serag, H.B.; Rudolph, K.L. **2007**. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroent.* 132, 2557-2576.

Fabbro, D.; Cowan-Jacob, S.W.; Moebitz, H. **2015**. Ten things you should know about protein kinases: IUPHAR Review 14. *Br. J. Pharmacol.* 172, 2675-2700.

Fukuda, M.; Kawahara, Y.; Hirota, T.; Akizuki, S.; Murakami, S.; Nakajima, H.; Ieiri, I.; Ohnishi, I. **2010**. Genetic Polymorphisms of Hepatic ABC-Transporter in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *J. of Cancer Therapy*. 1, 114-123.

Galons, H.; Oumata, N.; Meijer, L. **2010**. Cyclin-dependent kinase inhibitors: a survey of recent patent literature. *Exp.Opinion on Therap. Pat. Review*. 20, 377-404.

Gentric, G.; Desdouets, C.; Celton-Morizur, S. **2012**. Hepatocytes Polyploidization and Cell Cycle Control in Liver Physiopathology. *Int. J. of Hepatology*. Article ID 282430, 8 pages.

Gobeil, S.; Boucher, C. C.; Nadeau, D.; Poirier, G. G. **2001**. Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases. *Cell Death Differ*. 8(6), 588-594.

Gojo, I.; Zhang, B.; Fenton, R.G. **2002**. The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol induces apoptosis in multiple myeloma cells through transcriptional repression and down-regulation of Mcl-1. *Clin. Cancer Res*. 8(11), 3527-3538.

Golfieri, R.; Bilbao, J.I.; Carpanese, L.; Cianni, R.; Gasparini, D.; Ezziddin, S.; Paprottka, P.M.; Fiore, F.; Cappelli, A.; Rodriguez, M.; Ettorre, G.M.; Saltarelli, A.; Geatti, O.; Ahmadzadehfar, H.; a kol. **2013**. Comparison of the survival and tolerability of radioembolization in elderly vs. younger patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol*. 59, 753-761.

Golfieri, R.; Cappelli, A.; Cucchetti, A.; Piscaglia, F.; Carpenzano, M.; Peri, E.; Ravaioli, M.; D'Errico-Grigioni, A.; Pinna, A.D.; Bolondi, L. **2011**. Efficacy of selective transarterial chemoembolization in inducing tumor necrosis in small (< 5 cm) hepatocellular carcinomas. *Hepatology*. 53, 1580-1589.

Gucký, T.; Jorda, R.; Zatloukal, M.; Bazgier, V.; Berka, K.; Řezníčková, E.; Béres, T.; Strnad, M.; Kryštof, V. **2013**. A novel series of highly potent 2,6,9-

trisubstituted purinecyclin-dependent kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* 56, 6234-6247.

Haider, C.; Grubinger, M.; Rezníková, E.; a kol. **2013**. Novel inhibitors of Cyclin-dependent kinases combat Hepatocellular Carcinoma without Inducing Chemoresistance. *Mol. Cancer Ther.* 12, 1947-1957.

Hanahan, D.; Weinberg, R.A. **2011**. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 144, 646-674.

Huang, C.H.; Lujambio, A.; Zuber, J.; Tschaharganeh, D.F.; Doran, M.G.; Evans, M.J. a kol. **2014**. CDK9-mediated transcription elongation is required for MYC addiction in hepatocellular carcinoma. *Genes&Develop.* 28, 1800-1814.

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, 4637-4645.

Cheng, A.; Kang, Y.; Lin, D.; Park, J.; Kudo, M.; Qin, S.; Omata, M.; Lowenthal, S.W.; Lanzaone, S.; Yang, L.; Lechuga, M.; Raymond, E. a SUN1170 HCC Study Group. **2011**. Phase III trial of sunitinib (Su) versus sorafenib (So) in advanced hepatocellular carcinoma (HCC). *J. Clin. Oncol.* 29, Sup. 15, 4000.

Chiang, D.Y.; Villanueva, A.; Hoshida, Y.; Peix, J.; Newell, P.; Minguez, B.; LeBlanc, A.C.; Donovan, D.J.; Thung, S.N.; Solé, M.; Tovar, V.; Alsinet, C.; Ramos, A.H.; Barretina, J. a kol. **2008**. Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 68, 6779-6788.

Chipumuro, E.; Marco, E.; Christensen, C.L. a kol. **2014**. CDK7 inhibition suppresses super-enhancer-linked oncogenic transcription in MYCN-driven cancer. *Cell.* 159, 1126-1139.

Cho, S.J.; Kim, Y.J.; Surh, Y.J.; Kim, B.M.; Lee, S.K. 2011. Ibulocydine is a novel prodrug Cdkinhibitor that effectively induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 286, 19662-19671.

Cho, S.J.; Lee, S.S.; Kim, Y.J.; Park, B.D.; Choi, J.S.; Liu, L.; Ham, Y.M.; Moon Kim, B.; Lee, S.K. 2010. Xylocydine, a novel Cdk inhibitor, is an effective inducer of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *Cancer Lett.* 287, 196-206.

Cho, Y.K.; Kim, J.K.; Kim, M.Y.; Rhim, H.; Han, J.K. 2009. Systematic review of randomized trials for hepatocellular carcinoma treated with percutaneous ablation therapies. *Hepatology.* 49, 453-459.

Joo, M.; Kang, Y.K.; Kim, M.R.; Lee, H.K.; Jang, J.J. 2001. Cyclin D1 overexpression in hepatocellular carcinoma. *Liver.* 21, 89-95.

Kaiser, K.; Mallick, R.; Butt, Z.; Mulcahy, M.F.; Benson, A.B.; Cella, D. 2014. Important and relevant symptoms including pain concerns in hepatocellular carcinoma (HCC): a patient interview study. *Supp. Care Cancer.* 22(4), 919-926.

Kim, H.E.; Kim, D.G.; Lee, K.J.; Son, J.G.; Song, M.Y.; Park, Y.M.; Kim, J.J.; Cho, S.W.; Chi, S.G.; Cheong, H.S.; Shin, H.D.; Lee, S.W.; Lee, J.K. 2012. Frequent amplification of CENPF, GMNN and CDK13 genes in hepatocellular carcinomas. *PLoS One.* 7, e43223.

Knockaert, M.; Greengard, P.; Meijer, L. 2002. Pharmacological inhibitors of cyclindependent kinases. *Trends Pharm. Sci.* 23, 417-425.

Kryštof, V.; Cankar, P.; Frysová, I.; Slouka, J.; Kontopidis, G.; Dzubák, P.; Hajdúch, M.; Srovnal, J.; de Azevedo, W. F. Jr; Orság, M.; Paprskárová, M.; Rolcík, J.; Látr, A.; Fischer, P. M.; Strnad, M. 2006. 4-arylazo-3,5-diamino-1H-pyrazole CDK inhibitors: SAR study, crystal structure in complex with CDK2, selectivity, and cellular effects. *J. Med. Chem.* 49(22), 65009.

Kryštof, V.; Uldrijan, S. **2010.** Cyclin-dependent kinase inhibitors as anticancer drugs. *Curr. Drug Targets.* 11, 291-302.

Law, M.E.; Corsino, P.E.; Narayan, S.; Law, B.K. **2015.** Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors as Anticancer Therapeutics. *Mol. Pharmacology.* 88(5), 846-852.

Leung, W.K.; Ching, A.K.; Chan, A.W.; Poon, T.C.; Mian, H.; Wong, A.S.; To, K.F.; Wong, N. **2011.** A novel interplay between oncogenic PFTK1 protein kinase and tumor suppressor TAGLN2 in the control of liver cancer cell motility. *Oncogene.* 30, 4464-4475.

Lim, S.; Kaldis, P. **2013.** Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development.* 140(15), 307993.

Lin, C.P.; Liu, C.R.; Lee, C.N.; Chan, T.S.; Liu, H.E. **2010.** Targeting c-Myc as a novel approach for hepatocellular carcinoma. *World J. Hepatol.* 2, 16-20.

Littman, S.J.; Knudsen, E.S.; Witkiewicz, A.; Mitchell, E.P. a kol. **2013.** A phase II study of PD-0332991 in patients with advanced hepatocellular cancer. *J. Clin. Oncology.* 31(4), 321.

Livraghi, T.; Meloni, F.; Di Stasi, M.; Rolle, E.; Solbiati, L.; Tinelli, C.; Rossi, S. **2008.** Sustained complete response and complications rates after radiofrequency ablation of very early hepatocellular carcinoma in cirrhosis: Is resection still the treatment of choice? *Hepatology.* 47, 82-89.

Llovet, J.M.; Ricci, S.; Mazzaferro, V.; Hilgard, P.; Gane, E.; Blanc, J.F.; de Oliveira, A.C.; Santoro, A.; Raoul, J.L.; Forner, A.; Schwartz, M.; Porta, C.; Zeuzem, S.; Bolondi, L.; Greten, T.F.; Galle, P.R. a kol. **2008.** Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 359, 378-390.

MacCallum, D. E.; Melville, J.; Frame, S.; Watt, K.; Anderson, S.; Gianella-Borradori, A.; Green, S. R. **2005.** Seliciclib (CYC202, R-Roscovitine) induces

cell death in multiple myeloma cells by inhibition of RNA polymerase II-dependent transcription and down-regulation of Mcl-1. *Cancer Research*. 65(12), 5399-5407.

Malumbres, M. 2014. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology*. 15, 122.

Masaki, T.; Shiratori, Y.; Rengifo, W.; Igarashi, K.; Yamagata, M.; Kurokohchi, K.; Uchida, N.; Miyauchi, Y.; Yoshiji, H.; Watanabe, S.; Omata, M.; Kuriyama, S. **2003.** Cyclins and cyclin-dependent kinases: comparative study of hepatocellular carcinoma versus cirrhosis. *Hepatology*. 37, 534-543.

Matsui, O.; Kadoya, M.; Yoshikawa, J.; Gabata, T.; Arai, K.; Demachi, H. a kol. **1993.** Small hepatocellular carcinoma: treatment with subsegmental transcatheter arterial embolization. *Radiology*. 188, 79-83.

Mazzaferro, V.; Bhoori, S.; Sposito, C.; Bongini, M.; Langer, M.; Miceli, R.; Mariani, L. **2011.** Milan criteria in liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an evidence-based analysis of 15 years of experience. *Liver Transpl*. 17(2), 44-57.

Mazzaferro, V.; Sposito, C.; Bhoori, S.; Romito, R.; Chiesa, C.; Morosi, C.; Maccauro, M.; Marchianò, A.; Bongini, M.; Lanocita, R.; Civelli, E.; Bombardieri, E.; Camerini, T.; Spreafico, C. **2013.** Yttrium-90 radioembolization for intermediate-advanced hepatocellular carcinoma: a phase 2 study. *Hepatology*. 57, 1826-1837.

McGlynn, K.A.; London, W.T. **2005.** Epidemiology and natural history of hepatocellular carcinoma. *Best Pract. Res. Clin. Gastroent*. 19, 3-23.

Misra, R.N.; Xiao, H.Y.; Williams, D.K.; Kim, K.S.; Lu, S.; Keller, K.A.; Mulheron, J.G.; a kol. **2004.** Synthesis and biological activity of N-aryl-2-aminothiazoles: potent pan inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 14(11), 2973-2977.

Morimoto, M.; Numata, K.; Kondou, M.; Nozaki, A.; Morita, S.; Tanaka, K. **2010**. Midterm outcomes in patients with intermediatesized hepatocellular carcinoma: a randomized controlled trial for determining the efficacy of radiofrequency ablation combined with transcatheter arterial chemoembolization. *Cancer*.116, 5452-5460.

Nakamura, T.; Iwamura, Y.; Kaneko, M.; Nakagawa, K.; Kawai, K.; Mitamura, K.; Futagawa, T.; Hayashi, H. **1991**. Deletions and rearrangements of the retinoblastoma gene in hepatocellular carcinoma, insulinoma and some neurogenic tumors as found in a study of 121 tumors. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 21, 325-329.

Nelsen, C.J.; Kuriyama, R.; Hirsch, B.; Negron, V.C.; Lingle, W.L.; Goggin, M.M.; Stanley, M.W.; Albrecht, J.H. **2005**. Short term cyclin D1 overexpression induces centrosome amplification, mitotic spindle abnormalities, and aneuploidy. *J. Biol. Chem.* 280, 768-776.

Nishida, N.; Goel, A. **2011**. Genetic and epigenetic signatures in human hepatocellular carcinoma: A systematic review. *Curr. Genomics*.12, 130.

Parekh, P.; Rao, K. **2007**. Overexpression of cyclin D1 is associated with elevated levels of MAP kinases, Akt and Pak1 during diethylnitrosamine-induced progressive liver carcinogenesis. *Cell Biol. Int.* 31, 35-43.

Park, J.W.; Finn, R.S.; Kim, J.S.; Karwal, M.; Li, R.K.; Ismail, F.; Thomas, M.; Harris, R.; Baudalet, C.; Walters, I.; Raoul, J.L. **2011**. Phase II, open-label study of brivanib as first-line therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 17, 1973-1983.

Payton, M.; Chung, G.; Yakowec, P.; Wong, A.; Powers, D.; Xiong, L.; Zhang, N.; Leal, J.; Bush, T.L.; Santora, V.; Askew, B.; Tasker, A.; Radinsky, R.; Kendall, R.; Coats, S. **2006**. Discovery and evaluation of dual CDK1 and CDK2 inhibitors. *Cancer Res.* 66, 4299-4308.

Pez, F.; Lopez, A.; Kim, M.; Wands, J.R.; de Fromental, C.; Merle, P. **2013.** Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: Molecular targets for the development of innovative anticancer drugs. *J. Hepatol.*59, 1107-1117.

Polier, G.;Ding, J.; Konkimalla, B.V.; Eick, D.; Ribeiro, N.; Köhler, R.; Giaisi, M.; Efferth, M.; Desaubry, L.; Krammer, P.H.; Li-Weber, M. **2011.** Wogonin and related natural flavones are inhibitors of CDK9 that induce apoptosis in cancer cells by transcriptional suppression of Mcl-1. *Cell Death Dis.* 2(7), e182.

Puisieux, A.; Galvin, K.; Troalen, F.; Bressac, B.; Marçais, C.; Galun, E. a kol. **1993.** Retinoblastoma and p53 tumor suppressor genes in human hepatomacell lines. *FASEB J.* 7, 1407-1413.

Raza, A.; Sood, G.K. **2014.** Hepatocellular carcinoma review: Current treatment, and evidence-based medicine. *World J. of Gastroent.* 20(15), 4115-4127.

Romano, G.; Giordano, A. **2008.** Role of the cyclin-dependent kinase 9-related pathway in mammalian gene expression and human diseases. *Cell Cycle.* 7(23), 36648.

Rivadeneira, D.B.; Mayhew, C.N.; Thangavel, C.; Sotillo, E.; Reed, C.A.; Graña, X.; Knudsen, E.S. **2010.** Proliferative suppression by CDK4/6 inhibition: Complex function of the retinoblastoma pathway in liver tissue and hepatoma cells. *Gastroent.* 138, 1920-1930.e2.

Ruzzenente, A.; Valdegamberi, A.; Campagnaro, T.; Conci, S.; Pachera, S.; Iacono, C.; Guglielmi, A. **2011.** Hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients with portal hypertension: is liver resection always contraindicated? *World J. Gastroenterol.*17, 5083-5088.

Sala, M.; Llovet, J.M.; Vilana, R.; Bianchi, L.; Solé, M.; Ayuso, C. a kol. **2004.** Initial response to percutaneous ablation predicts survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 40, 1352-1360.

Salem, R.; Lewandowski, R.J.; Mulcahy, M.F.; Riaz, A.; Ryu, R.K.; Ibrahim, S.; Atassi, B.; Baker, T.; Gates, V.; Miller, F.H.; Sato, K.T. a kol. **2010**. Radioembolization for hepatocellular carcinoma using Yttrium-90 microspheres: a comprehensive report of long-term outcomes. *Gastroent.* 138, 52-64.

Santoro, A.; Rimassa, L.; Borbath, I.; Daniele, B.; Salvagni, S.; Van Laethem, J.L.; Van Vlierberghe, H.; Trojan, J. a kol. **2013**. Tivantinib for second-line treatment of advanced hepatocellular carcinoma: a randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet. Oncol.* 14, 55-63.

Shachaf, C.M.; Kopelman, A.M.; Arvanitis, C.; Karlsson, A.; Beer, S.; Mandl, S.; Bachmann, M.H.; Borowsky, A.D.; Ruebner, B.; Cardiff, R.D.; a kol. **2004**. MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer. *Nature.* 431, 1112-1117.

Shapiro, G.I. **2006**. Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *J. Clin. Oncol.* 24, 1770-1783.

Shi, X.N.; Li, H.; Yao, H.; Liu, X.; Li, L.; Leung, K.S.; Kung, H.F.; Lu, D.; Wong, M.H.; Lin, M.C. **2015**. In Silico Identification and In Vitro and In Vivo Validation of Anti-Psychotic Drug Fluspirilene as a Potential CDK2 Inhibitor and a Candidate Anti-Cancer Drug. *PLoS One.* 10(7), e0132072.

Shibata, T.; Iimuro, Y.; Yamamoto, Y.; Maetani, Y.; Ametani, F.; Itoh, K. a kol. **2002**. Small hepatocellular carcinoma: comparison of radio-frequency ablation and percutaneous microwave coagulation therapy. *Radiology.* 223, 331-337.

Schlaeger, C.; Longerich, T.; Schiller, C.; Bewerunge, P.; Mehrabi, A.; Toedt, G.; Kleeff, J.; Ehemann, V.; Eils, R.; Lichter, P.; a kol. **2008**. Etiology-dependent molecular mechanisms in human hepatocarcinogenesis. *Hepatology.* 47, 511-520.

Sobin, L.H.; Gospodarowicz, M.K.; Wittekind, Ch. TNM Classification of malignant tumours[online]. Seventh Edition. The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, PO19 8SQ, UK: John Wiley, 2010 [cit. 2017-12-07]. ISBN 978-80-904259-6-5.

Song, M.J.; Chun, H.J.; Song, do S.; Kim, H.Y.; Yoo, S.H.; Park, C.H.; Bae, S.H.; Choi, J.Y.; Chang, U.I.; Yang, J.M.; Lee, H.G.; Yoon, S.K. **2012**. Comparative study between doxorubicin-eluting beads and conventional transarterial chemoembolization for treatment of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 57, 1244-1250.

Syed, Y.Y. **2017**. Ribociclib: First global approval. *Drugs.* 77(7), 799-807.

Taniguchi, M. **2012**. Liver transplantation in the MELD era-analysis of the OPTN/UNOS registry. *Clin. Transpl.* 41-65.

Toh, H.C.; Chen, P.J.; Carr, B.I.; Knox, J.J.; Gill, S.; Ansell, P.; McKeegan, E.M.; Dowell, B.; Pedersen, M.; Qin, Q.; Qian, J.; Scappaticci, F.A.; Ricker, J.L.; Carlson, D.M.; Yong, W.P. **2013**. Phase 2 trial of linifanib (ABT-869) in patients with unresectable or metastatic hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 119, 380-387.

Tong, J.; Wang, P.; Tan, S.; Chen, D.; Nikolovska-Coleska, Z.; Zou, F.; Yu, J.; Zhang, L. **2017**. Mcl-1 Degradation Is Required for Targeted Therapeutics to Eradicate Colon Cancer Cells. *Cancer Res.* 77(9), 2512-2521.

Uehara, T.; Ainslie, G.R.; Kutanzi, K.; Pogribny, I.P.; Muskhelishvili, L.; Izawa, T.; Yamate, J.; Kosyk, O.; Shymonyak, S.; Bradford, B.U. a kol. **2013**. Molecular mechanisms of fibrosis-associated promotion of liver carcinogenesis. *Toxicol. Sci.* 32, 53-63.

Venook, A.P.; Papandreou, C.; Furuse, J.; de Guevara, L.L. **2010**. The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective. *Oncologist.* 15 supplement 4, 5-13.

VIZUS. Chemoterapie. Registr-hcc.cz [online]. ©2005-2017. [cit. 2017-12-18].

Wang, C.; Jin, H.; Gao, D.; Wang, L.; Evers, B. a kol. **2018**. A CRISPR screen identifies CDK7 as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Cell Resea.* 0, 1-3.

Wang, K.; Hampson, P.; Hazeldine, J.; Kryštof, V.; Strnad, M.; Pechan, P.; Lord, J.M. **2012**. Cyclin-dependent kinase 9 activity regulates neutrophil spontaneous apoptosis. *PLoSOne*. 7, e30128.

Wang, Y.; Zhang, T.; Kwiatkowski, N. a kol. **2015**. CDK7-dependent transcriptional addiction in triple-negative breast cancer. *Cell*. 163, 174-186.

Wheeler, L.W.; Lents, N.H.; Baldassare, J.J. **2008**. Cyclin A-CDK activity during G1 phase impairs MCM chromatin loading and inhibits DNA synthesis in mammalian cells. *Cell Cycle*. 7, 2179-2188.

Wong, T.C.; Lo, C.M. **2013**. Resection strategies for hepatocellular carcinoma. *Semin. Liver Dis*. 33, 273-281.

Yao, F.Y.; Kerlan, R.K.; Hirose, R.; Davern, T.J.; Bass, N.M.; Feng, S.; Peters, M.; Terrault, N.; Freise, C.E.; Ascher, N.L.; Roberts, J.P. **2008**. Excellent outcome following down-staging of hepatocellular carcinoma prior to liver transplantation: an intention-to-treat analysis. *Hepatology*. 48, 819-827.

Yue, X.; Zhang, Z.; Liang, X.; Gao, L.; Zhang, X.; Zhao, D.; Liu, X.; Ma, H.; Guo, M.; Spear, B.T. a kol. **2012**. Zinc fingers and homeoboxes 2 inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and represses expression of Cyclins A and E. *Gastroenterology*. 142, 1559-1570.e2.

Zatloukal, M.; Jorda, R.; Gucký, T.; Řezníčková, E.; Voller, J. a kol. **2013**. Synthesis and in vitro biological evaluation of 2,6,9-trisubstituted purines targeting multiple cyclin-dependent kinases. *Eur. J. Med. Chem*. 61, 61-72.

Zhong, X.Y.; Xu, X.X.; Yu, J.H.; Jiang, G.X.; Yu, Y.; Tai, S.; Wang, Z.D.; Cui, Y.F. **2012**. Clinical and biological significance of Cdk10 in hepatocellular carcinoma. *Gene*. 498, 68-74.

Zhu, A.X.; Abrams, T.A.; Miksad, R.; Blaszkowsky, L.S.; Meyerhardt, J.A.; Zheng, H.; Muzikansky, A.; Clark, J.W.; Kwak, E.L.; Schrag, D.; Jors, K.R.; Fuchs, C.S.; Iafrate, A.J.; Borger, D.R.; Ryan, D.P. **2011**. Phase 1/2 study of everolimus in advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 117, 5094-5102.

Zhu, Y.Z.; Zhu, R.; Fan, J.; Pan, Q.; Li, H.; Chen, Q.; Zhu, H.G. **2010**. Hepatitis B virus X protein induces hypermethylation of p16INK4A promoter via DNA methyltransferases in the early stage of HBV-associated hepatocarcinogenesis. *J. Viral. Hepat.* 17, 98-107.