

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

Centrum regionu Haná pro biotechnologický  
a zemědělský výzkum



**Příprava a charakterizace potenciálních inhibitorů  
heat-shock proteinu 70**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Veronika Martinková</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Václav Mik, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2014

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Veronika Martinková
Název práce	Příprava a charakterizace potenciálních inhibitorů heat-shock proteinu 70
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Václav Mik, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2014
Abstrakt	Bakalářská práce se zabývá přípravou a charakterizací potenciálních inhibitorů heat-shock proteinu 70 (Hsp70). V teoretické části je popsána jeho struktura, funkce, klinický význam a především způsoby jeho inhibice. V praktické části bylo připraveno celkem 16 látek odvozených od adeninu. U 13 z nich byla pomocí fluorescenčního polarizačního testu zjišťována míra schopnosti kompetovat s fluorescenčně značeným adenosintrifosfátem (ATP) o vazebné místo v Hsp70. Na závěr byla testována cytotoxicita připravených látek na vybraných nádorových buněčných liniích G361, MCF7 a K562.
Klíčová slova	Heat-shock protein 70, kompetitivní inhibitory, syntéza, adenosinové deriváty, biologická aktivita
Počet stran	47
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname	Veronika Martinková
Title of thesis	Synthesis and characterization of novel inhibitors of heat-shock protein 70
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Václav Mik, Ph.D.
The year of presentation	2014
Abstract	This bachelor thesis is focused on synthesis and characterization of novel heat-shock protein 70 inhibitors. In theoretical part, the knowledges about HSP70 structure, function, clinical application and its known inhibitors are summarized. In practical part, totally 16 compounds were prepared from which 13 novel inhibitors were tested in fluorescence polarization assay as well as for their cytotoxicity on selected cancer cell lines G361, MCF7, and K562.
Keywords	Heat-shock protein 70, competitive inhibitors, synthesis, adenosine derivates, biological activity
Number of pages	47
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Václava Mika, Ph.D. s použitím citované literatury.“

V Olomouci dne .....

Veronika Martinková

Děkuji především svému školiteli Mgr. Václavu Mikovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, trpělivost, vstřícnost a rady během práce v laboratoři a zejména při sepisování této práce. Dále bych ráda poděkovala celému kolektivu laboratoře organické syntézy CRH za pomoc při práci v laboratoři.

Dalšími, komu touto cestou děkuji, jsou Mgr. Radek Jorda, Ph.D. za realizaci testů na cytotoxicitu a Mgr. Michal Ďurech za provedení kompetičního inhibičního testu.

# Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD A CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>HEAT-SHOCK PROTEINY 70.....</b>	<b>12</b>
2.1	STRUKTURA HSP70.....	13
2.1.1	<i>Substrát vazebná doména .....</i>	<i>14</i>
2.1.2	<i>Nukleotid vazebná doména .....</i>	<i>15</i>
2.1.3	<i>Raménko .....</i>	<i>15</i>
2.2	ATPASOVÝ CYKLUS.....	16
2.2.1	<i>J-proteiny.....</i>	<i>17</i>
2.2.2	<i>Proteiny vyměňující nukleotidy.....</i>	<i>17</i>
2.3	INTERAKCE S DALŠÍMI KO-CHAPERONY.....	18
2.3.1	<i>HOP.....</i>	<i>18</i>
2.3.2	<i>HIP.....</i>	<i>19</i>
2.3.3	<i>CHIP .....</i>	<i>19</i>
2.4	KLINICKÝ VÝZNAM.....	20
2.4.1	<i>Rakovina.....</i>	<i>20</i>
2.4.2	<i>Neurologická onemocnění.....</i>	<i>20</i>
<b>3</b>	<b>INHIBICE HEAT-SHOCK PROTEINU 70 .....</b>	<b>21</b>
3.1	INHIBITORY SUBSTRÁT VAZEBNÉ DOMÉNY .....	21
3.2	LÁTKY MIMIKUJÍCÍ SUBSTRÁT .....	21
3.2.1	<i>2-fenylethynsulfonamid .....</i>	<i>21</i>
3.3	INHIBITORY NUKLEOTID VAZEBNÉ DOMÉNY .....	21
3.3.1	<i>NSC 630668-R/1.....</i>	<i>21</i>
3.3.2	<i>MKT-077.....</i>	<i>22</i>
3.3.3	<i>Sulfoglykolipidy .....</i>	<i>22</i>
3.3.4	<i>Inhibitory s flavonoidní strukturou.....</i>	<i>22</i>
3.3.5	<i>Látky mimikující ATP.....</i>	<i>23</i>
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>26</b>
4.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	26
4.2	METODY .....	26
4.3	SYNTÉZA .....	27
4.3.1	<i>8-bromadenosin (1).....</i>	<i>27</i>
4.3.2	<i>C8 substituce – obecný postup (2-11).....</i>	<i>28</i>
4.3.3	<i>9-(2-hydroxyethyl)adenin (12) .....</i>	<i>32</i>

4.3.4	8-brom-9-(2-hydroxyethyl)adenin (13)	33
4.3.5	8-benzylamino-9-(2-hydroxyethyl)adenin (14)	34
4.3.6	8-benzylaminoadenin (15)	34
4.3.7	8-(2-fenylethylamino)adenosin (16)	35
4.4	BIOLOGICKÁ AKTIVITA	36
4.4.1	Fluorescenční polarizační test	36
4.4.2	Kompetiční test	36
4.4.3	Cytotoxicita na vybraných buněčných liniích	37
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b>	<b>37</b>
5.1	SYNTÉZA	38
5.2	BIOLOGICKÁ AKTIVITA	40
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA</b>	<b>43</b>

## Seznam použitých zkratk

ADP	adenosindifosfát
app. bt	vypadá jako široký triplet
AMK	aminokyselina
ATP	adenosintrifosfát
Bag	athanogen asociovaný s Bcl2
bd	široký dublet
BiP	protein vážící imunoglobuliny (binding imunoglobulin protein)
bs	široký singlet
d	dublet
dd	dublet dubletu
DCM	dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N'</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
ekv.	ekvivalent
ESI <sup>+</sup> -MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem v pozitivním módu
Et <sub>2</sub> O	diethylether
EtOAc	ethyl-acetát
EtOH	ethanol
FAM	karboxyfluorescein
FP	fluorescenční polarizace
G361	buněčná linie maligního melanomu
HIP	protein interagující s Hsc70 (Hsc70-interacting protein)
HOP	protein zprostředkovávající interakci mezi Hsp70 a Hsp90 (Hsp70/Hsp90 organizing protein)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
Hsc	heat-shock cognate protein
Hsp	protein teplotního šoku (heat-shock protein)
CHIP	protein interagující s C-koncem Hsp70
<i>J</i>	interakční konstanta
K562	buněčná linie chronické myeloidní leukemie
m	multiplet
MeOH	methanol
MCF7	buněčná linie adenokarcinomu prsu



NEF	protein vyměňující nukleotidy (nukleotid exchange factor)
NVD	nukleotid vazebná doména
MR	mikrovlnný reaktor
NMR	nukleární magnetická rezonance
PDB	proteinová data banka
PE	petrolether
ppm	parts per milion
q	kvartet
s	singlet
SHR	receptor pro steroidní hormon
SVD	substrát vazebná doména
t	triplet
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
TPR	tetratrikopeptidová sekvence
UV/VIS	ultrafialová oblast světla/viditelná oblast světla
δ	chemický posun

# **Teoretická část**

# 1 Úvod a cíle práce

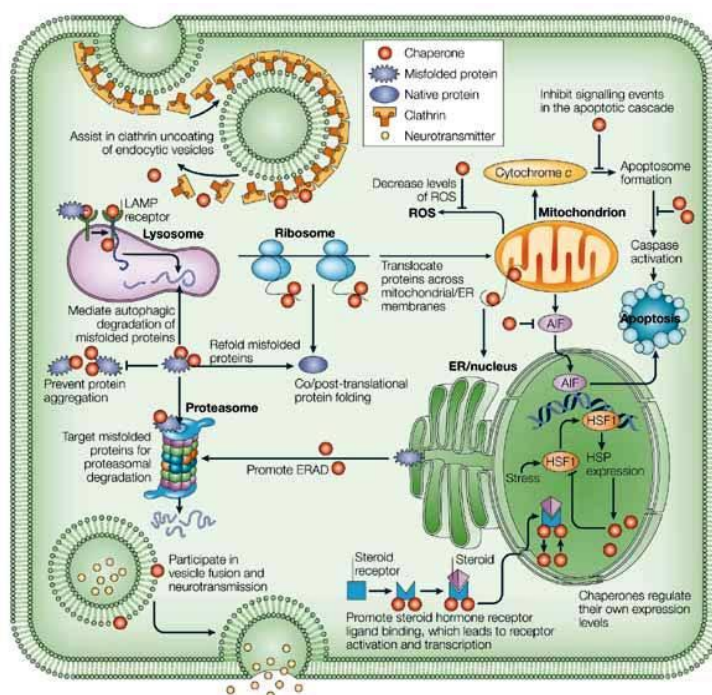
Nejenom v buňce, ale i v rámci celého organismu, plní proteiny řadu důležitých funkcí, k nimž je nezbytné jejich správné složení do funkční konformace. Některé proteiny potřebují k tomuto složení molekulární chaperony, což jsou proteiny mající v buňce řadu funkcí: pomáhají skládat částečně složené a nesložené proteiny, účastní se skládání nově syntetizovaných proteinů, zabraňují agregaci nefunkčních proteinů, pomáhají degradovat nežádoucí proteiny a některé chaperony dovedou i rozbalit a opět složit chybně složený protein. Většinu chaperonů tvoří heat-shock proteiny, které pro svou funkci používají energii získanou hydrolýzou ATP. Heat-shock proteiny dělíme podle molekulové hmotnosti (kDa) na rodiny Hsp60, Hsp70 a Hsp90 (Alberts, 2008). Hsp70 jsou spojovány s některými neurologickými nebo nádorovými onemocněními.

Jelikož je inhibice ATPasové aktivity Hsp70 možným terapeutickým cílem pro výše zmíněná onemocnění, je cílem teoretické části vypracování literární rešerše na téma Hsp70 a možnosti jeho inhibice. Experimentální část se zabývá syntézou potenciálních inhibitorů Hsp70 strukturně odvozených od adeninu a jejich charakterizací pomocí dostupných fyzikálně-chemických metod. U potenciálních inhibitorů byla zjišťována jejich biologická aktivita v kompetičním fluorescenčním polarizačním testu a cytotoxicita na vybraných nádorových buněčných liniích.

## 2 Heat-shock proteiny 70

Heat-shock proteiny 70 (Hsp70) tvoří rodinu molekulárních chaperonů s molekulovou hmotností 70 kDa. Objev Hsp učinil v roce 1962 Ritossa při zkoumání buněk slinných žláz octomilky (*Drosophila melanogaster*), které vystavil po definovanou dobu zvýšené teplotě (Ritossa, 1962). O několik let později bylo zjištěno, že přežití buněk způsobila zvýšená exprese 70 kDa heat-shock proteinu (Tissiere *et al.*, 1974).

Hsp70 plní v buňce mnoho funkcí, jak při fyziologickém stavu buňky, tak při buněčném stresu. Pomáhají skládat nově vznikající proteiny, transportovat vezikuly a proteiny v rámci buňky, pomáhají degradovat nechtěné proteiny a skládat a rozkládat komplexy proteinů (Obr. 1). Díky těmto funkcím napomáhají v buňce udržovat proteinovou homeostázi.



**Obr. 1 Funkce Hsp70.** Hsp70 je na obrázku znázorněn jako chaperon, převzato z Muchowski a Wacker, 2005.

Členové rodiny Hsp70 jsou velice konzervované proteiny, které se vyskytují napříč všemi říšemi organismů. Nachází se u bakterií (DnaK), kvasinek (Ssa), rostlin (atHsp70 - *Arabidopsis thaliana*) a u člověka (Hsp70). Srovnáním DnaK z *E. coli* a eukaryotního Hsp70 byla zjištěna 50% shoda mezi těmito proteiny a přibližně 70% podobnost v aminokyselinové sekvenci (Gupta, 1998).

V lidských buňkách existuje 16 isoform Hsp70 (Tab. 1), které dohromady tvoří přibližně 2 % proteomu buňky (Zylicz a Wawrzynow, 2001). Mezi nejdůležitější konstitutivně exprimované isoformy patří heat-shock cognate protein (Hsc70), který se nachází v jádře a cytosolu, dále protein vážící imunoglobuliny (BiP)

v endoplasmatickém retikulu a mitochondriální mtHsp70 (Daugaard *et al.*, 2007). Stres, kterým je např. změna teploty, přítomnost těžkých kovů, mikrobiální infekce, oxid dusnatý, zvýšená hladina vápenatých kationtů, antibiotika apod., slouží jako impuls pro navázání příslušných transkripčních faktorů na daný promotor, čímž se zvýší exprese stresových forem Hsp70 (Kiang a Tsokos, 1998). Některé stresové proteiny jsou exprimované ve všech tkáních (např. Hsp72), zatímco u některých isoform je exprese tkáňově specifická (např. Hsp12A je exprimovaný v mozku, ledvinách a svalech) (Brocchieri *et al.*, 2008).

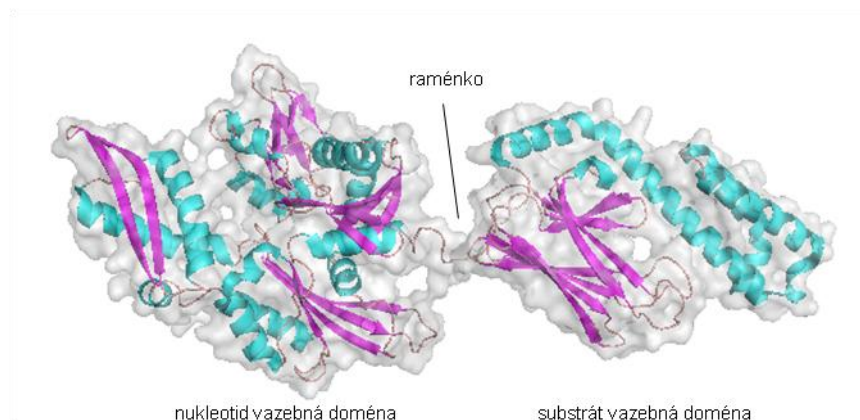
**Tab. 1. Isoformy lidského Hsp70.** Data v tabulce byla použita z [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org).

protein	alternativní název	název genu	homologie k Hsp70-1A/1B (%)	počet AMK
Hsp70 1A/1B	Hsp71, Hsp72	HSPA1A, HSPA1B	100	641
protein podobný Hsp71 (heat shock 70 kDa protein 1-like)	-	HSPA1L	89	641
Hsc71 (heat shock cognate 71 kDa protein)	Hsc70	HSPA8	85	646
70 kDa protein 2 příbuzný (heat shock-related 70 kDa protein 2)	-	HSPA2	83	639
Hsp70-6 (heat shock 70 kDa protein 6)	-	HSPA6	82	643
GRP-78	BiP	HSPA5	60	654
stres-70 protein	GRP-75, mortalin, mtHsp70	HSPA9	44	679
předpokládaný Hsp70-7 (putative heat shock 70 kDa protein 7)	-	HSPA7	44	367
Hsp70-14	Hsp60	HSPA14	27	509
Hsp70-4	-	HSPA4	24	840
Hsp105	Hsp110	HSPH1	23	858
Hsp70-4L	-	HSPA4L	23	839
Hsp70-13	STCH	HSPA13	23	471
protein 1 řízený zvýšenou hypoxií (hypoxia up-regulated protein 1)	Grp170	HYOU1	17	999
Hsp70-12A	-	HSPA12A	14	675
Hsp70-12B	-	HSPA12B	13	686

## 2.1 Struktura Hsp70

Nejvíce informací o struktuře Hsp70 nám poskytuje DnaK z *E. coli* (Zhu *et al.*, 1996). Vzhledem k vysoké homologii aminokyselinových sekvencí mezi DnaK a lidským Hsp70 lze k popisu struktury lidského analogu použít krystalovou strukturu DnaK. Hsp70 se skládají ze dvou nezávislých domén: na N-konci z konzervované nukleotid

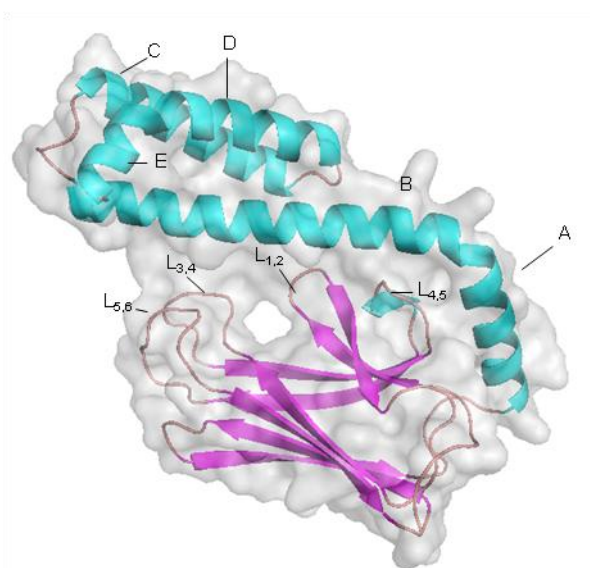
vazebné domény (NVD) s ATPasovou aktivitou a z více variabilní substrát vazebné domény (SVD) na C-konci (Obr. 2). Obě domény jsou navzájem spojeny krátkým hydrofóbním raménkem (Aprile *et al.*, 2013).



**Obr. 2** Krystalová struktura DnaK z *E. coli* (PDB: 2KHO).

### 2.1.1 Substrát vazebná doména

Substrát vazebná doména se skládá ze dvou poddomén: 25 kDa  $\beta$ -listové a 10 kDa helikální.  $\beta$ -listová poddoména je tvořena sendvičem dvou stočených čtyřřetězcových  $\beta$ -listů s vyčnívajícemi smyčkami, které stabilizují navázaný substrát. Helikální poddoména se skládá z pěti helixů (Obr. 3). Helixy A a B jsou sbaleny kolem  $\beta$ -listové poddomény, kde stabilizují vnitřní smyčky L<sub>1,2</sub> a L<sub>4,5</sub>. Helix B navíc vytváří solný můstek a několik vodíkových vazeb mezi vnějšími smyčkami L<sub>3,4</sub> a L<sub>5,6</sub>, čímž uzavírá substrát vazebné místo jako víko. Na C-konci substrátové vazebné domény se nachází EEVD motiv, který umožňuje navázání některých ko-chaperonů (Mayer a Bukau, 2005).

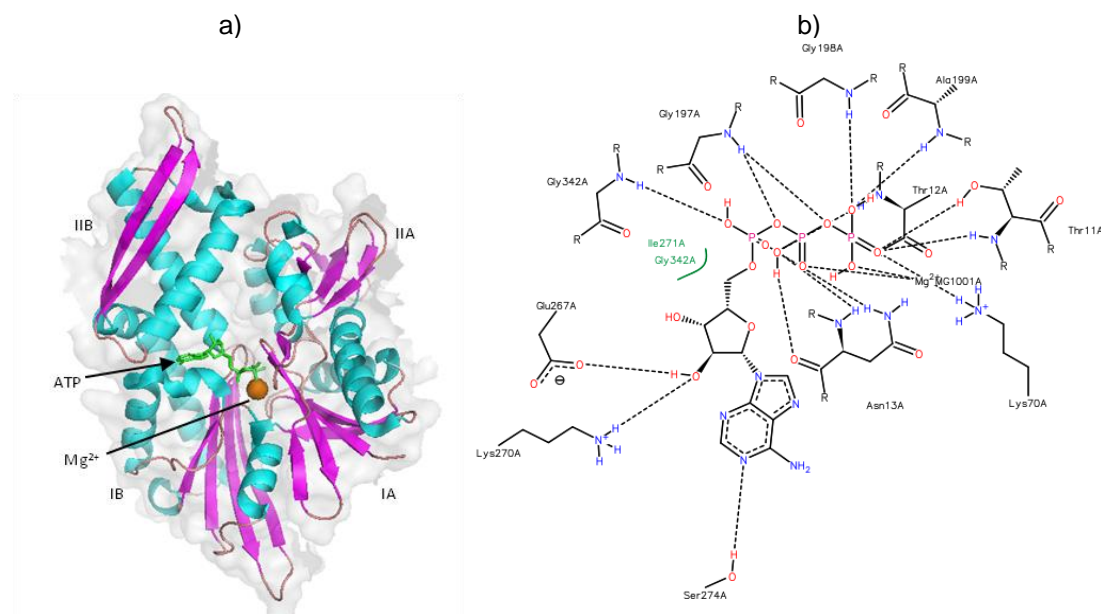


**Obr. 3** Substrát vazebná doména DnaK *E. coli* (PDB: 2KHO).

## 2.1.2 Nukleotid vazebná doména

Nukleotid vazebnou doménu (NVD) tvoří tetramer skládající se ze dvou velkých globulárních poddomén I a II, které jsou dále rozděleny na podjednotky A a B. Ve spodní části jsou obě poddomény rozděleny hlubokým zářezem vytvářejícím vazebné místo pro adenosinové nukleotidy (Obr. 4a) (Flaherty *et al.*, 1990).

Správnou lokalizaci ATP v aktivním místě zajišťuje hydrofobní adenosin vazebná kapsa a rozsáhlá síť vodíkových interakcí mezi  $\beta$ - a  $\gamma$ -fosfátem ATP a residui všech čtyř podjednotek NVD. Molekula ATP je navíc v aktivním centru koordinovaná pomocí  $Mg^{2+}$  iontu, se kterým vytváří  $\beta$ - a  $\gamma$ -fosfát komplex (Obr. 4b). Na hydrolýze ATP se pravděpodobně nejvýznamněji podílí Glu171 koordinující atakující molekulu vody a fungující také jako akceptor uvolněného protonu a dále Lys70, který stabilizuje pentavalentní přechodový stav fosfátu během hydrolýzy ATP (Kityk *et al.*, 2012).



**Obr. 4 Vazba ATP v nukleotid vazebné doméně. a)** struktura domény (PDB: 4B9Q). **b)** schéma interakcí mezi ATP a jednotlivými residui nukleotid vazebné domény (PDB: 4JN4).

## 2.1.3 Raménko

Flexibilní raménko s vysoce konzervovanou sekvencí třinácti aminokyselin spojující nukleotid a substrát vazebnou doménu hraje důležitou roli v interdoménové komunikaci a interakci s J-proteiny. Esenciální sekvencí je motiv Val389-Leu-Leu-Leu-Asp393. Studie s bodovými mutacemi ukázaly, že residua Val389, Leu391 a Asp393 jsou klíčová pro interdoménovou komunikaci a interakci s NVD (Vogel *et al.*, 2006), zatímco Leu390 s Leu392 jsou nezbytné pro interakci s J-proteiny (Kumar *et al.*, 2011).

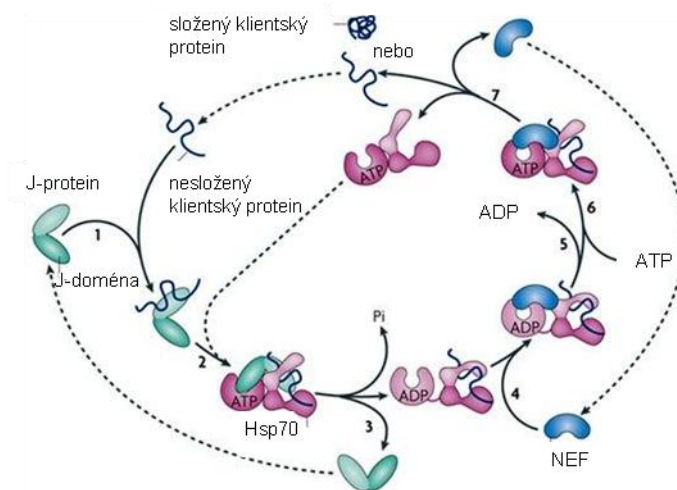
## 2.2 ATPasový cyklus

Hsp70 se váží na klientské proteiny díky rozpoznání krátkého degenerovaného motivu, který je tvořený řetězcem pěti reziduí bohatých na hydrofóbní aminokyseliny (Leu, Ile, Val, Phe, Tyr) a je obklopen regiony s pozitivně nabitými aminokyselinami. Tyto motivy se vyskytují ve všech proteinech v průměru každých 30-40 aminokyselin. Pokud je protein správně složen, nachází se nejvíce hydrofóbních motivů uvnitř proteinu, zatímco při změně konformace a po denaturaci se tyto motivy dostávají na povrch. Tím je vysvětlena schopnost Hsp70 vázat se na špatně složené proteiny, nikoliv však na formy nativní (Rüdiger *et al.*, 1997).

Vazba substrátu je alostericky regulována vazbou ATP/ADP. Protein existuje ve dvou konformačních stavech s navázaným ATP - otevřená konformace (nízká afinita k substrátu) nebo s navázaným ADP (uzavřená konformace, vysoká afinita k substrátu). Samovolný přechod mezi těmito dvěma konformacemi je příliš pomalý, proto jsou zapotřebí kofaktory: J-proteiny (v některých případech zprostředkovávají navázání klientského proteinu a stimulují ATPasovou aktivitu) a proteiny vyměňující nukleotidy (NEF) (způsobují oddisociování ADP, a tím pádem i uvolnění opraveného klientského proteinu).

ATPasový cyklus je zahájen buďto přímým navázáním klientského proteinu (substrátu) do hydrofóbního vazebného místa v SVD, nebo je tento proces zprostředkován J-proteiny. Interakcí Hsp70 s J-proteiny dochází ke konformačním změnám proteinu, které vedou k hydrolýze ATP a uzavření substrátu v aktivním místě (Obr. 5). J-proteiny stimulují ATPasovou aktivitu Hsp70 až 1000krát, bez těchto proteinů by hydrolýza jednoho ATP trvala při 30 °C přibližně 20 až 30 min. Jakmile je v nukleotidové vazebné doméně ADP, helix B uzavře substrát jako víko. Smyčka L<sub>3,4</sub> navíc vytváří s hlavním řetězcem klientského peptidu vodíkové vazby a hydrofóbní interakce, čímž je afinita pro substrát zvýšena 9-400krát. Aby mohlo dojít k uvolnění opraveného, klientského proteinu z Hsp70, musí dojít pomocí NEF k uvolnění ADP a následnému navázání ATP. Na změně konformace klientského proteinu se může podílet několik Hsp70 najednou (Kampinga a Craig, 2010, Mayer a Bukau, 2005, Mayer, 2013).





Obr. 5 Schéma ATPasového cyklu Hsp70 podle Kampinga a Craig, 2010.

### 2.2.1 J-proteiny

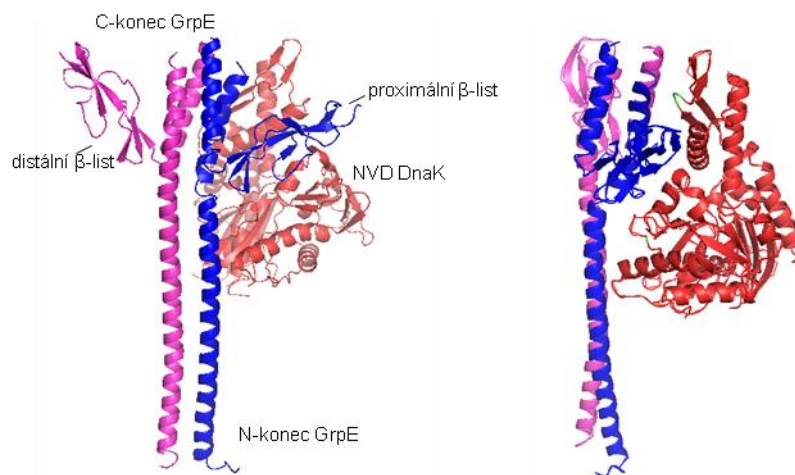
J-proteiny (neboli Hsp40) jsou rozsáhlou skupinou ko-chaperonů, které interagují s Hsp70: zprostředkovávají hydrolyzu ATP, na čemž závisí uzavření substrátu v kavitě substrát vazebné domény (Kelley, 1999). J-proteiny obsahují konzervovanou oblast, J-doménu, přibližně o 70 aminokyselinách. Tento motiv, nezbytný pro navázání J-proteinu na flexibilní raménko, je tvořený částečně konzervovaným tripeptidem His, Pro a Asp, který se nachází ve smyčce mezi helixy II a III (Obr. 6a) (Greene *et al.*, 1998). J-proteiny dělíme podle obsahu domén na tři skupiny (Obr. 6b) (Kampinga a Craig, 2010).



Obr. 6 J-proteiny. a) Struktura J-domény bakteriálního J-proteinu z *E. coli* (PDB: 1XBL). b) rozdělení J-proteinů podle obsažených domén: J = J-doména, G/F = oblast bohatá na Gly a Phe, Zn = zinkový prst (zinc finger domain), C = C-terminální doména, převzato z Mayer a Bukau, 2005.

### 2.2.2 Proteiny vyměňující nukleotidy

NEF hrají důležitou roli v ATPasovém cyklu, protože vyměňují nukleotidy. Nejlépe popsáným NEF je bakteriální protein GrpE z *E. coli*. Jedná se o dimer skládající se z hlavního dlouhého  $\alpha$ -helixu, na jehož konci je několik menších helixů a  $\beta$ -smyček (Obr. 7).



**Obr. 7 GrpE v komplexu s DnaK z *E. coli*.** Fialově je znázorněno GrpE neinteragující s DnaK, modře GrpE interagující s DnaK a červeně nukleotid vazebná doména DnaK. Napravo je znázorněn komplex GrpE s DnaK otočený o 90° (PDB: 1DKG).

$\beta$ -listová doména GrpE reaguje s doménami IB a IIB DnaK z obou stran nukleotid vazebného místa. Několik aminokyselin řetězce GrpE (Arg104, Glu107, Val108) zprostředkovává intermolekulární kontakty s DnaK (Asn282, Pro284, Tyr285). Navázání GrpE do tohoto nukleotid vazebného místa způsobí pootočení subdomény IIB, čímž dojde k otevření vazebného místa a k uvolnění ADP (Harrison, 2003, Harrison *et al.*, 1997).

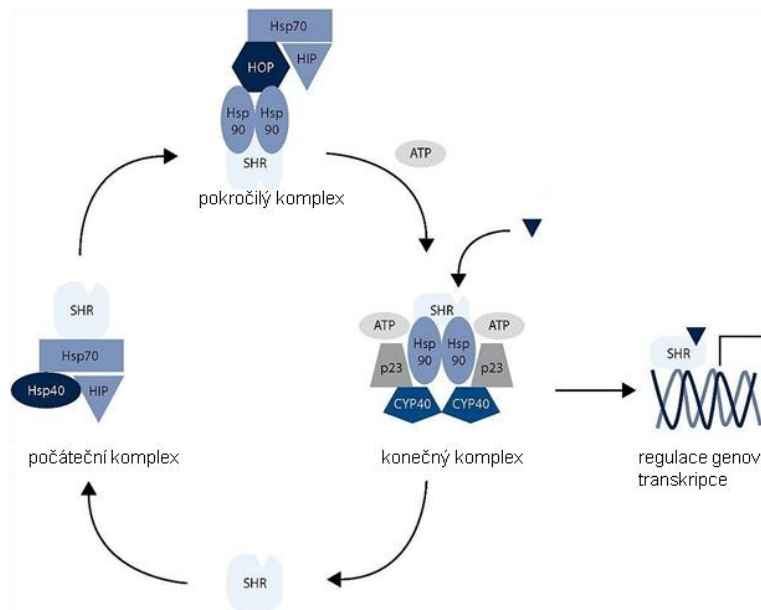
Lidským ekvivalentem GrpE jsou Bag proteiny, kterých existuje asi šest druhů (Takayama *et al.*, 1999).

## 2.3 Interakce s dalšími ko-chaperony

Kromě již zmíněných NEF a J-proteinů interaguje Hsp70 i s dalšími ko-chaperony. Jejich společným strukturním prvkem je obsah tetratrikopeptidové repetice (TPR), kterou se ko-chaperony váží na EEVD motiv Hsp70.

### 2.3.1 HOP

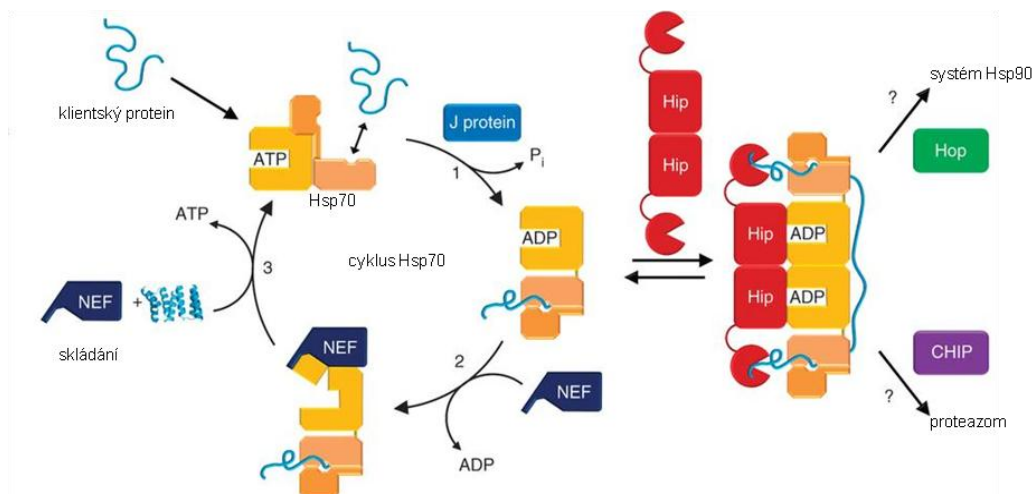
Jedním z ko-chaperonů interagujících s Hsp70 je 60 kDa protein HOP, zprostředkovávající interakci mezi Hsp70 a Hsp90. HOP má tři domény (TPR1, TPR2A a TPR2B) a každá obsahuje tři TPR motivy (Scheufler *et al.*, 2000). HOP se na Hsc70 váže pomocí TPR1, rozpoznáním motivu PTIEEVD, zatímco TPR2A a TPR2B se specificky váží na Hsp90. TPR2A rozpoznává pět C-terminálních residuí Hsp90 (MEEVD) (Hernandez *et al.*, 2002). HOP hraje také důležitou roli při maturaci receptorů steroidního hormonu (Obr. 8) (Ďurech *et al.*, 2012).



**Obr. 8** Maturace steroidního receptoru. Chaperonový cyklus maturace receptorů pro steroidní hormon (SHR) zahrnující Hsp70, Hsp90 a jejich ko-chaperony, podle Ďurech *et al.*, 2012.

### 2.3.2 HIP

HIP (jinak nazýván p48) je dimer se 40 kDa podjednotkami, který interaguje s Hsp70, kde se váže do jeho nukleotid vazebné domény (Hohfeld *et al.*, 1995). HIP zpomaluje cyklus Hsp70 tím, že pomáhá stabilizovat konformaci Hsp70 s navázaným ADP, a přeměrovává také komplex Hsp70-ADP-substrát k Hsp90 nebo k degradaci pomocí proteasomu (Obr. 9). HIP je pravděpodobně schopen interagovat se dvěma Hsp70 na stejném substrátu, čímž se pravděpodobně oddaluje uvolnění substrátu (Li *et al.*, 2013b).



**Obr. 9** Model funkce HIP v kontrole kvality proteinů, podle Li *et al.*, 2013b.

### 2.3.3 CHIP

Dalším proteinem s TPR doménou je CHIP interagující s C-koncem Hsc70. Kromě této domény obsahuje i U-box doménu dohlížející na stanovení priority pro navázání Hsp70

nebo Hsp90 (Ballinger *et al.*, 1999). CHIP je dimer o velikosti 35 kDa a funguje jako E3 ubiquitin ligasa, tzn. že přidává na substrát ubikvitinilační značku, podle které proteasom rozpozná, jaký protein má degradovat (Jiang *et al.*, 2001).

## 2.4 Klinický význam

Hsp70 souvisí s mnoha onemocněními. Patologie onemocnění je spojována buď s jeho nadměrnou aktivitou (např. abnormální stabilizace specifického substrátu), nebo s nedostatečnou funkcí. Tento jev vyplývá ze selhání Hsp70 správně rozeznat a přeskádat špatně složené substráty (Patury *et al.*, 2009).

### 2.4.1 Rakovina

Hsp70 je spojen s rakovinným onemocněním prsu, endometria, střeva a prostaty (Evans *et al.*, 2010). Na začátku tumorogeneze způsobenou expresí onkogenů (např. c-myc) dovede Hsp70 ochránit buňky před jejich transformací na buňky rakovinné. Hsp70 potlačuje buněčnou senescenci, která je důležitým protirakovinným mechanismem v brzkých stádiích bujení a pro úspěšnou léčbu rakoviny (Goloudina *et al.*, 2012). O Hsp70 je známo, že mají v rakovině minimálně tři úlohy. Snaží se potlačit konformační změny zmutovaných proteinů běžných u rakovinných buněk, specificky inhibují dráhy buněčné smrti a v neposlední řadě mitochondriální Hsp70 přímo inaktivují tumor supresorový protein p53 (Zuiderweg *et al.*, 2013). Bohužel zvýšený výskyt Hsp70 v nádorech koreluje s nižší prognózou pro úspěšnou terapii (Ciocca a Calderwood, 2005).

Hsp70 také přímo inhibuje několik kroků v apoptotické signální dráze. Inhibuje lysosomální permeabilizaci membrán, uvolňuje cytochrom c z mitochondrie a aktivuje a přemísťuje proapoptotické faktory (Patury *et al.*, 2009).

### 2.4.2 Neurologická onemocnění

Spousta neurodegenerativních onemocnění (Alzheimerova, Parkinsonova a Huntingtonova choroba) jsou způsobeny nadměrnou akumulací špatně složených proteinů (Kirkegaard *et al.*, 2010).

Chafekara *et al.* zkoumali vliv aktivátoru (SW02) a inhibitoru (CE12) Hsp70 na polyglutaminové shluky proteinů. Zjistili, že zvýšenou aktivitou Hsp70 dochází k rozpuštění nežádoucích shluků proteinů, tím se však zároveň zvýší jejich toxicita. Na druhou stranu se inhibicí Hsp70 sice sníží množství rozpuštěných proteinů, ale dojde ke snížení toxicity. Jako novým terapeutickým cílem se tedy jeví kombinace aktivátoru a inhibitoru, kdy by docházelo k rozpuštění nežádoucích shluků proteinů a zároveň i ke snížení toxicity rozpuštěných proteinů (Chafekar *et al.*, 2012).

### 3 Inhibice heat-shock proteinu 70

Rodina proteinů Hsp70 je vhodným terapeutickým cílem pro řadu onemocnění. Vhodným místem pro vazbu léčiva jsou substrát a nukleotid vazebné domény, dalším možným způsobem je narušení protein-proteinových interakcí Hsp70 s ko-chaperony (např. Bag-1 a HOP) (Massey, 2010).

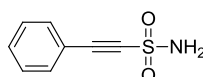
#### 3.1 Inhibitory substrát vazebné domény

#### 3.2 Látky mimikující substrát

Bylo zjištěno, že se na DnaK *E. coli* váže řada krátkých antibakteriálních peptidů např. pyrrocoricin, drosocin a apidaecin (Otvos *et al.*, 2000). Pyrrocoricin (VDKGSYLPRPTPPRPIYNRN) inhibuje *in vitro* ATPasovou aktivitu DnaK vazbou do substrát vazebné domény mezi helixy D a E ( $K_d = 50 \mu\text{M}$ ) a *in vivo* inhibuje skládání substrátu (Kragol *et al.*, 2001).

##### 3.2.1 2-fenylethynsulfonamid

2-fenylethynsulfonamid, neboli pifithrin- $\mu$ , (Obr. 10) se váže do substrát vazebné domény Hsp70 a narušuje tím interakce s ko-chaperony a proteinem p53 (Leu *et al.*, 2009). Kaiser *et al.* zjistili, že 2-fenylethynsulfonamid inhibuje Hsp70 u akutní myeloidní leukemie ( $\text{IC}_{50} = 8,9 \mu\text{M}$ ) (Kaiser *et al.*, 2011).

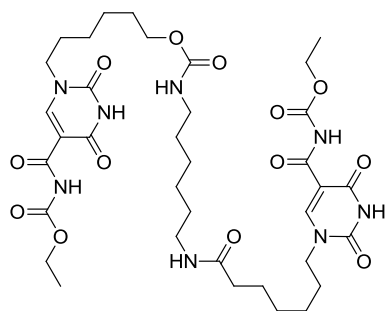


Obr. 10. 2-fenylethynsulfonamid

#### 3.3 Inhibitory nukleotid vazebné domény

##### 3.3.1 NSC 630668-R/1

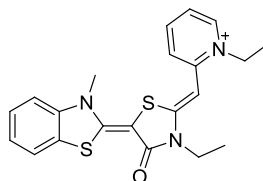
Fewell *et al.* screeningem látek odvozených od 15-deoxyspergualinu objevili NSC 630668-R/1 (Obr. 11). Tato sloučenina, zkráceně R/1, inhibuje ATPasovou aktivitu kvasinkového Ssa1p ( $\text{IC}_{50} = 100 \mu\text{M}$ ) a *in vitro* translokaci proteinů do endoplazmatického retikula, zprostředkovanou dvěma Hsc70 – Ssa1 a BiP (Fewell *et al.*, 2001).



Obr. 11 Inhibitor NSC 63068-R/1.

### 3.3.2 MKT-077

MKT-077 je kladně nabitě rhodacyaninové barvivo (Obr. 12), které se váže poblíž vazebného místa pro ATP v mtHsp70. Jeho selektivita je způsobena iontovým charakterem sloučeniny, díky čemuž se hromadí kvůli protonovému gradientu v rychle se dělících rakovinných buňkách. MKT-077 inhibuje proliferaci rakovinných buněčných linií prsu, střeva a močového měchýře ( $IC_{50} \sim 1-5 \mu M$ ) (Koya *et al.*, 1996). Bohužel dochází k jeho rychlé metabolizaci díky oxidaci na pyridinovém a benzothiazolovém kruhu, proto jsou v současné době hledány stabilnější sloučeniny odvozené od MKT-077 (Li *et al.*, 2013a).



Obr. 12 MKT-077.

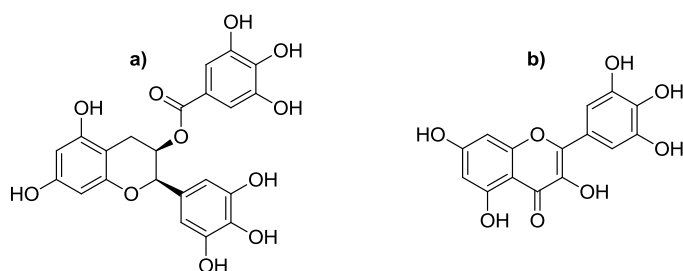
### 3.3.3 Sulfoglykolipidy

Mamelak a Lingwood zjistili pomocí doménové delecce a bodové mutace, že jsou sulfogalaktosyl-ceramid a sulfogalaktoglycerolipid vázány do nukleotid vazebné domény (Mamelak a Lingwood, 2001). Pravděpodobně se jedná o nekompetitivní inhibitory, protože se nemění  $K_m$  hydrolýzy ATP a snižuje se  $V_{max}$ . Bylo zjištěno, že se adamantylový derivát sulfoglykolipidu specificky váže na Hsp70 v hovězím mozku ( $IC_{50} = 50 \mu M$ ), což by mohlo mít potenciální uplatnění při léčbě neurodegenerativních onemocnění (Whetstone a Lingwood, 2003).

### 3.3.4 Inhibitory s flavonoidní strukturou

(-)-epigallokatechin gallát (Obr. 13a) je přírodní polyfenolický flavonoid ze zeleného čaje, u něhož byla pomocí afinitní chromatografie zjištěna interakce s BiP ( $K_d = 0,7 \mu M$ ). U myricetinu (Obr. 13b) se také zjistilo, že funguje jako inhibitor Hsp70

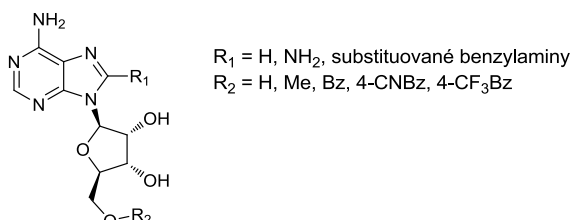
( $IC_{50} \sim 10 \mu M$ ) a navíc iniciuje degradaci tau proteinu (protein spojený s Alzheimerovou chorobou) (Jinwal *et al.*, 2009).



Obr. 13 Inhibitory s flavonoidní strukturou. a) (-)-epigallokatechin gallát b) myricetin.

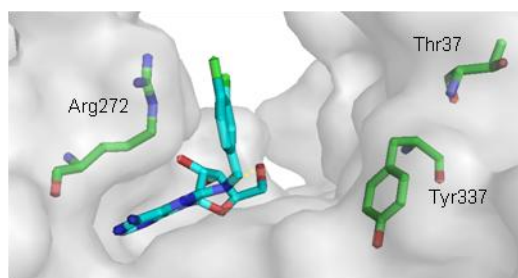
### 3.3.5 Látky mimikující ATP

Williamson *et al.* v roce 2009 za pomoci krystalové struktury komplexu ATP s Hsc70/Bag1 navrhli a připravili sérii 8- a 8,5'-substituovaných derivátů adenosinu (Obr. 14).



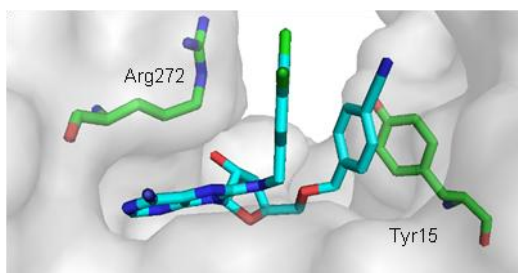
Obr. 14 8,5'-disubstituované deriváty adenosinu.

Substitucí adenosinu amino skupinou v poloze C8 došlo k výraznému snížení  $IC_{50}$  z  $560 \mu M$  (adenosin) na  $9,4 \mu M$  (8-aminoadenosin). Pozitivní vliv na aktivitu mělo přidání aromatického kruhu do pozice C8 - 8-(3,4-dichlorbenzylamino)adenosin (I) ( $IC_{50} = 9,1 \mu M$ ). Následnou substitucí 4-kyanobenzylem v poloze 5' u 3,4-dichlorbenzylamoniadenosinu byla snížena hodnota  $IC_{50}$  na  $0,5 \mu M$  (II). S některými inhibitory byly připraveny krystalové komplexy s Hsc70/Bag-1. Krystalová struktura I/Hsc70/Bag-1 (Obr. 15) odhalila posun Arg272, čímž došlo k vytvoření  $\pi$ -interakce mezi C8 substituentem a Arg272.



Obr. 15 Krystalová struktura komplexu I/Hsc70/Bag1 (PDB: 3FZK).

V krystalové struktuře komplexu II/Hsc70/Bag1 (Obr. 16) byla pozorována stabilizace inhibitoru ve vazebném místě pomocí několika  $\pi$ -interakcí mezi Arg272, aromatickými kruhy obou substituentů a Tyr15.



**Obr. 16** Krystalová struktura komplexu II/Hsc70/Bag1 (PDB: 3FZM).



# **Experimentální část**

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Použité chemikálie

Při přípravě jednotlivých produktů byly použity následující chemikálie: adenin, 3,4-dimethoxybenzylamin (Across Organics); aceton- $d_6$ , benzylamin, borohydrid sodný, dimethylsulfoxid- $d_6$  (DMSO- $d_6$ ), ethylenkarbonát, 3-chlorbenzylamin, 3,4-dichlorbenzylamin, 3,4,5-trimethoxybenzylamin, 4-methylbenzylamin (Aldrich); *N,N*-diisopropylethylamin (DIPEA), 2-fenylethylamin, 4-chlorbenzylamin a 4-methoxybenzylamin (Fluka); (4-trifluormethyl)benzylamin (Fluorochem Limited); methanol (MeOH) HPLC čistoty (LAB-SCAN analytical sciences); aceton, *N,N'*-dimethylformamid DMF, chloroform, methanol, NaOH, octan sodný, petrolether (PE) (Lachner); 2,5-dimethoxybenzylamin (Maybridge); ethanol (EtOH) UV/VIS čistoty (Penta) a adenosin (Olchemim s.r.o.), demi voda, 8-bromadenin byl připraven v laboratoři organické syntézy Oddělení chemické biologie a genetiky, Centrum regionu Haná.

Suchá rozpouštědla byla připravena podle postup Bradley *et al.*, 2010. K aktivovanému 3A° molekulovému sítu (24 hodin – 300 °C) bylo přidáno dané rozpouštědlo (20% m/v) a takto bylo sušeno pod  $\text{CaCl}_2$  zátkou po dobu minimálně 72 hodin.

### 4.2 Metody

Syntéza za pomoci mikrovln byla provedena v mikrovlnném reaktoru (MR) Discover SP (CEM Corporation) v uzavřeném systému (tlaková ampule).

Průběh reakcí byl sledován pomocí tenkovrstevné chromatografie (TLC) na hliníkových destičkách pokrytých silikagelem 60 F<sub>254</sub> nebo 60 RP-18 F<sub>254</sub> (Merck KGaA). Mobilní fáze, které byly využity, jsou uvedeny níže u jednotlivých reakcí. Vizualizace TLC destiček byla provedena pod UV lampou (Camag) při vlnové délce 254 nm. U některých sloučenin byly pro vizualizaci použity barvicí roztoky - vanilin a ninhydrin.

K purifikaci látek pomocí sloupcové chromatografie byl použit silikagel LC60A 40-63 micron (Grace Davison Discovery Sciences) a u reverzní sloupcové chromatografie silikagel DAVISIL 633NC18E (GRACE VYDAC).

Úhel stáčení polarizovaného světla byl měřen polarimetrem polAAR 3001 (Optical Activity Limited) při vlnové délce 589 nm. U jednotlivých látek byl připraven jejich roztok o koncentraci 0,15 g/100 ml v HPLC MeOH.

Čistota připravených produktů byla změřena pomocí vysokoúčinného kapalinového chromatografu (HPLC Alliance 2690 Separations Module, Waters, Milford, MA, USA) na koloně C18 Symmetry (Waters) délky 150 mm a o průměru 2,1 mm s pórovitostí 5  $\mu\text{m}$ . Vzorek byl rozpuštěn v MeOH (1 mg/ml) a naředěn 100krát do počáteční mobilní fáze (objem nastříknutého vzorku byl 10  $\mu\text{l}$ ). Separace byla provedena methanolickým gradientem (0' – 90 % A; 25' – 10% A; 35' – 10 % A; 36' – 90 % A; 45' –10 % A) o průtoku 0,25 ml/min. Mobilní fázi B tvořil MeOH a mobilní fázi A 15 mM mravenčan amonný (pH = 4,0). Jednotlivé složky byly detekovány DAD detektorem (PDA 2996, Waters) v rozmezí 210 – 400 nm.

Pro účely identifikace produktů pomocí LC-MS byl eluát z kolony veden do hmotnostního spektrometru ZMD 2000 (Micromass, Manchester, UK). Iontový zdroj (ESI) byl vyhříván na teplotu 120°C, desolvatační teplota byla 300°C. Dusík byl použit jako zmlžovací i desolvatační plyn. Ionizace byla dosažena kapilárním napětím 3,0 kV a napětím na vstupní štěrbině 20 V. Měření bylo prováděno v pozitivním (ESI+) FULLSCAN módu v rozsahu  $m/z$  50-850.

Spektra nukleární magnetické rezonance byla změřena na přístroji Jeol ECA-500 při frekvencích 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) a 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). Vzorky byly měřeny v DMSO- $d_6$  a acetonu- $d_6$ .

## 4.3 Syntéza

### 4.3.1 8-bromadenosin (1)

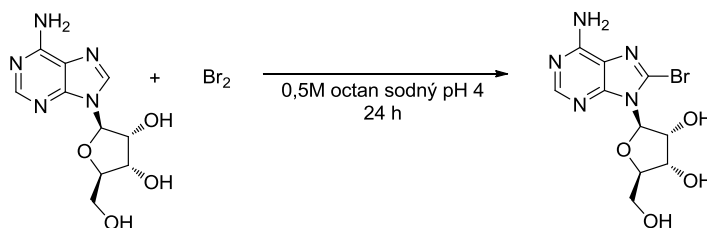


Schéma 1. Příprava 8-bromadenosinu.

K suspenzi adenosinu (1,87 mmol, 500 mg) v 0,5 M octanu sodném pH 4,0 (9 ml) byl pod inertní atmosférou za laboratorní teploty přikapán roztok  $\text{Br}_2$  (0,25 mmol, 145  $\mu\text{l}$ ) ve vodě (9 ml). Reakční směs byla míchána 24 h za laboratorní teploty. Poté byla vzniklá suspenze zneutralizována  $\text{NaHSO}_3$  a zakoncentrována na vakuové odparce na poloviční objem. Vzniklá suspenze byla 2 h chlazená v ledové lázni. Poté byla oranžová sraženina zfiltrována, promyta vychlazenou vodou a vysušena v sušárně při 50 °C (Capon a Trotter, 2005).

výtěžek: 73 % (473 mg)

HPLC čistota: 95 %

$[\alpha_D^{20}]$ : +64° (koncentrace 3,88 mM, MeOH)

ESI<sup>+</sup>-MS m/z: (347,7, [M+H]<sup>+</sup>)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 3,48-3,49 (m, *J* = 4,3 Hz, 1H), 3,64 (dd, *J* = 3,7; 12,2 Hz, 1H), 3,94 (q, *J* = 3,7 Hz, 1H), 4,15 (dd, *J* = 1,8; 4,9 Hz, 1H), 5,06 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H), 5,20 (s, 1H), 5,43 (s, 2H), 5,80 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H), 7,56 (s, 2H), 8,0 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 62,63; 71,40; 71,62; 87,25; 120,18; 127,78; 150,34; 152,87; 155,69.

### 4.3.2 C8 substituce – obecný postup (2-11)

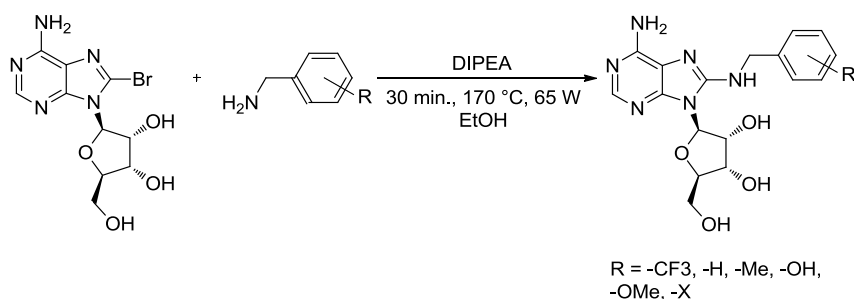
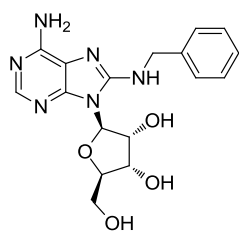


Schéma 2. Příprava C8 substituovaných derivátů adenosinu.

V 10 ml reakční kyvetě byla rozsuspendována látka **1** (0,29 mmol, 100 mg) s příslušným benzylaminem (5 ekv.) a DIPEA (2 ekv., v případě hydrochloridu nebo hydrobromidu 3 ekv.) v EtOH (5 ml). Vzniklá suspenze byla zahřívána v mikrovlnném reaktoru po dobu 30-75 minut (140-170 °C, max. výkon 65 W). Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 4:1, PE/EtOAc/MeOH 1:1:0,1). Reakční směs byla následně zakoncentrována za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce. K odparku byl přidán DCM (10 ml) a vzniklá suspenze byla ponechána při 4 °C ke krystalizaci do druhého dne. Následně byla vzniklá sraženina zfiltrována, promyta DCM a vysušena při 50 °C. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s reverzní fází. Produkt byl eluován směsí MeOH/H<sub>2</sub>O v poměru 2:3 a poté 3:2. Výsledný produkt byl překrytalizován z DCM a vysušen v sušárně při 50 °C. Výtěžky reakcí byly v rozmezí 23-42 % (Williamson *et al.*, 2009).

### 8-benzylaminoadenosin (2)



výtěžek: 28 % (30 mg)

HPLC čistota: 98 %

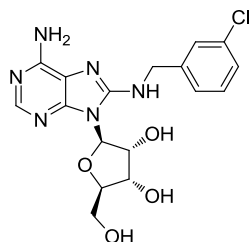
$[\alpha_D^{20}]$ : +101,3° (koncentrace 4,03 mM, MeOH)

ESI<sup>+</sup>-MS m/z: (372,8, [M+H]<sup>+</sup>)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 3,54-3,62 (m, 2H), 3,95 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 4,06-4,10 (m, 1H), 4,49-4,58 (m, 2H), 4,69 (q, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,14 (d, *J* = 4,3 Hz, 1H), 5,26 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,90 (d, *J* = 7,3 Hz, 2H), 6,81 (q, *J* = 4,3 Hz, 1H), 7,17-7,33 (m, 6H), 7,52 (t, *J* = 6,1 Hz, 1H), 7,94 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 45,98; 62,31; 71,45; 71,65; 86,38; 87,02; 117,54; 127,18; 127,58; 128,772; 140,46; 149,04; 150,92; 151,85; 152,97.

### 8-(3-chlorbenzylamino)adenosin (3)



výtěžek: 29 % (34 mg)

HPLC čistota: 99,9 %

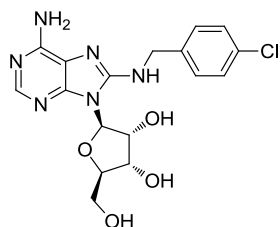
$[\alpha_D^{20}]$ : +76° (koncentrace 3,69 mM, MeOH)

ESI<sup>+</sup>-MS m/z: (406,8, [M+H]<sup>+</sup>)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 3,53-3,66 (m, 2H), 3,97 (s, 1H), 4,09 (s, 1H), 4,54 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H), 4,68 (s, 1H), 5,14 (s, 1H), 5,28 (s, 1H), 5,81-5,93 (m, 2H), 6,48 (s, 2H), 7,19-7,39 (m, 4H), 7,60 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H), 7,86 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 45,23; 62,3; 71,39; 71,59; 86,42; 87,06; 117,47; 126,28; 127,71; 127,39; 130,69; 133,46; 143,18; 149,18; 150,32; 151,66; 153,05.

### 8-(4-chlorbenzylamino)adenosin (4)



výtěžek: 34 % (40 mg)

HPLC čistota: 99,4 %

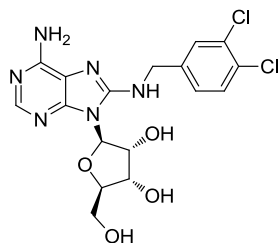
$[\alpha_D^{20}]$ : +82,6° (koncentrace 3,69 mM, MeOH)

ESI<sup>+</sup>-MS m/z: (406,8, [M+H]<sup>+</sup>)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 3,51-3,65 (m, 2H), 3,95 (s, 1H), 4,08 (s, 1H), 4,46-4,58 (m, 2H), 4,68 (q, *J* = 6,1 Hz, 1H), 5,13 (d, *J* = 3,7 Hz, 1H), 5,26 (d, *J* = 6,1 Hz, 1H), 5,81-5,93 (m, 2H), 6,48 (s, 2H), 7,30-7,39 (m, 4H), 7,54 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H), 7,86 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  ppm: 45,15; 62,29; 71,40; 71,60; 86,93; 86,99; 117,46; 128,57; 129,58; 131,75; 139,46; 149,16; 150,31; 151,68; 153,00.

### 8-(3,4-dichlorobenzylamino)adenosin (5)



výtěžek: 40 % (51 mg)

HPLC čistota: 93 %

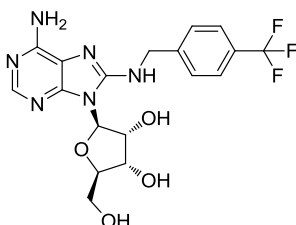
$[\alpha_D^{20}]$ : +81,3°(koncentrace 3,39 mM, MeOH)

ESI<sup>+</sup>-MS m/z: (442,7, [M+H]<sup>+</sup>)

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  ppm: 3,54-3,63 (m, 2H), (s, 1H), 4,08 (app. bt, 1H), 4,52 (d,  $J = 6,1$  Hz, 2H), 4,68 (q,  $J = 6,7$  Hz, 1H), 5,15 (d,  $J = 4,3$  Hz, 1H), 5,29 (d,  $J = 6,7$  Hz, 1H), 5,85-5,91 (m, 2H), 6,52 (s, 2H), 7,33 (d,  $J = 6,7$  Hz, 1H), 7,51-7,64 (m, 3H), 7,86 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  ppm: 44,81; 62,31; 71,44; 71,60; 86,38; 87,06; 117,39; 128,12; 129,65; 129,76; 130,94; 131,35; 141,74; 149,28; 150,31; 151,45; 1153,06.

### 8-(4-trifluormethylbenzylamino)adenosin (6)



výtěžek: 24 % (30 mg)

HPLC čistota: 99,7 %

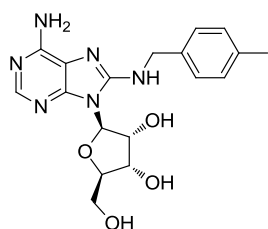
$[\alpha_D^{20}]$ : +82°(koncentrace 3,41 mM, MeOH)

ESI<sup>+</sup>-MS m/z: (440,8, [M+H]<sup>+</sup>)

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  ppm: 3,53-3,64 (m, 2H), 3,96 (bs, 1H), 4,09 (bs, 1H), 4,63 (bs, 2H), 4,71 (q,  $J = 6,7$  Hz, 1H), 5,15 (d,  $J = 3,7$  Hz, 1H), 5,29 (d,  $J = 6,7$  Hz, 1H), 5,83-5,92 (m, 2H), 5,90 (d,  $J = 7,3$  Hz, 1H), 6,50 (s, 2H), 7,54 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H), 7,65 (d,  $J = 8,0$  Hz, 3H), 7,86 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  ppm: 45,41; 62,30; 71,42; 71,59; 86,38; 87,08; 117,48; 125,64; 128,29; 145,40; 149,22; 150,34; 151,66; 153,06.

### 8-(4-methylbenzylamino)adenosin (7)



výtěžek: 24 % (27 mg)

HPLC čistota: 99 %

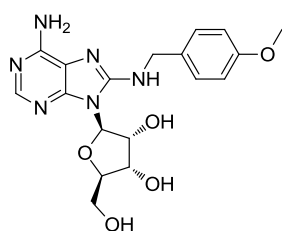
$[\alpha_D^{20}]$ : +70°(koncentrace 3,88 mM, MeOH)

ESI<sup>+</sup>-MS m/z: (386,8, [M+H]<sup>+</sup>)

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  ppm: 2,23 (s, 3H), 3,52-3,62 (m, 2H), 3,94 (s, 1H), 4,08 (bs, 1H), 4,44-4,56 (m, 2H), 4,67 (q,  $J = 6,7$  Hz, 1H), 5,11 (d,  $J = 3,7$  Hz, 1H), 5,22 (d,  $J = 6,7$  Hz, 1H), 5,84 (bt, 1H), 5,89 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H), 6,45 (s, 2H), 7,08 (d,  $J = 7,3$  Hz, 2H), 7,22 (d,  $J = 7,3$  Hz, 2H), 7,44 (t,  $J = 6,1$  Hz, 1H), 7,85 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  ppm: 21,22; 45,53; 62,31; 71,40; 71,59; 86,32; 86,94; 117,53; 127,66; 129,26; 136,19; 137,85; 149,04; 150,29; 151,85; 152,93.

### 8-(4-methoxybenzylamino)adenosin (8)



výtěžek: 38 % (44 mg)

HPLC čistota: 99,9 %

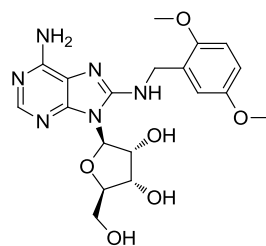
$[\alpha_D^{20}]$ : +73,3° (koncentrace 3,72 mM, MeOH)

ESI<sup>+</sup>-MS m/z: (402,8, [M+H]<sup>+</sup>)

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  ppm: 3,54-3,62 (m, 2H), 3,68 (s, 3H), 3,93 (s, 1H), 4,07 (s, 1H), 4,39-4,53 (m, 2H), 4,65 (q,  $J = 6,3$  Hz, 1H), 5,12 (d,  $J = 3,7$  Hz, 1H), 5,23 (d,  $J = 6,7$  Hz, 1H), 5,82-5,91 (m, 2H), 6,49 (s, 2H), 6,83 (d,  $J = 8,0$  Hz, 2H), 7,27 (d,  $J = 8,0$  Hz, 2H), 7,42 (t,  $J = 5,8$  Hz, 1H), 7,84 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  ppm: 45,28; 55,55; 62,31; 71,40; 71,59; 86,30; 86,94; 114,09; 117,58; 129,07; 132,31; 149,00; 150,29; 151,84; 152,95; 158,67.

### 8-(2,5-dimethoxybenzylamino)adenosin (9)



výtěžek: 42 % (53 mg)

HPLC čistota: 99 %

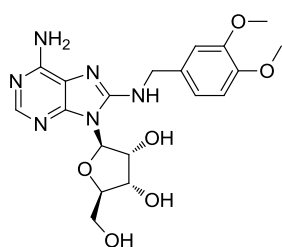
$[\alpha_D^{20}]$ : +76° (koncentrace 3,46 mM, MeOH)

ESI<sup>+</sup>-MS m/z: (433,1, [M+H]<sup>+</sup>)

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  ppm: 3,59 (s, 6H), 3,73 (s, 2H), 3,97 (s, 1H), 4,09 (s, 1H), 4,37-4,59 (m, 2H), 4,71 (d,  $J = 5,5$  Hz, 1H), 5,15 (s, 1H), 5,29 (d,  $J = 6,1$  Hz, 1H), 5,83 (app. bt, 1H), 5,94 (d,  $J = 7,3$  Hz, 1H), 6,48 (s, 2H), 6,67-6,91 (m, 3H), 7,33 (s, 1H), 7,86 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  ppm: 41,10; 55,71; 56,14; 62,32; 71,48; 71,68; 86,32; 87,00; 111,40; 114,08; 117,47; 129,19; 149,09; 150,37; 151,17; 151,80; 152,97; 153,62.

### 8-(3,4-dimethoxybenzylamino)adenosin (10)



výtěžek: 23 % (29 mg)

HPLC čistota: 99,9 %

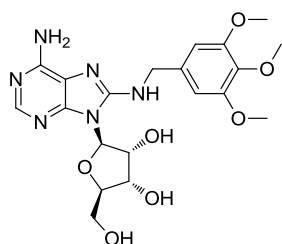
$[\alpha_D^{20}]$ : +66,7° (koncentrace 3,46 mM, MeOH)

ESI<sup>+</sup>-MS m/z: (433,10, [M+H]<sup>+</sup>)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 3,52-3,62 (m, 2H), 3,68 (d, *J* = 9,2 Hz, 6H), 3,94 (s, 1H), 4,07 (app. bt, 1H), 4,41-4,52 (m, 2H), 4,67 (q, *J* = 7,0 Hz, 1H), 5,13 (d, *J* = 3,7 Hz, 1H), 5,24 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,84-5,91 (m, 2H), 6,49 (s, 2H), 6,79-7,01 (m, 3H), 7,41 (t, *J* = 6,1 Hz, 1H), 7,85 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 45,62; 55,91; 56,07; 62,29; 71,44; 71,58; 86,32; 86,96; 111,91; 112,17; 117,53; 119,83; 132,79; 148,119; 149,08; 149,04; 150,29; 151,79; 152,94.

### 8-(3,4,5-trimethoxybenzylamino)adenosin (11)



výtěžek: 25 % (34 mg)

HPLC čistota: 99,5 %

$[\alpha_D^{20}]$ : +72,7° (koncentrace 3,24 mM, MeOH)

ESI<sup>+</sup>-MS m/z: (462,8, [M+H]<sup>+</sup>)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 3,58 (s, 3H), 3,60 (bs, 2H), 3,70 (s, 6H), 3,95-3,97 (m, 1H), 4,09 (bs, 1H), 4,48 (d, *J* = 6,1 Hz, 2H), 4,67 (q, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,17 (bs, 1H), 5,28 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H), 5,91 (bd, *J* = 7,3 Hz, 2H), 6,65 (bs, 2H), 6,67 (s, 2H), 7,52 (app. bt, 1H), 7,89 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 45,98; 56,29; 60,47; 62,28; 71,49; 71,59; 86,39; 87,00; 104,94; 117,35; 135,99; 136,68; 148,65; 150,22; 151,77; 152,51; 153,26.

### 4.3.3 9-(2-hydroxyethyl)adenin (12)

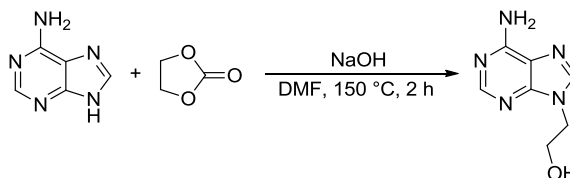


Schéma 3. Příprava 9-(2-hydroxyethyl)adeninu.

Směs adeninu (7,4 mmol, 1 g) a ethylenkarbonátu (13,32 mmol, 1,173 g) v DMF (30 ml) byla přivedena k varu. Poté byl přidán NaOH (0,28 mmol, 11 mg). Směs byla míchána za refluxu 2 h (150 °C) a následně byla zakoncentrována pomocí vysokého vakua (60 °C, 2.10<sup>-1</sup> mbar). Po přidání horkého EtOH (57 ml) k odparku byla směs



zfiltrována přes křemelinu. Filtrát byl zakoncentrován za sníženého tlaku na polovinu a ponechán 2 h při 4 °C ke krystalizaci. Pevný produkt byl zfiltrován, promyt EtOH, Et<sub>2</sub>O a následně vysušen při 50 °C v sušárně. Matečný louh byl ponechán přes noc při 4 °C ke krystalizaci. Následně byla uskutečněna druhá filtrace podle již zmíněného postupu. Vznikla světle růžová pevná látka. (Holý, 1978).

výtěžek: 53 % (0,7 g)

HPLC čistota: 97 %

ESI<sup>+</sup>-MS m/z: (179,9, [M+H]<sup>+</sup>)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 3,69 (q, *J* = 5,2 Hz, 2H), 4,14 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H), 4,98 (t, *J* = 5,2 Hz, 1H), 7,15 (s, 2H), 8,03 (s, 1H), 8,08 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 46,23; 59,78; 119,22; 141,86; 150,06; 152,79; 156,44.

#### 4.3.4 8-brom-9-(2-hydroxyethyl)adenin (13)

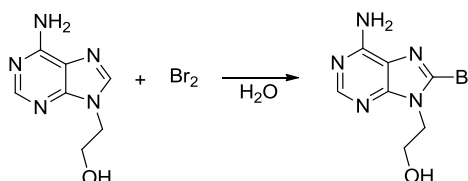


Schéma 4. Příprava 8-brom-9-(2-hydroxyethyl)adeninu.

Do roztoku Br<sub>2</sub> (5,47 mmol, 282 μl) ve vodě (40 ml) byla za vzniku suspenze přidána látka **12** (2,79 mmol, 500 mg). Reakční směs byla míchána přes noc za laboratorní teploty a poté zakoncentrována za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn ve vodě (25 ml) a zneutralizován 2 M NaOH. Vzniklá suspenze byla dána na dvě hodiny do ledové lázně. Pevný oranžový produkt byl zfiltrován, promyt vychlazenou vodou (20 ml) a vysušen v sušárně při 50 °C. (Holý *et al.*, 1986).

výtěžek: 49 % (352 mg)

HPLC čistota: 95 %

ES<sup>+</sup>-MS m/z: (259,8, [M+H]<sup>+</sup>)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 3,69 (q, *J* = 5,8 Hz, 2H), 4,14 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H), 4,97 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H), 7,33 (s, 2H), 8,08 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm: 46,99; 59,15; 119,56; 127,55; 151,42; 153,19; 155,25.

#### 4.3.5 8-benzylamino-9-(2-hydroxyethyl)adenin (14)

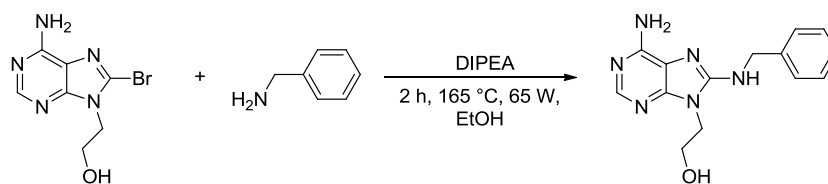


Schéma 5. Příprava 8-benzylamino-9-(2-hydroxyethyl)adeninu.

V 10 ml reakční vialce byla rozsuspendována látka **13** (0,52 mmol, 134 mg) s benzylaminem (2,60 mmol, 284  $\mu$ l) a DIPEA (1,04 mmol, 178  $\mu$ l) v EtOH (5 ml). Vzniklá suspenze byla zahřívána v mikrovlnném reaktoru po dobu 2 h (165 °C, max. výkon 65 W). Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 4:1). Reakční směs byla poté zakoncentrována za sníženého tlaku na vakuové odparce za vzniku žlutého gelu. Surový produkt byl částečně přečištěn krystalizací z DCM (20 ml). Finální purifikace byla provedena pomocí sloupcové chromatografie (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 14:1). Frakce byly následně zakoncentrovány za sníženého tlaku na vakuové odparce za vzniku žlutého gelu. Výsledný produkt byl ponechán přes noc ke krystalizaci z DCM (5 ml) při 4 °C. Následně byla bílá pevná látka zfiltrována, promyta vychlazeným DCM (10 ml) a vysušena v sušárně při 50 °C.

výtěžek: 35 % (51 mg)

HPLC čistota: 98 %

ESI<sup>+</sup>-MS m/z: (285,1, [M+H]<sup>+</sup>)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm: 3,65 (q, *J* = 5,5 Hz, 2H), 4,02 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H), 4,56 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H), 5,09 (t, *J* = 5,2 Hz, 1H), 6,35 (s, 2H), 7,11 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H), 7,20 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,29 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 7,36 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,87 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm: 43,60; 45,89; 59,75; 117,26; 127,24; 127,65; 128,75; 140,44; 149,30; 150,97; 152,58; 152,75.

#### 4.3.6 8-benzylaminoadenin (15)

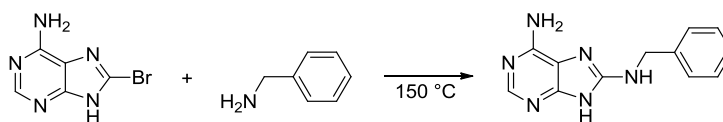


Schéma 6. Příprava 8-benzylaminoadeninu.

V 5 ml reakční vialce byl smíchán adenin (0,93 mmol, 200 mg) s benzylaminem (9,18 mmol, 1 ml). Směs byla zahřívána na 150 °C po dobu 2 h. Následně byla reakční směs zakoncentrována na vakuové odparce. Produkt byl nejprve překrystalizován

z  $\text{CHCl}_3$  (20 ml) a následně z acetonu (10 ml). Výsledný produkt byl vysušen v sušárně při  $50\text{ }^\circ\text{C}$  (Young *et al.*, 1990).

výtěžek: 55 % (146 mg)

HPLC čistota: 99 %

ESI<sup>+</sup>-MS m/z: (240,9, [M+H]<sup>+</sup>)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, aceton-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm: 4,47 (d,  $J = 6,1$  Hz, 2H), 6,25 (s, 2H), 7,20 (t,  $J = 6,9$  Hz, 1H), 7,28-7,33 (m, 6H), 7,87 (s, 1H).

#### 4.3.7 8-(2-fenylethylamino)adenosin (16)

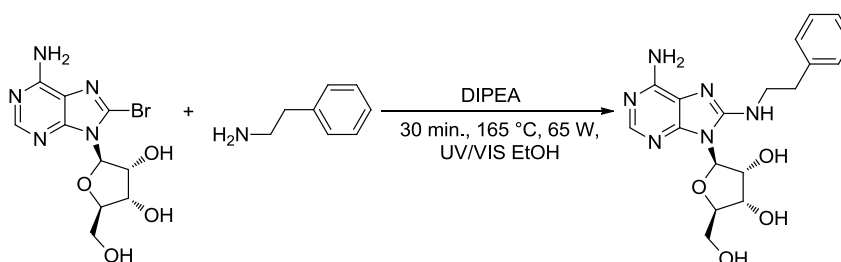


Schéma 7. Příprava 8-fenylethyladenosinu.

V 10 ml reakční vialce byla rozsuspendována látka **1** (0,28 mmol, 100 mg) s 2-fenylathylaminem (1,45 mmol, 182  $\mu$ l) a DIPEA (0,57 mmol, 99  $\mu$ l) v EtOH (5 ml). Suspenze byla zahřívána v mikrovlnném reaktoru po dobu 30 min ( $165\text{ }^\circ\text{C}$ , max. výkon 65 W). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  4:1). Reakční směs byla zakoncentrována za sníženého tlaku na vakuové odparce. K odparku byl přidán DCM (10 ml) a vzniklá suspenze byla ponechána při  $4\text{ }^\circ\text{C}$  ke krystalizaci do druhého dne. Následně byla vzniklá sraženina zfiltrována a promyta DCM. Surový produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie. Produkt byl eluován směsí  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9:1 (v/v). Frakce byly zakoncentrovány na vakuové odparce a vzniklý bílý produkt byl poté vysušen v sušárně při  $50\text{ }^\circ\text{C}$ .

výtěžek: 75 % (84 mg)

HPLC čistota: 98 %

$[\alpha]_D^{20}$ :  $+77,3^\circ$  (koncentrace 3,88  $\mu$ M, MeOH)

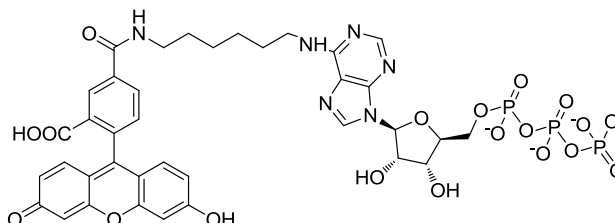
ESI<sup>+</sup>-MS m/z: (387,3, [M+H]<sup>+</sup>)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm: 2,88 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H), 3,52-3,64 (m, 3H), 3,93 (d,  $J = 1,8$  Hz, 1H), 4,04-4,1 (m, 1H), 4,60 (q,  $J = 7,0$  Hz, 1H), 5,13 (d,  $J = 4,0$  Hz, 1H), 5,19 (d,  $J = 6,7$  Hz, 1H), 5,83-5,88 (m, 2H), 6,50 (s, 2H), 7,02 (t,  $J = 5,4$  Hz, 1H), 7,27-7,28 (m, 6H), 7,86 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm: 35,37; 44,63; 62,19; 71,26; 71,48; 86,16; 86,94; 117,62; 126,59; 128,84; 129,23; 140,18; 149,05; 150,24; 151,68; 152,96.

## 4.4 Biologická aktivita

### 4.4.1 Fluorescenční polarizační test



Obr. 17  $\text{N}^6$ -(6-amino)hexyl-ATP-5-FAM.

Fluorescenční polarizační test probíhal na his-tagované nukleotid vazebné doméně Hsc70 (residua 3-384) s použitím fluorescenčně značeného ATP (obr. 17). Pro určení disociační konstanty  $K_D$  této interakce byly různé koncentrace nukleotid vazebné domény Hsc70 titrovány 30 nM fluorescenčně značeným ATP v reakčním pufru (25 mM Hepes, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM dithiotreitol, 0,05% Tween-20). K odstranění nespecifických vazeb byl použit hovězí sérový albumin (Sigma Aldrich). Reakce a měření byly provedeny ve 384 jamkové destičce Nunc Plate (Thermo Scientific) v celkovém objemu 14  $\mu\text{l}$ . Destička byla inkubována na třepačce po dobu 1 h. Fluorescenční polarizace byla poté měřena na FilterMax<sup>TM</sup> F5 Multimode Microplate Readeru (Molecular Devices) při 21 °C a emisní vlnové délce 535 nm (excitace 485 nm). Disociační konstanta byla spočítána pomocí následujícího vzorce:

$$FP = B_{max} * C / (K_d + C)$$

FP = fluorescenční polarizace, C = koncentrace analyzovaného proteinu,  $B_{max}$  = maximální specifická vazebná kapacita,  $K_d$  = disociační konstanta.

Výsledky byly vyhodnoceny pomocí GraphPad Prism verze 5.03 pro Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).

### 4.4.2 Kompetiční test

Screening připravených látek byl proveden pomocí kompetičního fluorescenčně polarizačního testu při fixní koncentraci inhibitoru (100  $\mu\text{M}$ ). Hodnoty  $\text{IC}_{50}$  byly získány ve stejném testu (30 nM fluorescenčně značený ATP, 5,5  $\mu\text{M}$  NVD Hsc70) při různé koncentraci inhibitoru (1 nM až 1 mM). Složení pufru, reakční objem a přístrojové vybavení bylo stejné jako při předchozím fluorescenčním polarizačním testu.

Hodnota IC<sub>50</sub> byla spočítána pomocí vzorce:

$$FP = B_{min} + (B_{max} - B_{min}) / (1 + 10^{\log C - \log IC_{50}})$$

FP = fluorescenční polarizace, C = koncentrace analyzovaného kompetitoru, B<sub>max</sub> a B<sub>min</sub> = specifická vazebná kapacita, logIC<sub>50</sub> = logaritmus koncentrace kompetitoru, při které se snižuje aktivita mezi B<sub>max</sub> a B<sub>min</sub> na polovinu.

Hodnoty K<sub>i</sub> byly získány pomocí konvertoru dostupném na webových stránkách (<http://botdb.abcc.ncifcrf.gov/toxin/kiCaIPL.jsp> (PMID: 19395593)).

#### 4.4.3 Cytotoxicita na vybraných buněčných liniích

Cytotoxicita látek byla testována na nádorových buněčných liniích G361, K562 a MCF7. Látky byly k buněčným liniím přidávány v koncentrační řadě 0,1 až 100 μM.

K buňkám nádorové linie G361 kultivovaným v DMEM médiu (obohacené o 10% fetální hovězí sérum, 4 mM glutamin, 100 IU/ml penicilin a 100 μg/ml streptomycin) ve vlhčeném inkubátoru s CO<sub>2</sub> při 37 °C byly jednotlivé testované látky ve výsledné koncentraci 50 μM. Po 72 hodinové inkubaci byl k buňkám přidán fluorescenční acetomethoxy-kalcein a následně byla změřena fluorescence živých buňek pomocí spektrofotometru pro mikrotitrační destičky (Fluoroskan Ascent microplate reader, Labsystems) emisní vlnové délce 538 nm (excitace 485 nm) (Jorda *et al.*, 2011).

## 5 Výsledky a diskuze

Vývoj, syntéza a testování potenciálních inhibitorů Hsp70 je společným projektem Regionálního centra aplikované molekulární onkologie (Brno) a Laboratoře růstových regulátorů Univerzity Palackého v Olomouci.

V brněnské výzkumné skupině probíhal počítačový návrh látek a jejich následné testování. Massey ve své publikaci poukázal na obtížnost počítačové predikce inhibitorů pro nukleotid vazebné místo Hsp70. Vypočítaná hodnota Dskore 0,95 pro Hsp70 naznačuje obtížnou predikci. Software zahrnoval algoritmus pro velikost, ohraničení, hydrofobicitu/hydrofilitu vazebného místa (Massey, 2010). Naším cílem byla tedy příprava inhibitorů, jejichž K<sub>i</sub> by napomohly upřesnit parametry počítačového modelu vazebného místa Hsp70 pro přesnější dokování a návrh nových potenciálních inhibitorů.

## 5.1 Syntéza

Syntéza C8-substituovaných derivátů adenosinu probíhala ve dvou krocích (Schéma 8). V první části byla provedena bromace adenosinu podle publikace Capon a Trotter, 2005 s výtěžkem 73% (v publikaci 55 %) za vzniku **1**, který byl prekurzorem pro následující reakce. V další části syntézy byly k látce **1** připojovány různé substituované benzylaminy podle modifikovaného protokolu Williamson *et al.*, 2009.

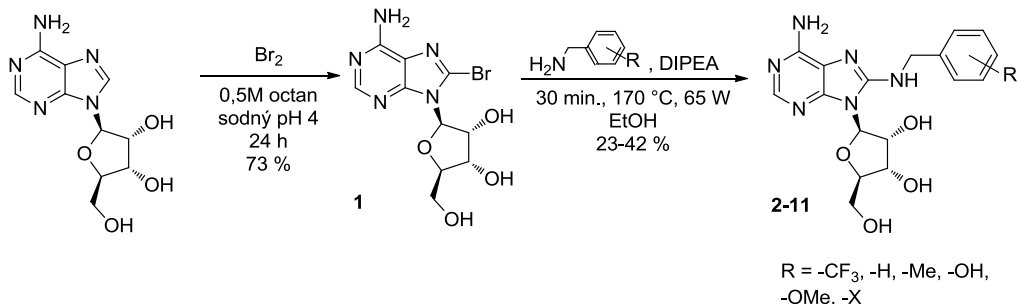


Schéma 8. Příprava 8-substituovaných adenosinů.

Purifikace látek probíhala krystalizací z DCM (odstranění majority benzylaminu) a na závěr pomocí sloupcové chromatografie s reverzní fází (C18). V porovnání s původní publikací (18 %) byla látka **5** získána s vyšším výtěžkem (40 %). Rozdíl byl v purifikaci, kde autor použil krystalizaci ze směsi MeOH/DCM (1:4), PS-benzaldehyd a flash chromatografii.

Nízké výtěžky reakcí mohly být způsobeny jednak použitím vysoké teploty v MR (vznik vedlejších a degradačních produktů) a při purifikaci pomocí reverzní fáze. V tabulce 3 jsou přehledně zobrazeny připravené látky s jejich reakční dobou, teplotou a výtěžkem.

Tab. 2. Přehled připravených potenciálních inhibitorů Hsp70. <sup>a</sup> výtěžek publikovaný v článku Williamsona *et al.*, 2009.

Látka	Název	Reakční doba (min)	Reakční teplota (°)	Výtěžek (%)
<b>2</b>	8-benzylaminoadenosin	30	170	28
<b>3</b>	8-(3-chlorbenzylamino)adenosin	60	170	29
<b>4</b>	8-(4-chlorbenzylamino)adenosin	30	170	34
<b>5</b>	8-(3,4-dichlorbenzylamino)adenosin	75	140	40 (18) <sup>a</sup>
<b>6</b>	8-(4-trifluormethylbenzylamino)adenosin	30	165	24
<b>7</b>	8-(4-methylbenzylamino)adenosin	45	170	24
<b>8</b>	8-(4-methoxybenzylamino)adenosin	30	170	38
<b>9</b>	8-(2,5-dimethoxybenzylamino)adenosin	30	170	42
<b>10</b>	8-(3,4-dimethoxybenzylamino)adenosin	30	170	23
<b>11</b>	8-(3,4,5-trimethoxybenzylamino)adenosin	30	170	25

S cílem zjistit minimální strukturní nároky na látky s inhibičními vlastnostmi vůči nukleotid vazebné doméně Hsp70 byl modifikován adenin v pozici N9. Nejprve byl připraven inhibitor s 2-hydroxyethylem v pozici N9 (Schéma 9). V prvním kroku byl připraven 9-(2-hydroxyethyl)adenin (53 %) (Holý, 1978), který byl následně nabromován v pozici C8 (49 %) (Holý *et al.*, 1986). Posledním krokem bylo připojení benzylaminu za použití podobných podmínek jako u látek **2-11**. Konečným produktem byl 8-(benzylamino)-9-(2-hydroxyethyl)adenin (**14**) s výtěžkem 35 % (Tab. 2).

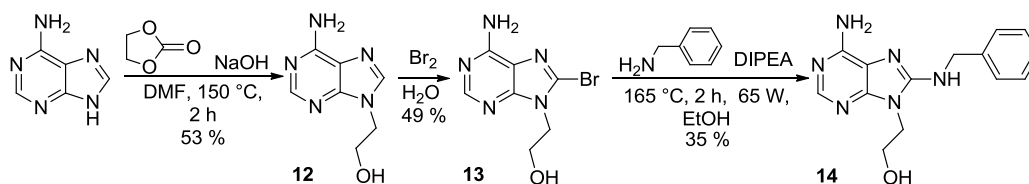


Schéma 9. Příprava 9-(2-hydroxyethyl)adeninu.

Další látkou s modifikací v pozici N9 byl 8-benzylaminoadenin (**15**) (55 %), s cílem zjistit, zda je ribosa nezbytným strukturním prvkem pro navázání do vazebného místa Hsp70. Látka byla připravena podle protokolu Young *et al.*, 1990 (Schéma 10).

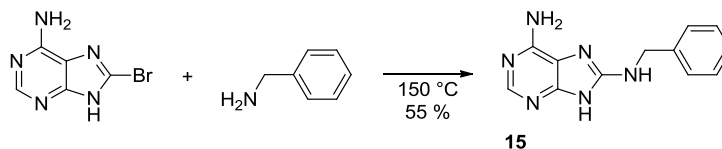


Schéma 10. Příprava 8-benzylaminoadeninu.

Na závěr byla připravena látka 8-(2-fenylethylamino)adenosin (75 %), která se lišila od látky **2** jednou methylenovou skupinou. Při reakci byly použity stejné podmínky jako u látek **2-11** (Schéma 11).

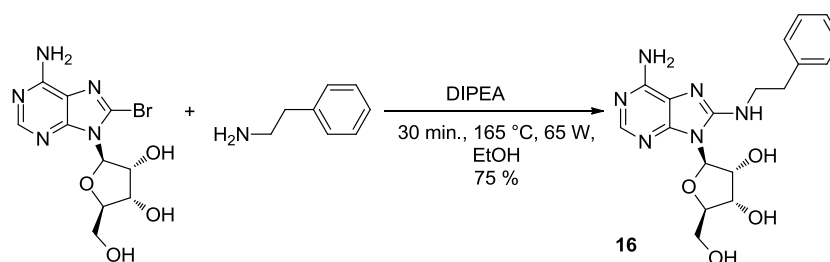


Schéma 11. Příprava 8-(2-fenylethylamino)adenosinu.

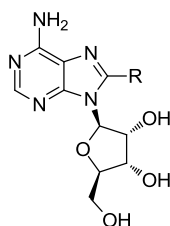
## 5.2 Biologická aktivita

U připravených látek **2-11** a **14-16** byla testována schopnost inhibice vazby fluorescenčně značeného ATP do aktivního místa nukleotid vazebné domény Hsp70 pomocí kompetičního testu a cytotoxicita na vybraných nádorových buněčných liniích.

V kompetičním testu vykazovala většina látek (**2-11**) přibližně stejnou aktivitu  $K_i$  v rozmezí 1,3-2,7  $\mu\text{M}$  (Tab. 4). Výjimkou byla látka **8** s hodnotou  $K_i$  7,9  $\mu\text{M}$ . Nejúčinnějšími látkami byly **4** (4-chlorbenzylamino derivát) a **9** (2,5-dimethoxybenzylamino derivát) s  $K_i$  1,3  $\mu\text{M}$ . Látky **4** a **9** se vázaly do aktivního místa v porovnání s přirozeným substrátem ATP 1,7krát lépe. U látek, které byly modifikovány v pozici N9 **14** a **15**, byly hodnoty  $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$  (látky byly neaktivní). ATP ( $K_i = 2,2 \mu\text{M}$ ) byl použit jako pozitivní kontrola pro porovnání schopnosti inhibitorů kompetovat s fluorescenčně značeným ATP. Látka **16** byla měřena v rozdílné sérii měření, tudíž nelze použít absolutní hodnoty  $K_i$ , ale jeho vazba do NVD byla 4krát slabší než vazba ATP.

**Tab. 3. Biologická aktivita inhibitorů Hsp70 pomocí kompetitivního fluorescenčního testu.** Pro porovnání schopnosti inhibitorů kompetovat s fluorescenčně značeným ATP byl neznačený ATP použit jako kontrola ( $\text{IC}_{50}$  a  $K_i$  rovny 2,2  $\mu\text{M}$ ).

Látka	R	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )
<b>2</b>		2,4	2,3
<b>3</b>		2,2	2,1
<b>4</b>		1,4	1,3
<b>5</b>		1,7	1,7
<b>6</b>		2,6	2,5
<b>7</b>		2,2	2,1
<b>8</b>		8,2	7,9
<b>9</b>		1,3	1,3
<b>10</b>		2,3	2,2
<b>11</b>		2,8	2,7





Na základě získaných výsledků měly na aktivitu největší vliv substituce chlorem v *para* poloze a methoxy skupinou v poloze 2 a 5. Tyto substituce vedou ke zvýšení  $\pi$ - $\pi$  interakce mezi ligandem a Arg272 v aktivním místě nukleotid vazebné domény. V porovnání s látkou **2** přidáním methylenového můstku do postranního řetězce v poloze C8 (**16**), došlo ke snížení aktivity 4krát. Pravděpodobně touto modifikací došlo k oddálení aromatického kruhu a následnému oslabení  $\pi$ -interakce. Jelikož látky **14** a **15** nevykazovaly žádnou aktivitu, předpokládáme, že je ribosa nezbytným strukturním motivem pro vazbu do aktivního místa.

Dále byla u látek **2-11** testována jejich toxicita na třech nádorových buněčných liniích: MCF7, K562 a G361. Všechny látky však byly neúčinné, protože jejich hodnoty  $IC_{50}$  byly vyšší než 100  $\mu$ M.

Poté byly aplikovány látky v 50  $\mu$ M koncentraci na buněčnou linii G361, přičemž se vyhodnocovala procentuální viabilita buněk (Tab. 4).

**Tab. 4. Procentuální viabilita.** Procentuální viabilita buněčné nádorové linie G361 po aplikaci látek **2-11** o koncentraci 50  $\mu$ M po dobu 72 h.

látka	viabilita (%)	odchylka měření
<b>2</b>	98,22	0,94
<b>3</b>	72,17	2,70
<b>4</b>	81,62	12,24
<b>5</b>	72,54	4,39
<b>6</b>	77,66	0,59
<b>7</b>	97,16	0,14
<b>8</b>	101,45	5,59
<b>9</b>	97,37	1,63
<b>10</b>	83,13	0,03
<b>11</b>	82,13	2,07

Na základě výsledků testu lze konstatovat, že látky nevykazovaly výraznou cytotoxicitu. Nejmenší procentuální životnost prokazovaly buňky G361 po aplikaci látky **3**, kdy nepřežilo přibližně 25 % buněk. Látky **4** a **9**, které vykazovaly nejnižší hodnoty v inhibičním testu Hsp70, byly netoxické vůči testované buněčné linii (viabilita 82, respektive 98 %). Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že inhibice Hsp70 způsobená aplikací připravených látek není pro tyto buňky letální. Snížená viabilita po aplikaci některých látek byla pravděpodobně způsobena jiným mechanismem než inhibicí Hsp70.

## 6 Závěr

V rámci této bakalářské práce byla vypracována rešerše literatury na téma Hsp70. V teoretické části byla podrobně popsána struktura Hsp70, jeho funkce a především přehled dosud známých látek, které inhibují jeho aktivitu. V praktické části bylo připraveno celkem 16 látek, z toho bylo 13 finálních potenciálních inhibitorů otestováno v kompetičním polarizačním testu pro zjištění míry schopnosti kompetovat s fluorescenčně značeným ATP o vazebné místo v Hsp70. Dále byla testována jejich cytotoxicita na vybraných buněčných liniích G361, K562 a MCF7.

Nejúčinnějšími látkami v kompetičním testu byly látky **4** a **9** ( $K_i = 1,3 \mu\text{M}$ ), které se do nukleotid vazebné domény Hsp70 vázaly 1,7krát lépe než přirozený substrát ATP. Testované látky vykazovaly na vybraných buněčných liniích nízkou cytotoxicitu ( $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$ ). Nejlepší výsledek měla látka **3**, kde po aplikaci inhibitoru (finální koncentrace  $50 \mu\text{M}$ ) na buněčnou linii G361 přežilo 75 % buněk. Z dosažených výsledků vyplývá, že cytotoxické účinky připravených látek byly pravděpodobně způsobeny jiným mechanismem než inhibicí Hsp70.

## 7 Použitá literatura

Alberts B. (2008), *Molecular biology of the cell*, 5. vydání, str. 388, Garland Science, NY, USA.

Aprile F. A., Dhulesia A., Stengel F., Roodveldt C., Benesch J. L. P., Tortora P., Robinson C. V., Salvatella X., Dobson C. M., Cremades N. (2013) Hsp70 Oligomerization Is Mediated by an Interaction between the Interdomain Linker and the Substrate-Binding Domain. *Plos One* **8**, 1-17.

Ballinger C. A., Connell P., Wu Y. X., Hu Z. Y., Thompson L. J., Yin L. Y., Patterson C. (1999) Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4535-4545.

Bradley D., Williams G., Lawton M. (2010) Drying of Organic Solvents: Quantitative Evaluation of the Efficiency of Several Desiccants. *J. Org. Chem.* **75**, 8351-8354.

Brocchieri L., de Macario E. C., Macario A. J. L. (2008) Hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. *BMC Evol. Biol.* **8**, 1-20.

Capon R. J., Trotter N. S. (2005) N-3,5'-cyclooxanthosine, the first natural occurrence of a cyclonucleoside. *J. Nat. Prod.* **68**, 1689-1691.

Ciocca D. R., Calderwood S. K. (2005) Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress & Chaperones* **10**, 86-103.

Daugaard M., Rohde M., Jaattela M. (2007) The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett.* **581**, 3702-3710.

Đurech M., Vojtěšek B., Müller P. (2012) The many roles of molecular chaperones and co-chaperones in tumor biology. *Klin. Onkol.* **25**, 45-49.

Evans C. G., Chang L., Gestwicki J. E. (2010) Heat Shock Protein 70 (Hsp70) as an Emerging Drug Target. *J. Med. Chem.* **53**, 4585-4602.

Fewell S. W., Day B. W., Brodsky J. L. (2001) Identification of an inhibitor of hsc70-mediated protein translocation and ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **276**, 910-914.

Goloudina A. R., Demidov O. N., Garrido C. (2012) Inhibition of HSP70: A challenging anti-cancer strategy. *Cancer Lett.* **325**, 117-124.

Greene M. K., Maskos K., Landry S. J. (1998) Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 6108-6113.

Gupta R. S. (1998) Protein phylogenies and signature sequences: A reappraisal of evolutionary relationships among archaebacteria, eubacteria, and eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1435-1491.

Harrison C. (2003) GrpE, a nucleotide exchange factor for DnaK. *Cell Stress & Chaperones* **8**, 218-224.

Harrison C. J., HayerHartl M., DiLiberto M., Hartl F. U., Kuriyan J. (1997) Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK. *Science* **276**, 431-435.

Hernandez M. P., Sullivan W. P., Toft D. O. (2002) The assembly and intermolecular properties of the hsp70-Hop-hsp90 molecular chaperone complex. *J. Biol. Chem.* **277**, 38294-38304.

Hohfeld J., Minami Y., Hartl F. U. (1995) Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc/Hsp40 reaction cycle. *Cell* **83**, 589-598.

Holý A. (1978) Synthesis of new mono hydroxyalkyl and disubstituted hydroxyalkyl and aminoalkyl derivatives of heterocyclic bases. *CCCC* **43**, 3444-3465.

Holý A., Kohoutová J., Merta A., Votruba I. (1986) Studies on S-adenosyl-L-homocysteinehydrolase. XVI. 9-(aminoalkyl)88-hydroxyadenines: preparation, mechanism of formation and use in affinity chromatography of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase. *CCCC* **51**, 459-477.

Chafekar S. M., Wisen S., Thompson A. D., Echeverria A., Walter G. M., Evans C. G., Makley L. N., Gestwicki J. E., Duennwald M. L. (2012) Pharmacological Tuning of Heat Shock Protein 70 Modulates Polyglutamine Toxicity and Aggregation. *ACS Chem. Biol.* **7**, 1556-1564.

Jiang J. H., Ballinger C. A., Wu Y. X., Dai Q., Cyr D. M., Hohfeld J., Patterson C. (2001) CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase - Identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation. *J. Biol. Chem.* **276**, 42938-42944.

Jinwal U. K., Miyata Y., Koren J., Jones J. R., Trotter J. H., Chang L., O'Leary J., Morgan D., Lee D. C., Shults C. L., Rousaki A., Weeber E. J., Zuiderweg E. R. P., Gestwicki J. E., Dickey C. A. (2009) Chemical Manipulation of Hsp70 ATPase Activity Regulates Tau Stability. *J. Neurosci.* **29**, 12079-12088.

Jorda R., Havlíček L., McNae I. W., Walkinshaw M. D., Voller J., Šturc A., Navrátilová J., Kuzma M., Mistrík M., Bártek J., Strnad M., Kryštof V. (2011) Pyrazolo 4,3-d pyrimidine Bioisostere of Roscovitine: Evaluation of a Novel Selective Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases with Antiproliferative Activity. *J. Med. Chem.* **54**, 2980-2993.

Kaiser M., Kuhn A., Reins J., Fischer S., Ortiz-Tanchez J., Schlee C., Mochmann L. H., Heesch S., Benlasfer O., Hofmann W. K., Thiel E., Baldus C. D. (2011) Antileukemic activity of the HSP70 inhibitor pifithrin-mu in acute leukemia. *Blood Cancer J.* **1**, 1-8.

Kampinga H. H., Craig E. A. (2010) The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 579-592.

Kelley W. L. (1999) Molecular chaperones: How J domains turn on Hsp70s. *Curr. Biol.* **9**, R305-R308.

Kiang J. G., Tsokos G. C. (1998) Heat shock protein 70 kDa: Molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol. Ther.* **80**, 183-201.

Kirkegaard T., Roth A. G., Petersen N. H. T., Mahalka A. K., Olsen O. D., Moilanen I., Zylicz A., Knudsen J., Sandhoff K., Arenz C., Kinnunen P. K. J., Nylandsted J., Jaattela M. (2010) Hsp70 stabilizes lysosomes and reverts Niemann-Pick disease-associated lysosomal pathology. *Nature* **463**, 549-554.

Koya K., Li Y., Wang H., Ukai T., Tatsuta N., Kawakami M., Shishido T., Chen L. B. (1996) MKT-077, a novel rhodacyanine dye in clinical trials, exhibits anticarcinoma activity in preclinical studies based on selective mitochondrial accumulation. *Cancer Res.* **56**, 538-543.

Kragol G., Lovas S., Varadi G., Condie B. A., Hoffmann R., Otvos L. (2001) The antibacterial peptide pyrrocoricin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry* **40**, 3016-3026.

Leu J. I. J., Pimkina J., Frank A., Murphy M. E., George D. L. (2009) A Small Molecule Inhibitor of Inducible Heat Shock Protein 70. *Mol. Cell* **36**, 15-27.

- Li X. K., Srinivasan S. R., Connarn J., Ahmad A., Young Z. T., Kabza A. M., Zuiderweg E. R. P., Sun D. X., Gestwicki J. E. (2013a) Analogues of the Allosteric Heat Shock Protein 70 (Hsp70) Inhibitor, MKT-077, As Anti-Cancer Agents. *Acs Med. Chem. Lett.* **4**, 1042-1047.
- Li Z., Hartl F. U., Bracher A. (2013b) Structure and function of Hip, an attenuator of the Hsp70 chaperone cycle. *Nature Struct. Mol. Biol.* **20**, 929-937.
- Mamelak D., Lingwood C. (2001) The ATPase domain of hsp70 possesses a unique binding specificity for 3'-sulfogalactolipids. *J. Biol. Chem.* **276**, 449-456.
- Massey A. J. (2010) ATPases as Drug Targets: Insights from Heat Shock Proteins 70 and 90. *J. Med. Chem.* **53**, 7280-7286.
- Mayer M. P., Bukau B. (2005) Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 670-684.
- Mayer M. P. (2013) Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends Biochem. Sci.* **38**, 507-514.
- Muchowski P. J., Wacker J. L. (2005) Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 11-22.
- Otvos L., O I., Rogers M. E., Consolvo P. J., Condie B. A., Lovas S., Bulet P., Blaszczyk-Thurin M. (2000) Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry* **39**, 14150-14159.
- Patury S., Miyata Y., Gestwicki J. E. (2009) Pharmacological Targeting of the Hsp70 Chaperone. *Curr. Top. Med. Chem.* **9**, 1337-1351.
- Ritossa F. (1962) New puffin pattern induced by temperature shock and dnp in *Drosophila*. *Experientia* **18**, 571-&.
- Rüdiger S., Germeroth L., SchneiderMergener J., Bukau B. (1997) Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *EMBO J.* **16**, 1501-1507.
- Scheufler C., Brinker A., Bourenkov G., Pegoraro S., Moroder L., Bartunik H., Hartl F. U., Moarefi I. (2000) Structure of TPR domain-peptide complexes: Critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* **101**, 199-210.

Takayama S., Xie Z. H., Reed J. C. (1999) An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. *J. Biol. Chem.* **274**, 781-786.

Tissiere A., Mitchell H. K., Tracy U. M. (1974) Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster* relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* **84**, 4535-4545.

Whetstone H., Lingwood C. (2003) 3'-sulfogalactolipid binding specifically inhibits Hsp70 ATPase activity in vitro. *Biochemistry* **42**, 1611-1617.

Williamson D. S., Borgognoni J., Clay A., Daniels Z., Dokurno P., Drysdale M. J., Foloppe N., Francis G. L., Graham C. J., Howes R., Macias A. T., Murray J. B., Parsons R., Shaw T., Surgenor A. E., Terry L., Wang Y. K., Wood M., Massey A. J. (2009) Novel Adenosine-Derived Inhibitors of 70 kDa Heat Shock Protein, Discovered Through Structure-Based Design. *J. Med. Chem.* **52**, 1510-1513.

Young R. C., Jones M., Milliner K. J., Rana K. K., Ward J. G. (1990) Purine derivatives as competitive inhibitors of human erythrocyte membrane phosphatidylinositol 4-kinase. *J. Med. Chem.* **33**, 2073-2080.

Zhu X. T., Zhao X., Burkholder W. F., Gragerov A., Ogata C. M., Gottesman M. E., Hendrickson W. A. (1996) Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* **272**, 1606-1614.

Zylicz M., Wawrzynow A. (2001) Insights into the function of Hsp70 chaperones. *IUBMB Life* **51**, 283-287.

<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

[http://www.uniprot.org/uniprot/?query=%28family%3A%22heat+shock%22+AND+protein+AND+70+AND+taxonomy%3Ahuman%29+AND+reviewed%3Ayes&sort=score,](http://www.uniprot.org/uniprot/?query=%28family%3A%22heat+shock%22+AND+protein+AND+70+AND+taxonomy%3Ahuman%29+AND+reviewed%3Ayes&sort=score)  
staženo 15.5.2014