

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Diplomová práce**

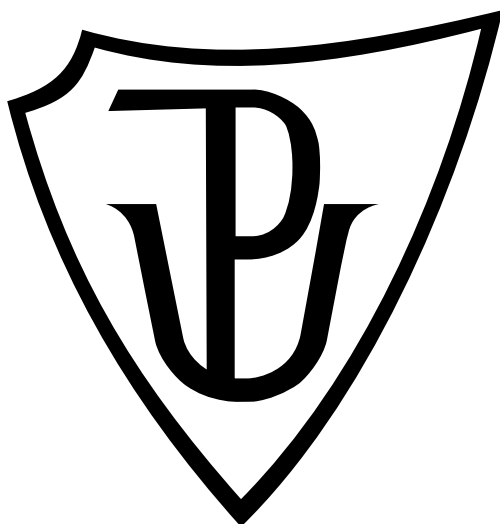
**Olomouc 2016**

**Bc. Agáta Kubíčková**

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Biologická charakterizace  
nových 2,6,9-trisubstituovaných purinů**

**Diplomová práce**

**Bc. Agáta Kubíčková**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie  
Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2016**

**Vedoucí práce: Mgr. Radek Jorda, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením  
Mgr. Radka Jordy, Ph.D. a uvedla jsem všechny použité prameny a literaturu.

V Olomouci dne 2.5. 2016

-----

## Souhrn

Cílem této diplomové práce bylo biologicky charakterizovat nové 2,6,9-trisubstituované puriny, které byly připraveny s cílem inhibovat kinasy rodiny PAK (p21-activated protein kinase). Strukturně se od sebe tyto látky odlišují substituentem v pozici N9 purinu a umístěním atomu Cl na benzylaminu v poloze C6.

Nejlepší inhibiční aktivitu vůči PAK vykazovala látka 4622, ale bohužel stále preferenčně inhibovala cyklin-dependentní kinasy (CDK), známý cíl takto substituovaných purinů. Jelikož se v rámci dané knihovny podařilo potlačit inhibiční aktivitu CDK, ale nikoliv vylepšit vůči PAK, naše pozornost se přesunula na látku s dobrými antiproliferačními vlastnostmi vůči nádorovým buněčným liniím. U látky 4841 bylo pomocí kinasového profilování zjištěno, že vykazuje velmi dobrou inhibiční aktivitu vůči proteinu ERBB4 (receptor epidermálního růstového faktoru 4).

Poté byly testovány účinky nízkomolekulárního inhibitoru ERBB látky 4841 na linii MCF-7 odvozenou od adenokarcinomu prsu. Z výsledků vyplývá, že buňky této linie jsou senzitivní vůči působení látky 4841. Jejich proliferace je vlivem 4841 téměř zastavena a v důsledku toho narůstá jejich počet v G1 fázi cyklu. Tento fakt je podpořen také mírně zvýšenou hladinou proteinu p21. Dále bylo zjištěno, že látka 4841 zabraňuje aktivaci receptorů ERBB a její inhibiční aktivita je srovnatelná s lapatinibem. Vlivem inhibice receptorů ERBB látkou 4841 dochází také ke snížení aktivity podřízené kinasy Erk1/2.

## Summary

The main aim of the theoretical part of this diploma thesis was description of the biological active 2,6,9-trisubstituted purines. The practical part was focused on the synthesis of novel inhibitors of PAK (p21 activated protein kinases) that mainly differ by the substituents at the N9 position of purine ring and by the position of chlorine on C6-aminobenzyl ring.

Compound 4622 has displayed the highest inhibition activity against PAK but unfortunately it also preferentially inhibits CDKs. We therefore selected for further profiling and biological characterization different compound displaying the most potent antiproliferative effect on tumour cell-lines. Results from the kinase selectivity screen showed us that compound 4841 exhibit significant inhibition activity against tyrosine kinase ERBB4 (HER4).

We have determined biological effects of 4841 on breast adenocarcinoma cell line MCF-7 and found that cells are sensitive to this drug, their proliferation diminished and inhibitor can also downregulate ERK1/2 pathway. We also found that 4841 is able to decrease phosphorylation of kinases of ERBB family and it's inhibition effect is comparable to lapatinib, approved anticancer drug.

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce Mgr. Radku Jordovi, Ph.D. za čas, vstřícnost a cenné rady, které mi poskytl během tvorby této práce. Zároveň děkuji doc. RNDr. Vladimíru Kryštofovi, Ph.D. za možnost vypracovat experimentální část práce v jeho laboratoři. Mé díky patří také personálu laboratoře, jmenovitě Ditě Jordové, Janě Hudcové, Janě Komárkové a Olze Hustákové, za poskytnuté cenné praktické rady a ochotu.

## Obsah

1.	Úvod .....	7
2.	Současný stav řešené problematiky .....	8
2.1.	Vybrané molekulární cíle 2,6,9–trisubstituovaných purinů.....	8
2.1.1.	Inhibitory CDK .....	8
2.1.2.	Inhibitory CK1 .....	11
2.1.3.	Inhibitory PAK.....	13
2.1.4.	Inhibitory BTK.....	16
2.1.5.	Inhibitory PI3K .....	17
2.1.6.	Inhibitory Src a Abl .....	19
2.1.7.	Inhibitory STAT3.....	22
2.2.	Receptory epidermálního růstového faktoru a jejich inhibitory.....	24
3.	Cíle práce .....	29
4.	Materiál a metodika .....	30
4.1.	Přístroje a laboratorní vybavení .....	30
4.2.	Použité chemikálie.....	30
4.3.	Použité roztoky .....	30
4.4.	Použité protilátky .....	31
4.5.	Buněčná linie .....	32
4.6.	Testované látky .....	32
4.7.	Kultivace buněk, sklízení a lyzace .....	32
4.8.	SDS-PAGE a Western blotting .....	33
4.9.	Cytometrické techniky .....	34
5.	Výsledky .....	35
5.1.	Výběr látek.....	35
5.2.	Vliv látky 4622 na buněčnou linii MCF-7.....	36
5.3.	Vliv látky 4667 na nádorovou buněčnou linii MCF-7.....	38
5.4.	Vliv látky 4841 na nádorovou buněčnou linii MCF-7.....	40
6.	Diskuze.....	50
7.	Závěr .....	54
8.	Literatura .....	55
9.	Seznam použitých zkratk a symbolů .....	63

## 1. Úvod

V současnosti vzrůstá zájem o puriny hlavně z hlediska jejich potencionálního terapeutického využití. Analýzou kompletně osekvenovaného lidského genomu bylo zjištěno, že 4 až 7 % ze všech kódovaných proteinů využívá pro svou funkci právě puriny jako kofaktory nebo kosubstráty (Chapman, 2004). To z této poměrně velké skupiny proteinů dělá potenciální terapeutický cíl purinů. U většiny nádorových onemocnění je aktivita proteinkinas klíčová pro proliferaci, migraci a zabránění procesům spjatým s programovanou buněčnou smrtí. Z těchto důvodů v poslední době nabývá na významu inhibice proteinkinas, jakožto nová strategie při léčbě nádorů. Mechanismus působení mnoha inhibitorů proteinkinas spočívá v jejich specifickém navázání do ATP-vazebného místa jedné nebo více kinas. Tím je toto místo blokováno a kinasa ztrácí svou fosfotransferasovou aktivitu. Detailní znalost struktury ATP-vazebného místa velmi usnadňuje navržení a vývoj nových kompetitivních inhibitorů kinas (Legrauerend *et* Grierson, 2006).

Nyní existuje mnoho purinových inhibitorů kinas, které vykazují nanomolární inhibiční aktivity. Další pozitivní farmakologickou vlastností purinových derivátů a jejich analogů je, že jsou do savčích buněk transportovány pasivně i aktivně stejně jako nukleotidy. Proto jsou některé zahrnuty mezi potencionální léčiva a to nejen protinádorová, ale i k léčbě Parkinsonovy choroby, deprese, diabetu, astmatu, revmatoidní artritidy a osteoporózy (Sharma *et al.*, 2016). Tento výčet jistě není konečný, jelikož další využití purinů jsou stále objevována.

V teoretické části práce uvádím stručný výběr dosud známých vysoce účinných 2,6,9-trisubstituovaných purinů se zaměřením na jejich design, popis mechanismu navázání do aktivních míst kinas a s tím související protinádorové účinky.



## 2. Současný stav řešené problematiky

### 2.1. Vybrané molekulární cíle 2,6,9–trissubstituovaných purinů

#### 2.1.1. Inhibitory CDK

Cyklin dependentní kinasy jsou rodinou serin/threoninových proteinkinás, které k tomu aby byly aktivní, potřebují podjednotku – cyklin (Manning *et al.*, 2002). U člověka je známo 20 CDK a 29 cyklinů (Cao *et al.*, 2014). V průběhu evoluce došlo u savců ke vzniku tří podrodin CDK regulujících buněčný cyklus (Cdk1, Cdk4 a Cdk5) a pěti podrodin řídících transkripci (Cdk7, Cdk8, Cdk9, Cdk11 a Cdk20). Podrodiny CDK se mezi sebou neliší jen funkcí, ale i počtem vázaných cyklinů. CDK regulující buněčný cyklus mohou vázat více různých cyklinů, kdežto CDK řídící transkripci jsou aktivovány jediným cyklinem. U některých CDK ovšem došlo ke kombinaci obou funkcí (Malumbres, 2014).

CDK mají v buněčné biologii nezastupitelnou roli, jelikož v závislosti na extra- a intracelulárních signálech regulují buněčný cyklus, genovou expresi, alternativní sestřih, diferenciaci, angiogenezi, exocytózu, autofagii a senescenci. Během mitózy se podílí na řízení duplikace centriolu, dynamiky dělicího vřeténka a kohezi sesterských chromatid (Carlsten *et al.*, 2013; Lim *et al.*, 2013; Malumbres, 2014). Na průběh buněčného dělení mají největší vliv CDK1 a CDK2. CDK2 určuje vstup buňky do S fáze a ovlivňuje celý její průběh včetně replikace DNA. Následně CDK1 řídí kompletní průběh M fáze a tedy i mitózy. CDK4 a CDK6 fosforylují a deaktivují nádorové supresory z rodiny Rb, což vede k uvolnění mnoha transkripčních faktorů nezbytných pro zahájení proliferace (Schaffer *et al.*, 2010).

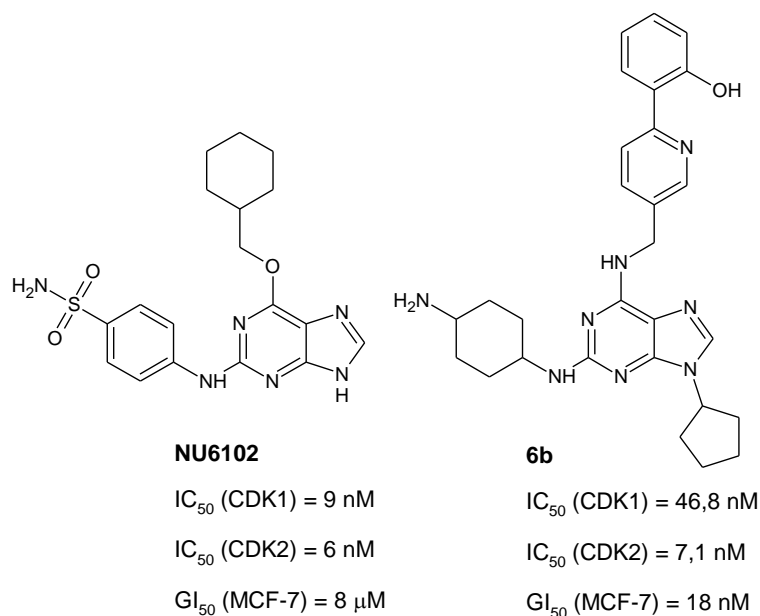
Vývoj inhibitorů CDK jakožto potenciálních protirakovinných léčiv započal přibližně před 20 lety. Mezi inhibitory CDK patří látky ze skupiny purinů, alkaloidů a flavonoidů. Většina z těchto látek svým strukturním uspořádáním mimikuje ATP, s nímž kompetují o ATP-vazebné místo CDK (Davies *et al.*, 2002a). První generace těchto látek je označována jako pan-CDK inhibitory, protože vykazují relativně nízkou specifitu vůči některé z CDK a inhibiční aktivitu v řádu mikromolů. Ze skupiny 2,6,9-trissubstituovaných purinů mezi ně náleží např.: olomoucín (Veselý *et al.*, 1994), CVT313 (Brooks *et al.*, 1997), purvalanol (Gray *et al.*, 1998), roskovitín (Seliciclib) (Havlíček *et al.*, 1997). Následně bylo vyvinuto mnoho látek na bázi purinů s výrazně lepší protirakovinnou a inhibiční aktivitou, řádově nanomolární. Konkrétně se jedná o tyto 2,6,9-trissubstituované puriny: H717 (Dreyer *et al.*, 2001), MDL108522 (Shum *et*

*al.*, 2001), 3-chloranilino deriváty (Oh *et al.*, 2001), deriváty NU (Davies *et al.*, 2002a; Hardcastle *et al.*, 2004), deriváty olomoucinu (Kryštof *et al.* 2005; Zatloukal *et al.* 2013), CR8 (Bettayeb *et al.*, 2008) nebo další bi-aryl deriváty (Trova *et al.* 2009a,b; Gucky *et al.* 2013).

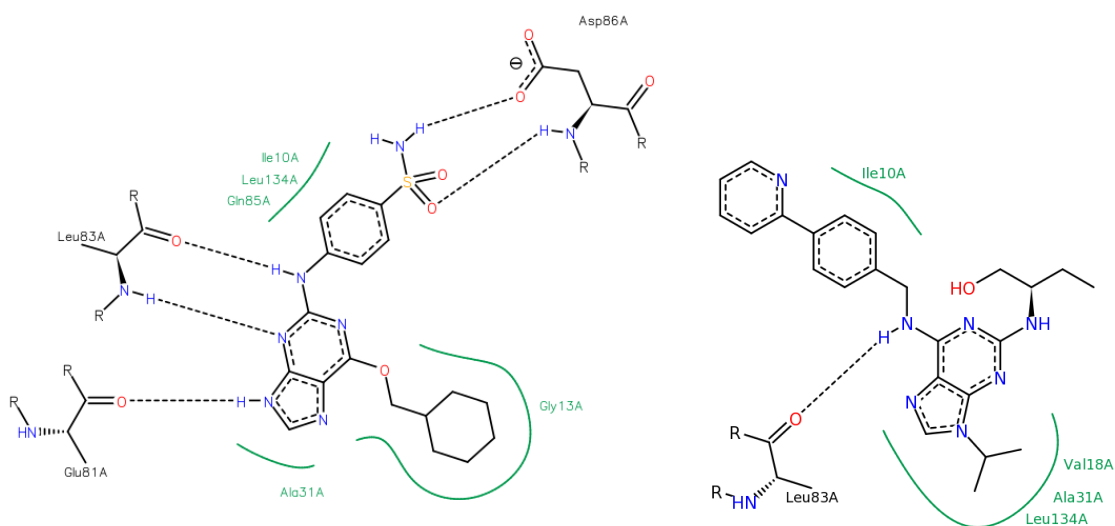
Způsob vazby derivátů 2,6,9-trisubstituovaných purinů do ATP-vazebného místa CDK byl objasněn kokrytalizací vybraných inhibitorů s CDK2. Všechny purinové deriváty se váží na CDK prostřednictvím konzervovaného donor-akceptor-donorového motivu. Ten spočívá ve dvou silných vodíkových vazbách mezi Leu83 a atomy dusíku N6, N7 a dále mezi kyslíkem Glu81 a vodíkem na C8 purinu Obr. 2 (Davies *et al.*, 2002a,b). Výjimkou jsou puriny ze skupiny NU mající ve své struktuře O<sup>6</sup>-cyklohexylmethyl skupinu. Tyto inhibitory také vytváří trojici vodíkových vazeb s residui Leu83 a Glu81, ale prostřednictvím atomů dusíku N1 a N9 a za použití atomu vodíku v poloze N2 purinu viz Obr. 2 (Davies *et al.*, 2002a,b; Hardcastle *et al.*, 2004). Svými CDK inhibičními účinky v řádu nanomolů mezi NU deriváty vyniká 2-(4-sulfanilyl)purin známý pod názvem NU6102 viz Obr. 1 (Davies *et al.*, 2002). Tato látka vytváří s ATP-vazebným místem CDK další dvě vodíkové vazby obě s Asp86 v jednom případě je donorem aminoskupina sulfonamidu a ve druhém je akceptorem atom O sulfonamidu. Obě vazby vytváří optimální hydrofobní prostředí pro interakce mezi anilinovou skupinou a povrchem CDK2 (Hardcastle *et al.*, 2004).

Při vývoji CDK inhibitoru, který by byl transportovatelný dopaminovým transportérem, byla vytvořena hybridní molekula mezi roskovitinem a substrátem transporteru označovaná jako CR8 (Bettayeb *et al.*, 2008). Roskovitin a CR8 se od sebe liší pouze substituentem v poloze C6, ale toto rozšíření struktury zapříčinilo několikanásobné zvýšení inhibiční aktivity vůči CDK. Objevem CR8 byl odstartován vývoj dalších biaryl derivátů s cílem nalézt pokud možno co nejefektivnější selektivní CDK inhibitory s výraznou antiproliferační aktivitou. Významného průměrně 1000násobného zlepšení antiproliferačních vlastností bylo dosaženo obměnou substituentů v poloze C6 purinu. Ty sice nezasahují do ATP-vazebného místa CDK2, ale jsou ve styku s vnějším prostředím kinasy a ovlivňují tak rozpustnost látek a jejich biologickou dostupnost. V rámci studií Guckého *et al.* (2013) a Trova *et al.* (2009a,b) bylo otestováno mnoho substituentů a jejich kombinací právě v poloze C6 purinu. Jako nejvhodnější substituent v této poloze byl objeven 2-hydroxy-(6-fenylpyridin-3-yl)methylamin viz látka 6b na Obr. 1.

Dále byly otestovány různé substituenty v poloze C2 purinu, kdy nejvíce vodíkových vazeb s aktivním místem CDK2, a to dvě, tvoří trans-4-aminocyklohexylamin. Vhodnou kombinací substituentů s ohledem na co nejlepší anti-CDK aktivitu je v pozici C2 purinu trans-4-aminocyklohexylamin a v pozici N9 cyklopentyl (Gucky *et al.*, 2013).



Obr. 1 Vybrané struktury purinových inhibitorů CDK s uvedenými inhibičními aktivitami.



Obr. 2 Vlevo je vyobrazen způsob vazby NU6102 na CDK2 (PDB ID: 4EOR), vpravo je na komplex CDK2 s cyklinem A navázán inhibitor CR8 (PDB ID: 3DDP).

### 2.1.2. Inhibitory CK1

Další skupinou kinas, u které byly 2,6,9-trisubstituované puriny nalezeny jako poteincionální inhibitory, jsou kasein kinasy (CK1). Proteinkinasy CK1 jsou rodinou serin/threoninových kinas sestávající ze sedmi členů:  $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2 a  $\gamma$ 3. Všechny isoformy jsou poměrně konzervované v kinasových doménách, odlišují se především délkou a primární strukturou obou konců nekatalytických domén. Každá z isoform preferuje již prefosforylované substráty (Cheong *et Virshup*, 2011). Rodina kasein kinas má velké množství rozličných substrátů, což nasvědčuje tomu, že reguluje rozmanité buněčné procesy jako např.: signální dráhu Wnt, mechanismy opravy DNA, vezikulární transport, dynamiku aktinového cytoskeletu a cirkadiální rytmy (Gallego *et Virshup*, 2007).

CK1 jsou ubikvitně exprimovány v centrálním nervovém systému. Bylo zjištěno, že deregulace CK1 $\delta$  a CK1 $\epsilon$  vede u člověka ke vzniku neurodegenerativních onemocnění, poruch spánku, zánětů a nádorů. Spekuluje se také o roli CK1 $\delta$  v signalizaci prostřednictvím dopaminu, uvolnění neurotransmiteru a fosforylaci receptorů neurotransmiteru (Zhou *et al.*, 2010). Byl prokázán vliv CK1 $\delta$  na progresi Alzheimerovy choroby, jelikož tato isoforma hyperfosforyluje Tau protein, což vede k odumírání neuronů. CK1 se také podílí na produkci  $\beta$ -amyloidů štěpením jejich prekursoru APP (amyloid precursor protein) (Flajolet *et al.*, 2007).

U nádorových onemocnění bylo prokázáno, že CK1 modifikují nádorový supresor p53 a onkogen MDM2, zabraňují navození apoptózy, ovlivňují stabilitu mikrotubulů a funkce centrosomu. U některých typů nádorů je zvýšena exprese CK1 $\delta$  a CK1 $\epsilon$ . Je známo, že tyto dvě isoformy aktivují Wnt dráhu prostřednictvím stabilizace  $\beta$ -cateninu, k čemuž dochází prostřednictvím fosforylace receptoru Lrp 5/6 (lipoprotein receptor-related protein 5/6) nebo proteinů rodiny Dishevelled. Tímto způsobem je CK1 $\epsilon$  schopna vyvolat transformaci a některé subtypy nádorů prsu jsou na této aberantní dráze závislé. Dále jsou kinasy CK1 $\delta$  a CK1 $\epsilon$  deregulovány v adenokarcinomu pankreatu a nádorech vaječníků (Cruciat *et al.*, 2013; Rodriguez *et al.*, 2012).

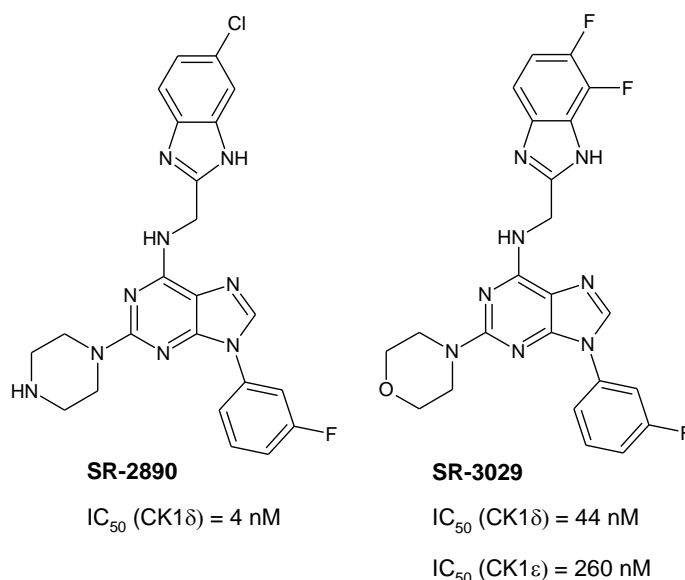
Protože rodina kasein kinas hraje důležitou roli v biologii nádorových buněk a její inhibitory by našly uplatnění v léčbě mnoha onemocnění, poutá jejich vývoj v současné době značnou pozornost. Tyto skutečnosti vedly Bibiana *et al.* (2013) k vývoji inhibitorů CK1 $\delta$  a CK1 $\epsilon$ . Pomocí high throughput screeningu (HTS) identifikovali „hit“ pojmenovaný SR-653234. Další rozsáhlé studie odhalily analog

SR-653234 označovaný jako SR-1277. Jelikož SR-1277 ( $IC_{50}(CK1\delta) = 49 \text{ nM}$ ,  $IC_{50}(CK1\epsilon) = 260 \text{ nM}$ ) vykazoval nízkou rozpustnost, neoptimální farmakokinetické vlastnosti a metabolickou nestabilitu byly syntetizovány jeho analogy.

Metabolická nestabilita byla snížena zavedením 3-fluoro-fenyly na N9, čímž vzrostla i inhibiční aktivita vůči CK1 $\delta$ . Poté byla připravena další série analogů lišících se substituenty na benzimidazolovém jádře v pozicích 4 a 5 vedoucí k dalšímu nárůstu inhibiční aktivity vůči CK1 $\delta$  v porovnání s výchozí látkou.

Jak již bylo zmíněno SR-1277 vykazovala nízkou rozpustnost. Za účelem jejího zvýšení byla syntetizována série analogů se substituenty piperazinem a piperidinem v pozici C2 purinu. Kinetická analýza prokázala, že nově získané inhibitory SR-2890 a SR-3029 jsou ATP-kompetitivními inhibitory CK1 $\delta$  a CK1 $\epsilon$  viz Obr. 3. Dalšími studiemi bylo prokázáno, že SR-2890 (CK1 $\delta$ ,  $IC_{50} = 4 \text{ nM}$ ) a SR-3029 (CK1 $\delta$ ,  $IC_{50} = 44 \text{ nM}$ , CK1 $\epsilon$ ,  $IC_{50} = 260 \text{ nM}$ ) jsou vysoce selektivními inhibitory CK1 $\delta$  a CK1 $\epsilon$  s *in vitro* a *in vivo* farmakokinetickými charakteristikami umožňujícími jejich další studium na xenograftech. Zejména látka SR-3029 vykazovala střední schopnost penetrovat přes hematoencefalickou bariéru a je reálně její testování na zvířecích modelech s nádorovým onemocněním mozku.

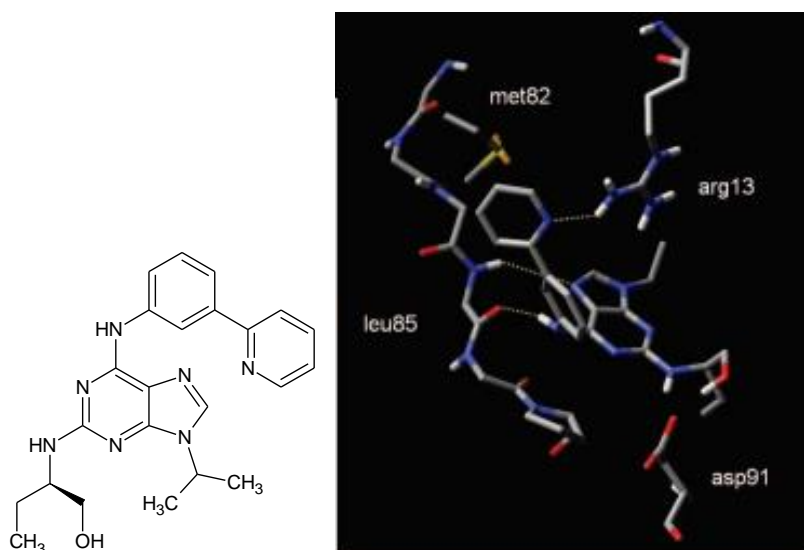
Nově získané inhibitory SR-2890 a SR-3029 interagují s Arg13 kinasy CK1 $\delta$  prostřednictvím substituentů na benzimidazolovém jádře, které se pevně váží do ATP-vazebného místa kinasy. Dále substituenty v pozici C2 interagují s Asp132 (Bibian *et al.*, 2013).



Obr. 3 Struktury purinových CK1 inhibitorů SR-2890, SR-3029 a jejich inhibiční aktivity.

Další nadějný inhibitor kinas, byl syntetizován skupinou Demangea *et al.* (2013). Při hledání CDK inhibitoru byl objeven 2,6,9-trisubstituovaný purin DRF053 viz Obr. 4 preferenčně inibující CK1 ( $IC_{50} = 10$  nM), dále komplexy CDK5/p25 ( $IC_{50} = 80$  nM) a CDK1/Cyclin B ( $IC_{50} = 220$  nM). Poté byly připraveny deriváty DRF053, ale žádný z nich nevykazoval zvýšenou inhibiční aktivitu vůči CK1.

Při dockingu DRF053 byly zjištěny dva způsoby, jakými se tato látka váže na CK1 $\delta$ . V obou případech se vazby zúčastňují atomy dusíku adeninu. N6 je donorem a N7 akceptorem vodíkové vazby s kavitou kinasy. Dva způsoby vazby DFR053 jsou způsobeny tím, že 3-pyridinylfenylamino skupina v pozici C6 může rotovat o 60 stupňů. Při prvním způsobu vazby dochází ke vzniku vodíkové vazby mezi dusíkem pyridinu a Arg16. Fenyl je přitom uspořádán paralelně s guanidino skupinou Arg16, čímž dochází ke vzniku  $\pi$ - $\pi$  interakce. Při druhém způsobu vazby dochází mezi 3-pyridinylfenylamino skupinou a C-terminálním koncem kinasy ke stacking interakcím a také k hydrofobním interakcím s residuem Pro87 (Demange *et al.*, 2013; Oumata *et al.*, 2008).



Obr. 4 Vlevo je uvedena struktura CK1 inhibitoru DRF053. Vpravo jeho pozice v ATP-vazebném místě CK1 $\delta$  získaná dokováním. Vodíkové vazby jsou znázorněny žlutými přerušovanými čarami. Převzato z Oumata *et al.*, 2008.

### 2.1.3. Inhibitory PAK

Rodina proteinem p21 aktivovaných serin/threoninových proteinkinás u člověka čítá celkem šest členů rozdělených na skupinu I (PAK 1 – 3) a II (PAK 4 - 6) (Kumar *et al.*, 2006). Obě skupiny jsou navzájem z 50 % sekvenčně

identické. Co se týče katalytických domén, ty jsou sekvenčně shodné mezi oběma skupinami z 80 - 90 %. Skupiny se od sebe odlišují autoinhibičními mechanizmy a částečně i svými funkcemi (Radu *et al.*, 2014).

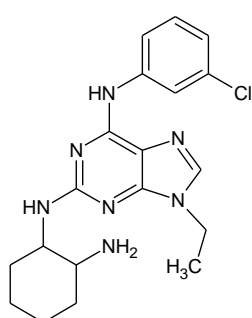
PAK regulují významné buněčné procesy jako např.: proliferaci, cytoskeletální dynamiku, motilitu, morfologii nebo vaskulogenezi (Hu *et al.*, 2011; Srinivasan *et al.*, 2009). Dále podporují vstup buněk do G1 fáze aktivací signálních drah Erk, Akt a Wnt (Arias-Romero *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). Vybranými substráty PAK jsou např. některé jaderné receptory, Aurora kinasa A a Polo-like kinasa 1 (Maroto *et al.*, 2008). Bylo zjištěno, že PAK4 negativně ovlivňuje hladinu proteinu p21, čímž podporuje přechod z G1 do S fáze (Nekrasova *et al.*, 2011). PAK ovlivňují i schopnost nádorů metastazovat, jelikož regulují expresi matrixových metalloproteinů, které následně rozvolňují extracelulární matrix (Rider *et al.*, 2013). Někteří členové rodiny PAK zabraňují navození programovatelné buněčné smrti, apoptózy, fosforylací proteinu BAD, který se poté nemůže navázat na protein Bcl-2. PAK také aktivují signální dráhu NF- $\kappa$ B a snižují aktivitu kaspas 7 a 8 (Friedland *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2011).

U mnoha nádorových onemocnění byla zjištěna korelace mezi zvýšenou aktivitou PAK a sníženou pravděpodobností přežití pacientů (Dart *et al.*, 2013). Inhibitory PAK pravděpodobně najdou využití při léčbě intestinálních nádorů, dále tumorů pankreatu, vaječnicků a prsu. Při studiích na myších modelech bylo zjištěno, že onkogenní signály, pocházející z mutací aktivovaných enzymů ERBB2, KRAS a merlinu, jsou závislé na funkčnosti PAK. Z tohoto důvodu se nabízí možnost, že nádory závislé na této aberantní signalizaci by mohly být vhodným cílem inhibitorů PAK (Arias-Romero *et al.*, 2013; Radu *et al.*, 2014).

Ze skupiny II je nejprostudovanější kinasa PAK4. Bylo zjištěno, že v mnoha typech tumorů a nádorových buněčných liniích je buďto overexprimována, nebo došlo k amplifikaci jejího genu, či k bodové mutaci. Z tohoto důvodu byla zvolena PAK4 potenciálním protinádorovým molekulárním cílem (Rudolph *et al.*, 2015). Dosud je v proteinové databázi (Protein Data Bank) k dispozici 18 struktur PAK4 kokrytalizovaných s různými ligandy. Jedním z nich je duální inhibitor kinas CDK a PAK, 2,6,9-trisubstituovaný purin CGP74514A (PDB ID: 2CDZ) viz Obr. 5 a Obr. 6.

Vazba CGP74514A na PAK byla zjištěna při screeningu více než 600 nízkomolekulárních látek za použití rekombinantní kinasy a screeningového testu založeného na změně fluorescence při teplotním posunu (fluorescence-based

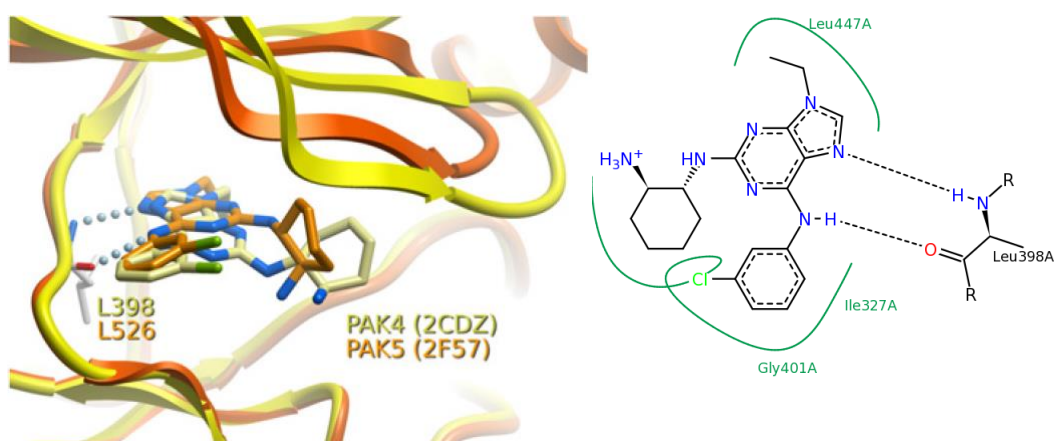
temperature shift screening assay) (Eswaran *et al.*, 2007). Eswaran *et al.* (2007) tímto způsobem objevili šest inhibitorů PAK a CGP74514A vykazujících mikromolární inhibiční aktivitu. Za přítomnosti 10  $\mu\text{M}$  CGP74514A měly PAK4, PAK5 a PAK6 tyto residuální aktivity: 56%, 12% a 23%. Následně byl CGP74514A úspěšně kokrytalizován s PAK4 a PAK5, čímž byl odhalen jeho způsob vazby do kavit kinas. Tento inhibitor se váže jen dvěma vodíkovými vazbami na Leu239 prostřednictvím atomů N6 a N7. Jeho pozice je dále stabilizována mnoha hydrofobními interakcemi s residui Phe397, Ile327, Ala348 a Val335 v N-koncové doméně a Leu398, Leu447, Gly401 a Val379 v C-koncové doméně viz Obr. 6 (Eswaran *et al.*, 2007).



**CGP74514A**

$\text{IC}_{50}$  (PAK4) = 3,74  $\mu\text{M}$

Obr. 5 Struktura purinového inhibitoru PAK kinas CGP74514A a jeho inhibiční aktivita.



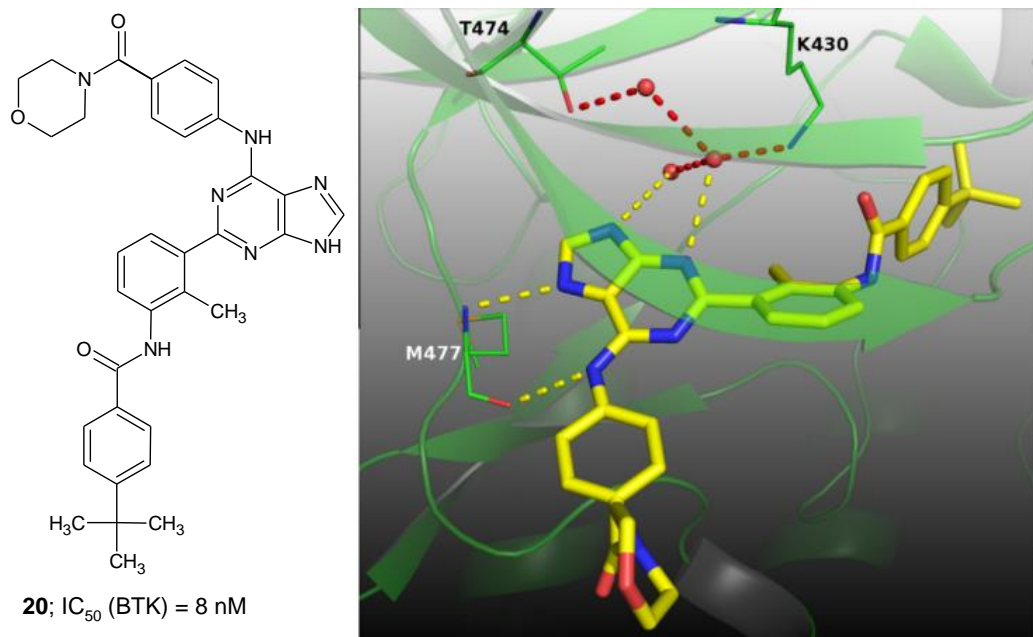
Obr. 6 Vlevo je znázorněna vazba inhibitoru CGP74514A na PAK4 (žlutá) a PAK5 (oranžová), převzato z Eswaran *et al.*, 2007. Vpravo jsou blíže zachyceny interakce inhibitoru CGP74514A s aktivním místem PAK4 (PDB ID: 2CDZ).



#### 2.1.4. Inhibitory BTK

BTK neboli Brutonova tyrosin kinasa náleží do Tec rodiny nереceptorových tyrosinkinás. BTK je exprimována ve většině hematopoetických buněk např. v B lymfocytech, mastocytech, a makrofázích. Mutace v genu kódujícím BTK způsobují změny ve vývoji pre-B a B lymfocytů vedoucí k agamaglobulinémii vázané na chromosom X. BTK se také podílí na vzniku lymfomů a leukémie (Mohamed *et al.*, 2009).

Při hledání nových účinnějších inhibitorů BTK Shi *et al.* (2014) nahradili imidazopyrazinovou část stávajících BTK inhibitorů imidazo[1,2-*a*]pyrazinů šesti bioisosterními heterocykly. Pouze deriváty purinů vykazovaly zvýšenou inhibiční aktivitu a selektivitu vůči BTK. Značné rozdíly mezi těmito heterocykly byly objasněny molekulárním modelováním a následně získanou krystalovou strukturou BTK s nejúčinnější látkou 20 (PDB ID: 4NWM), která se váže do lipofilní kapsy kinasy viz Obr. 7. Interakcí s BTK se účastní N7 a aminoskupina C6 anilinu tvořící dvě vodíkové vazby s amidem a karbonylem Met477 v pantové části kinasy. Další interakce byly zjištěny mezi atomy N3, N9 purinu, molekulami vody a residui Lys430, Thr474. Následné studie odhalily, že při nahrazení substituentu v pozici N9 purinu jakýmkoliv jiným substituentem, vyjma atomu H, dojde ke snížení inhibiční aktivity a selektivity vůči BTK. Nejúčinnější látka 20 ( $IC_{50}$  (BTK) = 8 nM) byla testována na 400 kinasach. Vykazovala jak výbornou selektivitu k BTK, tak aktivitu při inhibici enzymu a růstu lidských nádorových buněčných linií. Tato látka je bohužel metabolicky nestabilní a výzkum v této oblasti dále pokračuje (Shi *et al.*, 2014).



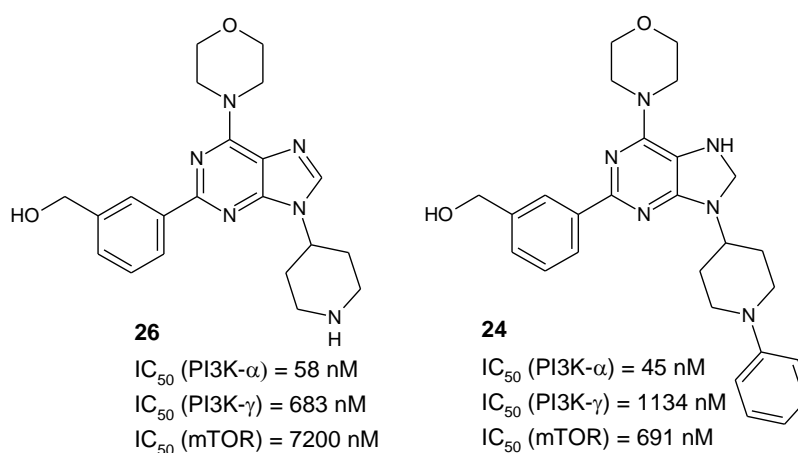
Obr. 7 Vlevo struktura BTK inhibitoru látky 20. Vpravo způsob vazby této látky do kapsy BTK. Žlutě jsou zvýrazněny vodíkové vazby mezi BTK a purinovým jádrem, červeně mezi molekulou vody, BTK a látkou 20. Převzato z Shi *et al.*, 2014.

### 2.1.5. Inhibitory PI3K

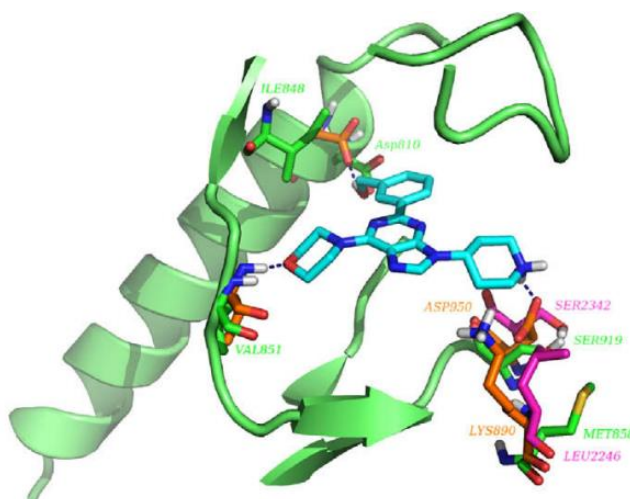
Fosfatidylinositol-3-kinasa (PI3K) patří do nadrodiny PIKKs (PI3K related kinases) zahrnující mTOR, ATM, ATR a DNA-PK. Třída PI3K zahrnuje 4 subtypy: PI3K- $\alpha$ , PI3K- $\beta$ , PI3K- $\gamma$ , PI3K- $\delta$ . PI3K jsou aktivovány prostřednictvím receptorových tyrosin kinas a Ras. Aktivní PI3K fosforyluje PIP-2 na PIP-3, který jakožto druhý posel, aktivuje podřízenou kinasu Akt. PI3K/Akt dráha je stěžejní dráhou v regulaci buněčného růstu, glukosového metabolismu, syntézy proteinů, proliferace, diferenciace, inhibice apoptózy a motility (Liu *et al.*, 2009; Yap *et al.*, 2008). PI3K- $\alpha$  je důležitým molekulárním cílem pro léčbu nádorových onemocnění, protože amplifikace jejího genu se velmi často vyskytuje v tumorech (Hong *et al.*, 2010). Deregulace PI3K- $\alpha$  v epiteliálních nádorových buňkách vede k nekontrolovatelné proliferaci a inhibici apoptózy (Ameriks *et Venable*, 2009). Několik inhibitorů PI3K- $\alpha$  je nyní klinicky testováno (O'Brien *et al.*, 2010).

Gilbert *et al.* (2010) syntetizovali sérii nových purinových a pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidinových inhibitorů PI3K- $\alpha$ . Purinové inhibitory měly dobrou inhibiční aktivitu a selektivitu vůči PI3K- $\alpha$  při srovnání s PI3K- $\gamma$  a mTOR. Zatímco strukturně příbuzné pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidiny měly dobrou inhibiční aktivitu vůči PI3K- $\alpha$  i mTOR. Vysvětlení selektivity purinových inhibitorů k PI3K- $\alpha$  bylo nalezeno

použitím upravené známé krystalografické struktury PI3K- $\gamma$  s navázanou látkou 26 viz Obr. 9. Látky, které mají v pozici C6 morfolin, vykazují lepší inhibiční efekt, než látky s piperidinem, jelikož vytváří další vodíkovou vazbu s Val851. Druhá vodíková vazba se nachází mezi (3-HOCH<sub>2</sub>)fenyl skupinou a Asp810. Snížená selektivita látky 26 v porovnání s látkou 24 vůči PI3K- $\gamma$  je vysvětlována tak, že protonovatelný atom dusíku v piperidinu je lépe tolerován Asp950 v PI3K- $\gamma$  v porovnání s residui Ser919 a Ser2342 PI3K- $\alpha$  a mTOR viz Obr. 8. Velké hydrofobní skupiny na piperidinu byly lépe tolerovány hydrofobními residui v PI3K- $\alpha$  (Met858) a mTOR (Leu2264) než hydrofilnějším Lys890 v PI3K- $\gamma$  (Gilbert *et al.*, 2010).

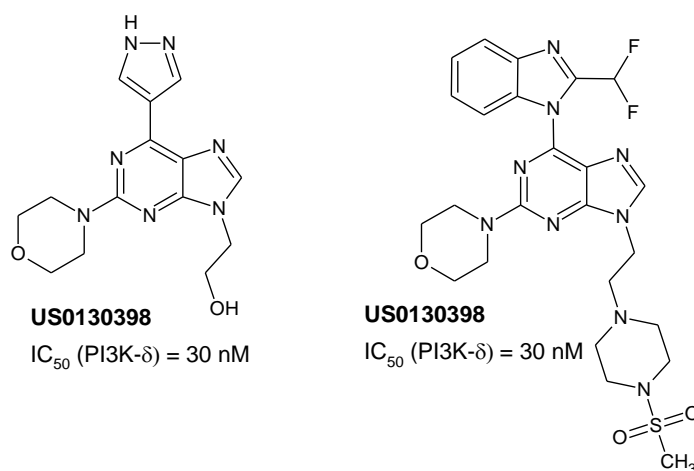


Obr. 8 Struktura PI3K inhibitorů látky 24 a 26.



Obr. 9 Znárodnění vazby látky 26 na PI3K- $\alpha$  (zelená), PI3K- $\gamma$  (oranžová) a mTOR (fialová). Převzato z Gilbert *et al.* (2010).

PI3K- $\delta$  je heterodimerní enzym exprimovaný hlavně v lymfocytech a mastocytech. PI3K- $\delta$  se podílí na aktivaci leukocytů produkcí PIP-3. Z tohoto důvodu by inhibitory PI3K- $\delta$  našly uplatnění při léčbě leukocytárních malignit a zánětlivých onemocnění (Murray *et al.*, 2012; Safina *et al.*, 2013). Je známo, že vysoce selektivní inhibitory PI3K- $\delta$  jsou získávány záměnou heterocyklů, které se váží do kapsy kinasy. Struktury dvou vybraných inhibitorů PI3K- $\delta$  jsou uvedeny na Obr. 10. Zvýšení selektivity inhibitorů vůči PI3K- $\delta$  je způsobeno jejich interakcí s Trp760 ve vazebném místě enzymu (Safina *et al.*, 2013).



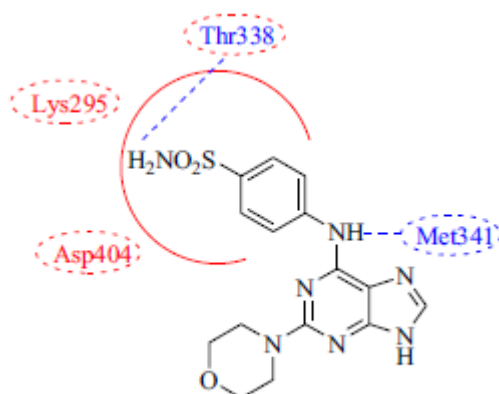
Obr. 10 Struktury purinových inhibitorů PI3K- $\delta$ .

### 2.1.6. Inhibitory Src a Abl

Rodina Src je nejstarší a zároveň nejprostudovanější skupinou nereceptorových tyrosin kinas. U člověka sestává z 11 členů: Blk, Brk, Fgr, Frk, Fyn, Hck, Lck, Lyn, c-Src, Srm, c-Yes. U mnoha malignit byla zjištěna overexprese, deregulace, nebo mutace těchto enzymů, nejčastěji v intestinálních nádorech, dále v nádorech prsu a pankreatu (Finn, 2008; Rucci *et al.*, 2008). Z tohoto důvodu je stále rodina Src kinas atraktivním cílem pro design nových léčiv k léčbě jak tumorů, tak kostních onemocnění (Azam *et al.*, 2006). Na buněčné úrovni kinasa Src reguluje proliferaci, diferenciaci, migraci a působí také antiapoptoticky. Kinasy Abl a Src navzájem vykazují značnou sekvenční homologii a proto inhibitory Src zároveň inhibují i Abl (Wang *et al.*, 2008).

Huang *et al.* (2010) syntetizovali sérii 32 purinů a hodnotili jejich inhibiční aktivitu vůči c-Src. Výsledné IC<sub>50</sub> (c-Src) se pohybovaly od 0,02  $\mu$ M do 3,14  $\mu$ M. Nejúčinnější látkou z této skupiny purinů byla látka 5i (IC<sub>50</sub> (Src) = 20 nM). Za účelem

objasnění interakcí mezi touto látkou a Src kinasou bylo provedeno molekulární dokování viz Obr. 11.



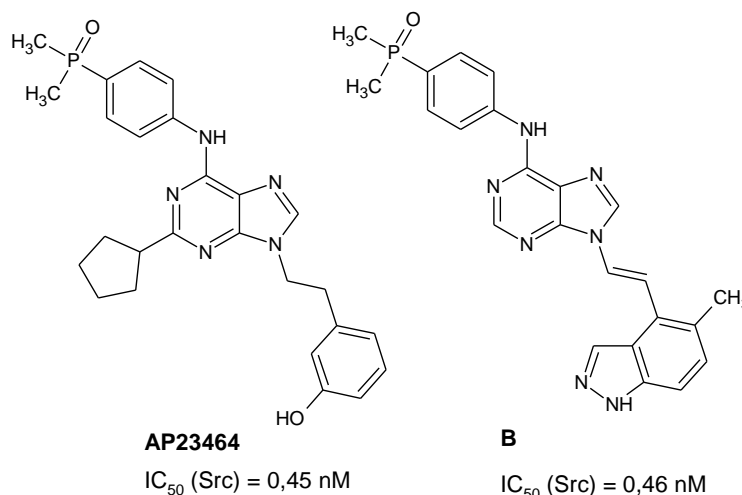
Obr. 11 Způsob vazby látky 5i na kinasu Src. Modře jsou znázorněny vodíkové vazby, červeně hydrofobní interakce. Převzato z Sharma *et al.* (2016).

Nejlepšího inhibičního efektu bylo dosaženo u purinů, jejichž C2 substituentem byl morfolin. Pro optimální inhibiční aktivitu vůči Src jsou vhodné substituenty v meta nebo para poloze aminobenzenu. Největší nárůst inhibice Src byl zaznamenán, když byl na benzylamin zaveden sulfonamid. Ten se zasouvá hluboko do vazebného místa Src, s nímž navazuje hydrofobní interakce a vodíkovou vazbu s Thr338. Další dvě vodíkové vazby jsou mezi NH skupinou C6 substituentu a karbonylem Met341 a NH skupinou Met341. Při screeningu na panelu tyrosinkinas vykazovala látka 5i velkou selektivitu vůči Src. Dále byla testována *in vitro* na buněčné linii MDA-MB-231 odvozené od adenokarcinomu prsu. Kromě inhibice fosforylace Src látka 5i dále způsobovala inhibici migrace a snižovala invazivnost (Huang *et al.*, 2010).

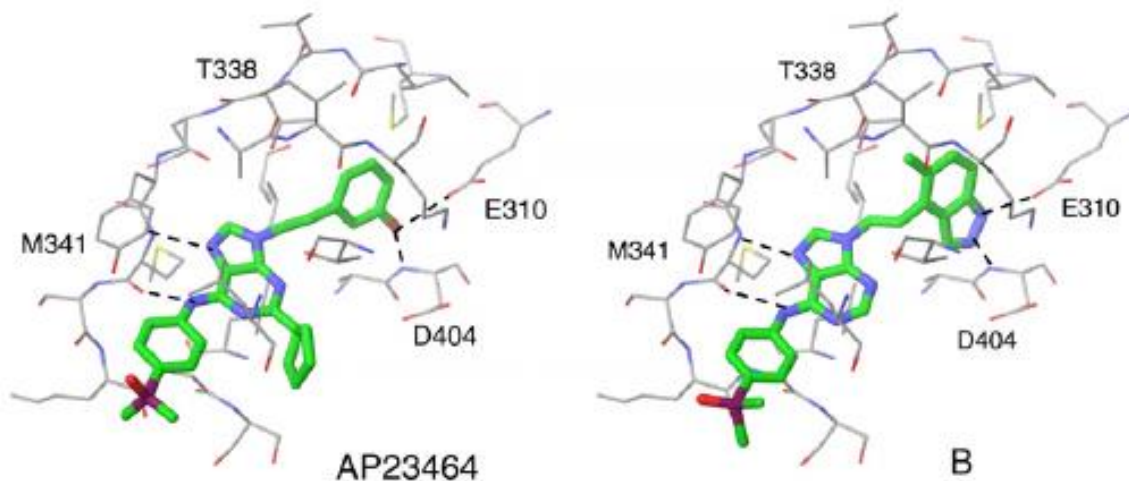
V PDB jsou nyní k dispozici dvě krystalové struktury Src s purinovými inhibitory: AP23451 (PDB ID: 2BDF) a AP23464 (PDB ID: 2BDJ). AP23464 je vysoce účinným inhibitorem kinas Src a Abl, jelikož jeho  $IC_{50}$  je u obou kinas menší než 1 nM. AP23464 vytváří unikátní interakce se Src prostřednictvím substituentu v pozici N9 purinu. 3-hydroxyfenylethyl se zanořuje hluboko do vazebného místa Src a navazuje vodíkové vazby s residui Glu310 a Asp404. U obou komplexů Src/AP23451 a Src/AP23464 se vytváří iontová vazba mezi residui Lys295 a Glu310. Fenylethylová skupina aromatického charakteru je obklopena hydrofobními postranními řetězci Lys295, Met314, Ile336, a Tyr338 (Dalgarno *et al.*, 2006). AP23464 se stal předlohou pro vývoj nových stabilnějších a snáze syntetizovatelných Src/Abl inhibitorů, které mají v pozici 9 arenethylovou skupinu viz Obr. 12. Ta vytváří

prostřednictvím dvou atomů N dvě vodíkové vazby viz Obr. 13. Výhoda arenethylové skupiny, v porovnání s 3-hydroxyfenylethylovou skupinou spočívá v tom, že nepodléhá rychlé metabolizaci, což zlepšuje farmakokinetické vlastnosti nových purinových Src/Abl inhibitorů (Wang *et al.*, 2008).

Summy *et al.* (2005) designovali a syntetizovali další strukturně příbuzná analoga mezi nimiž AP23848 vykazuje vůči c-Src nejlepší inhibiční aktivitu:  $IC_{50} = 0,4$  nM.



Obr. 12 Struktury duálních Src/Abl inhibitorů AP23464 a B.

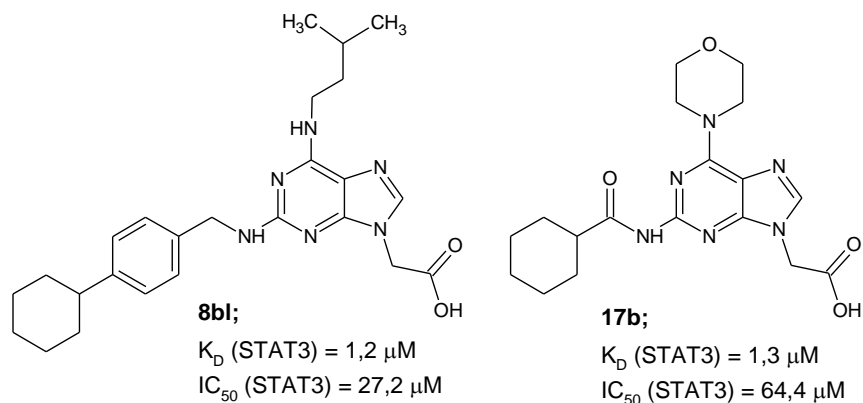


Obr. 13 Znázornění způsobu vazby inhibitoru AP23464 a látky B na Src kinasu. Vodíkové vazby jsou znázorněny čerchovanými čarami. Atomy uhlíku jsou zvýrazněny zeleně, dusíku modře a fosforu červeně. Převzato z Wang *et al.* (2008).

### 2.1.7. Inhibitory STAT3

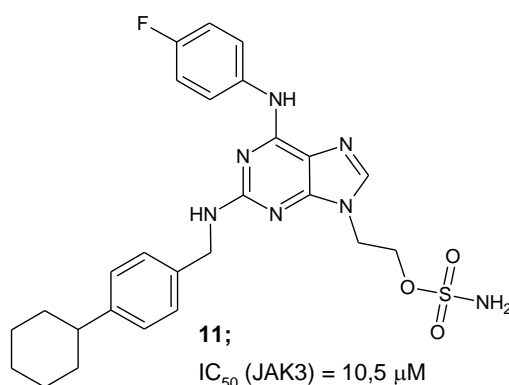
STAT3 je transkripční faktor aktivovaný receptory pro cytokiny a růstové faktory. Aktivní STAT3 je dimer vznikající interakcí mezi SH2 doménou jednoho monomeru a fosforylovaným tyrosinovým residuem druhého monomeru (pTyr705). Dimery jsou translokovány do jádra, kde se akumulují, specificky váží na DNA a spouštějí transkripci určitých genů. Aberantní aktivace STAT3 je často způsobena cytokiny nebo růstovými faktory a potencována mnoha post-translačními modifikacemi (Demaria *et al.*, 2014). STAT3 na buněčné úrovni regulují proliferaci a diferenciaci. Zvýšená aktivita STAT3 vede v lidských buňkách k nekontrolovatelnému buněčnému dělení, zabraňuje navození apoptózy, což vyúsťuje v transformaci. Proto mají inhibitory STAT3 velký potenciál jako nová terapeutika (Mandal *et al.*, 2013).

Bylo již popsáno mnoho inhibitorů dimerizace STAT3. Jen jediná látka OPB-31121 ovšem nedávno vstoupila do klinického testování (Bendell *et al.*, 2014; Hayakawa *et al.*, 2013). Prostřednictvím dokovacích studií byla u více než čtyřiceti 2,6,9-trisubstituovaných purinů zkoumána jejich interakce se STAT3. Některé z nich vykazovaly afinitu k purifikovanému STAT3 a také snižovaly jeho fosforylaci na buněčné úrovni viz Obr. 14. Tyto látky sice měly jen mírné antiproliferační účinky, zato ale způsobovaly ztrátu viability jen u buněčných linií dependentních na STAT3 signalizaci. Dokovacími studii bylo následně zjištěno, že se puriny váží do kapes SH2 domén STAT3, čímž brání jejich dimerizaci. Puriny se váží hlavně do hydrofobních kavit v kapse A prostřednictvím C2 a N6 substituentů a také do polární kavity karboxylovou skupinou interagující s Ser611, Ser613 a Arg609. Tato polární kavity obsahuje fosforylační místo Tyr705. Pro interakci se STAT3 je nepostradatelný substituent v pozici N9 purinu, atomy dusíku v pozicích 1 a 2 se nezúčastňují vazby (Shahani *et al.*, 2011).



Obr. 14 Struktury zástupců první generace purinových inhibitorů STAT3. Uvedeny jsou jejich afinity a inhibiční aktivity vůči STAT3.

Za účelem získání nových inhibitorů STAT3, které budou mít lepší biologickou dostupnost a vyšší cytotoxicitu vůči nádorovým buňkám, syntetizovali Shahani *et al.* (2013) mnoho nových látek na bázi 2,6,9-trisubstituovaných purinů. V pozici N9 purinu nahradili karboxylovou skupinu bioisostery. Tímto způsobem získané analogy byly podrobeny testům cytotoxicity na třech lidských nádorových buněčných liniích odvozených od nádoru prsu (MDA-MB-468), karcinomu prostaty (DU 145) a akutní myeloidní leukemie (OCI-AML2). Ze sady testovaných látek vykazovala látka 11 cytotoxicitu v řádech mikromolů viz Obr. 15. Proto byla dále testována na panelu 11 buněčných linií odvozených od mnohočetného myelomu, u všech měla cytotoxické účinky. Nejcitlivější buněčnou linií byla XG6, u níž je zvýšena hladina STAT3. Dále byla ověřována vazba látky 11 na STAT3. Výsledky překvapivě ukázaly, že látka 11 neinhibuje STAT3, ale kinasy JAK, ABL1 a AAK1.



Obr. 15 Struktura látky 11 inhibující kinasy JAK, ABL1 a AAK1.

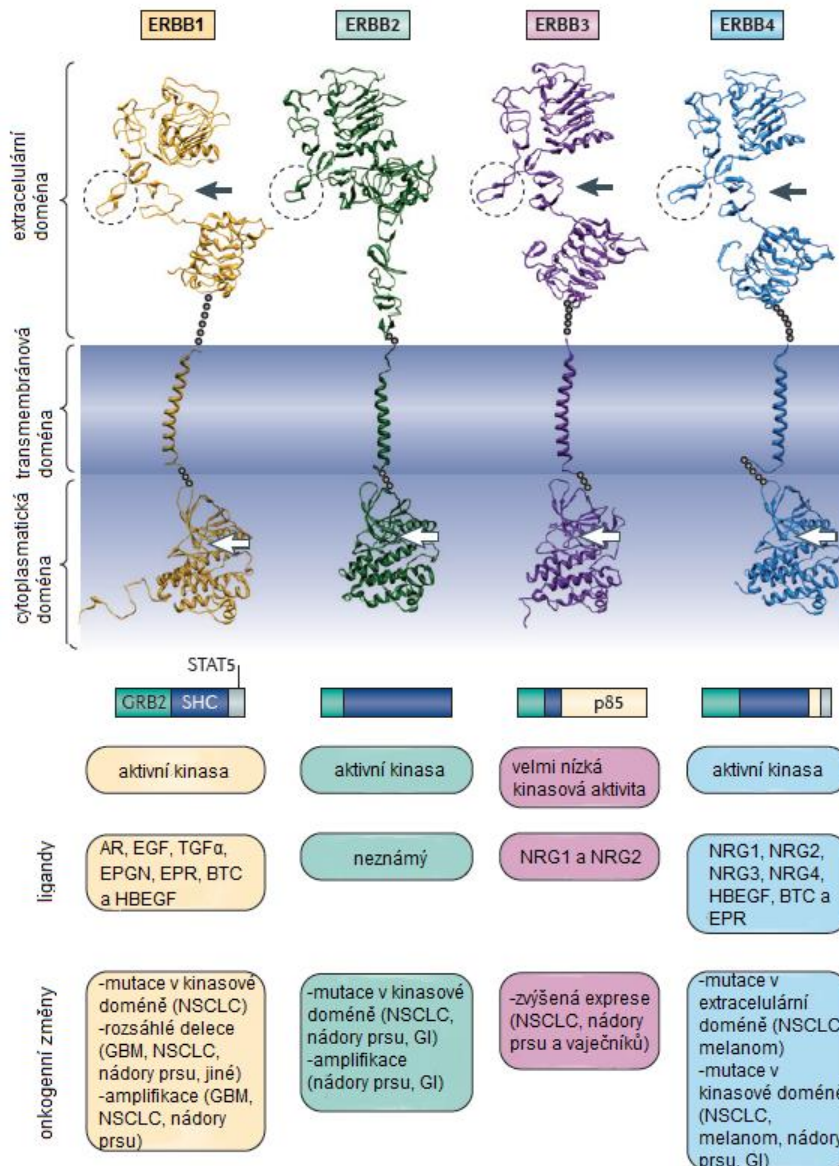


## 2.2. Receptory epidermálního růstového faktoru a jejich inhibitory

Rodina receptorů epidermálních růstových faktorů náleží do skupiny receptorových tyrosinkinas. Tato rodina má čtyři členy, přičemž všichni jsou exprimováni v buňkách epidermálního, neuronálního a mesenchymálního původu (Casalini *et al.*, 2004).

ERBB receptory jsou tvořeny extracelulární doménou vázající ligand, hydrofobní transmembránovou částí a intracelulární částí obsahující konzervovanou tyrosinkinasovou doménu viz Obr. 16. Na receptory z rodiny ERBB se specificky váže 12 růstových faktorů. Po navázání ligandu dochází k homo- nebo heterodimerizaci ERBB receptorů. Při aktivaci slouží jedna kinasová doména jako aktivátor a druhá je akceptorem stimulu. Následně dochází k autofosforylaci na tyrosinových residuích, které slouží k navázání adaptorových proteinů a spuštění patřičných signálních drah (Roskoski, 2004).

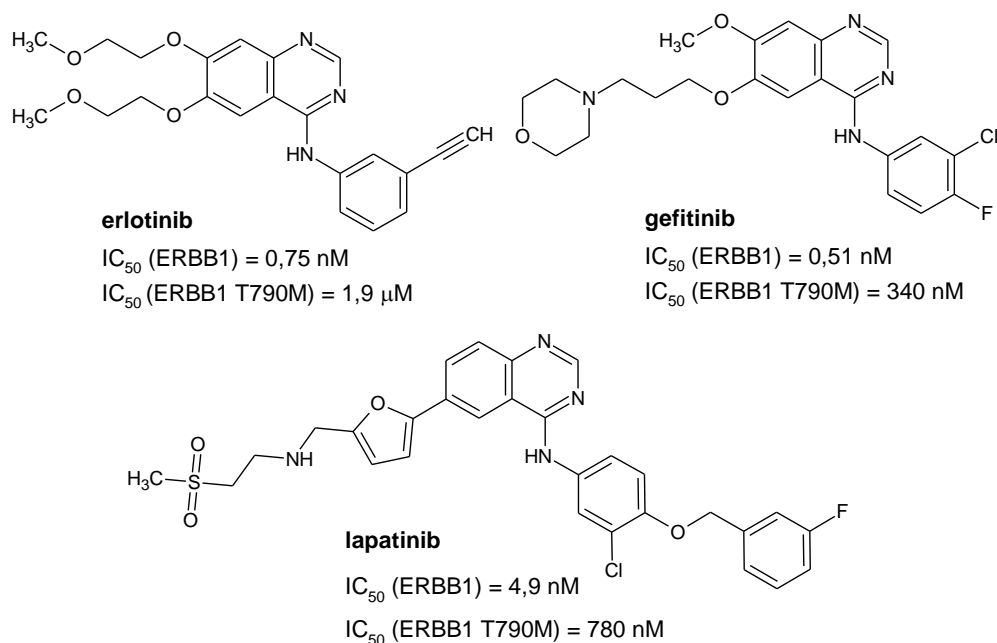
Rodina ERBB má zásadní vliv na vývoj, diferenciaci a proliferaci buněk. Také řídí mnoho signálních drah např.: Ras-Erk a PI3K-Akt. Aby byla zajištěna diversifikace a amplifikace signálu došlo k odlišnostem ve funkci mezi členy ERBB rodiny. ERBB1 a ERBB4 jsou klasickými receptorovými tyrosinkinasami. U ERBB2 není dosud známý žádný ligand, přičemž tento receptor zaujímá konstitutivně aktivní konformaci. ERBB3 téměř postrádá kinasovou aktivitu, ale jeho kinasová doména slouží jako aktivátor. Aktivace ERBB2 a ERBB3 probíhá jejich heterodimerizací se zbývajícími členy rodiny ERBB, nebo vznikají dimery ERBB2 - ERBB3 spouštějící dráhy se značným mitogenním potenciálem. ERBB3 totiž aktivuje dráhu PI3K-Akt a ERBB2 Ras-Erk, což vede ke stimulaci k proliferaci a zároveň brání v apoptóze (Casalini *et al.*, 2004; Jura *et al.*, 2009; Roskoski, 2004; Zhang *et al.*, 2012).



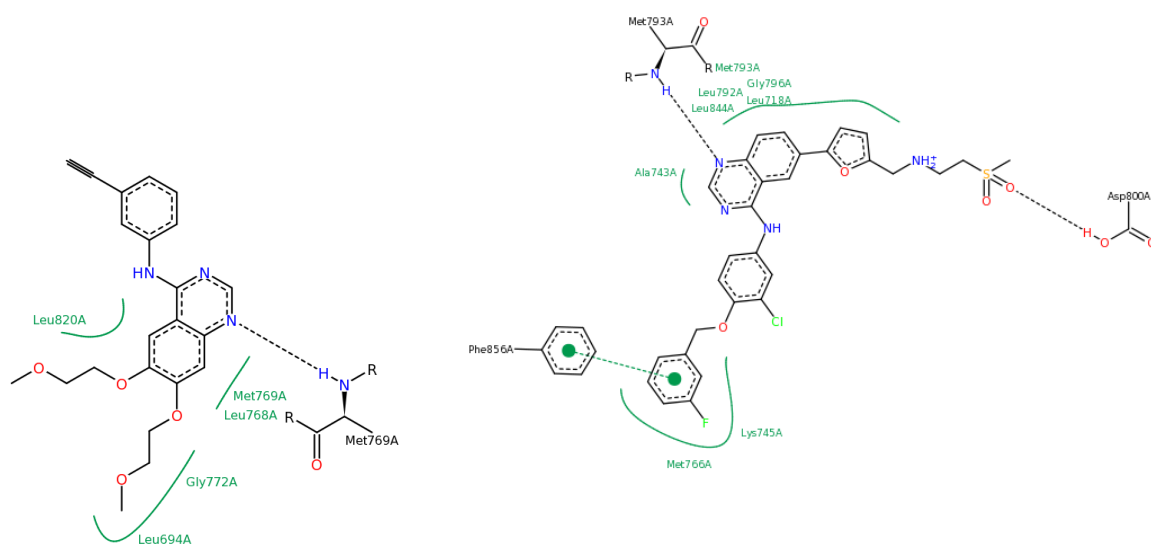
Obr. 16 Krystalové struktury čtyř členů rodiny ERBB. Černé šipky označují ligand vazebné domény, bílé ATP-vazebná místa. Čerchovaně jsou zvýrazněny dimerizační smyčky. Pod strukturami receptorů jsou znázorněny dokovací místa a jejich specifikace. (AR – amfiregulin, BTC –  $\beta$ -celulin, EGF – epidermální růstový faktor, EPGN – epigen, EPR – epiregulin, GBM – glioblastom, GI – gastrointestinální trakt, HBEGF – heparin vázající EGF, NRG – neuregulin neboli heregulin, TGF $\alpha$  – transformující růstový faktor  $\alpha$ .) Převzato z Yarden et. al., 2012.

Aberantní aktivita ERBB vyúsťuje v nekontrolovatelný růst a tumorigenezi, přičemž je také příčinou vzniku aterosklerózy a psoriázy. Ke zvýšené aktivaci ERBB1 a ERBB2 v nádorových onemocněních dochází amplifikací příslušných genů vyúsťující v overexpresi, dále bodovými mutacemi, částečnou delecí a nadměrnou

autokrinní produkcí ligandů (Hynes et MacDonald, 2009). K amplifikaci ERBB1 dochází u 50 % gliomů a u třetiny nádorů prsu byla detekována amplifikace ERBB2. V nádorech epitelálního původu často dochází k zesílení pozitivní zpětné vazby regulující aktivitu ERBB. Aktivní MAPK při ní spouští transkripci a sekreci mnoha růstových faktorů, které posléze aktivují ERBB. Bylo zjištěno, že u nádorů dochází i k oslabení negativní zpětné vazby kontrolující aktivitu ERBB. Ta je zabezpečována dvěma mechanismy: na transkripci nezávislými procesy (endocytóza, miRNA, sekundární fosforylace) a procesy zahrnujícími transkripci a proteosyntézu působícími pomaleji (DEGs (delayed early genes), ID-miRs, ERRF11, CBL) (Avraham et Yarden, 2011; Avraham et al., 2010; Yarden et Pines, 2012; Ying et al., 2010). Onkogenní potenciál ERBB3 je závislý na overexpresi ERBB1 a ERBB2. Zatímco u ERBB4 je situace komplikovanější, jelikož má více isoforem odlišujících se mezi sebou různou aktivitou. Některé z nich jsou označovány jako tumor supresivní, jiné onkogenní. V mnoha tumorech byl zaznamenán výskyt bodových mutací v *ERBB4* způsobujících snadnější aktivaci receptoru a vznik nádoru (Prickett et al., 2009). Protože jsou receptory ERBB často aberantně aktivní v různých typech nádorových onemocnění, byly zvoleny jako vhodný cíl pro terapii. Vývoj léčiv se zaměřil hlavně na inhibici ERBB1 a ERBB2, jelikož jejich role ve vzniku nádorů je nejvíce prozkoumána (Tebbutt et al., 2013). K léčbě nádorů prsu s amplifikací *ERBB2*, nebo s aktivním intracelulárním fragmentem p95ERBB2 byl v roce 2007 schválen duální inhibitor ERBB1 a ERBB2 lapatinib (Tykerb; GlaxoSmithKline) viz Obr. 17 a Obr. 18 (Rusnak et al., 2001; Scaltriti et al., 2007; Spector et al., 2005). Pro léčbu pacientů s pokročilým NSCLC byly schváleny erlotinib (Tarceva; Roche/Genentech) a gefitinib (Iressa; AstraZeneca) viz Obr. 17 a Obr. 18. Struktura všech tří inhibitorů je založena na 4-anilinoquinazolinu, který se váže do pantové oblasti kinas (Smith, 2005).



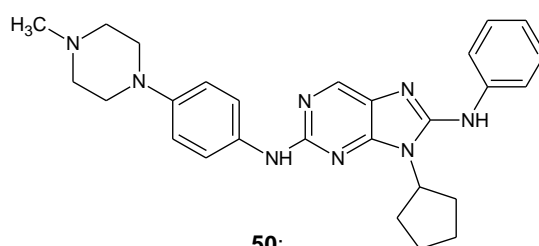
Obr. 17 Struktury klinicky schválených inhibitorů ERBB receptorů a jejich inhibiční aktivity.



Obr. 18 Vlevo způsob vazby erlotinibu (PDB ID: 1M17) a vpravo lapatinibu (PDB ID: 1XKK) na ERBB1.

Na nádory plic ročně umírá nejvíce pacientů. Více než 80 % ze všech typů nádorů plic spadá do skupiny NSCLC. Právě ERBB1 byl vybrán jako nejvhodnější molekulární cíl pro léčbu NSCLC. ERBB1 je u tohoto onemocnění často mutován, přičemž dochází k záměně threoninu za methionin v pozici 790. ERBB1 s onkogenní mutací T790M snadněji váže ATP, čímž je zvýšena jeho aktivita (Sharma *et al.*, 2016; Yarden *et Pines*, 2012). Za účelem vývoje nové generace inhibitorů ERBB1,

kteře budou účinné i vůči mutovanému ERBB1 T790M, Yang *et al.* (2012) provedli virtuální screening následovaný kinasovými esejemi proti knihovně známých kinasových inhibitorů. Ze všech screenovaných látek N-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)fenyl)-N-fenyl-9H-purin-2,8-diamin (látka 49) vykazoval inhibiční aktivitu vůči ERBB1 s aktivační mutací i s mutací způsobující rezistenci vůči dosavadním léčivům. Za účelem optimalizace struktury a aktivity látky 49 byly syntetizovány deriváty 2,8-dianilinopurinů. Tyto deriváty byly *in vitro* testovány na dvou lidských nádorových buněčných liniích odvozených od NSCLC - HCC827 a H1975, které mají jak ERBB1 mutaci způsobující rezistenci vůči léčivům, tak aktivační mutaci ERBB1. Z výsledků studie vyplynulo, že vazebná afinita inhibitoru 50 vůči ERBB1 závisí na vhodné velikosti substituentu v pozici N9 purinu. Látka 50 viz Obr. 19 byla dále *in vitro* testována a prokázalo se, že inhibuje jak ERBB1 s mutací způsobující rezistenci vůči léčivům, tak s aktivační mutací. Tato látka současně také inhibuje mnoho dalších onkokinas. Experimentálně bylo dokázáno, že vyvolává defosforylaci ERBB1, čímž zabraňuje aktivaci podřízených kinas. Dále byly stanovovány její farmakokinetické parametry *in vivo* na xenograftech. Na prvním modelu odvozeném od linie HCC827 došlo po 15-denní terapii látkou 50 (5 mg/kg) ke kompletní regresi tumoru při orálním podávání 1 dávky denně. Na druhém modelu odvozeném od linie H1975 došlo opět při orálním podávání látky 50 (50 mg/kg) 1krát denně ke znatelnému zmenšení tumoru. *In vivo* studiemi bylo zdokumentováno, že látka 50 má dobré farmakokinetické vlastnosti (Yang *et al.*, 2012).



**50;**

$IC_{50}$  (ERBB1) = 4 nM

$IC_{50}$  (ERBB2) = 60 nM

$IC_{50}$  (ERBB4) = 30 nM

Obr. 19 Struktura inhibitoru receptorů rodiny ERBB látky 50 a její inhibiční aktivity.

### 3. Cíle práce

1. Vypracování rešerše o současném stavu problematiky. Známé molekulární cíle 2,6,9-trisubstituovaných purinů.
2. Experimentální část: charakterizace vlivu vybraných inhibitorů z knihovny 2,6,9-trisubstituovaných purinů na vybrané nádorové linie *in vitro*. Stanovení změn v rozložení buněčného cyklu po ovlivnění nádorových buněk inhibitorem, specifikace molekulárního cíle inhibitoru a analýza proapoptotických účinků.
3. Zpracování získaných dat a interpretace výsledků.

## **4. Materiál a metodika**

### **4.1. Přístroje a laboratorní vybavení**

Během vypracování experimentální části této práce byly použity následující přístroje a laboratorní vybavení: CO<sub>2</sub> inkubátor (Sanyo), flowbox s vertikálním prouděním vzduchu TC 48 (Gelaire), centrifuga BR4i (Jouan), mikroskop Nikon TMS (Nikon), vodní lázeň, ultrazvukový homogenizátor Sonoplus HD2200 (Bandelin), UV-VIS spektrofotometr UV-1800 (Shimadzu), aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad), blotovací aparatura Mini Trans-Blot Cell (BioRad), chemiluminiscenční kamera LAS4000 (FujiFilm) a průtokový cytometr Cell Lab Quanta™ SC – MPL (Beckman Coulter).

### **4.2. Použité chemikálie**

Chemikálie použité při experimentech: trypsin, penicilin, streptomycin, L-glutamin, inhibitory proteas leupeptin a aprotinin, bromfenolová modř, ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), ethylenglykoltetraoctová kyselina (EGTA), dimethylsulfoxid (DMSO), dithiothreitol (DTT), fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), N,N'-metylenbisakrylamid, tetramethylethylendiamin (TEMED), 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU), propidium jodid, Nonidet P-40, Triton X-100, fluorid sodný, peroxidisíran amonný, hydroxid draselný od firmy Sigma Aldrich; kultivační médium Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetální telecí sérum, hovězí sérový albumin (BSA) od firmy Invitrogen; epidermální růstový faktor a heregulin  $\beta$ -1 od firmy Peprotech; 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-merkapt ethanol od firmy Serva; dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, chlorid sodný a draselný od firmy Penta; dodecyl síran sodný (SDS) a glycerol od firmy Lach-Ner; dihydrogenfosforečnan draselný od firmy Chemapol.

### **4.3. Použité roztoky**

K vypracování experimentální části této diplomové práce byly použity roztoky: PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH = 7,4 – 7,5); TBS: 137 mM NaCl, 20 mM TRIS (pH = 6,8);

RIPA pufr: 20 mM TRIS (pH = 7,4), 100 mM NaCl, 5 mM EGTA, 2 mM NaF, 0,2% Nonidet P-40, těsně před použitím byl přidán: 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>;

Činidlo Bradfordové: 0,01% Coomassie Brilliant Blue, 95% ethanol, 85% kyselina fosforečná;

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

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

Blotovací pufr: 25 mM TRIS, 192 mM glycin;

Ponceau S: 0,2% v 1% kyselině octové;

Blokovací roztok: 5% mléko nebo BSA v TBS s 0,1% Tween 20;

Promývací roztoky pro cytometrické techniky: 1% BSA v PBS, 1% BSA v PBS s 0,5% v/v Tween 20, 0,5% BSA v PBS, 2 M HCl s 0,5% Triton X-100; 0,1M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10 H<sub>2</sub>O

#### 4.4. Použité protilátky

V rámci experimentální části byly pro imunodetekci zvolených proteinů použity tyto specifické primární protilátky: cyklin D1 (1:500), EGFR (1:1000), Erk 1/2 (1:300), HER2 (1:1000), HER3 (1:1000), HER4 (1:1000), HSP70 (1:1000), kaspasa 7 (1:500), fosfo-EGFR Tyr1068 (1:1000), fosfo-Erk 1/2 Tyr202/204 (1:500), fosfo-HER2 Tyr1221/1222 (1:1000), fosfo-HER3 Tyr1289 (1:1000), fosfo-HER4 Tyr1284 (1:1000), fosfo-RNAPII Ser2/5 (1:1000), fosfo-PAK4 Ser474/PAK5 Ser602/PAK6 Ser560 (1:1000), fosfo-Rb Ser807/811 (1:250), PAK4 (1:1000), Rb klon 4H1 (1:200) od firmy Cell Signaling; p53 (1:20) klon DO-1, p21 (1:500), PCNA (1:1000) klon PC-10 od Dr. B. Vojtěška z Masarykova onkologického ústavu v Brně; cyklin D3 (1:500) od firmy Invitrogen; RNAPII (1:1000) od firmy Millipore; β-aktin (1:1000) a p27 (1:250) od firmy Santa Cruz Biotechnology; α-tubulin (1:500) DM1A od firmy Sigma.

K detekci primárních protilátek byly použity následující sekundární protilátky značené křenovou peroxidasou RAM/Px (1:1000) a SWAR/Px (1:1000) od firmy Sigma Aldrich.

Při 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.



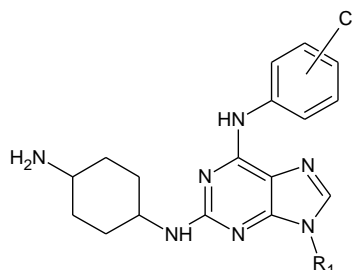
#### 4.5. Buněčná linie

Adherentní buněčná linie MCF-7 je odvozená od adenokarcinomu prsu. Buňky byly kultivovány v médiu DMEM 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% CO<sub>2</sub>. Jelikož tato linie neexprimuje kaspasu 3 vlivem mutace v *CASP -3* genu (Janicke *et al.*, 1998), byla v rámci experimentů detekována kaspasa 7.

#### 4.6. Testované látky

V experimentální části diplomové práce byly testovány biologické účinky tří vybraných 2,6,9-trisubstituovaných purinů viz Obr. 20 z kolekce Laboratoře růstových regulátorů, Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého a Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Všechny inhibitory byly připraveny Mgr. Veronikou Malínkovou. Pro srovnání a ověření některých vlastností látky 4841 byly testovány i známé inhibitory rodiny ERBB erlotinib a lapatinib.

Všechny testované látky byly připraveny jako 50mM nebo 100mM roztoky v DMSO a pro experimenty byly podle potřeby ředěny v DMSO.



Obr. 20 Obecná chemická struktura testovaných látek.

#### 4.7. Kultivace buněk, sklizení a lyzace

Nejprve byl určitý počet buněk dané linie vyset na Petriho misku a kultivován v médiu při 37 °C, v atmosféře 5% CO<sub>2</sub> po dobu 24 h. Pro cytometrickou analýzu bylo použito 0,5 milionu buněk v 5 ml média a pro Western blotting 1,5 milionu buněk v 15 ml média. Následující den byl do média přidán roztok testované látky rozpuštěný v DMSO. Do kontroly bylo DMSO také přidáno, ale jeho koncentrace nikdy nepřesáhla 0,1 % celkového objemu. Takto ovlivněné buňky byly opět kultivovány při 37 °C, v atmosféře 5% CO<sub>2</sub> po danou dobu. Při cytometrické analýze

zaměřené na stanovení syntézy DNA byl 30 min před sklizením k buňkám přidán roztok 5-bromo-2'-deoxyuridinu (BrdU).

Buňky určené k analýze pomocí Western blottingu byly mechanicky seškrábány ze dna Petriho misky a přeneseny spolu s kultivačním médiem do zkumavek. Po centrifugaci (1000 g, 4 °C, 10 min) byl pelet 2-krát promyt v PBS a následně uskladněn při -80 °C. Pokud ihned po sklizení následovala lyzace, byl pelet zmražen v tekutém dusíku po dobu 10 min.

Manipulace se vzorky během lyzace opět probíhala na ledu. Ke vzorkům byl nejdříve přidán lyzační pufr. K rozbití peletu došlo resuspendováním po dobu 25 min a následným ultrazvukováním vzorků. Poté byly vzorky centrifugovány (14 000 rpm, 4 °C, 25 min) a následně byla stanovena přesná koncentrace proteinů v supernatantu metodou podle Bradfordové (Bradford, 1976). Koncentrace proteinů ve všech vzorcích byla upravena na stejnou hodnotu přidáním lyzačního pufru. Proteiny byly následně denaturovány SDS vzorkovacím pufrem a zahřátím na 95 °C po dobu 5 min. Takto získané vzorky byly skladovány v -20 °C.

#### **4.8. SDS-PAGE a Western blotting**

Proteiny byly separovány dle molekulových hmotností pomocí úplně denaturující diskontinuální SDS-PAGE. Při napětí 80 V proteiny nejdříve prošly 5% zaostřovacím gelem a poté bylo napětí zvýšeno na 120 V, došlo k jejich separaci v 10% nebo 12,5% dělicím gelu. Ten byl zvolen dle molekulových hmotností analyzovaných proteinů. Proteiny byly z gelu přeneseny na nitrocelulosovou membránu za použití Western blottingu. Přenos probíhal za konstantního proudu 270 mA po dobu 3 h za neustálého chlazení. Poté byly proteiny vizualizovány na membráně nabarvené v roztoku Ponceau S. Membrána byla po nařezání dle potřeby odbarvena v TBS. Následovala 1h blokace membrán v 5% mléku, nebo 5%BSA, rozpuštěném v TBS s 0,1% Tweenem 20. Membrány byly následně opláchnuty v TBS, osušeny a přeneseny do vlhké komůrky, kde na ně byla aplikována naředěná primární protilátka. Primární i sekundární protilátky byly ředěny ve stejném roztoku, jakým byly blokovány membrány. Inkubace s primární protilátkou probíhala přes noc při 4 °C. Poté byly membrány promyty v tomto pořadí v TBS, TBS s Tweenem a 2krát v TBS. Membrány byly po promytí osušeny přeneseny do vlhké komůrky a na ně byla aplikována naředěná sekundární protilátka konjugovaná

s křenovou peroxidasou. Inkubace probíhala 1 h při laboratorní teplotě. Po skončení inkubace byly membrány znova promyty. Po osušení na ně byla nanese směs luminol, peroxidasa v poměru 1:1 nebo bylo použito citlivějších roztoků s označením femto. Následovala detekce chemiluminiscence, při níž dochází ke stabilizaci produktů, vzniklých činností křenové peroxidasy, vyzářením světelného kvanta. Míra chemiluminiscence je přímo úměrná množství křenové peroxidasy a to je dáno množstvím analyzovaného proteinu, což umožňuje kvantifikaci.

#### **4.9. Cytometrické techniky**

Skližení buněk určených na cytometrickou analýzu bylo prováděno na ledu z důvodu zamezení degradace vzorků. Aby bylo omezeno mechanické poškození buněk, byly vzorky sklíženy trypsinizací a do zkumavek bylo přeneseno médium i EGTA. Buňky byly zcentrifugovány (1000 g, 4 °C, 10 min) a 2-krát promyty 1% PBS. Fixace probíhala v 70% ethanolu při -20 °C. Poté byl pelet promyt v PBS a po centrifugaci resuspendován v malém objemu PBS/BSA. K suspenzi byl přidán roztok 2M HCl a 0,5% Tritonu X-100. Po 30 min inkubaci byly buňky opět zcentrifugovány (1000 g, 4 °C, 8 min) a resuspendovány v bazickém roztoku 0,1M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10 H<sub>2</sub>O neutralizujícím kyselinu. Po centrifugaci byl pelet resuspendován v roztoku PBS-T obsahujícím PBS, 1% BSA a 0,5% v/v Tween 20. Došlo k permeabilizaci buněk pro protilátky a enzymy. K peletu byla následně nejprve přidána protilátka anti-BrdU-FITC a poté roztok PBS-T. Po 1 h inkubaci ve tmě následovala centrifugace (1000 g, 4 °C, 8 min) a promytí v PBS-T. K peletu byl na závěr přidán PBS a propidium jodid, který se interkaluje do dvoušroubovice DNA. Jeho vazba do DNA je stechiometrická a umožňuje stanovení obsahu DNA v buňkách a tedy i fáze buněčného cyklu. Při excitaci světlem o vlnové délce 488 nm emituje propidium jodid světlo o vlnové délce >560 nm to je zachyceno detektorem průtokového cytometru a kvantifikováno stejně jako fluorescenční signál FITC odpovídající přesně množství inkorporovaného BrdU v buňkách.

## 5. Výsledky

### 5.1. Výběr látek

V Laboratoři růstových regulátorů se dlouhodobě věnují vývoji ATP-kompetitivních CDK inhibitorů z nichž jedny z neúčinnějších jsou 2,6,9-trisubstituované puriny. Jelikož u těchto látek lze vhodnou obměnou substituentů modulovat molekulární cíl jejich působení byla připravena knihovna 2,6,9-trisubstituovaných purinů za účelem změny jejich inhibiční aktivity z CDK na PAK kinasy. Látky byly odvozeny od duálního inhibitoru CDK a PAK, CGP74514A. Navzájem se od sebe odlišují hlavně v délce a rozvětvenosti substituentu v pozici N9 purinu a v poloze atomu Cl na benzylaminu. Výše zmíněná knihovna obsahuje 25 látek. Výběr látek byl uskutečněn na základě předem stanovených hodnot  $IC_{50}$  a  $GI_{50}$  viz Tab. I. Z nových 2,6,9-trisubstituovaných purinů vykazovala látka 4622 3,5x vyšší inhibiční aktivitu vůči PAK4 při porovnání s inhibitorem CGP74514A. Vzhledem k ostatním, novým látkám, které jsou součástí knihovny má látka 4622 nejlepší inhibiční aktivitu vůči PAK4, ale zároveň i třetí nejlepší inhibiční aktivitu vůči CDK2. Další látky vybírány s ohledem na co nejnižší inhibiční aktivitu vůči CDK2 a s přihlédnutím k hodnotám  $GI_{50}$ . Podle těchto kritérií byly dále k testování zvoleny látky 4667 a 4841. Inhibiční aktivita obou látek vůči PAK4 je nízká a předpokládá se, že inhibují jiný molekulární cíl.

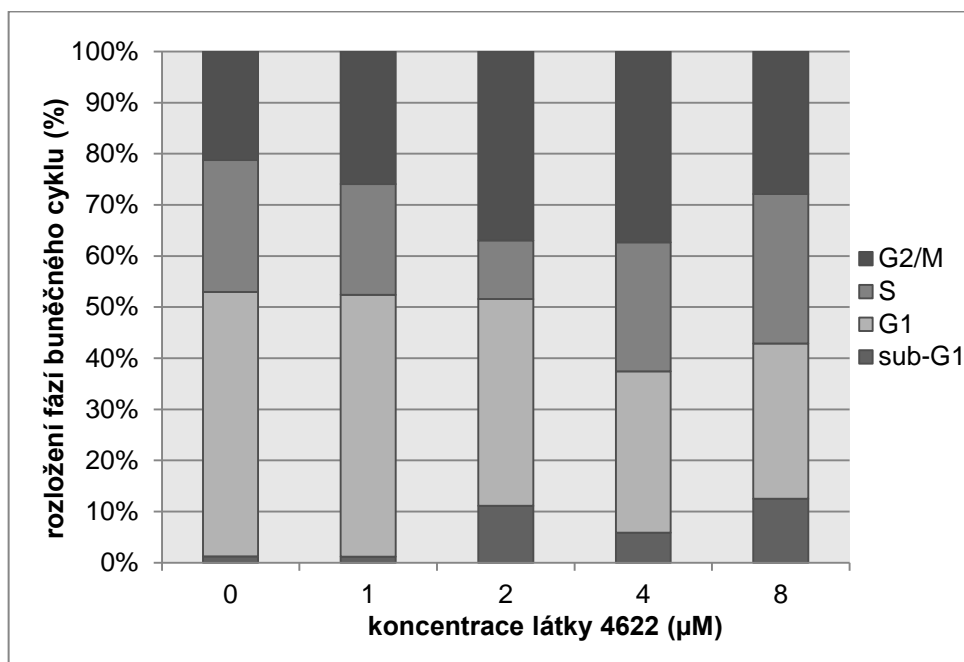
Tab. I Inhibiční aktivity nových 2,6,9-trisubstituovaných purinů na biochemické a buněčné úrovni. Inhibice zvolených enzymů byla stanovena kinasovou inhibiční reakcí. Inhibice růstu asynchronních nádorových buněk byla testována na buněčných liniích K562 a MCF-7.

Název látky	IC <sub>50</sub> (μM)		GI <sub>50</sub> (μM)	
	PAK4	CDK2	K562	MCF-7
CGP74514A	3,74	0,01	-	-
purvalanol	4,20	0,18	-	-
4617	2,48	0,15	3,33	2,44
4619	1,13	0,11	2,61	2,15
4620	1,83	0,55	1,51	1,92
4621	2,37	0,50	2,74	2,97
4622	1,08	0,12	1,74	1,98
4623	1,41	0,47	1,82	3,22
4624	3,96	0,88	1,60	2,74
4625	4,67	0,52	4,03	3,42
4626	6,18	0,45	2,38	4,89
4664	12,00	0,98	2,52	4,47
4665	7,13	0,64	3,33	4,92
4666	5,40	0,51	7,60	12,65
4667	>20	5,97	5,46	6,31
4668	11,86	0,68	1,90	3,50
4670	20,33	1,44	9,39	9,06
4671	13,15	0,49	5,26	2,76
4672	1,57	0,23	3,24	3,61
4795	2,43	0,43	2,15	4,17
4796	6,50	0,61	1,69	3,87
4797	10,74	0,21	4,40	2,25
4798	26,02	0,31	3,27	4,86
4799	>50	9,01	>25	>25
4839	10,86	2,83	2,93	3,06
4840	9,24	5,50	2,90	4,60
4841	13,75	7,17	2,65	2,96

## 5.2. Vliv látky 4622 na buněčnou linii MCF-7

Pomocí cytometrické analýzy byl studován vliv látky 4622 na asynchronní buňky linie MCF-7. Testované koncentrace byly zvoleny v rozmezí 0,5 – 4x GI<sub>50</sub>. Z výsledků je patrné, že inhibitor 4622 má vliv na distribuci asynchronních buněk MCF-7 v jednotlivých fázích buněčného cyklu. S rostoucí koncentrací látky 4622 dochází k nárůstu počtu buněk v G2/M fázi a poklesu počtu buněk zejména v S fázi

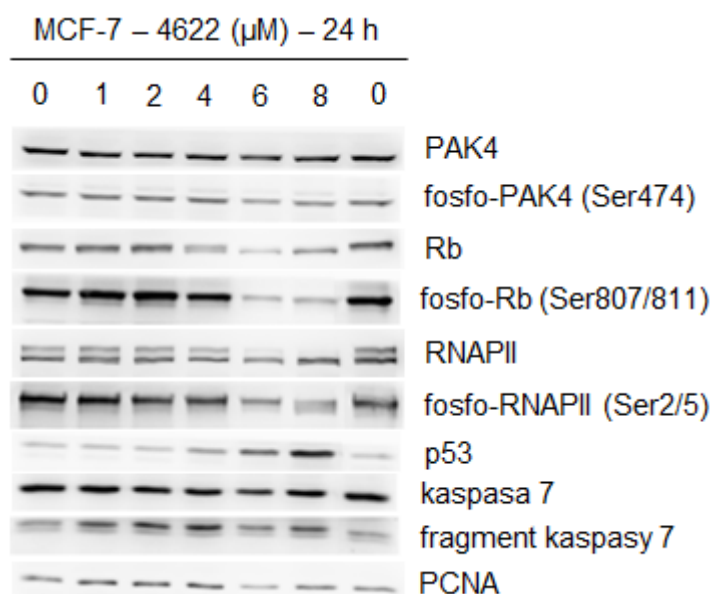
buněčného cyklu viz Graf 1. Sledovaný trend je shodný s tím, který je patrný u vlivu známých CDK inhibitorů (Zatloukal *et al.*, 2013). Vlivem působení inhibitoru výrazně stoupá také počet apoptotických buněk viz Graf 1. K největším změnám oproti kontrole došlo po 24h působení 2  $\mu\text{M}$  4622. Počet buněk v G2/M fázi se zdvojnásobil a na polovinu poklesl v S fázi při srovnání s kontrolou.



Graf 1 Histogram procentuální distribuce asynchronních buněk MCF-7 v jednotlivých fázích buněčného cyklu po 24 hodinové inkubaci s látkou 4622. Data byla zpracována pomocí programu Multicycle AV for Windows (verze 3.00).

V následujících experimentech byly sledovány změny v expresi a fosforylaci vybraných proteinů u nádorové linie MCF-7 po ovlivnění látkou 4622 za použití imunoblottingu. Byla sledována hladina celkové PAK4 a aktivní fosforylované formy PAK4 Ser474. Protože látka 4622 současně inhibuje také CDK byla monitorována hladina proteinů přímo souvisejících s inhibicí CDK. Cytotoxicita mnoha inhibitorů CDK je způsobena inhibicí transkripčních CDK (např. CDK7 a CDK9). Zablokování transkripce vede v buňkách k nahromadění aktivního p53, který poté zvýší produkci p21 (Denicourt *et Dowdy*, 2004). Z tohoto důvodu byla sledována hladina celkové RNAPII a její fosfoformy RNAPII Ser2/5, celkového p53, p21 a také celkového Rb a jeho fosforylované formy Rb Ser807/811 (Lim *et Kaldis*, 2013). Proapoptické

vlastnosti látky 4622 byly ověřeny detekcí kaspasy 7 a jejího aktivního fragmentu, který vzniká po spuštění apoptotické dráhy (Cohen, 1997; Gobeil *et al.*, 2001).



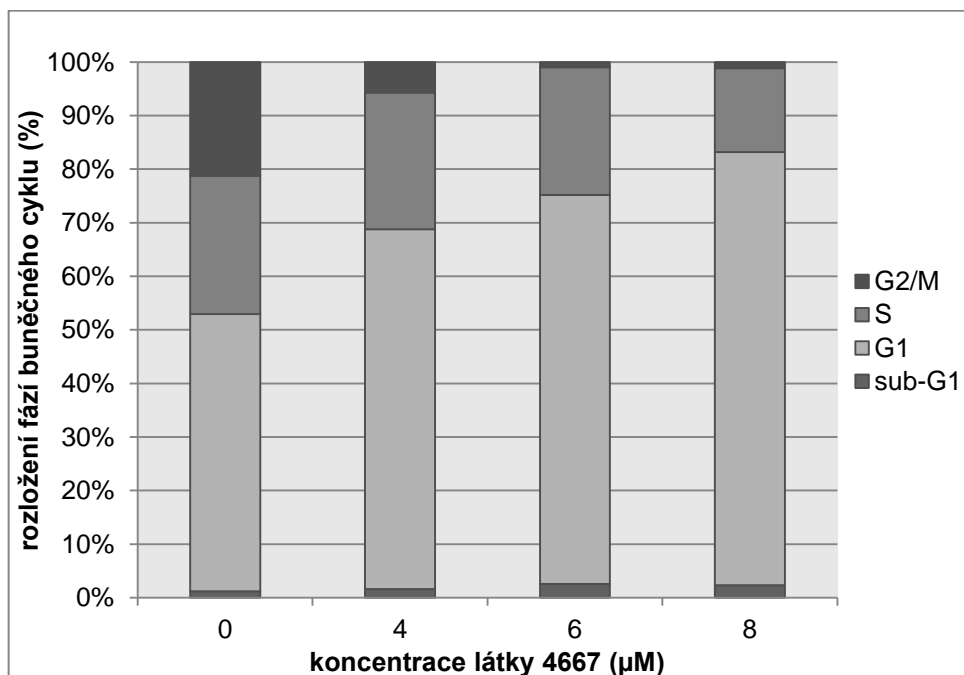
Obr. 21 Hladiny proteinů PAK4, Rb, RNAPII, p53 a kaspasy 7 detekovaných imunoblottingem v asynchronních nádorových buňkách MCF-7 po 24h ovlivnění inhibítorem 4622 o uvedených koncentracích. K ověření stejné koncentrace proteinů ve vzorcích byl detekován PCNA.

Z výsledků viz Obr. 21 je patrné, že látka 4622 preferenčně inhibuje CDK oproti PAK, což koresponduje s  $IC_{50}$  uvedenými Tab. I. K poklesu fosforylace PAK4 nedošlo ani u nejvyšší testované koncentrace látky 4622. Po 24hodinovém působení 4 – 8  $\mu$ M 4622 bylo zaznamenáno zvýšení hladiny p53, což je typickým projevem působení CDK inhibitoru. Se zvyšující se koncentrací 4622 koreluje pokles jak celkového, tak fosforylovaného Rb. Důkazem inhibice transkripčních CDK látkou 4622 je pokles fosforylace RNAPII Ser 2/5, přičemž hladina celkové RNAPII zůstává nezměněna a absence p21 u buněk ovlivněných 8  $\mu$ M 4622 viz Obr. 22. K navození apoptózy došlo už po 24h působení 2  $\mu$ M 4622.

### 5.3. Vliv látky 4667 na nádorovou buněčnou linii MCF-7

Dále byl testován vliv inhibitoru 4667 na rozložení asynchronních buněk MCF-7 v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Koncentrace inhibitoru byly zvoleny v rozsahu od 0,6x do 1,3x  $GI_{50}$ . Bylo zjištěno, že se zvyšující se koncentrací látky

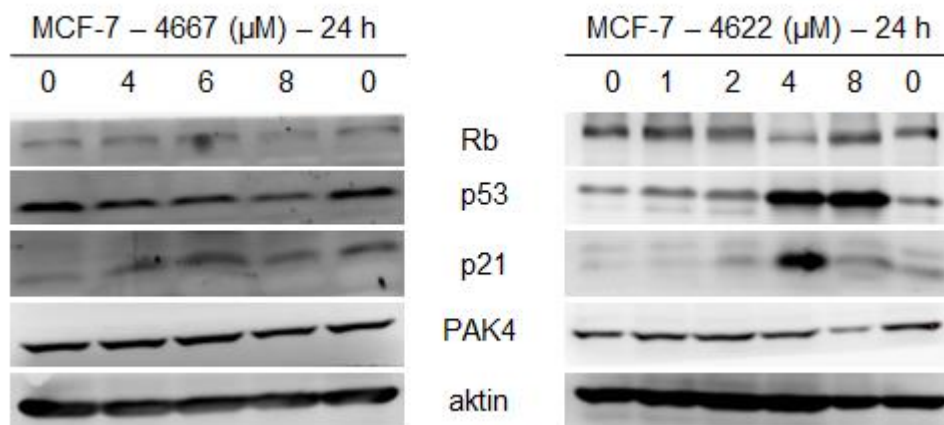
4667 dochází k razantnímu poklesu počtu buněk v G2/M fázi a nárůstu počtu buněk v G1 fázi cyklu viz Graf 2. Při porovnání s kontrolou byly největší změny zaznamenány po 24h působení 8  $\mu$ M 4667. Počet buněk v G2/M fázi klesl z 21 % u kontroly na 1 % a o 39 % poklesl počet buněk v S fázi cyklu. Počet apoptotických buněk se vlivem působení inhibitoru zdvojnásobil a o 58 % vzrostl počet buněk v G1 fázi.



Graf 2 Histogram procentuální distribuce asynchronních buněk MCF-7 v jednotlivých fázích buněčného cyklu po 24 hodinové inkubaci s látkou 4667. Data byla zpracována pomocí programu Multicycle AV for Windows (verze 3.00).

Podle výše uvedených výsledků je mechanismus působení látek 4622 a 4667 na biochemické a buněčné úrovni značně odlišný a za účelem jeho odhalení byla provedena analýza hladin proteinů: p53, p21, celkové PAK4 a celkového Rb pomocí imunoblottingu. Po 24h působení látky 4667 na linii MCF-7 zůstaly hladiny všech analyzovaných proteinů nezměněny viz Obr. 22. Inhibitor 4667 tedy inhibuje jiný molekulární cíl než 4622, což je v souladu i s předchozími výsledky. Přesný mechanismus jeho působení nebyl odhalen, jelikož byla dále testována látka 4841 kvůli dvojnásobně lepším hodnotám inhibice růstu asynchronních buněk linií K562 a MCF-7 v porovnání s látkou 4667.



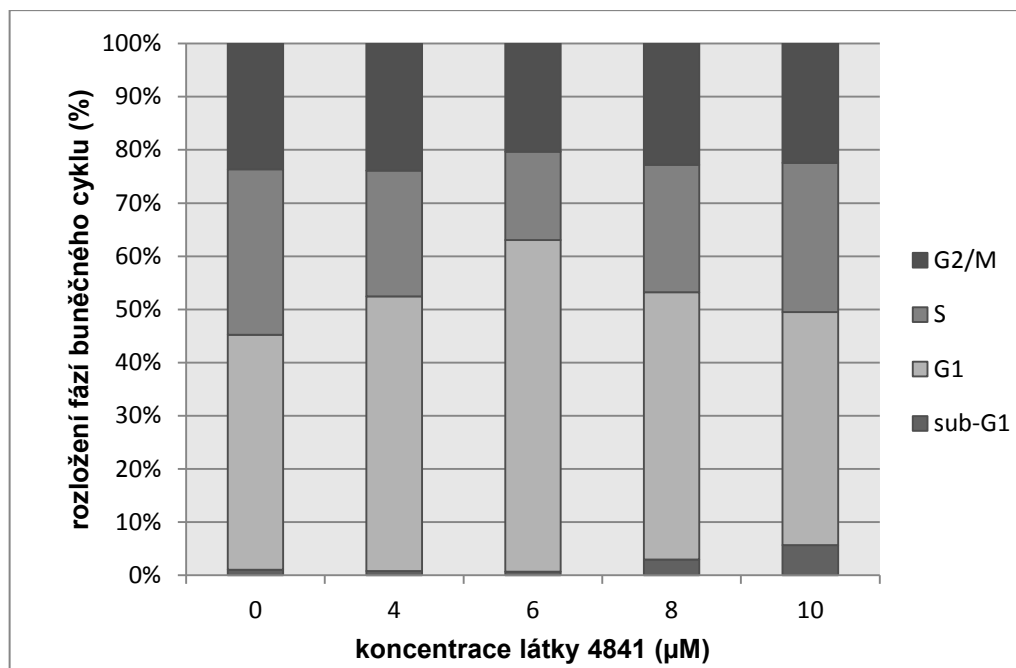


Obr. 22 Hladiny proteinů PAK4, Rb, p53 a p21 detekovaných imunoblottingem v asynchronních nádorových buňkách MCF-7 po 24h ovlivnění inhibitorem 4667 (vlevo) a 4622 (vpravo) o uvedených koncentracích. K ověření stejné koncentrace proteinů ve vzorcích byl detekován aktin.

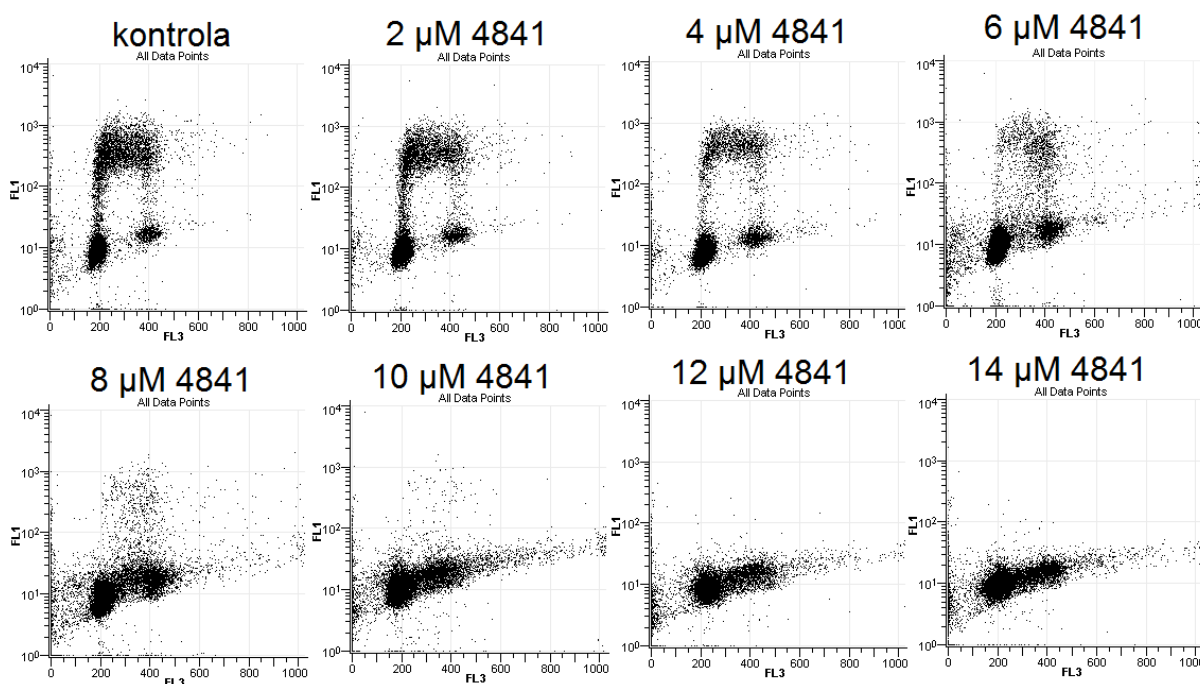
#### 5.4. Vliv látky 4841 na nádorovou buněčnou linii MCF-7

Látka 4841 se od ostatních látek z téže série odlišuje středně dobrou inhibicí růstu asynchronních nádorových buněk, která ovšem nesouvisí s inhibicí kinas PAK4 ani CDK2 viz Tab. I. Z těchto důvodů bylo odhalení jejího mechanismu působení prioritou. Nejdříve byl studován vliv látky 4841 na buněčný cyklus asynchronních buněk linie MCF-7. Po 24h působení 6 μM 4841 došlo k poklesu počtu buněk v S fázi na polovinu a o 18 % vzrostl počet buněk v G1 fázi cyklu viz Graf 3.

Snížení replikačního potenciálu buněk bylo ověřeno dvouparametrickou analýzou buněčného cyklu. K ovlivněným asynchronním buňkám linie MCF-7 byl 30 min před sklizením přidán 5-bromo-2'-deoxyuridin, který se inkorporuje pouze do nově syntetizovaných řetězců DNA. Výsledky dvouparametrické analýzy po 24h působení látky 4841 odhalily, že s rostoucí koncentrací tohoto inhibitoru dochází k prudkému poklesu počtu buněk nacházejících se v S fázi cyklu viz Obr. 23.



Graf 3 Histogram procentuální distribuce asynchronních buněk MCF-7 v jednotlivých fázích buněčného cyklu po 24 hodinové inkubaci s látkou 4841. Data byla zpracována pomocí programu Multicycle AV for Windows (verze 3.00).

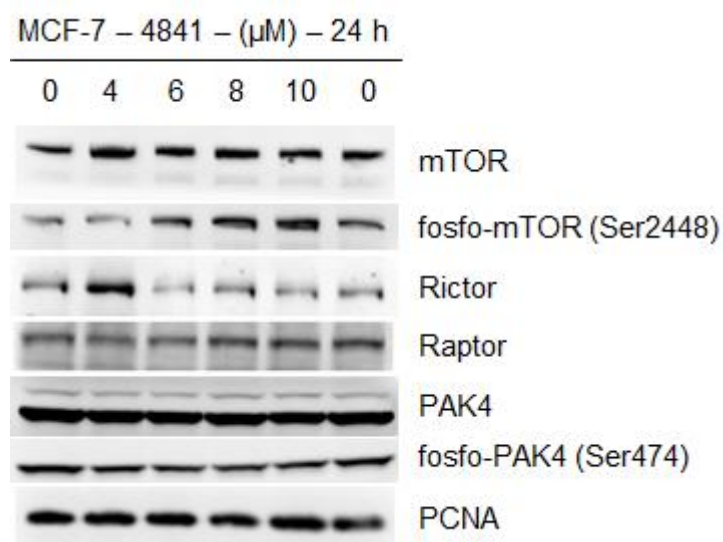


Obr. 23 Změny v replikačním potenciálu asynchronních buněk linie MCF-7 po ovlivnění látkou 4841 po dobu 24 h. FL3 odpovídá signálu propidium jodidu, FL1 odpovídá signálu FITC, který byl použit jako fluorescenční značka konjugovaná s protilátkou anti-BrdU.

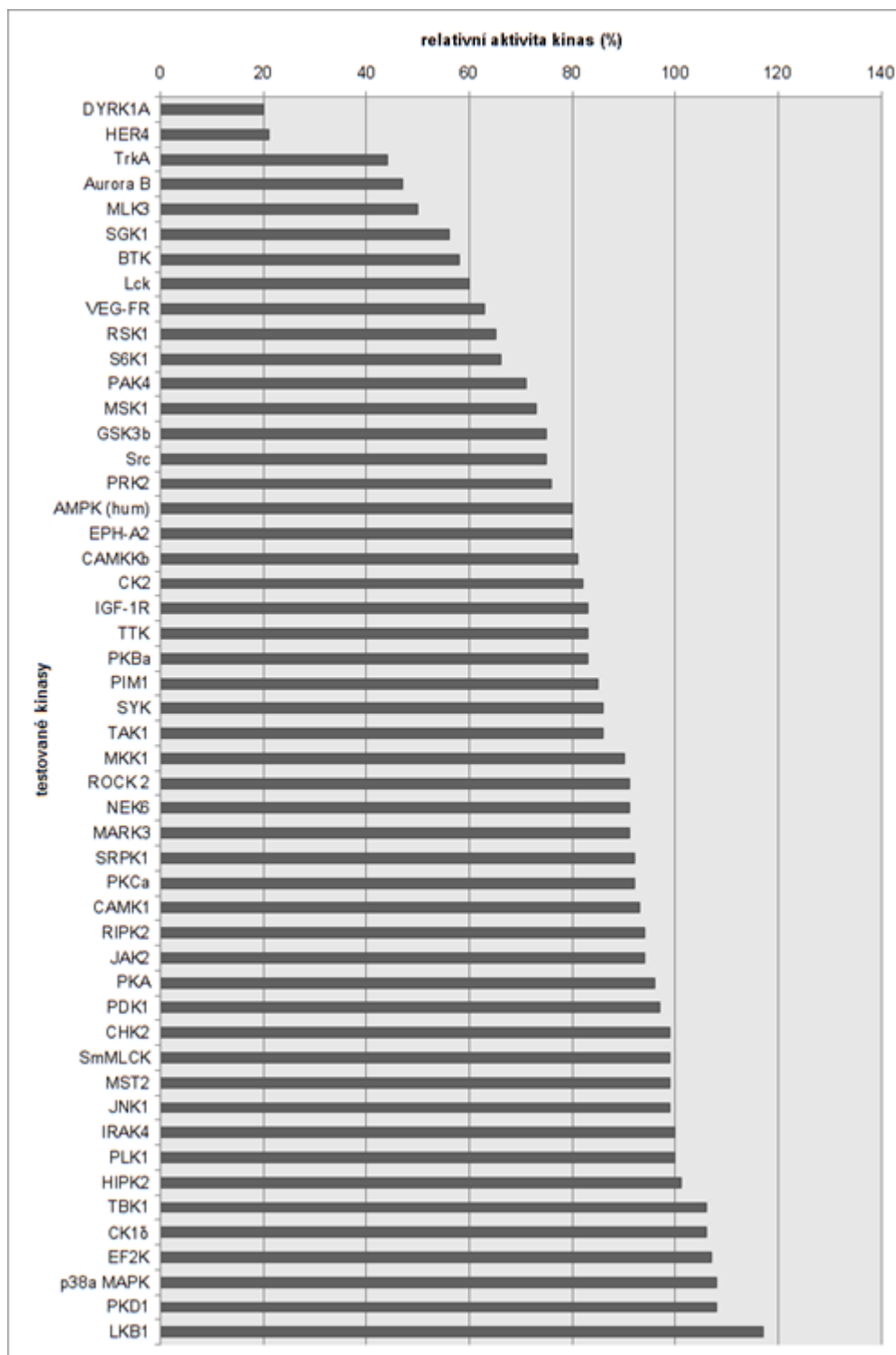
Dále byly sledovány změny v expresi a fosforylaci vybraných proteinů u nádorové linie MCF-7 po ovlivnění látkou 4841, proti nimž byly k dispozici protilátky. Zároveň byla látka 4841 poslána na testování na panelu vybraných kinas reprezentující lidský kinom. Při tomto testu byla sledována změna aktivity příslušné kinasy po inkubaci v přítomnosti 1  $\mu\text{M}$  roztoku 4841.

Největší pokles aktivity byl zaznamenán u kinas DYRK1A a ERBB4 (HER4), u obou klesla aktivita na 20 respektive 21 % viz Graf 4.

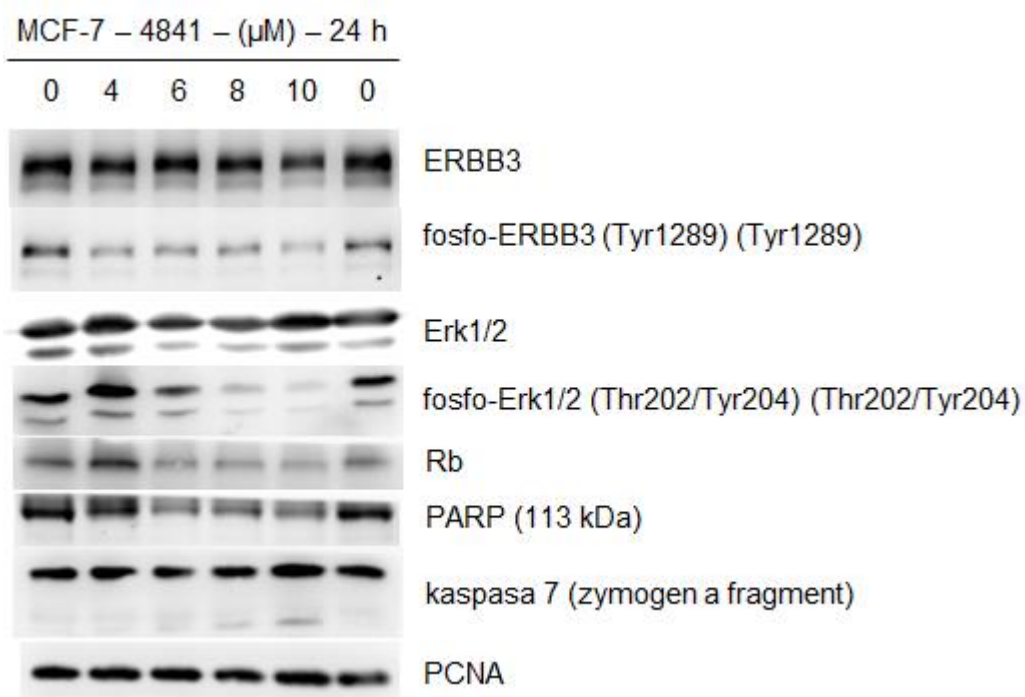
Než byly známy výsledky z kinasového profilování látky 4841, byly sledovány hladiny exprese mnoha proteinů, které jsou součástí významných signalizačních drah. Na Obr. 24 a Obr. 25 je uveden výběr několika výsledků imunodetekce. Po ovlivnění látkou 4841 nebyly zaznamenány změny v hladinách proteinů mTOR, Rictor, Raptor a PAK4 viz Obr. 24.



Obr. 24 Hladiny proteinů mTOR, Rictor, Raptor a PAK4 detekovaných imunoblottingem v asynchronních nádorových buňkách MCF-7 po 24h ovlivnění inhibitorem 4841 o uvedených koncentracích. K ověření stejné koncentrace proteinů ve vzorcích byl detekován PCNA.



Graf 4 Grafické znázornění výsledků screeningu 1 $\mu$ M 4841 na 50 kinasach.

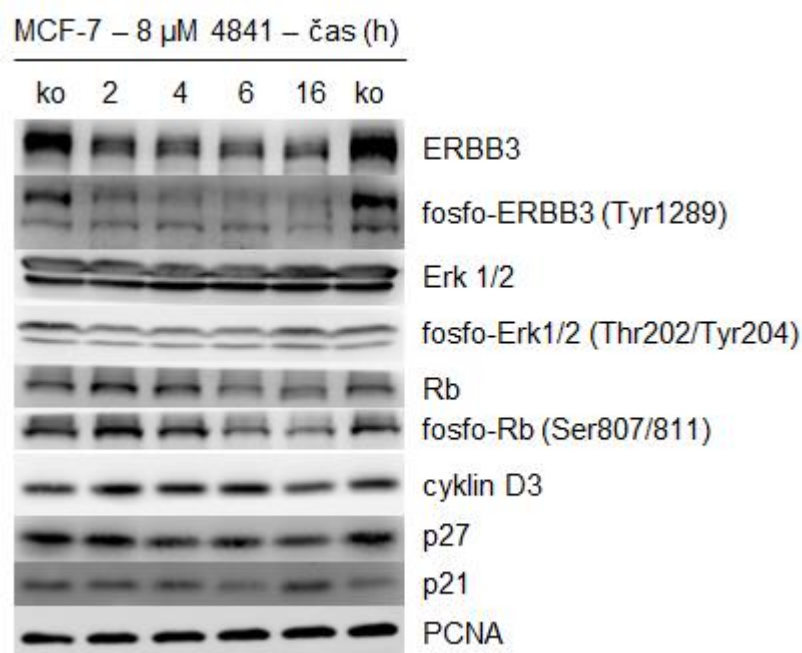


Obr. 25 Hladiny proteinů ERBB3, Erk 1/2, Rb, PARP a kaspasy 7 detekovaných imunoblottingem v asynchronních nádorových buňkách MCF-7 po 24h ovlivnění inhibitorem 4841 o uvedených koncentracích. K ověření stejné koncentrace proteinů ve vzorcích byl detekován PCNA.

Vlivem 24h působení látky 4841 však došlo k poklesu hladin proteinů: Rb a jeho fosfoformy. Významný je zejména pokles hladiny fosforylace proteinu Erk1/2 na místech Thr202 a Tyr204, který koreluje s výsledky screenu. Erk1/2 je součástí mitogeny aktivované kinasové dráhy, která je řízena receptory rodiny ERBB. Monitorovány byly také hladiny proteinů souvisejících s apoptózou. U buněk ovlivněných 6 – 8 μM 4841 byl zaznamenán katalyticky aktivní fragment kaspasy 7 a s ním související pokles hladiny celkového PARP (113 kDa). PARP se podílí na procesech související s opravou DNA a při apoptóze je štěpen právě kaspasami (Gobeil *et al.*, 2001; Soldani *et Scovassi*, 2002). Jakmile byly k dispozici výsledky screenu a příslušné protilátky, byl detekován pokles hladiny fosfo-ERBB3 Tyr1289 viz Obr. 25.

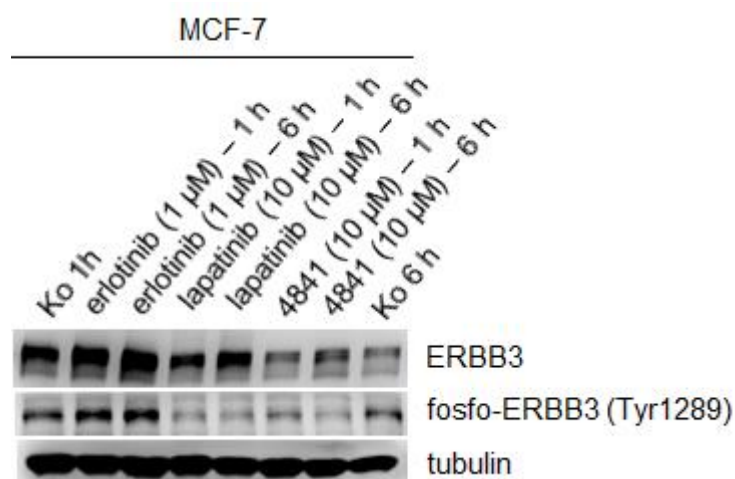
Následoval experiment zaměřený na určení mechanismu, kterým inhibitor 4841 blokuje vstup buněk do S fáze buněčného cyklu. Receptory rodiny ERBB jsou ve své podstatě detektory mitogenních signálů přicházejících z vnějšího prostředí. Tyto signály jsou receptory transdukovány až k sensorům – skupině cyklinů D, jejich

příslušným CDK a proteinu Rb. Klíčovým faktorem pro přechod z G1 do S fáze cyklu je míra fosforylace tumorového supresoru Rb (Lim *et al.* Kaldis, 2013). Ta je zvýšena v případě, kdy jsou CDK aktivní a následkem je vstup buňky do S fáze cyklu. Aktivita CDK může být významně snížena působením přirozených inhibitorů, které se řadí do dvou rodin: INK a Cip/Kip. Asynchronní buňky linie MCF-7 byly po rozdílné časové úseky vystaveny působení 8  $\mu$ M 4841. Kromě hladin ERBB3, Erk1/2 a jejich fosfoform, byly monitorovány hladiny proteinů účastnících se kontrolních procesů na pomezí G1 a S fáze - cyklinu D3, Cip/Kip inhibitorů CDK – p27 a p21, celkového Rb a fosfo-Rb Ser807/811. Z Obr. 26 vyplývá, že k poklesu fosforylace ERBB3 Tyr1289 dochází poměrně rychle, během 2 h. Za 6 h působení inhibitoru došlo k poklesu celkového a fosforylovaného Rb. Po 16 h lze pozorovat mírné zvýšenou hladinu p21. U ostatních proteinů byly hladiny nezměněny. Získané výsledky jsou v souladu s cytometrickou analýzou a blíže specifikovaly mechanismy, kterými látka 4841 zabraňuje vstupu nádorových buněk do S fáze cyklu.



Obr. 26 Hladiny proteinů ERBB3, Erk 1/2, Rb, cyklinu D3, p27 a p21 detekovaných imunoblottingem v asynchronních nádorových buňkách MCF-7 po ovlivnění inhibitorem 8  $\mu$ M 4841 v časovém intervalu 2 – 16 h. K ověření stejné koncentrace proteinů ve vzorcích byl detekován PCNA.

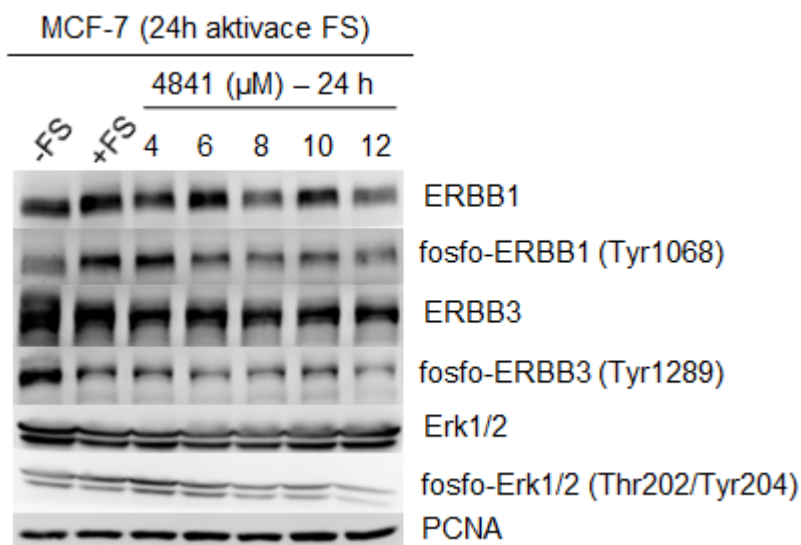
Po objasnění molekulárního cíle a mechanismu působení látky jsme provedli její srovnání s již schválenými léčivy erlotinibem (Tarceva; Roche/Genentech) a lapatinibem (Tykerb; GlaxoSmithKline), které rovněž inhibují fosforylaci receptorů rodiny ERBB. Průběh experimentu byl následující, asynchronní buňky linie MCF-7 byly vystaveny působení inhibitorů rodiny ERBB o daných koncentracích po dobu 1 h nebo 6 h. Poté byla pomocí imunoblottingu stanovena hladina celkového ERBB3 a jeho fosforylované formy fosfo-ERBB3 Tyr1289. Výsledky uvedené na Obr. 27 dokumentují, že látka 4841 vyvolává defosforylaci ERBB3 srovnatelnou s působením lapatinibu. K poklesu hladiny fosfo-ERBB3 Tyr1289 dochází rychleji po působení lapatinibu při srovnání s 4841 o stejné koncentraci a době působení. Po působení erlotinibu nebyla detekována změna hladiny fosfo-ERBB3 Tyr1289, jelikož jeho zvolená koncentrace byla příliš nízká.



Obr. 27 Hladiny proteinu ERBB3 a jeho fosfoformy detekované imunoblottingem v asynchronních nádorových buňkách MCF-7 po ovlivnění inhibitory erlotinibem, lapatinibem a 4841 v časových intervalech 1 h a 6 h. K ověření stejné koncentrace proteinů ve vzorcích byl detekován tubulin.

Dále byla zkoumána schopnost látky 4841 ovlivnit aktivaci receptorů ERBB1 a ERBB3. Byla stanovena hladina receptorů ERBB1, ERBB3 a jejich fosfoform v buňkách linie MCF-7, kterým bylo fetální sérum na 24 h odebráno (-FS), dále v buňkách, které byly po 24 h bez fetálního séra, ale následně jím byly stimulovány po dobu 24 h (+FS) a v buňkách, které byly zároveň stimulovány fetálním sérem a ovlivněny danými koncentracemi látky 4841 po dobu 24 h. Z výsledků na Obr. 28 je

patrné, že látka 4841 zabraňuje aktivaci ERBB1 a ERBB3, jelikož se váže do ATP-vazebného místa těchto tyrosinkinasových receptorů, které se v důsledku toho nemohou autofosforylovat a tedy aktivovat. U ERBB1 poklesla hladina jeho fosfoformy po 24h působení 12  $\mu$ M 4841 na hladinu srovnatelnou s negativní kontrolou (-FS). Mírný pokles hladiny byl zaznamenán také u proteinu Erk1/2 fosforylovaného na místech Thr202 a Tyr204.



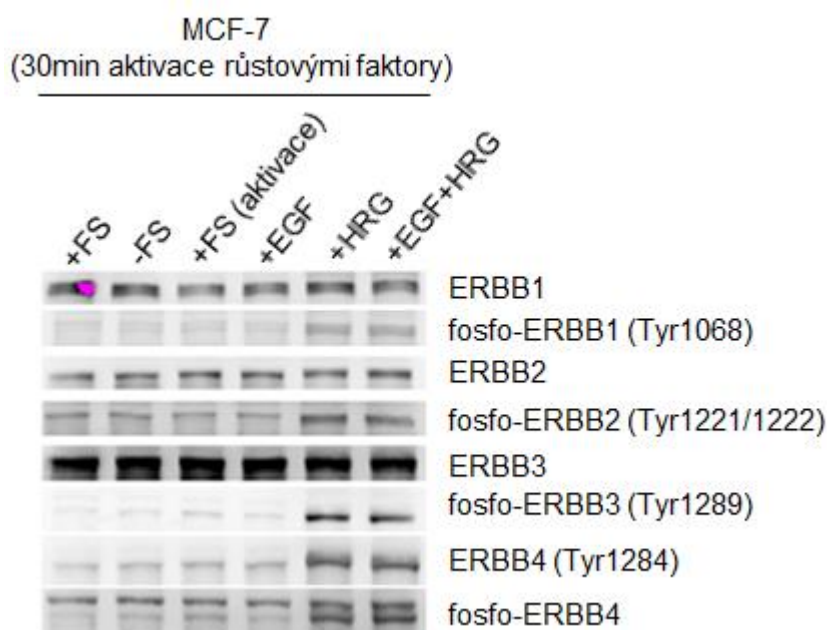
Obr. 28 Asynchronní buňky linie MCF-7 byly nejprve kultivovány v médiu obsahujícím fetální sérum poté jim bylo fetální sérum na 24 h odebráno (-FS). Následně na ně buďto nebyla aplikována látka 4841 - kontrola (+FS) nebo byly vystaveny působení 4841 o uvedených koncentracích po dobu 24 h za přítomnosti média obsahujícího fetální sérum. Pomocí imunoblottingu byly stanoveny hladiny proteinů ERBB1, ERBB3 a Erk1/2. K ověření stejné koncentrace proteinů ve vzorcích byl detekován PCNA.

Jelikož hladina fosforylovaných receptorů rodiny ERBB je v buňkách linie MCF-7 nízká byly k jejímu zvýšení použity přirozené ligandy těchto receptorů – epidermální růstový faktor (EGF) a heregulin (HRG). Výsledky stimulace jsou na Obr. 29. Hladina fosfoform ERBB se zvýšila jen za přítomnosti HRG, protože dodaný EGF nebyl biologicky aktivní.

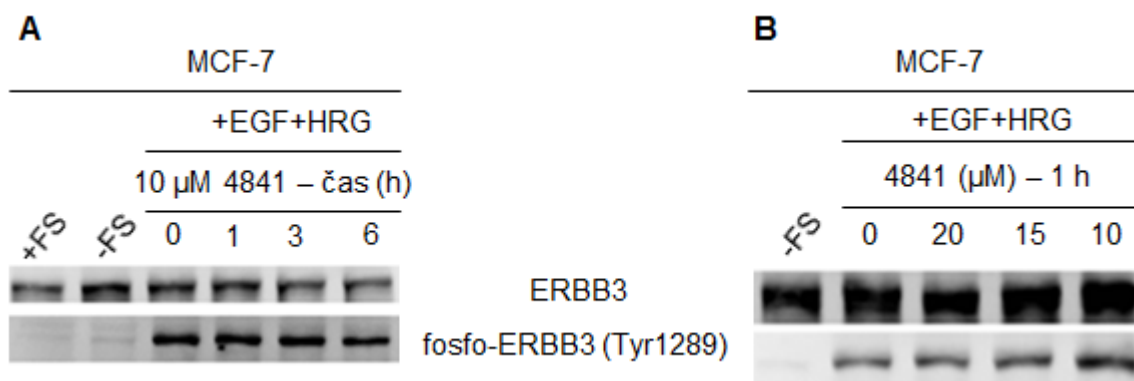
Následovaly experimenty, které měly za cíl ověřit vliv látky 4841 na aktivaci ERBB3 při stimulaci ERBB receptorů jejich ligandy – epidermálním růstovým faktorem a heregulinem. Asynchronní buňky linie MCF-7 byly nejdříve kultivovány



v médiu obsahujícím fetální sérum, poté jim bylo fetální sérum na 24 h odebráno. Následně byly po určité časové intervaly vystaveny působení látky 4841 o daných koncentracích za přítomnosti epidermálního růstového faktoru, heregulinu a média obsahujícího fetální sérum. Poté byly pomocí imunoblottingu stanoveny hladiny ERBB3 a fosfo-ERBB3 Tyr1289. Nebyly ovšem zjištěny žádné změny v hladinách těchto proteinů viz Obr. 30 A, B. Pravděpodobně totiž došlo k modifikaci studované látky, která tím ztratila svou inhibiční aktivitu. Jelikož i při poměrně vysoké koncentraci 20  $\mu$ M 4841 se její účinky neprojeví viz Obr. 30 B.



Obr. 29 Asynchronní buňky linie MCF-7 byly nejprve kultivovány v médiu s fetálním sérum (+FS) poté jim bylo fetální sérum na 24 h odebráno (-FS). Následně na ně buďto nebyly aplikovány růstové faktory - kontrola (+FS aktivace) nebo byly vystaveny působení uvedených růstových faktorů (EGF – epidermální růstový faktor, HRG – heregulin) o koncentracích 100 ng/ml po dobu 30 min za přítomnosti média obsahujícího fetální sérum. Pomocí imunoblottingu byly stanoveny hladiny proteinů ERBB1, ERBB2, ERBB3, ERBB4 a jejich fosfoform. Ve všech vzorcích byla koncentrace proteinů vyrovnána. Její ověření bylo provedeno vizuálně po obarvení Ponceau S.



Obr. 30 Asynchronní buňky linie MCF-7 byly nejprve kultivovány v médiu s fetálním sérem poté jim bylo fetální sérum na 24 h odebráno (-FS). Následně na ně buďto nebyly aplikovány růstové faktory - kontrola (+FS) nebo byly současně vystaveny působení uvedených růstových faktorů (EGF – epidermální růstový faktor, HRG – heregulin) o koncentracích 100 ng/ml a látky 4841 o uvedené koncentraci a době působení, za přítomnosti média obsahujícího fetální sérum. Pomocí imunoblottingu byla stanovena hladina proteinu ERBB3 a jeho fosfoformy. Ve všech vzorcích byla koncentrace proteinů vyrovnaná. Její ověření bylo provedeno vizuálně po obarvení Ponceau S.

## 6. Diskuze

Cílem praktické části diplomové práce bylo charakterizovat vliv vybraných inhibitorů z knihovny 2,6,9-trisubstituovaných purinů na vybrané nádorové linie *in vitro*. Stanovit změny v rozložení buněčného cyklu po ovlivnění nádorových buněk inhibitorem, specifikovat molekulární cíl inhibitoru a analyzovat proapoptotické účinky.

Studované látky byly odvozeny od duálního inhibitoru kinas CDK a PAK CGP74514A a navzájem se od sebe odlišují hlavně v délce a rozvětvenosti substituentu v pozici N9 purinu a v pozici atomu Cl na benzylaminu v poloze 6 purinu. Z knihovny nových 2,6,9-trisubstituovaných purinů připravených s cílem změny jejich inhibiční aktivity z CDK na PAK kinasy má látka 4622 nejlepší inhibiční aktivitu vůči PAK4 ( $IC_{50} = 1,08 \mu M$ ), ale současně vykazuje také 9krát vyšší inhibiční aktivitu vůči CDK2 ( $IC_{50} = 0,12 \mu M$ ). Nejdříve byl stanoven vliv této látky na buněčný cyklus nádorové linie MCF-7. Výsledkem cytometrické analýzy bylo zjištění, že s rostoucí koncentrací látky 4622 dochází k nárůstu počtu buněk v G2/M fázi a poklesu počtu buněk zejména v S fázi buněčného cyklu. Vlivem působení inhibitoru 4622 výrazně stoupá také počet buněk v sub-G1 fázi, což souvisí s proapoptotickými účinky látky. Podrobnější charakterizace působení látky na buněčné úrovni byla provedena za použití imunoblottingu. K poklesu hladiny fosfo-PAK4 Ser 474 nedošlo ani u nejvyšší testované koncentrace látky 4622. Po 24hodinovém působení bylo zaznamenáno zvýšení hladiny p53, což je typickým projevem působení CDK inhibitoru. Se zvyšující se koncentrací 4622 koreluje pokles jak celkového, tak fosforylovaného Rb. Důkazem inhibice globální transkripce látkou 4622 je rovněž pokles fosforylace RNAPII Ser 2/5 a absence p21 u buněk ovlivněných vyšší koncentrací 4622. K navození apoptózy došlo už po 24h působení nízkých koncentrací 4622, kdy byla detekována zvýšená hladina katalyticky aktivního fragmentu kaspasy 7. Tyto výsledky korespondují s inhibičními mechanismy pan-selektivních inhibitorů (MacCallum *et al.*, 2005). Závěrem lze tedy konstatovat, že látka 4622 preferenčně inhibuje kinasy CDK oproti PAK jak na biochemické, tak na buněčné úrovni.

Další látky k podrobnějšímu testování byly vybírány z knihovny nových 2,6,9-trisubstituovaných purinů s ohledem na co nejnižší inhibiční aktivitu vůči CDK2 a s přihlédnutím k hodnotám inhibice růstu nádorových linií K562 a MCF-7. Podle

těchto kritérií byla k podrobnější charakterizaci svého vlivu na nádorovou buněčnou linii MCF-7 zvolena látka 4667. Hodnota inhibiční aktivity této látky vůči PAK4 náleží mezi nejnižší v rámci celé knihovny ( $IC_{50} = >20 \mu M$ ).

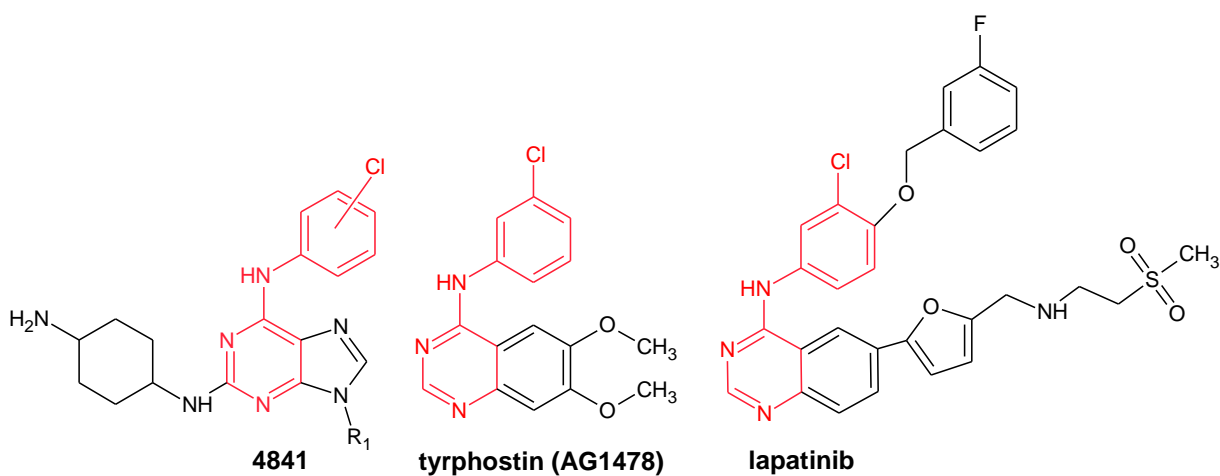
Nejdříve byl testován vliv inhibitoru 4667 na rozložení asynchronních buněk MCF-7 v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Z výsledků analýzy buněčného cyklu je patrné, že se zvyšující se koncentrací látky 4667 dochází k razantnímu poklesu počtu buněk v G2/M fázi a nárůstu počtu buněk v G1 fázi cyklu. Za účelem odhalení mechanismu působení látky 4667 na buněčné úrovni byla provedena analýza hladin proteinů: celkového Rb, p53, p21 a celkové PAK4 pomocí imunoblottingu. Po 24h působení látky 4667 na linii MCF-7 zůstaly hladiny všech analyzovaných proteinů nezměněny. Inhibitor 4667 tedy inhibuje jiný molekulární cíl než 4622. Přesný mechanismus jeho působení ale nebyl určen, jelikož byla dále testována látka 4841 kvůli dvojnásobně vyšším hodnotám inhibice růstu asynchronních buněk nádorových linií K562 a MCF-7 v porovnání s látkou 4667.

Látka 4841 nezpůsobuje inhibici růstu nádorových buněk prostřednictvím inhibice kinas PAK4 ( $IC_{50} = 13,745 \mu M$ ) ani CDK2 ( $IC_{50} = 7,170 \mu M$ ). Z těchto důvodů bylo prioritní odhalení jejího mechanismu působení na buněčné úrovni. Nejdříve byl studován vliv látky 4841 na buněčný cyklus asynchronních buněk linie MCF-7. Výsledky jednoparametrické cytometrické analýzy ukázaly, že vlivem působení inhibitoru došlo k razantnímu poklesu počtu buněk v S fázi a k nárůstu počet buněk v G1 fázi cyklu. K ověření získaných dat byla použita dvouparametrická analýza buněčného cyklu, která přesněji stanovuje replikační potenciál buněk na základě detekce 5-bromo-2'-deoxyuridinu inkorporovaného v DNA. Výsledky této analýzy souhlasily s předchozími. Za účelem specifikace molekulárního cíle inhibitoru 4841 byly monitorovány hladiny proteinů, které jsou součástí významných signalizačních drah pomocí imunoblottingu. Tímto způsobem bylo zjištěno, že vlivem působení látky 4841 dochází k poklesu hladin proteinů: Rb a jeho fosfoformy. Podstatné je, že se podařilo zdokumentovat pokles hladiny proteinu Erk1/2 fosforylovaného na místech Thr202 a Tyr204. Tento poznatek je důležitý, jelikož k usnadnění nalezení molekulárního cíle inhibitoru 4841 byla tato látka odeslána na otestování na panelu 50 kinas reprezentujících lidský kinom. Výsledky testu souhlasily s dosavadními výsledky, protože molekulárním cílem inhibitoru 4841 je dle výsledků screenu rodina receptorů ERBB, přičemž tyto receptory především řídí signalizační kaskády Ras-Erk a PI3K-Akt. Při relativně nízké koncentraci použité při

testu, jen 1  $\mu\text{M}$ , byl největší pokles aktivity zaznamenán u kinas DYRK1A a ERBB4. U obou klesla aktivita jen na 20 respektive 21 %. Při další charakterizaci inhibitoru 4841 se zaměřila pozornost na inhibici rodiny receptorů ERBB, jelikož úloha serin/threoninové kinasy DYRK1A ve vývoji nádorových onemocnění je málo prozkoumána. Zatím se jen spekuluje o jejím možném působení u některých typů leukemií (Malinge *et al.*, 2012).

Dále byly zjišťovány proapoptotické účinky látky 4841 prostřednictvím stanovení hladiny katalyticky aktivního fragmentu kaspasy 7, jakožto zástupce jednoho z hlavních efektorů apoptotické kaskády a jeho substrátu proteinu PARP. Už při nižších testovaných koncentracích byl zaznamenán nárůst hladiny fragmentu kaspasy 7 a s ním související pokles hladiny celkového PARP.

Porovnáním struktury inhibitoru 4841 s nyní známými nízkomolekulárními inhibitory rodiny ERBB byla zjištěna podobnost jeho struktury s lapatinibem a tyrphostinem (AG 1478) viz Obr. 31. Tyrphostin (AG 1478) a lapatinib jsou ATP-kompetitivní reverzibilní inhibitory ERBB.



Obr. 31 Obecná struktura látek 4841, tyrphostinu a lapatinibu. Červeně jsou označeny shodné části molekul.

Při srovnání dostupných informací o vlivu lapatinibu a tyrphostinu na buněčný cyklus s poznatky získanými o inhibitoru 4841 v rámci této práce je zřejmé, že všechny tyto látky způsobují srovnatelné změny v distribuci buněk (Carrasco-García *et al.*, 2011). Konkrétně nárůst počtu buněk v G1 fázi cyklu a značné snížení počtu buněk v S fázi cyklu. Tyrphostin a látka 4841 brání nádorovým buňkám ve vstupu do

S fáze poklesem hladiny fosforylovaného Rb a zvýšením hladiny inhibitorů CDK rodiny Cip/Kip (Carrasco-García *et al.*, 2011). V rámci jednoho experimentu byla přímo srovnávána inhibiční aktivita 4841 a lapatinibu vůči ERBB3 na asynchronních buňkách linie MCF-7. Inhibitor 4841 vyvolal defosforylaci ERBB3 srovnatelnou s působením lapatinibu. K poklesu hladiny fosfo-ERBB3 Tyr1289 došlo ovšem rychleji po působení lapatinibu při srovnání s 4841 o stejné koncentraci a době působení. V návaznosti na inhibici receptorů rodiny ERBB všechny srovnávané látky způsobují deaktivaci podřízené signální dráhy Ras-Erk.

Jelikož některé experimenty nebyly dokončeny, protože pravděpodobně došlo k modifikaci látky 4841, nejsou k dispozici data o inhibici receptorů ERBB2 a ERBB4.

## 7. Závěr

Za použití několika nezávislých metod byly charakterizovány některé biologické účinky tří nových 2,6,9-trisubstituovaných purinů na buněčnou linii MCF-7 odvozenou od adenokarcinomu prsu. Otestované látky jsou součástí knihovny nových 2,6,9-trisubstituovaných purinů připravených s cílem změnit inhibiční aktivitu látek z CDK na PAK kinasy, prostřednictvím změny délky a rozvětvenosti substituentu v poloze N9 purinu a také změny pozice atomu Cl na benzylaminu v poloze C6 purinu.

Látka 4622 vykazovala na biochemické úrovni nejvyšší inhibiční aktivitu vůči PAK kinasám v rámci celé knihovny. Podle získaných výsledků, ale preferenčně stále inhibuje CDK než PAK kinasy. Stejná korelace inhibičních aktivit byla zaznamenána i u dalších látek. Z tohoto důvodu byly k dalšímu testování vybrány látky s ohledem na jejich schopnost inhibovat růst nádorových buněk a zároveň s nízkými inhibičními aktivitami vůči CDK i PAK kinasám. Tato kritéria splnily látky 4667 a 4841, přičemž pozornost se zaměřila především na látku 4841 kvůli dobré inhibici růstu nádorových buněk. Její strukturní odlišnost pravděpodobně zapříčinila, že molekulárním cílem látky 4841 je rodina receptorů epidermálního růstového faktoru (ERBB). Bližším studiem této látky bylo zjištěno, že způsobuje blokaci vstupu buněk do S fáze cyklu defosforylací proteinu Rb a zvýšením hladiny CDK inhibitoru p21. Dále byla potvrzena její schopnost zabránit aktivaci receptorů ERBB prostřednictvím její vazby do ATP-vazebného místa těchto tyrosinkinás, čímž blokuje jejich autofosforylaci. Účinnost látky 4841 v inhibici ERBB je srovnatelná s ATP-kompetitivním reverzibilním inhibitorem ERBB lapatinibem, který je nyní už terapeuticky využíván. Látka 4841 a její analogy budou dále studovány se zaměřením na zlepšení stability, farmakodynamických a farmakokinetických vlastností.

## 8. Literatura

- Ameriks, M. K., a Venable, J. D. (2009). Small molecule inhibitors of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) delta and gamma. *Current topics in medicinal chemistry*, 9(8), 738–53.
- Arias-Romero, L. E., Villamar-Cruz, O., Huang, M., Hoeflich, K. P., a Chernoff, J. (2013). Pak1 kinase links ErbB2 to b-catenin in transformation of breast epithelial cells. *Cancer Research*, 73(12), 3671–3682.
- Avraham, R., Sas-Chen, A., Manor, O., Steinfeld, I., Shalgi, R., Tarcic, G., Yarden, Y. (2010). EGF decreases the abundance of microRNAs that restrain oncogenic transcription factors. *Science Signal.*, 3(124)
- Avraham, R., a Yarden, Y. (2011). Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(2)
- Azam, M., Nardi, V., Shakespeare, W. C., Metcalf, C. A. 3rd, Bohacek, R. S., Wang, Y., Daley, G. Q. (2006). Activity of dual SRC-ABL inhibitors highlights the role of BCR/ABL kinase dynamics in drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(24), 9244–9249.
- Bendell, J. C., Hong, D. S., Burris, H. A. 3rd, Naing, A., Jones, S. F., Falchook, G., Kurzrock, R. (2014). Phase 1, open-label, dose-escalation, and pharmacokinetic study of STAT3 inhibitor OPB-31121 in subjects with advanced solid tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 74(1), 125–130.
- Bettayeb, K., Oumata, N., Echalié, a, Ferandin, Y., Endicott, J. a, Galons, H., a Meijer, L. (2008). CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Oncogene*, 27(44), 5797–5807.
- Bibian, M., Rahaim, R. J., Choi, J. Y., Noguchi, Y., Schürer, S., Chen, W., Roush, W. R. (2013). Development of highly selective casein kinase 1 $\delta$ /1 $\epsilon$  (CK1 $\delta$ / $\epsilon$ ) inhibitors with potent antiproliferative properties. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23(15), 4374–4380.
- Brooks, E. E., Gray, N. S., Joly, A., Kerwar, S. S., Lum, R., Mackman, R. L., Shiffman, D. (1997). CVT-313, a specific and potent inhibitor of CDK2 that prevents neointimal proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 272(46)
- Cao, L., Chen, F., Yang, X., Xu, W., Xie, J., a Yu, L. (2014). Phylogenetic analysis of CDK and cyclin proteins in premetazoan lineages. *BMC Evolutionary Biology*, 14(1), 10.
- Carlsten, J. O. P., Zhu, X., a Gustafsson, C. M. (2013). The multitasking Mediator complex. *Trends in Biochemical Sciences*.
- Carrasco-García, E., Saceda, M., Grasso, S., Rocamora-Reverte, L., Conde, M., Gómez-Martínez, Á., Martínez-Lacaci, I. (2011). Small tyrosine kinase inhibitors interrupt EGFR signaling by interacting with erbB3 and erbB4 in glioblastoma cell lines. *Experimental Cell Research*, 317(10), 1476–1489.
- Casalini, P., Iorio, M. V, Galmozzi, E., a Menard, S. (2004). Role of HER receptors family in development and differentiation. *Journal of Cellular Physiology*, 200(3),



343–350.

- Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical Journal*, 326 ( Pt 1), 1–16.
- Cruciat, C.-M., Dolde, C., de Groot, R. E. A., Ohkawara, B., Reinhard, C., Korswagen, H. C., a Niehrs, C. (2013). RNA helicase DDX3 is a regulatory subunit of casein kinase 1 in Wnt-beta-catenin signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6126), 1436–1441.
- Dalgarno, D., Stehle, T., Narula, S., Schelling, P., Van Schravendijk, M. R., Adams, S., Sawyer, T. (2006). Structural basis of Src tyrosine kinase inhibition with a new class of potent and selective trisubstituted purine-based compounds. *Chemical Biology and Drug Design*, 67(1), 46–57.
- Dart, A. E., a Wells, C. M. (2013). P21-activated kinase 4--not just one of the PAK. *European journal of cell biology*, 92(4-5), 129–38.
- Davies, T. G., Bentley, J., Arris, C. E., Boyle, F. T., Curtin, N. J., Endicott, J. A., Whitfield, H. J. (2002). Structure-based design of a potent purine-based cyclin-dependent kinase inhibitor. *Nat Struct Biol*, 9(10), 745–749.
- Davies, T. G., Pratt, D. J., Endicott, J. a., Johnson, L. N., a Noble, M. E. M. (2002). Structure-based design of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Pharmacology a Therapeutics*, 93(2-3), 125–133.
- Demange, L., O. Lozach, Y. Ferandin, N.T. Hoang, L. Meijer, H. Galons (2013): Synthesis and evaluation of new potent inhibitors of CK1 and CDK5, two kinases involved in Alzheimer's disease. *Med. Chem. Res.* 22: 3247.
- Demaria, M., Camporeale, A., a Poli, V. (2014). STAT3 and metabolism: how many ways to use a single molecule? *International Journal of Cancer*, 135(9), 1997–2003.
- Denicourt, C., a Dowdy, S. F. (2004). Cip/Kip proteins: more than just CDKs inhibitors. *Genes a Development*, 18(8), 851–855.
- Dreyer, M. K., Borchering, D. R., Dumont, J. A., Peet, N. P., Tsay, J. T., Wright, P. S., Kim, S. H. (2001). Crystal structure of human cyclin-dependent kinase 2 in complex with the adenine-derived inhibitor H717. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(4), 524–530.
- Eswaran, J., Lee, W. H., Debreczeni, J. , Filippakopoulos, P., Turnbull, A., Fedorov, O., Knapp, S. (2007). Crystal Structures of the p21-Activated Kinases PAK4, PAK5, and PAK6 Reveal Catalytic Domain Plasticity of Active Group II PAKs. *Structure*, 15(2), 201–213.
- Finn, R. S. (2008). Targeting Src in breast cancer. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 19(8), 1379–1386.
- Flajolet, M., He, G., Heiman, M., Lin, A., Nairn, A. C., a Greengard, P. (2007). Regulation of Alzheimer's disease amyloid-beta formation by casein kinase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

*America*, 104(10), 4159–4164.

- Friedland, J. C., Lakins, J. N., Kazanietz, M. G., Chernoff, J., Boettiger, D., a Weaver, V. M. (2007).  $\alpha 6\beta 4$  integrin activates Rac-dependent p21-activated kinase 1 to drive NF-kappaB-dependent resistance to apoptosis in 3D mammary acini. *Journal of cell science*, 120(Pt 20), 3700–3712.
- Gallego, M., a Virshup, D. M. (2007). Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(2), 139–148.
- Gilbert, A. M., Nowak, P., Brooijmans, N., Bursavich, M. G., Dehnhardt, C., Santos, E. D., Mallon, R. (2010). Novel purine and pyrazolo[3,4-d]pyrimidine inhibitors of PI3 kinase-alpha: Hit to lead studies. *Bioorganic a Medicinal Chemistry Letters*, 20(2), 636–639. 1
- Gobeil, S., Boucher, C. C., Nadeau, D., a Poirier, G. G. (2001). Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases. *Cell Death and Differentiation*, 8(6), 588–594.
- Gray, N. S., Wodicka, L., Thunnissen, A.-M. W. H., Norman, T. C., Kwon, S., Espinoza, F. H., Schultz, P. G. (1998). Exploiting Chemical Libraries, Structure, and Genomics in the Search for Kinase Inhibitors. *Science*, 281(5376), 533–538.
- Gucky, T., Jorda, R., Zatloukal, M., Bazgier, V., Berka, K., Reznickova, E., Krystof, V. (2013). A novel series of highly potent 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(15), 6234–6247.
- Hardcastle, I. R., Arris, C. E., Bentley, J., Boyle, F. T., Chen, Y., Curtin, N. J., Whitfield, H. J. (2004). N2-substituted O6-cyclohexylmethylguanine derivatives: Potent inhibitors of cyclin-dependent kinases 1 and 2. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(15), 3710–3722.
- Havlíček, L., Hanuš, J., Veselý, J., Leclerc, S., Meijer, L., Shaw, G., a Strnad, M. (1997). Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: Synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *Journal of Medicinal Chemistry*, 40(4), 408–412.
- Hayakawa, F., Sugimoto, K., Harada, Y., Hashimoto, N., Ohi, N., Kurahashi, S., a Naoe, T. (2013). A novel STAT inhibitor, OPB-31121, has a significant antitumor effect on leukemia with STAT-addictive oncokinas. *Blood Cancer Journal*, 3, e166.
- Hong, S., Lee, S., Kim, B., Lee, H., Hong, S. S., a Hong, S. (2010). Discovery of new azaindole-based PI3K $\alpha$  inhibitors: Apoptotic and antiangiogenic effect on cancer cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 20(24), 7212–7215.
- Hu, G.-D., Chen, Y.-H., Zhang, L., Tong, W.-C., Cheng, Y.-X., Luo, Y.-L., Zhang, L. (2011). The generation of the endothelial specific cdc42-deficient mice and the effect of cdc42 deletion on the angiogenesis and embryonic development. *Chinese Medical Journal*, 124(24), 4155–4159.
- Huang, H., Ma, J., Shi, J., Meng, L., Jiang, H., Ding, J., a Liu, H. (2010). Discovery of novel purine derivatives with potent and selective inhibitory activity against c-*Src*

- tyrosine kinase. *Bioorganic a Medicinal Chemistry*, 18(13), 4615–4624.
- Hynes, N. E., a MacDonald, G. (2009). ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(2), 177–184.
- Chapman, T. (2004): Mining the proteome. *Nature*. 430(6995):109.
- Cheong, J. K., a Virshup, D. M. (2011). Casein kinase 1: Complexity in the family. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 43(4), 465–469.
- Janicke, R. U., Sprengart, M. L., Wati, M. R., a Porter, A. G. (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(16), 9357–9360.
- Jura, N., Shan, Y., Cao, X., Shaw, D. E., a Kuriyan, J. (2009). Structural analysis of the catalytically inactive kinase domain of the human EGF receptor 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(51), 21608–21613.
- Kryštof, V., McNae, I. W., Walkinshaw, M. D., Fischer, P. M., Vojtěšek, B., Strnad, M. (2005). Antiproliferative activity of olomoucine II, a novel 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(15), 1763–1771.
- Kumar, R., Gururaj, A. E., a Barnes, C. J. (2006). p21-activated kinases in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 6(6), 459–471.
- Legraverend, M., a Grierson, D. S. (2006). The purines: Potent and versatile small molecule inhibitors and modulators of key biological targets. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 14(12), 3987–4006.
- Li, X., Wen, W., Liu, K., Zhu, F., Malakhova, M., Peng, C., Dong, Z. (2011). Phosphorylation of caspase-7 by p21-activated protein kinase (PAK) 2 inhibits chemotherapeutic drug-induced apoptosis of breast cancer cell lines. *Journal of Biological Chemistry*, 286(25), 22291–22299.
- Lim, S., a Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development (Cambridge, England)*, 140(15), 3079–93.
- Liu, P., Cheng, H., Roberts, T. M., a Zhao, J. J. (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nature reviews. Drug discovery*, 8(8), 627–44.
- MacCallum, D. E., Melville, J., Frame, S., Watt, K., Anderson, S., Gianella-Borradori, A., Green, S. R. (2005). Seliciclib (CYC202, R-Roscovotine) 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.
- Malinge, S., Bliss-Moreau, M., Kirsammer, G., Diebold, L., Chlon, T., Gurbuxani, S., a Crispino, J. D. (2012). Increased dosage of the chromosome 21 ortholog Dyrk1a promotes megakaryoblastic leukemia in a murine model of Down syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(3), 948–962.

- Malumbres, M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology*, 15(6), 122.
- Mandal, P. K., Ren, Z., Chen, X., Kaluarachchi, K., Liao, W. S.-L., a McMurray, J. S. (2013). Structure-Activity Studies of Phosphopeptidomimetic Prodrugs Targeting the Src Homology 2 (SH2) Domain of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (Stat3). *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 19(1), 3–12.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., a Sudarsanam, S. (2002). The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science*, 298(5600), 1912–1934.
- Maroto, B., Ye, M. B., von Lohneysen, K., Schnelzer, a, a Knaus, U. G. (2008). P21-activated kinase is required for mitotic progression and regulates Plk1. *Oncogene*, 27(36), 4900–4908.
- Mohamed, A. J., Yu, L., Backesjo, C.-M., Vargas, L., Faryal, R., Aints, A., Smith, C. I. E. (2009). Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. *Immunological Reviews*, 228(1), 58–73.
- Murray, J. M., Sweeney, Z. K., Chan, B. K., Balazs, M., Bradley, E., Castanedo, G., Sutherlin, D. P. (2012). Potent and highly selective benzimidazole inhibitors of PI3-kinase delta. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(17), 7686–7695.
- Nekrasova, T., a Minden, A. (2011). PAK4 is required for regulation of the cell-cycle regulatory protein p21, and for control of cell-cycle progression. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(7), 1795–1806.
- O'Brien, C., Wallin, J. J., Sampath, D., GuhaThakurta, D., Savage, H., Punnoose, E. a, Lackner, M. R. (2010). Predictive biomarkers of sensitivity to the phosphatidylinositol 3' kinase inhibitor GDC-0941 in breast cancer preclinical models. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 16(14), 3670–83.
- Oh, C. H., Kim, H. K., Lee, S. C., Oh, C., Yang, B. S., Rhee, H. J., a Cho, J. H. (2001). Synthesis and biological properties of C-2, C-8, N-9 substituted 6-(3-chloroanilino)purine derivatives as cyclin-dependent kinase inhibitors. Part II. *Archiv Der Pharmazie*, 334(11), 345–350.
- Oumata, N., Bettayeb, K., Ferandin, Y., Demange, L., Lopez-Giral, A., Goddard, M. L., Galons, H. (2008). Roscovitine-derived, dual-specificity inhibitors of cyclin-dependent kinases and casein kinases 1. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(17), 5229–5242.
- Prickett, T. D., Agrawal, N. S., Wei, X., Yates, K. E., Lin, J. C., Wunderlich, J. R., Samuels, Y. (2009). Analysis of the tyrosine kinome in melanoma reveals recurrent mutations in ERBB4. *Nature genetics*, 41(10), 1127–1132.
- Radu, M., Semenova, G., Kosoff, R., a Chernoff, J. (2014). PAK signalling during the development and progression of cancer. *Nature reviews. Cancer*, 14(1), 13–25.
- Rider, L., Oladimeji, P., a Diakonova, M. (2013). PAK1 regulates breast cancer cell invasion through secretion of matrix metalloproteinases in response to prolactin

and three-dimensional collagen IV. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 27(7), 1048–64.

- Rodriguez, N., Yang, J., Hasselblatt, K., Liu, S., Zhou, Y., Rauh-Hain, J. A., Ng, S.-W. (2012). Casein kinase I epsilon interacts with mitochondrial proteins for the growth and survival of human ovarian cancer cells. *EMBO Molecular Medicine*, 4(9), 952–963.
- Roskoski, R. J. (2004). The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319(1), 1–11.
- Rucci, N., Susa, M., a Teti, A. (2008). Inhibition of protein kinase c-Src as a therapeutic approach for cancer and bone metastases. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 8(3), 342–9.
- Rudolph, J., Crawford, J. J., Hoefflich, K. P., a Wang, W. (2015). Inhibitors of p21-activated kinases (PAKs). *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(1), 111–129.
- Rusnak, D. W., Affleck, K., Cockerill, S. G., Stubberfield, C., Harris, R., Page, M., Lackey, K. (2001). The characterization of novel, dual ErbB-2/EGFR, tyrosine kinase inhibitors: potential therapy for cancer. *Cancer Research*, 61(19), 7196–7203.
- Safina, B. S., Sweeney, Z. K., Li, J., Chan, B. K., Bisconte, A., Carrera, D., Sutherland, D. P. (2013). Identification of GNE-293, a potent and selective PI3K inhibitor: Navigating in vitro genotoxicity while improving potency and selectivity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23(17), 4953–4959.
- Scaltriti, M., Rojo, F., Ocana, A., Anido, J., Guzman, M., Cortes, J., Baselga, J. (2007). Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(8), 628–638.
- Shahani, V. M., Yue, P., Haftchenary, S., Zhao, W., Lukkarila, J. L., Zhang, X., Turkson, J. (2011). Identification of Purine-Scaffold Small-Molecule Inhibitors of Stat3 Activation by QSAR Studies. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2(1), 79–84.
- Shahani, V. M., Ball, D. P., Ramos, A. V., Li, Z., Spagnuolo, P. A., Haftchenary, S., Gunning, P. T. (2013). A 2,6,9-hetero-trisubstituted purine inhibitor exhibits potent biological effects against multiple myeloma cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21(17), 5618–5628.
- Sharma, S., Singh, J., Ojha, R., Singh, H., Kaur, M., Bedi, P. M. S., a Nepali, K. (2016). Design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for purines as kinase inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 112, 298–346.
- Shi, Q., Tebben, A., Dyckman, A. J., Li, H., Liu, C., Lin, J., De Lucca, G. V. (2014). Purine derivatives as potent Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitors for autoimmune diseases. *Bioorganic a medicinal chemistry letters*, 24(9), 2206–11.
- Shum, P. W., Peet, N. P., Weintraub, P. M., Le, T. B., Zhao, Z., Barbone, F., Borcharding, D. R. (2001). The design and synthesis of purine inhibitors of

CDK2. III. *Nucleosides, Nucleotides a Nucleic Acids*, 20(4-7), 1067–1078.

- Schaffer, B. E., Park, K. S., Yiu, G., Conklin, J. F., Lin, C., Burkhart, D. L., Sage, J. (2010). Loss of p130 accelerates tumor development in a mouse model for human small-cell lung carcinoma. *Cancer Research*, 70(10), 3877–3883.
- Smith, J. (2005). Erlotinib: small-molecule targeted therapy in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Clinical Therapeutics*, 27(10), 1513–1534.
- Soldani, C., a Scovassi, A. I. (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 7(4), 321–328.
- Spector, N. L., Xia, W., Burris, H. 3rd, Hurwitz, H., Dees, E. C., Dowlati, A., Bacus, S. (2005). Study of the biologic effects of lapatinib, a reversible inhibitor of ErbB1 and ErbB2 tyrosine kinases, on tumor growth and survival pathways in patients with advanced malignancies. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(11), 2502–2512.
- Srinivasan, R., Zabuawala, T., Huang, H., Zhang, J., Gulati, P., Fernandez, S., Ostrowski, M. C. (2009). Erk1 and erk2 regulate endothelial cell proliferation and migration during mouse embryonic angiogenesis. *PLoS ONE*, 4(12).
- Summy, J. M., Trevino, J. G., Lesslie, D. P., Baker, C. H., Shakespeare, W. C., Wang, Y., Gallick, G. E. (2005). AP23846, a novel and highly potent Src family kinase inhibitor, reduces vascular endothelial growth factor and interleukin-8 expression in human solid tumor cell lines and abrogates downstream angiogenic processes. *Molecular cancer therapeutics*, 4(12), 1900–11.
- Tebbutt, N., Pedersen, M. W., a Johns, T. G. (2013). Targeting the ERBB family in cancer: couples therapy. *Nature Reviews Cancer*, 13(9), 663–673.
- Trova, M. P., Barnes, K. D., Alicea, L., Benanti, T., Bielaska, M., Bilotta, J., Friedrich, T. D. (2009). Heterobiaryl purine derivatives as potent antiproliferative agents: Inhibitors of cyclin dependent kinases. Part II. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19(23), 6613–6617.
- Trova, M. P., Barnes, K. D., Barford, C., Benanti, T., Bielaska, M., Burry, L., Friedrich, T. D. (2009). Biaryl purine derivatives as potent antiproliferative agents: inhibitors of cyclin dependent kinases. Part I. *Bioorganic a Medicinal Chemistry Letters*, 19(23), 6608–6612.
- Veselý, J., Havlicek, L., Strnad, M., Blow, J. J., Donella-Deana, a, Pinna, L., Leclerc, S. (1994). Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *European journal of biochemistry / FEBS*, 224, 771–786.
- Wang, Y., Shakespeare, W. C., Huang, W. S., Sundaramoorthi, R., Lentini, S., Das, S., Sawyer, T. K. (2008). Novel N9-arenethenyl purines as potent dual Src/Abl tyrosine kinase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18(17), 4907–4912.
- Wang, Z., Fu, M., Wang, L., Liu, J., Li, Y., Brakebusch, C., a Mei, Q. (2013). P21-activated kinase 1 (PAK1) can promote ERK activation in a kinase-independent manner. *Journal of Biological Chemistry*, 288(27), 20093–20099.

- Yang, J., Wang, L.-J., Liu, J.-J., Zhong, L., Zheng, R.-L., Xu, Y., Yang, S.-Y. (2012). Structural optimization and structure-activity relationships of N2-(4-(4-Methylpiperazin-1-yl)phenyl)-N8-phenyl-9H-purine-2,8-diamine derivatives, a new class of reversible kinase inhibitors targeting both EGFR-activating and resistance mutations. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(23), 10685–10699.
- Yap, T. A., Garrett, M. D., Walton, M. I., Raynaud, F., de Bono, J. S., a Workman, P. (2008). Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. *Current Opinion in Pharmacology*.
- Yarden, Y., a Pines, G. (2012). The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nature Reviews Cancer*, 12(8), 553–563.
- Ying, H., Zheng, H., Scott, K., Wiedemeyer, R., Yan, H., Lim, C., DePinho, R. a. (2010). Mig-6 controls EGFR trafficking and suppresses gliomagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(15), 6912–6917.
- Zatloukal, M., Jorda, R., Gucký, T., Řezníčková, E., Voller, J., Pospíšil, T., Strnad, M. (2013). Synthesis and in vitro biological evaluation of 2,6,9-trisubstituted purines targeting multiple cyclin-dependent kinases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 61, 61–72.
- Zhang, Q., Park, E., Kani, K., a Landgraf, R. (2012). Functional isolation of activated and unilaterally phosphorylated heterodimers of ERBB2 and ERBB3 as scaffolds in ligand-dependent signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(33), 13237–13242.
- Zhou, M., Rebholz, H., Brocia, C., Warner-Schmidt, J. L., Fienberg, A. A., Nairn, A. C., Flajolet, M. (2010). Forebrain overexpression of CK1delta leads to down-regulation of dopamine receptors and altered locomotor activity reminiscent of ADHD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(9), 4401–4406.

#### **Internetové zdroje:**

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

## 9. Seznam použitých zkratek a symbolů

AAK1	AP2 associated kinase 1
Abl	Abl tyrosine kinase
ABL1	ABL proto-oncogene 1
Akt (PKB)	Proteinkinase B
APP	Amyloid beta precursor protein
AR	Amfiregulin
ATM	ATM serine/threonine kinase
ATP	Adenosine triphosphate
ATR	Ataxia-Telanglectasia and Rad3-related
BAD	Bcl-2-associated agonist of cell death
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
BSA	Bovine serum albumin
BTC	$\beta$ -cellulin
BTK	Bruton tyrosine kinase
CBL	Cbl proto-oncogene
CDK	Cyclin-dependent kinase
Cip/Kip	CDK interacting protein/ kinase inhibitory protein
CK1	Casein kinase 1
DEGs	Delayed early genes
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
DTT	Dithiothreitol
E2F	E2F transcription factor
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor



EGTA	Ethylenglycoltetraacetic acid
EPGN	Epigen
EPR	Epiregulin
ERBB	Epidermal growth factor receptor
Erk	Extracellular-signal-regulated kinase
ERRFI1	ERBB receptor feedback inhibitor 1
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GBM	Glioblastoma
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
HBEGF	Heparin binding EGF
IC <sub>50</sub>	50% inhibitory concentration
ID-miRs	Immediately downregulated microRNAs
JAK	Janus kinase
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDM2	Murine double minute-2
miRNA	Micro RNA
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NRG	Neuregulin
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer
p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
PAK	p21-activated kinase
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PDB	Protein Data Bank
PI3K	Phosphatidylinositide 3-kinase
PIP-2	Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate

PIP-3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
Ras	Rat sarcoma
Rb	Retinoblastoma protein
RIPA	Radioimmunoprecipitation buffer
RNA	Ribonucleic acid
RNAPII	RNA polymerase II
SDS	Sodium dodecyl sulphate
Src	SRC proto-oncogene
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGF $\alpha$	Transforming growth factor alpha
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane