



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

Protinádorový účinek kombinace inhibitorů cyklin-dependentních kinas a BH3-mimetik

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Kristýna Jedličková
Studijní program:	B1501 Biologie
Studijní obor:	1501T019 Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
Školitel:	Eva Řezníčková, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2017

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora	Bc. Kristýna Jedličková
Název práce	Protinádorový účinek kombinace inhibitorů cyklin-dependentních kinas a BH3-mimetik
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2017
Jazyk	Český
Klíčová slova	Inhibitor CDK, BH3-mimetika, maligní lymfom, synergismus, venetoclax, BP-14
Počet stran	61
Počet příloh	1 (CD ROM)

ABSTRAKT

Maligní lymfomy jsou heterogenní skupina nádorových onemocnění postihujících lymfatické tkáně. Současná léčba zahrnuje zejména nescifickou chemoterapii, chirurgickou intervenci a radioterapii. Pro zvýšení účinnosti léčby jsou vyhledávány nové postupy a často jsou studovány také kombinace různých postupů a léčiv. Jedním z vysoce účinných nových protinádorových chemoterapeutik je venetoclax (ABT-199), který blokuje protein-proteinové interakce mezi některými proteiny rodiny BCL-2, čímž narušuje integritu mitochondrií a aktivuje apoptosu. Nedávné studie naznačily možnost synergického účinku s některými inhibitory proteinkinas včetně dinaciclibu. Cílem této práce bylo zjistit, zda také nově připravený inhibitor cyklin-dependentních kinas BP-14 zvyšuje protinádorovou účinnost venetoclaxu v buněčných liniích non-Hodgkinových lymfomů *in vitro*. Sledováním cytotoxicity pomocí MTT testu, biochemickým měřením aktivity caspas-3/7 a analýzou vybraných proteinů souvisejících s apoptosou bylo zjištěno, že kombinované působení venetoclaxu a BP-14 má v některých studovaných liniích synergický charakter. Výsledky tak potvrzují publikované informace o možném využití kombinace BH3-mimetik s CDK-inhibitory v klinické praxi.

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname	Kristýna Jedličková
Title of thesis	Anticancer activity of a combination of cyclin-dependent kinase inhibitors and BH3-mimetics
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
The year of presentation	2017
Language	Czech
Keywords	CDK inhibitor, BH3-mimetic, lymphoma, synergy, venetoclax, BP-14
Number of pages	61
Number of appendices	1 (CD ROM)

ABSTRACT

Malignant lymphomas are a heterogeneous group of tumor diseases affecting the lymphatic tissues. The current, methods of cancer treatment include especially non-specific chemotherapy, surgical intervention and radiotherapy. In order to improve the efficiency of the treatment, new approaches and their various combinations are continually developed together with new drugs. One of the highly effective new antitumour chemotherapeutics is venetoclax (ABT-199), which blocks protein-protein interactions between some BCL-2 family proteins. Subsequently it compromises the mitochondrial integrity and activates apoptosis. Recent studies have shown the potential synergistic effect with some protein kinase inhibitors including dinaciclib, a cyclin-dependent kinase inhibitor. The main objective of this work was to investigate whether the newly prepared cyclin-dependent kinase inhibitor BP-14 increases anticancer activity of venetoclax in non-Hodgkin's lymphoma cell lines *in vitro*. The monitoring of cytotoxicity by MTT assay, biochemical measurement of caspase-3/7 activity and analysis of selected proteins associated with apoptosis revealed that the combined effect of venetoclax and BP-14 in some studied lines was synergistic. The results thus confirm the published information of the possible application of a combination of BH3-mimetics and CDK inhibitors in clinical practice.

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením Doc. RNDr. Vladimíra Kryštofa, Ph.D. za použití citované literatury.

V Olomouci, dne

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych chtěla poděkovat především svému vedoucímu Doc. RNDr. Vladimíru Kryštofovi, Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady, věcné připomínky a trpělivost. Ráda bych také poděkovala Evě Řezníčkové, Ph.D. za její skvělý přístup, za ochotu a čas, který mi věnovala při řešení experimentální části. Ostatním zaměstnancům Laboratoře růstových regulátorů děkuji za vytvoření příjemného pracovního prostředí. A v neposlední řadě bych poděkovala mé rodině a svým blízkým za nesmírnou podporu během celého studia.

OBSAH

1	Úvod a cíle práce	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Maligní lymfomy	9
2.1.1	Příznaky onemocnění	9
2.1.2	Diagnostika maligních lymfomů.....	9
2.1.3	Historie a klasifikace lymfomů	10
2.2	Nespecifická (cytotoxická) léčba lymfomů.....	13
2.2.1	Protinádorová chemoterapie.....	13
2.2.2	Radioterapie	14
2.2.3	Vysokodávková chemoterapie a transplantace krvetvorných buněk.....	14
2.3	Cílená (specifická) léčba lymfomů	14
2.3.1	Imunoterapie	15
2.3.2	Cytokiny	17
2.3.3	Inhibice BTK.....	18
2.3.4	Inhibitory NOTCH.....	19
2.3.5	Cyklin-dependentní kinasy a jejich inhibitory	20
2.3.6	Proteinová rodina BCL-2 a vybraná léčiva	24
3	Experimentální část	29
3.1	Materiál	29
3.1.1	Přístrojové vybavení.....	29
3.1.2	Chemikálie	29
3.1.3	Roztoky	30
3.1.4	Protilátky.....	31
3.1.5	Použité buněčné linie	31
3.1.6	Testované látky	31
3.2	Metodika	33
3.2.1	Rozmrazování, pasážování a počítání buněk	33
3.2.2	MTT test a hodnocení cytotoxicity	33
3.2.3	Nasazení a sklizení buněk	34

3.2.4	Lyzování buněk a stanovení obsahu proteinů - Bradfordova metoda	35
3.2.5	SDS-PAGE elektroforéza a western blotting	35
3.2.6	Imunodetekce proteinů na membráně	36
3.2.7	Detekce aktivity caspas-3/7.....	36
4	Výsledky.....	38
4.1	Cytotoxicita testovaných látek	38
4.2	Cytotoxicita kombinace testovaných látek.....	39
4.3	Proteinové změny v buňkách ovlivněných testovanými látkami a jejich kombinací.....	42
4.4	Aktivace caspas v buňkách ovlivněných testovanými látkami a jejich kombinací.....	44
5	Diskuze.....	45
6	Závěr.....	48
7	Seznam použitých zkratk.....	49
8	Seznam použité literatury	51

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Maligní lymfomy jsou heterogenní skupina malignit, u nichž se odhaduje, že představují přibližně 3-6% onemocnění na celém světě. Současná léčba zahrnuje zejména nespecifickou léčbu, jako je chemoterapie, chirurgie a radioterapie. Takováto léčba však postihuje nejenom neoplastické buňky, ale i zdravé tkáně. Pozornost vědců je proto zaměřena v posledních letech na cílenou terapii, která by zlikvidovala specificky pouze transformované buňky. V současné době jsou léčebné postupy vylepšovány, nicméně léčba lymfomů je nedostatečná. Řada moderních postupů využívá kombinací dvou a více léčiv, působících často odlišnými mechanismy. Četné studie prokázaly, že kombinace dvou látek může mít větší účinek, než jaký by odpovídal účinku součtu samotných složek, a zároveň se tím mohou omezovat negativní vedlejší účinky léčby. Jedním z nových vysoce účinných protinádorových chemoterapeutik je venetoclax (ABT-199), který blokuje protein-proteinové interakce mezi doménami BH3 některých proteinů rodiny BCL-2, čímž narušuje integritu mitochondrií a aktivuje apoptosu. Nedávné studie naznačily možnost synergického účinku s řadou klasických i moderních protinádorových cytostatik. Velmi zajímavé jsou výsledky experimentů kombinující venetoclax s inhibitory cyklin-dependentních proteinkinás, které regulují buněčný cyklus a transkripci mRNA. Vývojem a charakterizací inhibitorů těchto kinás se dlouhodobě zabývá také Laboratoř růstových regulátorů. Nedávno připravený purinový inhibitor BP-14 má velmi silné protinádorové účinky v různých modelech *in vitro* i *in vivo*, kombinace s jinými léčivy zatím studovány nebyly. Cílem této práce proto bylo ověřit kombinovaného působení dinaciclibu s venetoclaxem v buněčných liniích non-Hodgkinových lymfomů *in vitro*, popsané nedávno v literatuře, dále pak zejména zjistit, zda i BP-14 zvyšuje protinádorovou účinnost venetoclaxu a případně popsat mechanismus buněčného působení.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Maligní lymfomy

Lymfom je obecný název pro celou řadu nádorů, které vznikají v lymfatickém systému. Vyznačují se abnormální reprodukcí buněk v lymfatickém systému (lymfatické uzliny, slezina, kostní dřeň), v důsledku toho není schopen organismus účinně bojovat s infekcí. Mohou se také vyskytovat extranodálně, nejčastěji ve štítné žláze, gastrointestinálním traktu jako je žaludek, střevo, slinné žlázy a v dýchacím traktu.

Odhaduje se, že přibližně 3-6% onkologických onemocnění jsou právě zhoubné novotvary lymfatických tkání. Skupinu lymfomů tvoří přibližně z 90% non-Hodgkinovy (NHL) lymfomy a z 10% Hodgkinovy lymfomy (HL) (Ferlay J *et al.* 2010). Mnoho hematopoetických malignit úzce souvisí s genetickými změnami a mají vliv na patogenezi onemocnění a jejich klinické chování.

2.1.1 Příznaky onemocnění

Nejčastějším prvním příznakem je nebolestivé zvětšení lymfatické uzliny na krku, v podpaží či tříse. Uzliny mohou růst i na jiných místech např. uvnitř hrudníku, v břiše, v pánvi nebo mohou lymfomy postihovat vnitřní orgány a tkáně. Konkrétní příznaky závisí na místě postižení a velikosti nádoru. Často bývá rozpoznání nemoci obtížné a nemocný přichází obvykle k lékaři až v pokročilejším stádiu choroby nebo jsou-li přítomny další projevy jako jsou například horečka nad 38 °C, noční pocení, větší úbytek hmotnosti, kašel či dušnost, svědění kůže, otoky a bolest různých částí těla.

2.1.2 Diagnostika maligních lymfomů

Lymfomy jsou diagnostikovány pomocí biopsie lymfatických uzlin. Vyšetření odhalí histopatologické rysy lymfomu. Následují specifické charakterizace imunofenotypizací a fluorescenční *in situ* hybridizací. Jestliže se skutečně jedná o lymfom, jsou nutná další vyšetření, pomocí kterých se zjistí rozsah onemocnění, tzv. staging. Stádia maligních lymfomů rozlišujeme dle různých klasifikací, jako je například Ann-Arbor klasifikace nebo revidovaná Blackledge klasifikace (Belada *et al.* 2009). Klinické stadium onemocnění určíme na základě vyšetření pomocí CT a PET/CT (Kořen J *et* Trněný M 2015).

2.1.3 Historie a klasifikace lymfomů

Nádory lymfatické tkáně jsou rozsáhlá a různorodá skupina. Jednotlivé podskupiny se mezi sebou velmi liší a to jak klinickými projevy, tak i léčbou a prognózou.

První zmínka o lymfomech se datuje k roku 1832. Thomas Hodgkin popsal lymfomy ve svém článku, který bohužel vyšel bez povšimnutí (Hodgkin T 1832). Na Hodgkinův objev o 30 let později navázal Sir Samuel Wilks a na jeho počest pojmenoval tento patologický materiál jeho jménem. Jako první tuto skupinu onemocnění nazval maligním lymfomem německý chirurg T. Billroth roku 1871.

První jednoduché pokusy o klasifikaci lymfomů byly realizovány zejména na základě buněčné a tkáňové morfologie (Papajík T *et al.* 2005, Lu P 2005). Postupem času se zavedením různých sofistikovanějších metod a technik bylo členění lymfomů složitější. Roku 1948 americký profesor R. A. Willis napsal ve své knize Tumours of lymphoid tissue „Nikde v patologii není takový chaos v názvech, jako je tomu v případě lymfoidních nádorů“ (Willis RA 1948). Tato skutečnost činila značné problémy nejen patologům, ale i lékařům nukleární medicíny, klinickým lékařům a radiologům, protože bylo obtížné srovnávat a chápat publikované údaje o výzkumu. Až roku 1991 založilo 19 patologů skupinu „International lymphoma study group“ (ILSG), která měla za úkol zkonstruovat jednotnou nomenklaturu lymfomů a položila tak základ WHO klasifikace. Ta je dnes přijímána jako celosvětový standard. Základní historie a chronologický vývoj v klasifikaci lymfomů jsou uvedeny v **tabulce 1**.

WHO klasifikace je založená na základech Revidované evropsko-americké klasifikace lymfomů (REAL, Revised European-American Lymphoma) a na základních principech Kielské klasifikace. Dělí malignity podle původu na B-buněčné neoplazie a neoplazie T a NK-buněk, dále dle zralosti na prekurzorové a lymfomy zralých buněk (**Tabulka 2**) (Földi M *et al.* 2010).

Tabulka 1: Chronologický vývoj v klasifikaci lymfomů. Převzato a upraveno z Aisenberg AC 2000.

Rok	Jméno	Historický vývoj
1832	Hodgkin T	První popis lymfomu
1845	Virchow R Bennet JH	Popis případu leukemie
1865	Wilks S	Skupina lymfomů pojmenována na počest jejich objevitele, tj. Hodgkinovy choroby
1864	Virchow R	Lymfomy definované jako aleukemické leukemie
1865	Cohnheim J	Zavedení pojmu pseudoleukemie namísto aleukemie
1892	Dreschfeld J	Lymfosarkom oddělen od skupiny pseudoleukemie a
1893	Kundrat H	Hodgkinovy choroby
1898	Sternberg C	Histologický popis Hodgkinova lymfomu
1902	Reed DM	
1925	Brill NF <i>et al.</i>	Popsán folikulární (nodulární) lymfom
1927	Symmers D	
1930	Roulet F	Retikulární sarkom oddělen od skupiny lymfosarkomů
1947	Jackson <i>et Parker</i> HJ	Subklasifikace Hodgkinových lymfomů: paraganulom, granulom a sarkom
1956	Rappaport H <i>et al.</i>	První moderní klasifikace non-Hodgkinových lymfomů na základě cytologie a infiltrace lymfomů do tkání
1958	Burkitt DP	Popsán Burkittův lymfom
1966	Lukes RJ <i>et Butler</i> JJ	Popsána nodulární skleróza (Hodgkinův lymfom)
1966	Lukes RJ <i>et al.</i>	Moderní čtyřdílná klasifikace Hodgkinových lymfomů
1972	Aisenberg AC <i>et Bloch</i> KJ	Objevení povrchových markerů – rozlišení B a T-lymfocytů
1973	Barcos MP <i>et Lukes</i> RJ	Definován lymfoblastický lymfom
1974	Lukes RJ <i>et Collins</i> RD	NHL klasifikace založená na rozlišení B a T-buněk, převážně používaná v USA
1974	Lennert K <i>et al.</i>	Kielská klasifikace – založená na rozlišení B a T-buněk, převážně používaná v Evropě
1981	Korsmeyer SJ <i>et al.</i>	Klonarita B-lymfomů definována jako přeskupení genů imunoglobulinů
1982	Taub R <i>et al.</i> Dalla-Favera R <i>et al.</i>	Klonování C-myc onkogenu z t (8; 14) Burkittova lymfomu
1984	Tsujimoto Y <i>et al.</i>	Klonování BCL-2 onkogenu z t (14; 18) folikulárního lymfomu
1985	Aisenberg AC <i>et al.</i> Minder MD <i>et al.</i> Waldman TA <i>et al.</i>	Klonarita T-buněčných lymfomů definována jako přeskupení genů kódující receptory
1991	Rosenberg CL <i>et al.</i>	Klonování BCL-1 onkogenu z t (11; 14) lymfomu pláštěvých buněk
1993	Ye BH <i>et al.</i>	Klonování BCL-6 onkogenu z difuzního velkobuněčného lymfomu
1994	Harris NL <i>et al.</i>	REAL klasifikace
2008	Jaffe ES <i>et al.</i>	WHO klasifikace

Tabulka 2: Lymfatické neoplazie dle klasifikace WHO 2008, 4. edice (Földi M *et al.* 2010).

Non-Hodgkinovy lymfomy	
Neoplazie B-buněk	Neoplazie T-buněk
<p>I. Neoplazie prekurzoru B-buněk - prekurzor B-lymfoblastické leukemie/lymfomy (celkem s 9 rozdílnými entitami)</p> <p>II. Neoplazie ze zralých B-buněk - chronická lymfatická leukemie/malobuněčný B-lymfocytární lymfom - B prolymfocytární leukemie - splenický lymfom z pláštěvých buněk</p> <p>- vlasatobuněčná leukemie - lymfoplazmocytyární lymfom</p> <p>- Waldenstörmová makroglobulinemie - heavy chain disease (onemocnění těžkých řetězců) se třemi různými entitami - myelom z plazmatických buněk - solitární plazmocytom kosti - extraoseální plazmocytom - extranodální lymfom z pláštěvých buněk (MALT-lymfom) - nodální lymfom z pláštěvých buněk - folikulární lymfom - velkobuněčný B-buněčný lymfom u multicentrického morbus Castlemanasociovaného s HHV8 - lymfom z pláštěvých buněk</p> <p>- difúzní velkobuněčný B-lymfom NOS stejně jako 4 podtypy - difúzní velkobuněčný B-lymfom asociovaný s chronickým zánětem - lymfomatoidní granulomatóza - primární mediastinální (thymický) velkobuněčný lymfom z B-buněk - intravaskulární velkobuněčný lymfom z B-buněk - ALK-pozitivní difúzní velkobuněčný B-lymfom - plazmoblastický lymfom - primární kutánní lymfom ze zárodečných center - primárně efuzní lymfom - Burkittův lymfom - B-buněčné lymfomy, neklasifikovatelné (s dvěma podtypy)</p>	<p>I. Neoplazie prekurzoru T-buněk - T-lymfoblastické leukemie</p> <p>II. Neoplazie ze zralých T-buněk - T-prolymfocytární leukemie</p> <p>- lymfocytární leukemie o velkých granulích - chronické lymfoproliferační onemocnění NK-buněk - agresivní leukemie NK-buněk - systémové EBV-pozitivní T-lymfoproliferativní onemocnění dětského věku - lymfom podobný hydroma vacciniiforme - extranodální NK/T-buněčný lymfom, nazální typ - T-buněčná leukemie/lymfom dospělého věku - s enteropatií asociovaný T-buněčný lymfom - hepatosplenický T-buněčný lymfom - subkutánní pannikulitida podobný T-buněčný lymfom - mycosis fungoides - Sézaryho syndrom - primární kutánní CD30-pozitivní lymfoproliferativní onemocnění (T) – dva podtypy - primární kutánní gama-delta-T-buněčný lymfom - primární kutánní CD8 a CD4-pozitivní lymfomy - periferní T-buněčný lymfom</p> <p>- angioimunoblastický T-buněčný lymfom - aplastický velkobuněčný ALK-pozitivní a ALK-negativní lymfomy</p>
Hodgkinovy lymfomy	
<p>I. Nodulární lymfocentrický Hodgkinův lymfom (paragranulom)</p> <p>II. Klasické Hodgkinovy lymfomy - nodulární skleróza - smíšený typ - na lymfocyty bohatý Hodgkinův lymfom - typ chudý na lymfocyty</p>	
Lymfoproliferační posttransplantační onemocnění (PTLD)	
<p>- časté změny (plazmocytární hyperplazie a mononukleóze podobné obrazy) - polymorfní PTLD - monomorfní PTLD (B a T/NK-buněčné typy) - PTLD typu klasického Hodgkinova lymfomu</p>	

2.2 Nеспецифická (cytotoxická) léčba lymfomů

V současné době je léčba maligních lymfomů založena na kombinaci cytotoxických chemoterapeutických látek, chirurgii a radioterapii. Všechny tyto metody jsou nespecifické a postihují nejen nádorové buňky, ale i buňky zdravých tkání organismu, s čímž souvisí četné nežádoucí účinky.

2.2.1 Protinádorová chemoterapie

Chemoterapie je založena na použití látek zastavujících růst buněk neboli cytostatik. V léčbě lymfomů se podávají téměř vždy v kombinaci, čímž dochází k násobení účinku léčby. Velmi zřídka je zvolena monoterapie, například při léčbě některých indolentních NHL. Podání závisí na zvoleném cytostatiku, nejčastěji však intravenózně. Doba působení léčiva v těle se pohybuje od několika hodin až po několik dnů.

Cytostatika jsou zaměřená na rychle množící buňky v těle, zejména na nádory, ale také působí nepříznivě i na krvinky v kostní dřeni, buňky vlasových kořínků, sliznice zažívacího traktu a pohlavní buňky. Z tohoto důvodu dochází k četným nežádoucím účinkům, jako je snížení krvetvorby, zejména bílých krvinek (náchylnost k infekcím), vypadávání vlasů a ochlupení, dále poškození sliznic, nevolnost, zvracení, ovlivnění plodnosti u obou pohlaví a u žen dočasná ztráta menstruace. Reakce na chemoterapii je individuální.

Volba léčebných schémat záleží na typu lymfomu, jeho stádiu, stupni poškození, věku a stavu pacienta, popř. reakci na předchozí léčbu (Kořen J *et* Trněný M 2015, Belada *et al.* 2009). Pokud se jedná o CD20-pozitivní pacienty, volí se chemoterapie v kombinaci s rituximabem. Mezi standardní chemoterapie patří COP (cyklofosfamid, vinkristin, prednison), COPP (cyklofosfamid, vinkristin, prokarbazin, prednison), CHOP (cyklofosfamid, doxorubicin, vinkristin, prednison), CHOEP (CHOP + etoposid), FCR *i. v.* nebo *p. o.* (fludarabin, cyklofosfamid, rituximab), FCM (fludarabin, cyklofosfamid, mitoxantron), FND (fludarabin, mitoxantron, dexamethason), ABVD (adriamycin, bleomycin, vinblastin, dakarbazin), BEACOPP (bleomycin, etoposid, adriamycin, cyklofosfamid, vinkristin, prokarbazin, prednison).

2.2.2 Radioterapie

Principem radioterapie je použití vysokoenergetického ionizujícího záření (převážně svazek elektronů, fotonů a hadronů). Dochází k přenosu energie ionizující částice na atomy a molekuly prostředí, které mohou způsobit excitaci atomů a vnitromolekulární přenos energie. Vzniklé volné radikály způsobují intenzivní oxidativní poškození DNA, což dále vede k zastavení růstu, až k indukci buněčné smrti. Cílem je zničit neoplastické buňky při co nejmenším zasažení okolní tkáně.

Nejčastějším vedlejším projevem radioterapie je únava, dále ztráta chuti k jídlu, nevolnost, poradiační ožehnutí kůže, podráždění sliznic dutiny ústní a jícnu (obtíže při polykání). Ztráta vlasů a ochlupení může být při použití vysokých dávek záření trvalá.

2.2.3 Vysokodávková chemoterapie a transplantace krvetvorných buněk

Transplantace kmenových buněk periferní krve nebo kostní dřeně bývá prováděna v případě léčby vysokodávkovou chemoterapií. Vyšší dávky chemoterapie mají obvykle vyšší protinádorový účinek, ale také závažnější nežádoucí účinky zejména na krvetvorbu. Tento léčebný postup se provádí v případě, že se jedná o relaps, popř. když nemoc dostatečně neodpovídá na léčebné postupy a v případě velmi agresivních lymfomů.

2.3 Cílená (specifická) léčba lymfomů

Omezená účinnost používaných léčebných postupů stimuluje vývoj nových terapeutik. Velmi pokrokovou léčebnou metodou je cílená terapie, jejíž podstatou je zasažení pouze transformovaných buněk s minimálním dopadem na normální buňky. Tato terapie je založená na modulaci unikátních molekul a signálních drah typických pro nádorové buňky. Cílená terapie může být založena na biologických molekulách nebo systémech, jako jsou např. protilátky (imunoterapie), cytokiny, interleukiny či viry, nebo se k cílené terapii využívají nízkomolekulární látky, jako jsou inhibitory kinas (např. BTK, ALK, CDK), BCL-2 antagonisté, modulátory NOTCH signalizace, proteasomu a další.

Nádorové buňky disponují celou řadou mechanismů, kterými jsou schopné unikat imunitnímu systému. Jedná se především o níže uvedené alterace (Igney FH *et* Kramer PH 2002):

1. snížená exprese nádorového antigenu, popřípadě jeho mutace či úplná ztráta
2. snížená exprese HLA (human leukocyte antigen) I. třídy

3. produkce cytokinů potlačující protinádorovou imunitní reakci jako jsou TGF- β (transforming growth factor beta) a IL-10 (interleukine-10)
4. exprese apoptotického receptoru Fas na povrchu neoplastických buněk
5. zvýšená exprese inhibičních molekul CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4) nebo PD-1 (programmed cell death-1), čímž nádorové buňky zabraňují cytotoxickému poškození zprostředkované T-lymfocyty

2.3.1 Imunoterapie

Imunoterapie využívá protilátky namířené přímo proti nádorovým lymfomovým buňkám. Po vazbě protilátek na povrch neoplastických buněk jsou tyto buňky zničeny v součinnosti s imunitním systémem pacienta. Úspěch a specifita imunoterapie je zcela závislá na volbě cílového antigenu. Účelem je zvolit antigen, který bude unikátní pro nádorové buňky, čímž se sníží pravděpodobnost rozvoje autoimunitní reakce (Igney FH *et al.* Kramer PH 2002).

Ipilimumab je plně humanizovaná monoklonální IgG1 protilátka cílená proti CTLA-4. CTLA-4 je exprimován na povrchu regulačních T-lymfocytů, které za fyziologických podmínek brání v autoimunitních reakcích. V mikroprostředí nádorů se regulační T-lymfocyty shlukují a brání tak cytotoxickým T-lymfocytům v likvidaci neoplastických buněk. Blokace CTLA-4 monoklonálními protilátkami ipilimumabu navrácí zpět správnou funkci cytotoxickým T-lymfocytům (O'Day SJ *et al.* 2007). Ipilimumab je považován v současné době za standardní imunoterapii melanomu (Attia P *et al.* 2005, Lipson EJ *et al.* 2011). V klinických studiích je aplikován při léčbě hematologických malignit. U této léčby sice byly prokázány imunitní nežádoucí účinky, ale byly snadno zvládnutelné (Davids MS *et al.* 2014). Léčebný protokol byl rovněž rozšířen o kombinaci ipilimumabu s protilátkou namířenou proti PD-1. Výsledky studií prokázaly lepší odpověď pacientů na léčbu v porovnání se samotným ipilimumabem. V kombinaci dokonce nedocházelo k eskalaci toxických účinků (Wolchok JD *et al.* 2013).

Nivolumab je plně humanizovaná IgG4 protilátka namířená proti PD-1 receptoru aktivních T-lymfocytů. Blokuje tak vazbu s ligandy PD-L1 a PD-L2 exprimovanými na povrchu nádorových buněk, a tak odhaluje nádorové buňky imunitnímu systému (Brahmer JR *et al.* 2010). Léčba touto protilátkou je zatížena výskytem častých imunologických nežádoucích účinků 3 a 4. stupně. Nicméně studie prokázala významné přežití pacientů ve II. fázi klinického testování (Fulchiero E *et al.* Jimeno A 2014).

Pembrolizumab (dříve MK-3475 či lambrolizumab) je humanizovaná IgG4 protilátka proti PD-1. Stejně jako nivolumab blokuje vazbu PD-1 s PD-L1 a PD-L2 (Scapin

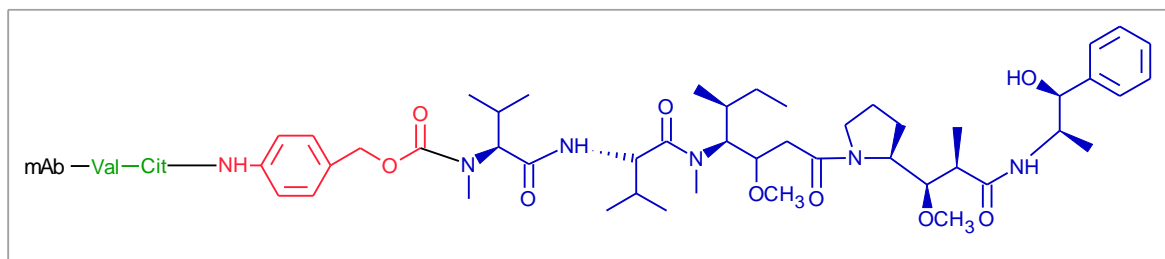
G *et al.* 2015). Často se uplatňuje v léčbě HL ale i jiných lymfomů. Ve srovnání s nivolumabem vykazuje vyšší afinitu k PD-1, zda se tato skutečnost promítá do lepší odpovědi na léčbu, je nutné ještě ověřit (Hamid O *et al.* 2013, Mahoney KM *et al.* 2015, Maly J *et al.* Alinari L 2016). Terapie pembrolizumabem je dobře tolerována a ve všech případech podání docházelo ke snížení celkového objemu nádoru (Moskowitz CH *et al.* 2014).

Rituximab (obchodní název Rituxan, Mabthera) byla první monoklonální protilátka cílená proti antigenu CD20, který je prezentován na membránách většiny B-buněčných lymfomů. Molekula CD20 je ideálním cílem pro terapii protilátkami, protože je exprimována pouze na membránách zralých B-lymfocytech, nikoliv na B-buněčných prekurzorech v kostní dřeni a plazmatických buňkách. Po vazbě na buňky B-lymfomu je aktivován komplement, což vede ke smrti B-lymfocytů a od nich odvozených lymfomových buněk. Rituximab vyčerpává všechny cirkulující CD20 pozitivní buňky během 48 hodin (Bonavida B 2006, Kobos R *et al.* Terry W 2015). Od roku 1998 je schválen FDA (the Food and Drug Administration) pro léčbu DLBCL (Diffuse large B-cell lymphoma). Velká evropská studie testovala použití rituximabu u 400 pacientů s DLBCL. Míra odpovědi na léčbu byla významně vyšší ve skupině, která užívala CHOP v kombinaci s rituximabem, než ve skupině pacientů, které byl podán pouze CHOP (Coiffier B *et al.* 2002). Dodnes je rituximab hojně užíván v terapii lymfomů u CD20-pozitivních pacientů. Volba léčebných schémat záleží na typu lymfomu, jeho stádiu, věku pacienta popř. reakci na předešlou léčbu. Léčbu lékař volí buď v monoterapii, často ale v kombinaci s chemoterapií, jako je například CHOP, COP, COPP, FCR, FCM, FND a další (Belada D *et al.* 2009).

Jedna z možností jak zvýšit účinnost monoklonálních protilátek je vazba radionuklidu k protilátce. Jedno z těchto léčiv je právě ibritumomab tiuxetan (obchodní název Zevalin), což je myší IgG1 monoklonální protilátka (anti-CD20), která je konjugována s radioaktivním ⁹⁰Y (yttrium). Využívá se pro léčbu pacientů s B-buněčným NHL, kteří nereagují na léčbu rituximabem (Marcus R 2005).

Studie ukázaly, že na některých lymfomech jsou produkovány ve velké míře receptory CD30, což je atraktivní cíl především pro imunoterapii. Byly vytvořeny monoklonální protilátky anti CD30 (brentuximab), které vykazovaly dobrou toleranci, ale disponovaly pouze 17% odezvou u pacientů s relapsem (Forero-Torres A *et al.* 2009). Proto byl brentuximab modifikován do podoby chimérické protilátky brentuximab vedotin (BV, obchodní název Adcetris). Obsahuje brentuximab a 3-5 jednotek mikrotubulárního toxinu monometyl auristatinu E, který je připojen přes linker (**Obrázek 1**) (Senter PD

et Sievers EL 2012). V roce 2011 byl BV schválen FDA pro léčbu ALCL (Anaplastic large-cell lymphoma) a DLBCL (de Claro RA *et al.* 2012). I když je BV celkově dobře snášen, mnozí pacienti pociťují sekundární neuropatii. Navíc byla potvrzena mezilékková interakce v současném užívání BV a bleomycinu, která vede až k pátému stupni plicní toxicity (Younes A *et al.* 2013).



Obrázek 1: Struktura systému brentuximab vedotin. Modře: MMAE (monometyl aurystatin E), červeně: linker pro štěpení proteasou PABC (p-aminobenzyloxy-carbonyl), Val: valin, Cit: citrulin, mAb: monoklonální protilátka (brentuximab). Převzato z Francisco JA *et al.* 2003.

2.3.2 Cytokiny

Cytokiny jsou jedinečnou třídou mezibuněčných regulačních proteinů produkovaných buňkami vrozené a adaptivní imunity. Jsou vylučovány do mezibuněčného prostoru nebo jsou vázány na membrány, kde působí jako mediátory intercelulární signalizace pro regulaci homeostázy imunitního systému a zánětlivých procesů (Cutler A *et* Brombacher F 2005, Lee S *et* Margolin K 2011).

Měření cytokinových profilů u pacientů poskytuje podstatnou informaci o stavu onemocnění. Díky svým modulačním schopnostem je terapeutické podávání cytokinů výhodné pro genovou terapii, léčbu infekčních a autoimunitních chorob a pro léčbu neoplastických onemocnění. Cytokiny přímo stimulují imunitní efektorové buňky a stromální buňky v místě nádoru a zlepšují tak rozpoznávání nádorových buněk pomocí cytotoxických efektorových buněk (Cutler A *et* Brombacher F 2005, Lee S *et* Margolin K 2011).

Cytokiny se vyznačují významným stupněm pleiotropismu, tzn. jeden určitý cytokin má schopnost působit na mnoho různých typů buněk a zprostředkovat různorodé až někdy protichůdné účinky, což je hlavním omezením terapie nádorů. Další důležitá schopnost cytokinové signalizace je stupeň redundance, v níž dochází k tomu, že cytokiny mají stejné funkční účinky, tzn. cytokin, který bude poměrně náročně modifikován, může být nahrazen jinými cytokiny (Lee S *et* Margolin K 2011).

K léčbě pacientů s rakovinou se využívají interferony (INF) a interleukiny (IL). Ke zmírnění vedlejších účinků chemoterapie jsou aplikovány cytokiny, které řadíme mezi hematopoetické růstové faktory.

Společným znakem interferonů jsou především antivirové, imunomodulační a antiproliferační účinky. V klinické praxi jsou aplikovány zejména INF- α a INF- β , stimulující aktivitu JAK1 (Janus kinase 1) a TYK2 (Tyrosine kinase 2) proteinů, což vede k fosforylaci tyrosinů STAT1 (Signal transducers and activators of transcription 1) a STAT2. V konečném důsledku je sekretován IL-4, který následně aktivuje B-lymfocyty (Dunn GP *et al.* 2005a, Dunn GP *et al.* 2005b).

INF- α je schválen pro léčbu některých hematologických maligních onemocnění a často je podáván jako adjuvantní (podpůrná) terapie (Lee S *et Margolin* K 2011). Většinu nežádoucích účinků lze zvládnout bez přerušení léčby. Byly hlášeny ale i závažnější neuropsychiatrické problémy (Jonasch E *et al.* 2000, Jonasch E *et al.* 2001, Greenberg DB *et al.* 2000, Musselman DL *et al.* 2001). INF- α má přímý vliv na apoptosu buněk prostřednictvím caspasového systému a podávání v nízkých dávkách působí jako anti-angiogenní činidlo (Chawla-Sarkar M *et al.* 2003, Kerbel RS *et al.* 2004).

INF- β je terapeuticky významný v potlačení autoimunitních reakcí jako je např. roztroušená skleróza, dále se využívá pro imunostimulaci léčby zhoubného nádoru. Ve srovnávacích analýzách protinádorového účinku INF typu I. je INF- β lepší induktor antiproliferativního účinku než INF- α (Borden EC *et al.* 1982, Chawla-Sarkar M *et al.* 2001, Johns TG *et al.* 1992). Klinické použití INF- β je omezené z důvodu jeho nízké biologické dostupnosti a kvůli trvalým vedlejším účinkům (Lee S *et Margolin* K 2011).

INF- γ se uplatňuje v boji proti virovým a některým bakteriálním infekcím. Podporuje buněčně zprostředkovanou imunitu primárně prostřednictvím svých účinků na populaci monocytů a makrofágů, zvyšuje tak jejich schopnost fagocytovat. Jsou výbornými induktory molekul MHC II (major histocompatibility complex II) a podporují také produkci několika růstových faktorů, zejména TGF, který stimuluje proliferaci fibroblastů a syntézu kolagenu. (Farrar MA *et Schreiber* RD 1993, Schoenborn JR *et Wilson* CB 2007). Jeho účinky jsou významné pro endogenní ochranu organismu před spontánním vznikem nádorů (Dighe AS *et al.* 1994).

2.3.3 Inhibice BTK

BCR (B-cell receptor) je kritický pro normální vývoj B-buněk a slouží jako antigenový receptor regulující několik buněčných procesů, včetně proliferace, diferenciace, apoptosy a migrace buněk (Mohamed AJ *et al.* 2009, Chavez JC *et al.* 2013). BTK (Bruton tyrosine

kinase) je zapotřebí pro aktivaci BCR, což vede ke spouštění kaskády dějů ovlivňujících dráhu nukleárního faktoru NF- κ B (nuclear factor kappa B). Nadměrná exprese BTK je spojována s vývojem některých B-buněčných malignit včetně CLL (chronic lymphocytic leukemia), MCL (mantle cell lymphoma), FL (follicular lymphoma), DLBCL (diffuse large B-cell lymphoma) a ALL (acute lymphoblastic leukemia). Proto jedním z ústředních terapeutických cílů je právě inhibice BTK (Pan Z *et al.* 2007, Young RM *et al.* Staudt LM 2013). Bylo provedeno několik preklinických studií zaměřených na inhibici BTK a jako slibný inhibitor, vyvolávající impozantní odpovědi, byl identifikován ibrutinib.

Ibrutinib (PCI-32765) se kovalentně váže v aktivním místě BTK a inhibuje tak fosforylaci na Tyr²²³ (Novero A *et al.* 2014, Honigberg LA *et al.* 2010). Inhiboval *in vitro* růst buněčných linií DLBCL, které nadměrně exprimují BTK (Davis RE *et al.* 2001), a také byla prokázána jeho aktivita na zvířecích modelech (Honigberg LA *et al.* 2010). V 1. fázi klinického testování byla prokázána úplná nebo téměř úplná obsazenost BTK ibrutinibem s klinicky aktivní dávkou u pacientů s relapsem/refrakterní NHL a CLL (Advani RH *et al.* 2013). Následující klinické studie (fáze 2 a 3) také prokázaly význam ibrutinibu u několika typů malignit B-buněk včetně kombinací s ofatumumabem, bendamustinem, rituximabem, temsirolimusem či RCHOP (Byrd JC *et al.* 2013, Byrd JC *et al.* 2014, Chanan-Khan A *et al.* 2016, Dreyling M *et al.* 2016, Wang ML *et al.* 2013, Wilson WH *et al.* 2015, Younes A *et al.* 2014).

2.3.4 Inhibitory NOTCH

NOTCH je vysoce konzervovaný signalizační systém, který umožňuje interakci mezi sousedními buňkami a jejich komunikaci. Buňky tak kontrolují svou diferenciaci, proliferaci a apoptosu pomocí transmembránových receptorů a ligandů (Morgan TH 1917). NOTCH signalizace hraje důležitou roli v procesu krvetvorby a v angiogenezi a jeho aktivace je vysoce závislá na síle signálu a typu buňky, proto změna ve fyziologické signalizaci může přispívat k rozvoji a růstu rakoviny prostřednictvím různých mechanismů (Gu Y *et al.* 2016). Největší podíl na deregulaci NOTCH signalizace má právě onkogenní mutace receptoru NOTCH1, který reprezentuje přes více než 50% T-buněčných akutních lymfoblastických leukemií (Weng AP *et al.* 2004), nicméně u ostatních akutních leukemií může působit jako nádorový supresor (Lobry C *et al.* 2013, Kannan S *et al.* 2013). Mutace receptoru NOTCH1 představuje nepříznivý prognostický marker u CLL (Willander K *et al.* 2013), ale i konstitutivní aktivace NOTCH2 je z 8% evidována v případech DLBCL (Lee S-

Y *et al.* 2009). V současné době není mnoho inhibitorů NOTCH. V preklinických studiích jsou testovány především inhibitory γ -sekretasy (GSI) (Purow B 2012).

V normálních hematopoetických buňkách je receptor štěpen v místě S2 a S3 metaloproteasou TNF- α konvertasou a komplexem γ -sekretasy, následkem toho se uvolní intracelulární fragment NOTCH1 (ICN). ICN se dále přemístí do jádra, kde je zahájena signální transdukce. Mutace NOTCH1 v buňkách ALL usnadňuje štěpení ICN a prodlužuje se tak poločas rozpadu, což způsobuje abnormální růst buněk leukemie. Inhibitory γ -sekretasy (GSI) zabraňují štěpení v místě S3 a tímto blokují aktivitu NOTCH1. U buněčných linií ALL, AML a B-buněčných lymfomů s mutovaným NOTCH1 bylo prokázáno, že GSI indukují apoptosu (Weng AP *et al.* 2004, Malecki MJ *et al.* 2006, Kogoshi H *et al.* 2007).

Další experimentální léčiva zahrnují inhibitory α -sekretasy, či využívají dalších přístupů, jako jsou protilátky nebo interferující RNA (Purow B 2012).

2.3.5 Cyklin-dependentní kinasy a jejich inhibitory

Aktivita cyklin-dependentních proteinkinás (CDK) je regulována fosforylací (pomocí enzymů proteinkinás) a defosforylací (pomocí enzymů proteinfosfátas). CDK jsou proteinové kinasy serinu/threoninu, jejichž aktivita závisí na vazbě a aktivaci cyklinovými partnery (cykliny). Tyto heterodimerní komplexy mohou fosforylovat různé substráty, které se podílejí na kontrole transkripce a progresu buněčného cyklu (BC) v reakci na různé podněty (Malumbres M *et Barbacid* M 2005). CDK jsou regulovány akumulací a degradací cyklinu. Cykliny samy o sobě nedisponují enzymovou aktivitou, ale jejich navázání na CDK je nezbytné k jejich enzymové aktivaci. Různé komplexy cyklin-CDK spouštějí různé kroky buněčného cyklu (**Tabulka 3**).

Jednotlivé události BC se objevují v přesně daném pořadí, proto musí systém regulace BC ve správném čase aktivovat enzymy a jiné proteiny nezbytné pro provedení každého procesu a po dokončení daného procesu je musí deaktivovat. Musí také zajistit, aby byl každý krok cyklu dokončen dříve, než začne krok následující. Systém musí reagovat na signály z okolních buněk, neboť hraje klíčovou roli v regulaci počtu buněk. Deregulace může totiž podporovat nebo přímo způsobovat vznik rakoviny.

Smyslem regulačního systému je zastavit buněčný cyklus v kontrolních bodech (v G1 a G2 fázi BC). V kontrolních bodech může být systém regulován signály od ostatních buněk, jako jsou růstové faktory a jiné extracelulární molekuly, které mohou buněčné dělení inhibovat nebo naopak podporovat. Specifické CDK-inhibiční molekuly mohou zastavit

BC v kontrolních bodech a to vazbou, která blokuje aktivitu nebo sestavení jednoho nebo více cyklin-CDK komplexů.

Tabulka 3: Funkce vybraných CDK a jejich cyklinových partnerů. Převzato a upraveno z Roskoski R Jr. 2016.

Enzym	Cyklin	Funkce
CDK1	A/B	Spouští přechody S-G2 a G2-M
CDK2	E	Spouští přechod z G1 do S-fáze, indukuje biosyntézu histonu a duplikaci centrozomu
CDK2	A	Reguluje přechod přes S fázi
CDK3	C	Spouští návrat z G0 fáze do G1 fáze fosforylací retinoblastomu; oprava DNA
CDK4/6	D1/2/3	Zprostředkovává fosforylací retinoblastomu v G1-fázi; Stimuluje syntézu cyklinů E; Syntéza cyklinů typu D je řízena extracelulárními mitogeny
CDK5	P35, G	Neuronální funkce; epigenetická regulace; syntéza glykogenu; sekrece inzulinu
CDK7 (CAK)	H	Zprostředkuje aktivaci CDK katalýzou fosforylace zbytku threoninu v T-smyčce nebo aktivačním segmentu; tvoří součást komplexu TFIIH, který je důležitý pro regulaci transkripce RNA polymerasy II a opravy DNA
CDK8	C	Reguluje transkripci řízenou RNA polymerasou II; inhibuje lipogenezi
CDK9	T	Reguluje transkripci řízenou RNA polymerasou II
CDK9	K	Reguluje transkripci řízenou RNA polymerasou II, DNA opravy
CDK10	M	Reguluje přechod z G2 do M-fáze

Aktivita CDK se zvyšuje u proliferativních onemocnění, jako je rakovina, kvůli časté nadměrné expresi pozitivních regulátorů (cyklinů) a časté inaktivaci inhibitorů CDK (Malumbres M *et* Barbacid M 2001). Hledání inhibitorů buněčného cyklu se stalo předmětem intenzivního zájmu, který vedl k identifikaci široké škály sloučenin inhibujících CDK (Grant S *et* Roberts JD 2003). Preklinické studie ukázaly, že inhibitory CDK mají schopnost nejen zablokovat proliferaci neoplastických buněk, ale také indukovat buněčnou smrt různými mechanismy.

První CDK inhibitory byly vyvinuty převážně proti CDK2 a byly relativně neselektivní. Tyto inhibitory zahrnují flavonoidy, puriny, indenopyrazoly, aminopyrimidiny, aminothiazoly, indirubiny, hymenialdisiny a deriváty paullonu (Asghar U *et al.* 2015, Sanchez-Martinez C *et al.* 2015). První generace CDK-inhibitorů zahrnuje i flavopiridol a R-roscovitin. Tyto sloučeniny vykazují malou specificitu vůči jednotlivým CDK a proto jsou běžně označovány jako pan-CDK inhibitory. Obecně platí, že inhibitory první generace trpí nízkým terapeutickým indexem, což vede k toxicitě při koncentracích nezbytných pro účinnou inhibici. Z těchto důvodů byly vyvinuty inhibitory pan-CDK druhé generace jako jsou dinaciclib, AT7519, milciclib (také známý jako PHA-848125AC), TG02, CYC065 a RGB-286638 (Otto T *et* Sicinski P 2017). Chemické struktury dále zmíněných CDK inhibitorů jsou uvedeny na **obrázku 2**.

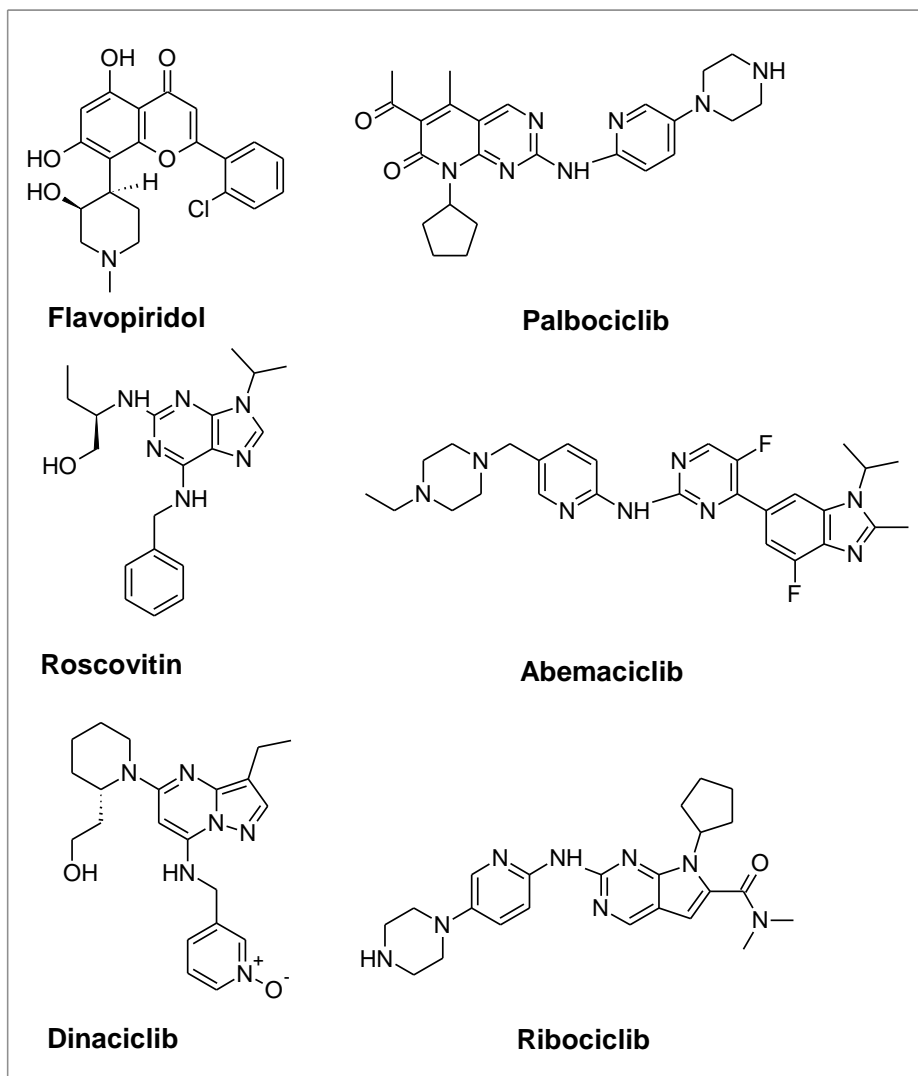
Flavopiridol (alvocidib) je semisyntetický alkaloid rohitukinu a jako naprostá většina ostatních inhibitorů je i tento ATP-kompetitorem. Flavopiridol inhibuje při submikromolárních koncentracích CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, CDK7 a rovněž inhibuje CDK9, který je klíčový pro regulaci transkripce mRNA, podílí se totiž na fosforylaci RNA polymerasy II (Carlson BA *et al.* 1996). Tato sloučenina je schopna zastavit buněčný cyklus ve dvou úrovních: buď během fáze G1 nebo během přechodu mezi fází G2 a M (Kaur G *et al.* 1992). Ačkoliv flavopiridol vykazoval významnou protinádorovou aktivitu v preklinických studiích (Arguello F *et al.* 1998), ve druhé fázi klinického testování vykazoval nedostatečnou účinnost u solidních karcinomů. Naopak významný protinádorový účinek byl pozorován u hematologických malignit, jako je CLL, avšak odpovědi na léčbu byly omezeny toxicitou (Aklilu M *et al.* 2003, Burdette-Radoux S *et al.* 2004, Byrd JC *et al.* 2007 a 2005, Liu G *et al.* 2004, Schwartz GK *et al.* 2001).

R-roscovitin (seliciclib) byl zařazen do klinických studií v roce 2001 firmou Cyclacel Pharmaceuticals, Inc. Tento derivát inhibuje CDK1, CDK2, CDK7 a CDK9, inhibiční aktivita této sloučeniny je slabá vůči CDK4 a CDK6. Roscovitin inhibuje jak fosforylaci proteinu retinoblastomu (Rb), tak i C-terminální domény RNA polymerasy II (Meijer L *et al.* 1997, McClue SJ *et al.* Blake D 2002). Roscovitin byl ověřován ve dvou klinických studiích fáze I (Benson C *et al.* 2007, Le Tourneau C *et al.* 2010).

Pozdější práce však ukázala, že mnoho buněčných aktivit těchto inhibitorů bylo pravděpodobně výsledkem inhibice CDK7 nebo CDK9, včetně transkripční inhibice buněčného cyklu a genů souvisejících s apoptosou (Lam LT *et al.* 2001, MacCallum DE *et al.* 2005, Whittaker SR *et al.* 2007, Whittaker SR *et al.* 2004).

Do druhé generace pan-CDK-inhibitorů patří dinaciclib (MK-7965, SCH 727965), který je zvláště silný inhibitor CDK1, CDK2, CDK5 a CDK9. Vykazuje vysokou antiproliferační aktivitou proti většině rakovinných buněk. V roce 2012 vstoupil do třetí fáze klinického testování (Guha M 2012). Vzhledem k slibným výsledkům u inhibitorů CDK první generace testovaných na pacientech s CLL (Byrd JC *et al.* 2007), byla studována jeho aktivita u pacientů s recidivující či refrakterní CLL (Flynn J *et al.* 2015). Celkově 54% respondentů reagovalo na léčbu, přičemž častým nežádoucím účinkem byla cytopenie a syndrom rozpadu nádoru. Z hlediska hematologických účinků bylo prokázáno, že léčba dinaciclibem reverzibilně snižuje počet neutrofilů a retikulocytů (Parry D *et al.* 2010). Byla hlášena také ortostatická hypotenze a zvýšená hladina kyseliny močové, nicméně celkově byl dinaciclib dobře tolerován (Nemunaitis JJ *et al.* 2013). Další studie zkoumaly účinnost léčby dinaciclibem v kombinaci s imunoterapií (Pembrolizumab) nebo s inhibitory PARP (veliparib) (Hossain DMS *et al.* 2016).

V současné době se obrací vědecký zájem na specifické antagonisty konkrétních CDK. Jedním z příkladů je trojice slibných značně specifických inhibitorů CDK4/6: Palbociclib (PD0332991), Abemaciclib (LY2835219) a Ribociclib (LEE011). Inhibice CDK4/6 vede ke snížení hladin fosforylovaného Rb, podporující tvorbu komplexů Rb-E2F a prevenci aktivity transkripčního faktoru E2F. Na ostatní CDK tyto inhibitory nemají žádný vliv a jejich aktivita je zvláště významná u nádorů, které exprimují protein Rb (Pan Q *et al.* 2016).

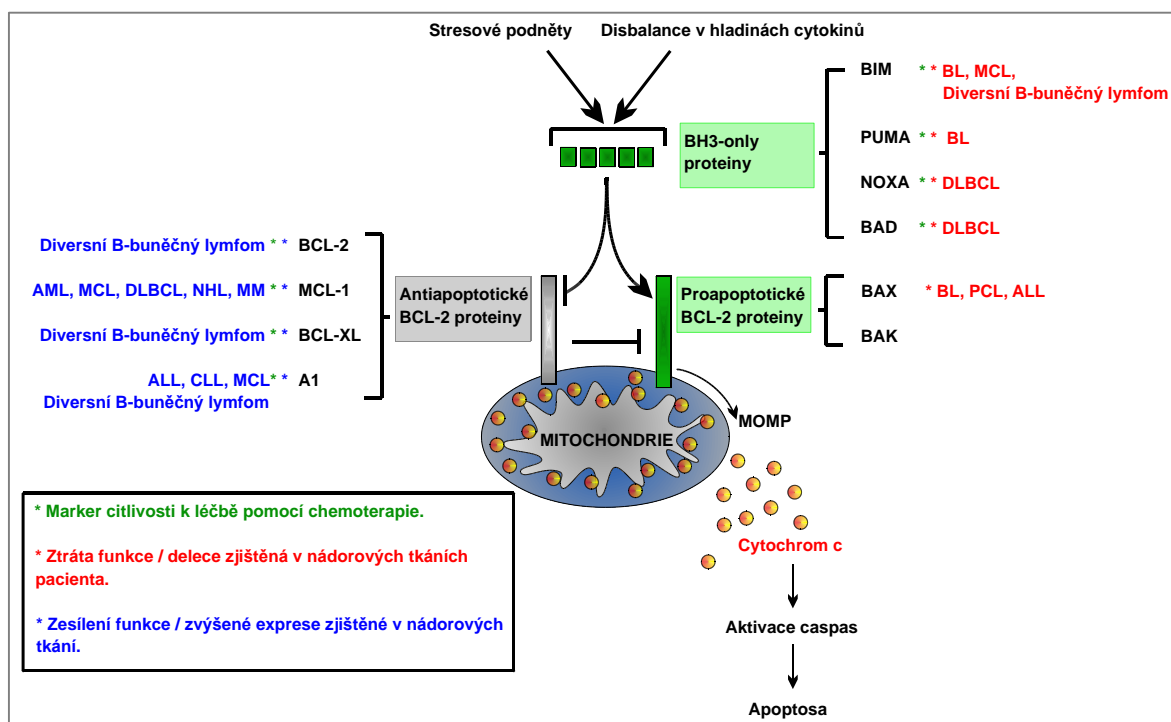


Obrázek 2: Chemické struktury vybraných inhibitorů CDK.

2.3.6 Proteinová rodina BCL-2 a vybraná léčiva

Nepřetržitá programovaná buněčná smrt je nezbytná pro udržení tkáňové homeostázy a tento proces je pozitivně či negativně regulován specifickými geny (Ellis HM *et* Horvitz HR 1986). Deregulace apoptosy může vést k těžkým poruchám tkáně, které mohou nakonec vyústit v rakovinu (Thomas S *et al.* 2013).

Mitochondrie představuje centrální regulační uzel v apoptotickém procesu, jejímž rozhodujícím faktorem je proces mitochondriální permeabilizace (MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization). MOMP je ovlivňována skupinou proteinů rodiny BCL-2 (B-cell lymphoma/leukemia 2). Nevyvážená exprese členů rodiny BCL-2 je spojována s vývojem hematologických malignit (**Obrázek 3**), jako je lymfom, leukemie nebo myelom a úzce souvisí s rezistencí na chemoterapii a radiční léčbu (Adams JM *et* Cory S 2007, Brinkmann K *et* Kashkar H 2014, Thomas S *et al.* 2013).



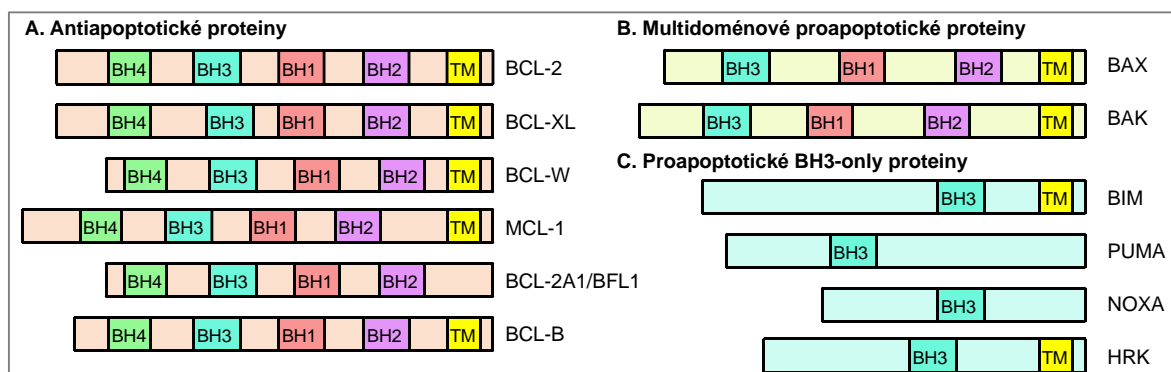
Obrázek 3: Význam proteinové rodiny BCL-2 v apoptose a hematologických malignitách. Vlastní zpracování dle Brinkmann K *et* Kashkar H 2014. Vysvětlivky: AML (acute myeloid leukemia); ALL (acute lymphoblastic leukemia); BL (Burkitt's lymphoma); CLL (chronic lymphocytic leukemia); DLBCL (diffuse large B-cell lymphoma); MCL (mantle cell lymphoma); MM (multiple myeloma); NHL (non-Hodgkin's lymphoma).

BCL-2 proteiny jsou na základě jejich struktury a funkce rozděleny do tří skupin, na antiapoptotické (enablers apoptosy), proapoptotické (aktivátory apoptosy) a BH3-only proteiny (**Obrázek 4**) (Adams JM *et* Cory S 2007).

Skupinu antiapoptotických proteinů zahrnují proteiny BCL-2, BCL-XL (B-cell lymphoma-extra large), MCL-1 (myeloid cell leukemia 1), BCL-W (BCL-2-like protein 2) a A1 (BCL-2 related protein A1). Fyziologickou funkcí je chránit buňku před různými cytotoxickými stimuly vazbou na proapoptotické proteiny.

Aktivátory apoptozy jsou BAK (BCL-2 antagonist killer), BAX (BCL-2 associated x protein) a BOK (BCL-2 related ovarian killer), z nichž první dva převažují a lokalizují se na mitochondriální membráně. Po obdržení signálu smrti dochází k oligomeraci BAK, BAX a BOK, jejímž výsledkem je tvorba mitochondriálních pórů. Následkem toho dochází ke zvýšení permeability mitochondriální membrány a je uvolňován cytochrom c do cytosolu, kde iniciuje proteolytickou aktivaci caspas, kulminující v apoptotické buněčné smrti (Adams JM *et* Cory S 2007, Brinkmann K *et* Kashkar H 2014, Thomas S *et al.* 2013).

Zástupci proteinové rodiny BCL-2 obsahují alespoň jeden konzervovaný sekvenční motiv BCL-2 homologní domény (BH1, BH2, BH3 a BH4), viz **obrázek 4** (Muchmore SW *et al.* 1996). Zvláštní skupinou jsou BH3-only proteiny, které postrádají všechny ostatní BCL-2 homologické domény s výjimkou BH3. Tato skupina obsahuje celkově osm členů, a to BIM (BCL-2-interacting mediator of cell death), BID (BCL-2-interacting domain death antagonist), BIK (BCL-2-interacting killer), BAD (BCL-2 antagonist of cell death), BMF (BCL-2-modifying factor), HRK (Harakiri), PUMA (p-53 upregulated modulator of apoptosis) a NOXA (NADPH oxidase activator).



Obrázek 4: Schematické znázornění vybraných proteinů BCL-2. Členové rodiny sdílejí až čtyři BCL-2 homologické domény (BH1-4), popřípadě transmembránovou doménu (TM). Vlastní zpracování dle Vogler M *et al.* 2017.

Na základě struktury a funkční interakce BCL-2 proteinů byla syntetizována řada nízkomolekulárních látek, které funkčně napodobují proapoptotické BH3-only proteiny. Tato tzv. BH3-mimetika se váží na BH3 vazebné místo BCL-2 antiapoptotických proteinů (BCL-2, BCL-XL, MCL-1 aj.), což způsobí uvolnění efektorových proapoptotických BAK a BAX z vazby na BCL-2 antiapoptotické proteiny. BH3-mimetika dělíme na nespecifická,

u kterých se předpokládá další mechanismus účinků, než jen pouze BH3 mimikry (gossypol, apogossypol a obatoclastax), a specifická BH3-mimetika (ABT-737, oblimersen) (Deng J 2017).

Gossypol je přírodní polyfenolový aldehyd nalezený v extraktu bavlníku (rod *Gossypium*, čeleď *Malvaceae*, slézovité). Původně byl charakterizovaný jako specifický antagonist BCL-XL (Kitada S *et al.* 2003). Následující studie prokázaly, že gossypol působí jako pan-BCL-2 inhibitor, je tedy schopen inhibovat většinu antiapoptotických BCL-2 proteinů (Zhai D *et al.* 2006). V preklinických studiích vykazuje silnou protinádorovou aktivitu na modelech DLBCL (Mohammad RM *et al.* 2005), CML (Meng Y *et al.* 2007), CLL (Balakrishnan K *et al.* 2009) a NHL (Li ZM *et al.* 2008). Vzhledem k toxicitě způsobené pravděpodobně dvěma reaktivními aldehydovými skupinami byly navrženy jiné látky odvozené od gossypolu, jako je například apogossypol. Studie prokázaly, že přípravek apogossypol má vynikající účinnost a je značně snižena toxicita ve srovnání s gossypolem (Shelley MD *et al.* 2000, Kitada S *et al.* 2008).

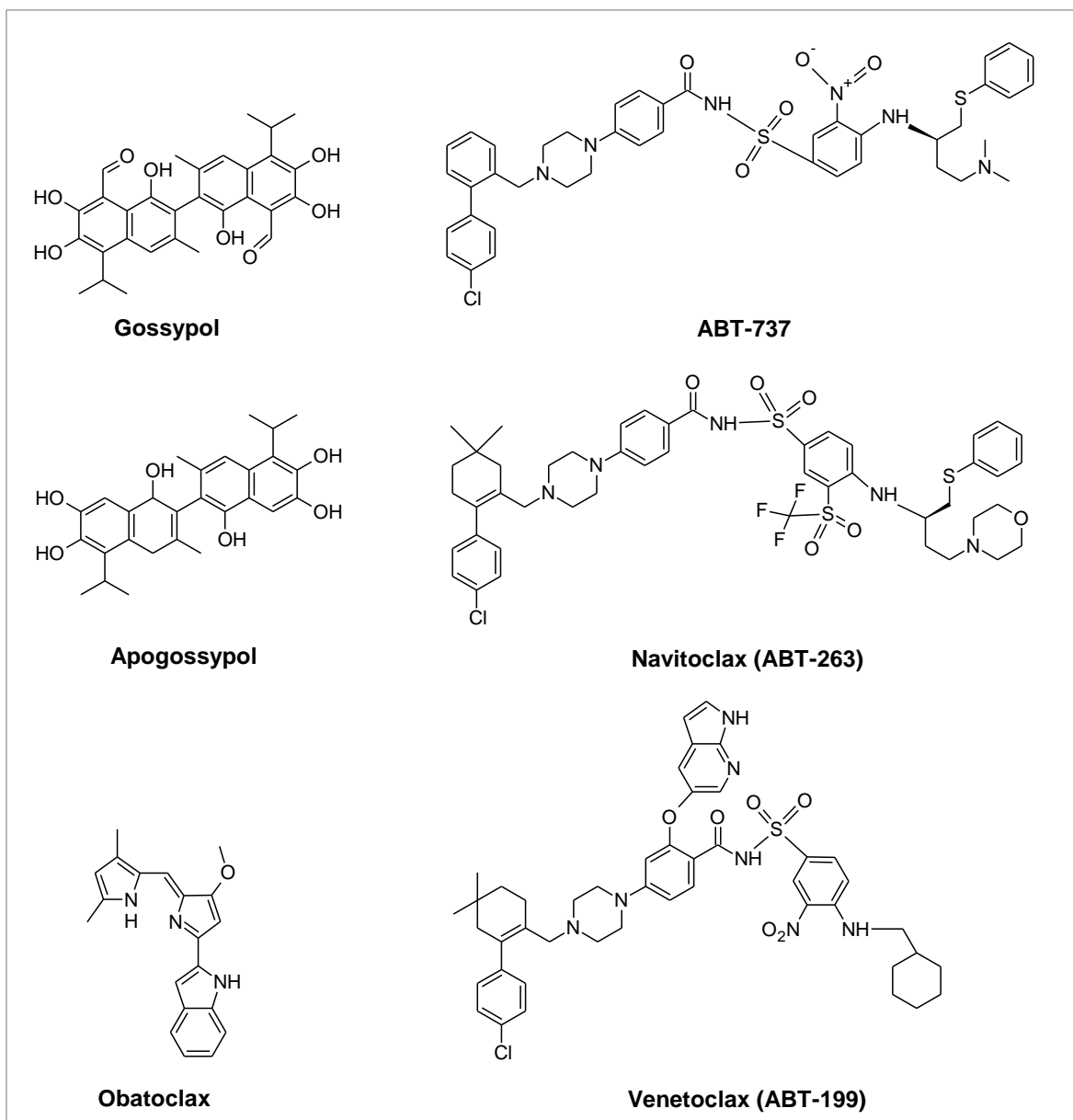
Obatoclastax, také znám jako GX-15-070, řadíme do pan-BCL-2 inhibitorů, jehož interakce indukuje apoptosu převážně nezávisle na BAX/BAK v nádorových buňkách a zabraňuje růstu nádoru. Jedná se o nízkomolekulární látku. Hydrofobní povaha obatoclastaxu je důležitá pro lokalizaci sloučeniny na mitochondriální membránu, což podporuje interakci obatoclastaxu s BCL-2 proteiny, které jsou zde umístěny (Nguyen M *et al.* 2007, Vogler M *et al.* 2009). Obatoclastax vykazuje významnou protinádorovou aktivitu v buněčných liniích odvozených od pacientů trpících různými hematologickými malignitami a pevnými tumory (Vogler M 2014, Goard CA *et al.* Schimmer AD 2013). Obatoclastax byl podáván jak samostatně, tak v kombinaci s chemoterapií a byla dokončena řada klinických studií (fáze I a II), výsledky bohužel nebyly příliš významné. Jako nejčastější vedlejší účinky byly hlášeny ospalost, euforie a zmatenost. Mechanismus, který je základem vývoje neurologických příznaků, je doposud neobjasněn. V současné době neexistují žádné probíhající klinické studie (Opydo-Chanek M *et al.* 2017).

Oblimersen je jednovláknová DNA molekula o velikosti 18-merů (Schlagbauer-Wadl H *et al.* 2000). V buněčných kulturách inhibuje expresi BCL-2 proteinu hybridizací s BCL-2 mRNA (Ramanarayanan J *et al.* 2004). I přes slibné výsledky v první a druhé fázi klinického testování u CLL (O'Brien SM *et al.* 2005), myelomu (Badros AZ *et al.* 2005) a melanomu (Bedikian AY *et al.* 2006), nebyl oblimersen schválen FDA, kvůli neuspokojivým výsledkům ve třetí fázi testování (O'Brien SM *et al.* 2009).

ABT-737 se váže s velmi vysokou afinitou ($K_i < 1$ nM) k BCL-XL, ale díky své podobné struktuře také k BCL-2 a BCL-W. Zejména MCL-1, BCL-B a BCL-2A1 mají

méně homologní strukturu, a proto nejsou inhibovány. Následující studie ukázaly, že je vhodný pro použití u hematologických pacientů, ale byl méně aktivní u solidních nádorů. Pozoruhodnou výjimkou byl SCLC (Small cell lung cancer), kde bylo zjištěno, že některé buněčné linie jsou vysoce citlivé na ABT-737. Další studie zkoumaly účinek ABT-737 v SCLC a identifikovaly základní roli MCL-1 při určování rezistence na ABT-737. Buněčné linie, které mají nízkou expresi MCL-1 jsou citlivější na podání ABT-737, než ty s vysokou expresí MCL-1 (Tahir K *et al.* 2007, Lin X *et al.* 2007, Hann CL *et al.* 2008). Hlavním omezením ABT-737 jako protinádorového léku je to, že není perorálně biologicky dostupný, což může omezit dávkovací režimy zejména při chronické léčbě. Za tímto účelem byla vyvinuta příbuzná sloučenina navitoclax (ABT-263) (Tse C *et al.* 2008). Biologická aktivita ABT-737 a ABT-263 se jeví jako srovnatelná, ačkoli bylo prokázáno, že ABT-263 je rychleji vázán lidským sérovým albuminem než ABT-737 (Vogler M *et al.* 2010).

Navitoclax (ABT-263) je nízkomolekulární látka, která se účinně váže na BCL-2, BCL-XL a BCL-W. V důsledku vazby jsou uvolňovány vázané proapoptotické proteiny, čímž následně dochází k MOMP v rakovinných buňkách závislých na BCL-2 (Tse C *et al.* 2008). V raných klinických studiích navitoclax vykazoval účinnost při léčbě CLL a SCLC (Gandhi L *et al.* 2011, Roberts AW *et al.* 2012). Léčba navitoclaxem však způsobuje trombocytopenii, jelikož trombocyty jsou závislé na antiapoptotické bílkovině BCL-XL. Podávání ABT-263 tedy vyžaduje omezení dávky u mnoha maligních onemocnění, zejména u leukemických pacientů, kteří často již trpí existující trombocytopenií (Schoenwaelder SM *et al.* 2011). Tato skutečnost vedla k vývoji venetoclaxu (ABT-199), modifikovaného BH3-mimetického derivátu ABT-263, který má zachovanou specifitu pro BCL-2, ale postrádá afinitu k BCL-XL (Souers AJ *et al.* 2013). Venetoclax je vysoce selektivní inhibitor BCL-2, který má dobrou biologickou dostupnost po perorálním podání a je velmi účinný při indukci buněčné smrti u malignit BCL-2 pozitivních pacientů. Venetoclax v současné době prochází intenzivním klinickým testováním (Vogler M *et al.* 2017).



Obrázek 5: Chemické struktury některých BH₃-mimetik.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Přístrojové vybavení

V experimentech bylo použito následující přístrojové vybavení: analytická váha 440-33N (KERN), aparatura na elektroforézu Mini Protean Tetra System (BioRad), blokový termostat MBT 250 (Fisher), blotovací aparatura Mini Trans-Blot Cell (BioRad), centrifuga BR4i (Jouan), CO₂ inkubátor (Sanyo), digitální zobrazovací přístroj LAS 4000 (FujiFilm), flowbox s vertikálním prouděním vzduchu TC 48 (Gelaire, Flow Laboratories), horizontální kruhová a vibrační třepačka Reax Top (Heidolph), magnetická míchačka s ohřevem RCT basic safety control (IKA), membránová vývěva (KNF LAB Laboport), inverzní mikroskop TMS (Nikon), odstředivka MPW15 (Formed), třepačka s kývavým pohybem Mini Rocker MR-1 (Biosan), ultrazvukový homogenizátor Sonopuls HD2200 (Bandelin), spektrofotometr UV-1800 (Shimadzu), destičkový spektrofotometr Infinite M200 PRO (Tecan), vodní lázeň GFL 1032, zdroj na western blot E-C Apparatus Corporation EC300P (Thermo Scientific), zdroj napětí na elektroforézu E-C Apparatus Corporation EC105 (Thermo Scientific).

3.1.2 Chemikálie

Při práci byly použity následující chemikálie v čistotě pro molekulární biologii: 2-merkaproethanol (Serva); 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid = MTT (Sigma Aldrich); akrylamid (Sigma Aldrich); aprotinin (Sigma Aldrich); bromfenolová modř (Merck Millipore); Coomassie brilliant blue (Sigma Aldrich); dimethylsulfoxid = DMSO (Sigma Aldrich); dinaciliclib (Selleck Chemicals); dithiothreitol = DTT (Sigma Aldrich); dodecylsírán sodný = SDS (Sigma Aldrich); ethanol (Sigma Aldrich); fenylmethylsulfonylfluorid = PMSF (Sigma Aldrich); fetální sérum = FBS (Invitrogen); fluorid sodný (Sigma Aldrich); glycerol (Sigma Aldrich); hovězí sérový albumin = BSA (Sigma Aldrich); chemiluminescenční substrát SuperSignal West Pico (Thermo Scientific); kultivační médium RPMI 1640 (Sigma Aldrich); kyselina fosforečná (Sigma Aldrich); kyselina octová (Sigma Aldrich); leupeptin (Sigma Aldrich); L-glutamin (Sigma Aldrich); N,N'-metylenbisakrylamid (Sigma Aldrich); n-butanol (Sigma Aldrich); penicilin (Sigma Aldrich); peroxodisírán amonný = APS (Sigma Aldrich); polyoxyethylensorbitanmonolaurát = Tween 20 (Sigma Aldrich); proteinový detekční

marker Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific); sodná sůl 3-hydroxy-4-(2-sulfo-4-[4-sulfofenylazo]fenylazo)-2,7-naftalendisulfonové kyseliny = Ponceau S (Sigma Aldrich); streptomycin (Sigma Aldrich); N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin = TEMED (Sigma Aldrich); tris(hydroxymethyl)aminomethan = TRIS (MP Biomedicals); vanadičnan trisodný (Sigma Aldrich); venetoclax (Shanghai Race Chemicals).

3.1.3 Roztoky

V experimentech byly použity následující roztoky: **blokovací pufr**: 5% BSA, 0,1% Tween 20 v TBS; **blotovací pufr**: 25 mM Tris báze, 192 mM glycin; **Bradfordovo činidlo**: 0,01% Coomassie brilliant blue, 95% ethanol, 85% kyselina fosforečná; **elektroforetický pufr**: 25 mM TRIS, 192 mM glycin, 0,1% SDS; **caspasový reakční pufr**: 25 mM PIPES/KOH (pH = 7,3), 2 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 5 mM DTT; **kultivační médium RPMI 1640**: médium Roswell Park Memorial Institute-1640, doplněném o 10% fetální hovězí sérum, penicilin (100 IU/ml), streptomycin (0,1 mg/ml) a L-glutamin (0,3 mg/ml); **MTT**: 5 mg/ml 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnitrazolium bromid v PBS; **PBS**: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄ (pH = 7,4); **Ponceau S**: 0,1% Ponceau S, 1% kyselina octová; **RIPA pufr**: 20 mM TRIS pH 7,4, 100 mM NaCl, 2 mM EGTA, 5 mM EDTA, 2 mM NaF, 0,2 % Nonidet P-40 (pH = 7,4), před použitím přidán: 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin a 10 µg/ml aprotinin; **TBS**: 137 mM NaCl, 20 mM TRIS (pH = 6,8); **TBS-T**: 137 mM NaCl, 20 mM TRIS (pH = 6,8), 0,1% Tween 20; **vzorkovací pufr (5x koncentrovaný)**: 0,3 M TRIS (pH=6,8), 10% SDS, 50% glycerol, 0,05% bromfenolová modř, 5% 2-merkaptoethanol.

3.1.4 Protilátky

Veškeré použité protilátky byly ředěny do roztoku 5% BSA v TBS s 0,1% Tween 20. V experimentech byly použity primární protilátky uvedené v **tabulce 4**.

Tabulka 4: Primární protilátky použité v experimentech.

Primární protilátka	Typ	Výrobce	Ředění
Anti- β -Actin	Myši	Santa Cruz Biotechnology	5000 \times
Anti-BAK	Králičí	Cell Signaling Technology	250 \times
Anti-BCL-2	Myši	Santa Cruz Biotechnology	250 \times
Anti-BIM	Králičí	Cell Signaling Technology	500 \times
Anti-MCL-1	Králičí	Santa Cruz Biotechnology	500 \times
Anti-PARP	Králičí	Santa Cruz Biotechnology	500 \times
Anti-XIAP	Králičí	Cell Signaling Technology	500 \times

K vizualizaci primárních protilátek byly použity sekundární protilátky (**Tabulka 5**) konjugované s křenuvou peroxidasou.

Tabulka 5: Sekundární protilátky použité v experimentech.

Sekundární protilátka	Typ	Výrobce	Ředění
Anti-rabbit (SWAR/Px)	Prasečí	Cell Signaling Technology	1000 \times
Anti-mouse (RAM/Px)	Králičí	Sigma Aldrich	1000 \times

3.1.5 Použité buněčné linie

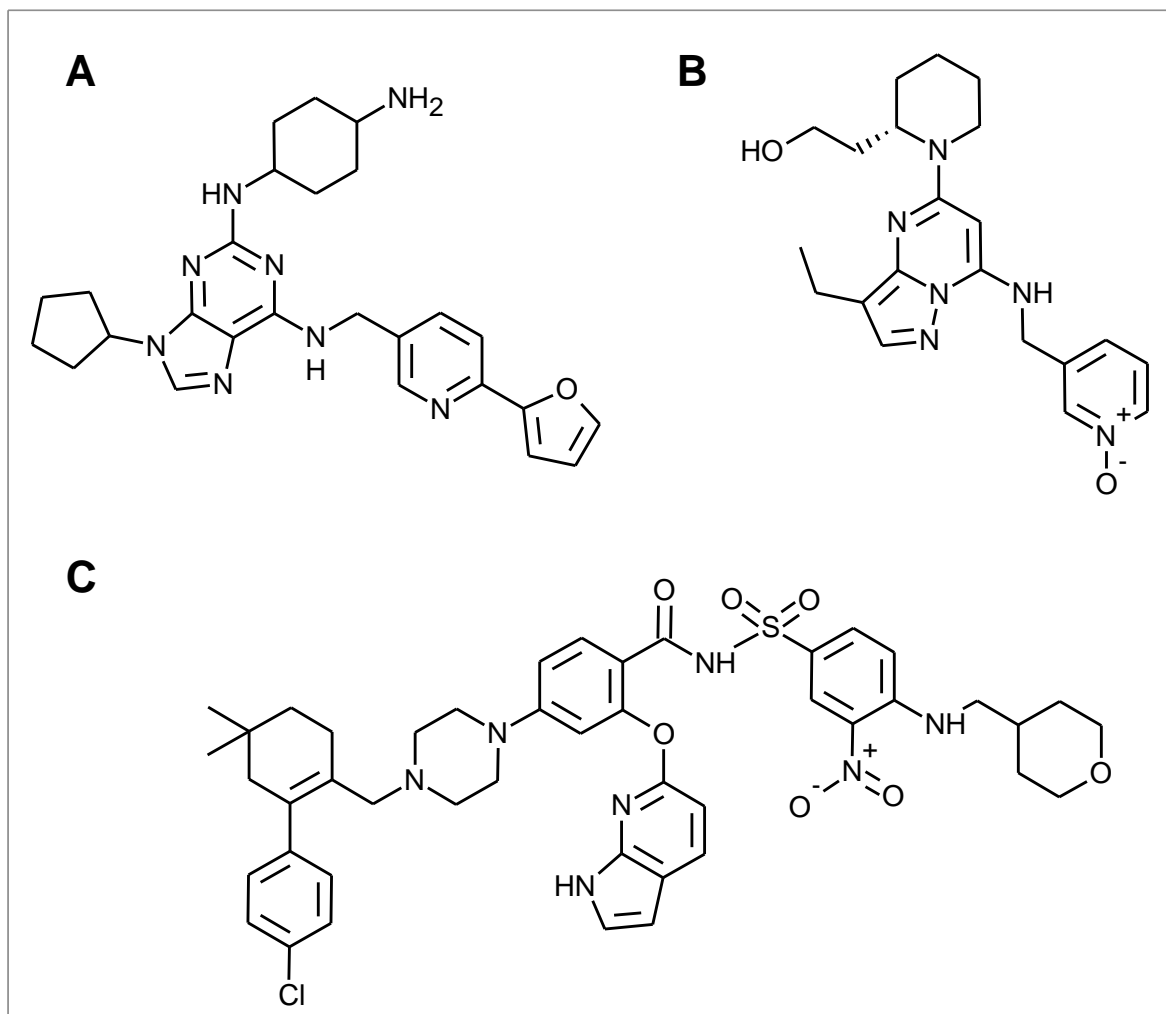
V experimentech byly použity buněčné linie Mino D21, SU DHL-4, HT a OCI-Ly2, odvozené od non-Hodginových lymfomů. Jedná se o suspenzní buněčné kultury, které byly kultivovány v médiu RPMI 1640 s přidavkem 10% FCS (Foetal Calf Serum), streptomycinu (0,1 mg/ml), penicilinu (100 U/ml) a L-glutaminu (2 mM) v CO₂ inkubátoru při teplotě 37 °C a v atmosféře obohacené 5% CO₂. Veškerá práce byla provedena za sterilních podmínek ve flow boxu.

3.1.6 Testované látky

K testování byly použity následující sloučeniny (**Obrázek 6**):

- BP-14: inhibitor CDK vyvinutý v Laboratoři růstových regulátorů (Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci)
- Dinaciclib (DIN): inhibitor CDK vyvíjený pro klinické použití (Merck)
- Venetoclax (ABT-199): BH3-mimetikum

Všechny zmíněné látky byly rozpuštěny ve 100% DMSO na koncentraci 100 mM a dále ředěny dle potřeby sterilní ddH₂O tak, aby koncentrace DMSO v kultivačním médiu nepřesáhla 0,1%.



Obrázek 6: Chemická struktura látek BP-14 (A), dinaciclib (B), venetoclax (C).

3.2 Metodika

3.2.1 Rozmrazování, pasážování a počítání buněk

Kryozkumavka se zamrazenými buňkami byla rychle rozmrazena a obsah resuspendován ve 2 ml média. Po 5 minutách byla zkumavka centrifugována při 1000 g po dobu 5 minut. Supernatant byl odstraněn, buňky resuspendovány v médiu a přeneseny do kultivační nádoby s nadbytkem média. Na základě rychlého růstu byly buněčné linie pasážovány 3× do týdne. Část média s buňkami byla vždy odstraněna a byla nahrazená novým médiem. Množství buněk bylo spočítáno pomocí Bürkerovy komůrky.

3.2.2 MTT test a hodnocení cytotoxicity

K určení cytotoxicity látek byl použit MTT test. Tento kolorimetrický test je založen na redukcí žlutého MTT mitochondriálním systémem na nerozpustný modrý formazán, který je následně rozpuštěn pomocí SDS. Životaschopnost buněk je přímo úměrná zbarvení roztoku. Kvantifikace se provádí měřením absorbance při vlnové délce 570 nm (Mosmann T 1983).

Test byl proveden následovně. Do 96-jamkového panelu byly nasazeny buňky o objemu 80 μ l a hustotě 20 000 buněk na jamku. Následující den byla vytvořena šestibodová koncentrační řada testovaných látek s faktorem ředění 3 s výjimkou buněčné linie OCI-Ly2, kdy faktor ředění byl 5 (**Tabulka 6**). Inkubace buněk s testovanými látkami probíhala 24 hodin, dále bylo přidáno 20 μ l roztoku MTT. Po 60 minutách působení byl vzniklý formazán rozpuštěn roztokem 10% SDS o objemu 100 μ l po dobu 4 hodin a následně byla změřená absorbance spektrofotometrem Infinite M200 PRO (Tecan). Výsledky měření byly vyhodnoceny v programu Origin, a následně byla odečtena hodnota IC₅₀, která představuje koncentraci látky, která usmrtí právě 50% buněk.

Tabulka 6: Koncentrace testovaných látek pro stanovení IC₅₀.

Buněčná linie	Testovaná látka	Koncentrace (nM)					
HT	ABT-199	100000,00	33333,33	11111,1	3703,7	1234,57	411,52
	BP-14	2500,00	833,33	277,78	92,59	30,86	10,29
	DIN	200,00	66,67	22,22	7,41	2,47	0,82
Mino D21	ABT-199	10000,00	3333,33	1111,11	370,37	123,46	41,15
	BP-14	5000,00	1666,67	555,56	185,19	61,73	20,58
	DIN	1000,00	333,33	111,11	37,04	12,35	4,12
SU DHL-4	ABT-199	10000,00	3333,33	1111,11	370,37	123,46	41,15
	BP-14	5000,00	1666,67	555,56	185,19	61,73	20,58
	DIN	1000,00	333,33	111,11	37,04	12,35	4,12
OCI-Ly2	ABT-199	10000,00	2000,00	400,00	80,00	16,00	3,20
	BP-14	10000,00	2000,00	400,00	80,00	16,00	3,20
	DIN	5000,00	1000,00	200,00	40,00	8,00	1,60

Pro testování kombinovaného účinku byl postup analogický. Buněčné linie byly ovlivněny nejprve jednotlivými cytostatiky a následně byla každá testovaná linie ovlivněna kombinací látek BP-14 - ABT-199 a DIN - ABT-199. Byla vytvořena osmibodová koncentrační řada s ředícím faktorem 2 (**Tabulka 7**). Test byl proveden v duplikátech.

Tabulka 7: Koncentrace testovaných látek pro stanovení kombinovaného účinku.

Buněčná linie	Testovaná látka	Koncentrace (nM)							
HT	ABT-199	25000,00	12500,00	6250,00	3125,00	1562,50	781,25	390,63	195,31
	BP-14	1000,00	500,00	250,00	125,00	62,50	31,25	15,63	7,81
	DIN	100,00	50,00	25,00	12,50	6,25	3,13	1,56	0,78
Mino D21	ABT-199	1000,00	500,00	250,00	125,00	62,50	31,25	15,63	7,81
	BP-14	1000,00	500,00	250,00	125,00	62,50	31,25	15,63	7,81
	DIN	200,00	100,00	50,00	25,00	12,50	6,25	3,13	1,56
SU DHL-4	ABT-199	500,00	250,00	125,00	62,50	31,25	15,63	7,81	3,91
	BP-14	5000,00	2500,00	1250,00	625,00	312,50	156,25	78,13	39,06
	DIN	1000,00	500,00	250,00	125,00	62,50	31,25	15,63	7,81
OCI-Ly2	ABT-199	500,00	250,00	125,00	62,50	31,25	15,63	7,81	3,91
	BP-14	5000,00	2500,00	1250,00	625,00	312,50	156,25	78,13	39,06
	DIN	1000,00	500,00	250,00	125,00	62,50	31,25	15,63	7,81

3.2.3 Nasazení a sklizení buněk

Do Petriho misek o průměru 10 cm byly nasazeny buňky o hustotě 500000 buněk/ml v celkovém objemu 8 ml. Následující den byla vytvořena koncentrační řada s ředícím faktorem 2, jak jednotlivých testovaných látek (BP-14, ABT-199), tak jejich kombinace (**Tabulka 8**). Misky, které nebyly ovlivněné, sloužily jako kontrola.

Po 24 hodinové inkubaci s testovanými látkami byly buňky přeneseny do vychlazené zkumavky. Petriho misky byly následně ještě opláchnuty 2 ml PBS a nakonec centrifugovány při 1000 g, 4 °C po dobu 8 minut. Veškerá následující práce byla prováděna na ledové tříšti. Po odsátí supernatantu byly buňky promyty 2 ml PBS a opět byly centrifugovány 1000 g/4 °C po dobu 8 minut. Buňky byly resuspendovány v 1,4 ml PBS a centrifugovány při 1000 g/4 °C po dobu 8 minut. Po odsátí supernatantu byly buňky uskladněny při teplotě -80 °C.

Tabulka 8: Koncentrace cytostatik pro sledování exprese vybraných proteinů.

Testovaná látka	Koncentrace (nM)					
ABT-199	60	30	15	7,5	3,75	
BP-14	600	300	150	75	37,5	

3.2.4 Lyzování buněk a stanovení obsahu proteinů - Bradfordova metoda

Veškerá práce byla provedena na ledě. Pelet buněk byl resuspendován v lyzačním pufru a po dobu 20-25 minut byla promíchávána každá zkumavka 3-4×, následně byly takto připravené lyzáty centrifugovány při 14000 g/4 °C po dobu 25 minut.

Ke stanovení celkových proteinů byla použita Bradford metoda (Bradford MM 1976). K 1 ml Bradfordova činidla bylo pipetováno 1 µl lyzovaného vzorku. Měření bylo provedeno v duplikátech. Absorbance byla měřena při vlnové délce 595 nm. Poté byly lyzáty ředěny lyzačním pufrém, tak aby všechny měly stejnou koncentraci. K danému množství lyzovaného vzorku bylo přidáno 5× SDS denaturačního vzorkovacího pufru. Vzorky byly povařeny po dobu 2 minut a rovnou analyzovány nebo uskladněny při -20 °C.

3.2.5 SDS-PAGE elektroforéza a western blotting

Separace proteinů byla provedena metodou SDS-PAGE v diskontinuálním uspořádání s 5% zaostřovacím a 10% dělicím gelem o tloušťce 1 mm. Na jamku bylo nanášeno 5,5 µg proteinů. Nejprve probíhala separace při 80 V po dobu 20-30 minut, jakmile vzorky pronikly do dělicího gelu, bylo napětí zvýšeno na 120 V. Po dokončení separace byly proteiny přeneseny na nitrocelulosovou membránu o velikosti pórů 0,45 µm (western blotting) za pomoci aparatury Mini Trans-blot Cell (Bio-Rad). Přenos probíhal při konstantním proudu 270 mA a za stálého chlazení po dobu 3 hodin.

3.2.6 Imunodetekce proteinů na membráně

Membrána byla krátce obarvena roztokem Ponceau-S pro zviditelnění proteinových markerů molekulové hmotnosti, opláchnuta v destilované vodě a usušena. Následně byla nastříhaná dle potřeby.

Po odbarvení membrán roztokem TBS, byly membrány po dobu 60 minut blokovány v 5% BSA v TBS-T na třepačce. Před nanášením primárních protilátek byly membrány promyty roztokem TBS a byly osušeny.

Primární protilátky byly ředěny dle návodu v roztoku TBS-T (**Tabulka 4**), nanесeny na příslušné membrány. Inkubace probíhala při 4 °C přes noc. Poté byly membrány promyty roztokem TBS, TBS-T a TBS po 5 minutách a 10 minut v roztoku TBS, osušeny a byly na ně nanесeny sekundární protilátky konjugované s křenuvou peroxidasou, které byly ředěny také v roztoku TBS-T (**Tabulka 5**).

Po inkubaci, která probíhala 60 minut při laboratorní teplotě, byly membrány promyty 10 minut v roztoku TBS, po 5 minutách v TBS-T a TBS, a nakonec 10 minut v TBS. Na osušené membrány byl nanесen detekční roztok pro chemoluminiscenci ECL Assay. Chemiluminiscence byla zaznamenána digitálním kamerovým systémem LAS 4000 (FujiFilm).

3.2.7 Detekce aktivity caspas-3/7

Principem měření je hydrolýza fluorescenčně značeného substrátu Ac-DEVD-AMC (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylkumarin). Substrát při štěpení aktivní caspasou 3 a 7 vytváří vysoce fluorescenční produkt AMC (7-amido-4-methylkumarin).

Do 96-jamkového panelu bylo nasazeno 30 000 buněk na jamku v 80 μ l média. Následující den byly buňky ovlivněny nejprve jednotlivými cytostatiky a následně jejich kombinací. Byla vytvořena osmibodová koncentrační řada s ředícím faktorem 2 (**Tabulka 9**), tak aby výsledný objem v jedné jamce byl 100 μ l. Po 24 hodinách bylo k buňkám přidáno 50 μ l předmíchaného One-step caspase-3/7 buffer (3 \times) obohacený o činidlo DEVD-AMC a DTT, PMFS. Takto připravený panel byl inkubován po dobu 3 hodin v CO₂ inkubátoru. Aktivita caspas 3 a 7 byla detekována pomocí fluorescenčního readeru Fluoroskan Ascent (Labsystems) s excitační vlnovou délkou 360 nm a emisní délkou 460 nm. Množství uvolněného AMC odpovídá aktivitě caspas-3/7.

Tabulka 9: Koncentrace cytostatik pro testování kombinovaného účinku na aktivitu caspas-3/7. Hodnoty jsou uvedeny v nM.

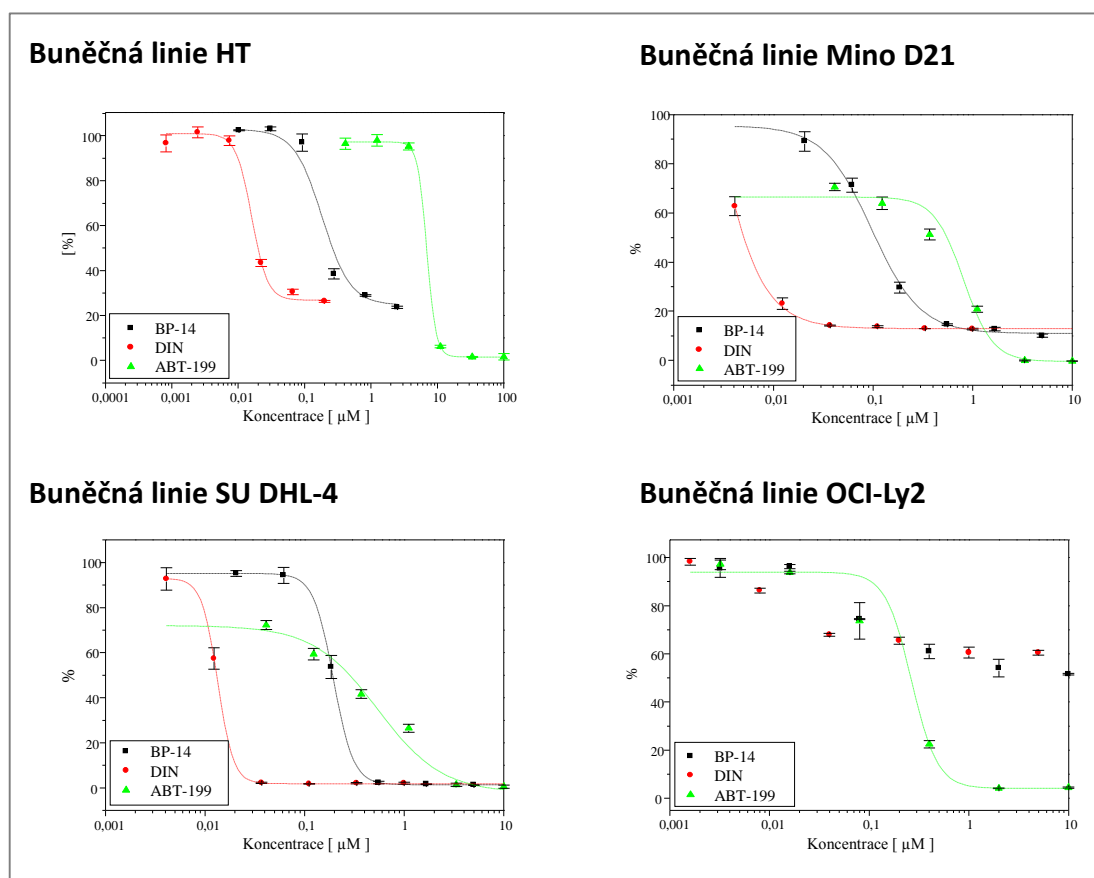
Testovaná látka	Koncentrace (nM)							
BP-14	5000	2500	1250	625	312,5	156,3	78,1	39,1
ABT-199	500	250	125	62,5	31,3	15,6	7,8	3,9
Kombinace	5000/500	2500/250	1250/125	625/62,5	312,5/31,3	156,3/15,6	78,1/7,8	39,1/3,9

4 VÝSLEDKY

4.1 Cytotoxicita testovaných látek

Míra cytotoxicity testovaných látek ABT-199 (venetoclax), BP-14 a dinaciclíb pro 24 hod působení byla stanovena pomocí MTT testu na čtyřech buněčných liniích non-Hodgkinových lymfomů - HT, Mino D21, OCI-Ly2 a SU DHL-4. Jednotlivé látky byly testovány v šestibodové koncentrační řadě v triplicátu s ředícím faktorem 3 (**Tabulka 6**). Měření bylo opakováno minimálně dvakrát. Na základě absorbance formazanu při 570 nm byly vytvořeny grafy závislosti životaschopnosti buněk na koncentraci testovaných látek (**Obrázek 7**), z nichž byly odečteny hodnoty IC_{50} (**Tabulka 10**).

Z testovaných látek byl nejúčinnější dinaciclíb, naopak nejméně účinná látka byla venetoclax. Buněčná linie Mino D21 byla obecně nejvíce citlivá k CDK inhibitorům, naopak nejméně citlivá byla OCI-Ly2. Citlivost k venetoclaxu byla odlišná, nejcitlivější buněčná linie byla OCI-Ly2, nejméně citlivá buněčná linie HT, přičemž rozdíl v citlivosti mezi těmito dvěma liniemi byl více než dvacetinásobný.



Obrázek 7: Grafické znázornění závislosti viability buněčných linií HT, Mino D21, SU DHL-4 a OCI-Ly2 na koncentraci ABT-199, BP-14 a DIN po 24 hod působení.

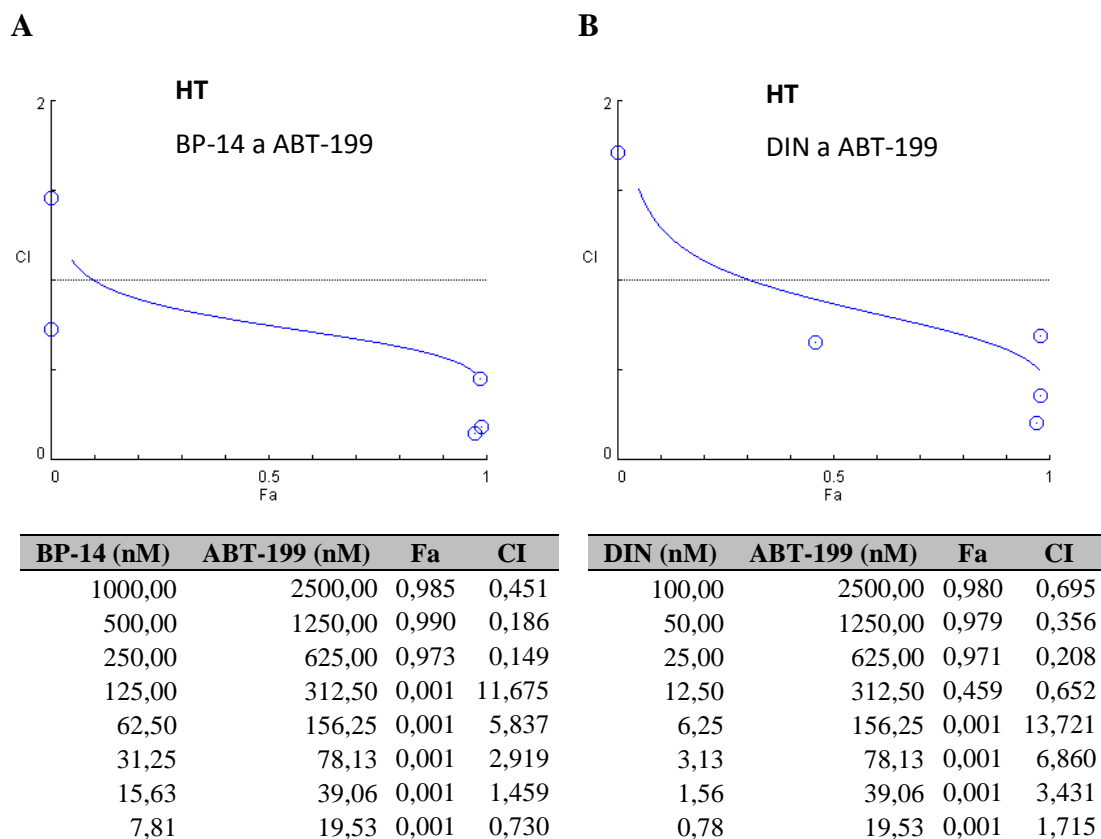
Tabulka 10: Cytotoxicita studovaných látek vyjádřená hodnotami IC₅₀ (μM).

Testovaná látka	IC ₅₀ (μM)			
	HT	Mino D21	SU DHL-4	OCI-Ly2
ABT-199	6,766	0,547	0,286	0,258
BP-14	0,261	0,106	0,191	> 10
DIN	0,020	0,005	0,013	> 5

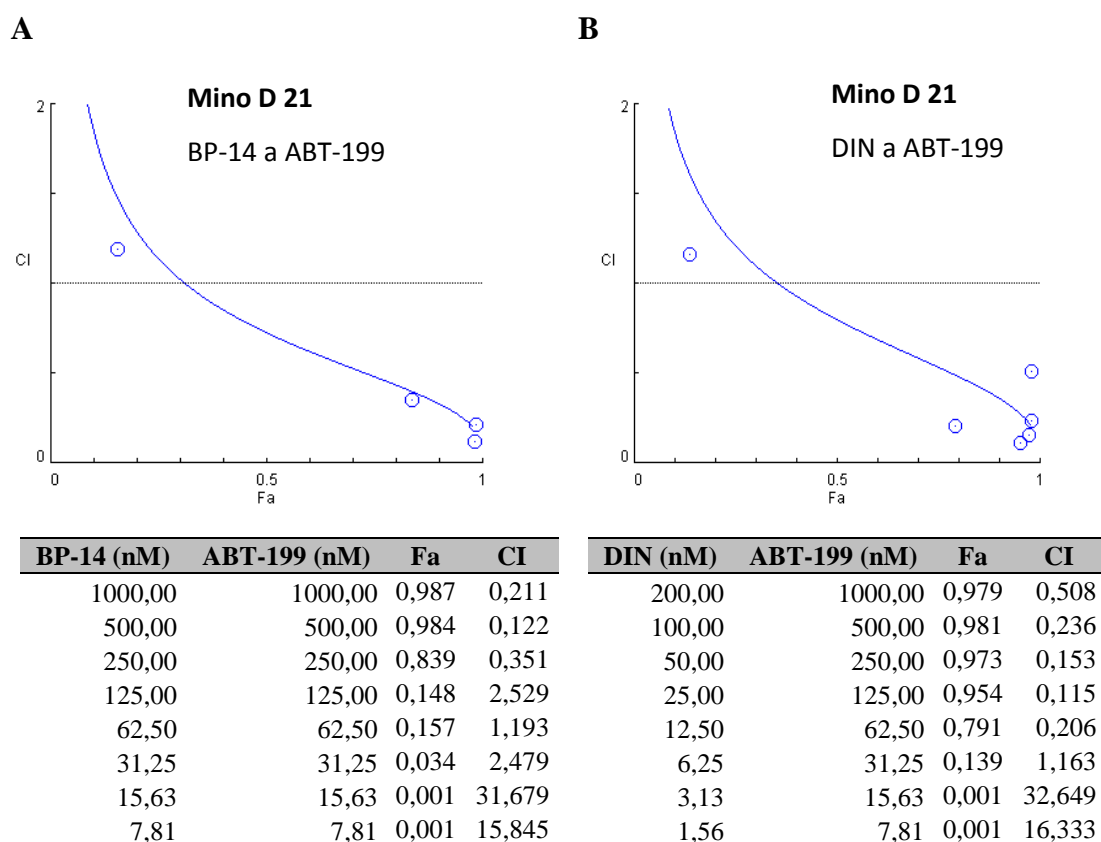
4.2 Cytotoxicita kombinace testovaných látek

Kombinovaný cytotoxický účinek látek na studované buněčné linie byl sledován pomocí MTT testu. Buněčné linie byly ovlivněny na 24 hodin graduálně klesajícími koncentracemi nejprve jednou látkou, poté druhou látkou a nakonec jejich kombinací. Výsledky byly zpracovány v programu CompuSyn, který provádí výpočetní simulaci ze zadaných parametrů (koncentrace a odpovídající úbytek viabilních buněk) a výstup zobrazuje jako závislost kombinačního indexu (CI, combination index) na podílu ovlivněných buněk (Fa, fraction affected). Hodnota Fa (fraction affected) je procentuální vyjádření buněk, které jsou negativně ovlivněny působením určité koncentrace dané toxické látky. Stoprocentní viabilitě buněk odpovídá hodnota Fa = 0, naopak Fa = 1 odpovídá nulové viabilitě. Povahu kombinovaného účinku dvou a více látek udává velikost kombinačního indexu CI. Pokud hodnota je CI < 1, jedná se o synergismus, naopak když je hodnota CI > 1 jedná se o antagonismus (Chou TC *et* Talalay P 1983, 1984). Graficky je synergický účinek látek znázorněn body pod rovnoběžkou s osou x.

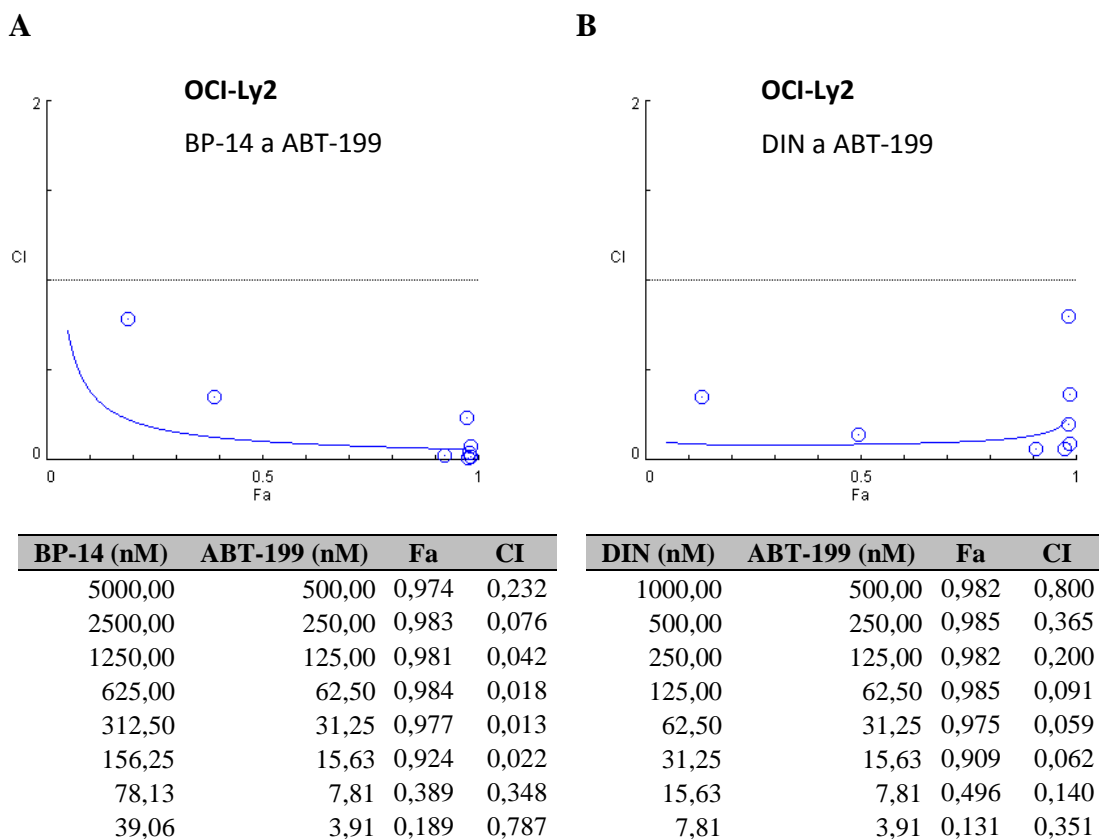
U obou dvou kombinací venetoclax-dinaciclib i venetoclax-BP-14 byly ve všech čtyřech lymfomových liniích zjištěny synergie v cytotoxickém působení. U linie OCI-Ly2 bylo synergické působení zjištěno pro obě kombinace v celém koncentračním rozsahu (**Obrázek 10**). V ostatních případech však synergie nebyly nalezeny v celém studovaném koncentračním rozsahu, ale jen v jeho části. Linie HT (**Obrázek 8**) a MINO D21 (**Obrázek 9**) vykazovaly zvýšenou citlivost k oběma kombinacím (synergii) zejména u vyšších koncentrací, pro BP-14 od 250 nM a pro dinaciclib od 12,5 nM výše. U nižších koncentrací byl překvapivě zjištěn dokonce antagonismus. U linie SU DHL-4 synergii v celém koncentračním rozsahu vykazoval pouze dinaciclib, inhibitor BP-14 se v obou krajních koncentracích choval v kombinaci s venetoclaxem antagonisticky (**Obrázek 11**).



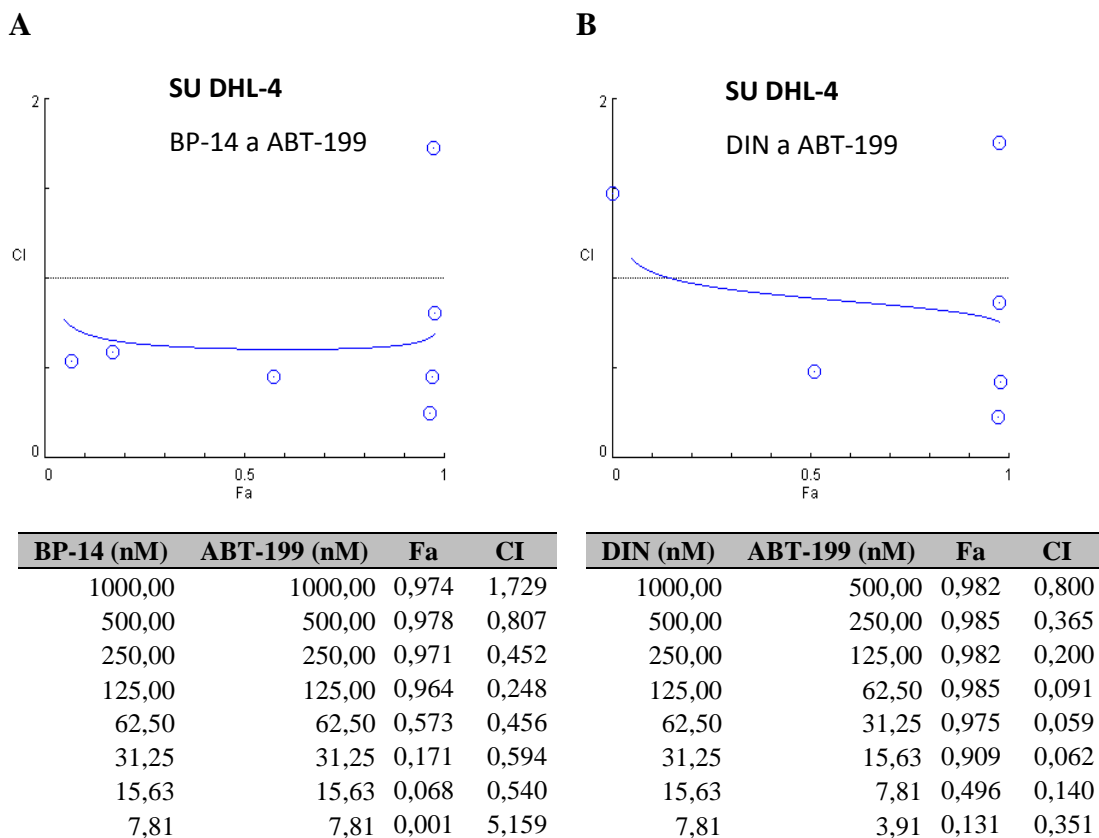
Obrázek 8: Synergický účinek kombinace ABT-199 a BP-14 (A) nebo DIN (B) u buněčné linie HT.



Obrázek 9: Synergický účinek kombinace ABT-199 a BP-14 (A) nebo DIN (B) u buněčné linie Mino D21.



Obrázek 10: Synergický účinek kombinace ABT-199 a BP-14 (A) nebo DIN (B) u buněčné linie OCI-Ly2.



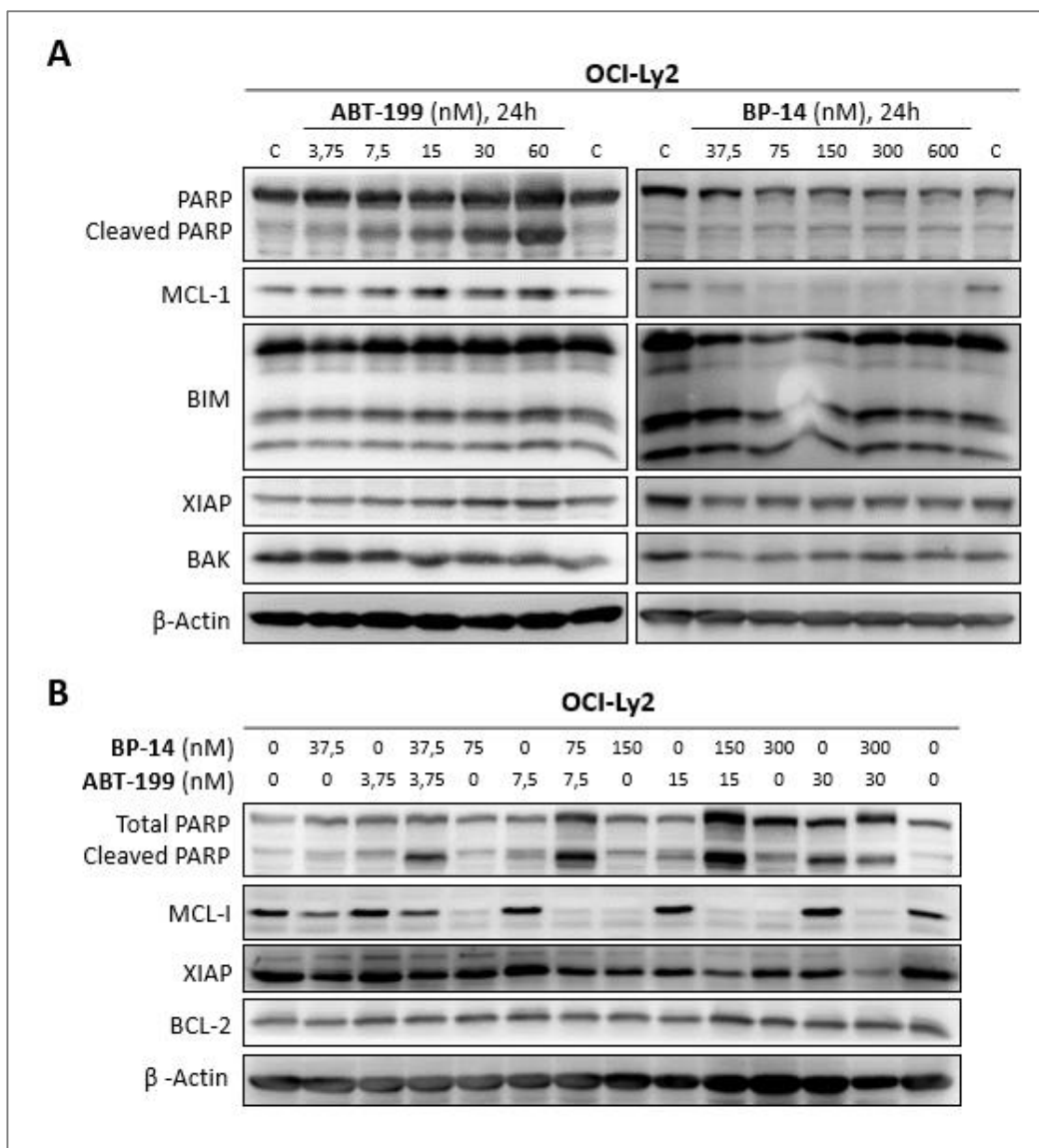
Obrázek 11: Synergický účinek kombinace ABT-199 a DIN (B) u buněčné linie SU DHL-4.

4.3 Proteinové změny v buňkách ovlivněných testovanými látkami a jejich kombinací

Jak ukázalo měření cytotoxicity, buněčná linie OCI-Ly2 vykazovala nejnižší citlivost k oběma studovaným inhibitorům CDK (dinaciclub i BP-14). Naopak ze všech čtyř lymfomových linií byla k nejcitlivější k venetoclaxu (**Tabulka 10**). Také kombinované působení inhibitorů CDK s venetoclaxem vykazovalo nejvýraznější synergii, a to přes celý zvolený koncentrační rozsah (**Obrázek 10**). Z tohoto důvodu byla linie OCI-Ly2 vybrána pro předběžnou analýzu mechanismu buněčného působení kombinace BP-14 a venetoclaxu. Jak obě tyto látky samostatně, tak jejich kombinace byla aplikována na exponenciálně rostoucí buňky OCI-Ly2 po dobu 24 hod. Poté byly buňky sklizeny a immunoblottingem byly analyzovány některé proteiny související s apoptosou. Pro kontrolu rovnoměrného nanesení lyzátů byla rovněž analyzována hladina aktinu, který by se v buňkách ovlivněných studovanými látkami po dobu trvání experimentu neměl zásadně měnit. Reprezentativní výsledky jsou uvedeny na **obrázku 12**.

Venetoclax v souladu s očekáváním vyvolával v buňkách koncentračně závislou fragmentaci proteinu PARP (Poly-ADP-ribose-polymerase), ale zejména změny v hladinách některých proteinů s BH3 doménami. Na **obrázku 12A** je zřejmý nárůst proteinu MCL-1 a XIAP, proteiny BIM a BAK se neměnily. Oproti tomu látka BP-14 ve zvoleném koncentračním rozsahu štěpení proteinu PARP nevyvolávala. Na hladinu proteinu MCL-1 však měla opačný vliv, než venetoclax. Koncentrační rozsah pro látku BP-14 byl záměrně posunut k nižším hodnotám, v nichž není sama o sobě cytotoxická.

Pokud byla na buňky OCI-Ly2 aplikována kombinace venetoclaxu a BP-14, uvedené proteiny se měnily jednoznačně výrazněji (**Obrázek 12B**). Fragmentace proteinu PARP je zřejmá v buňkách ovlivněných již nejnižší koncentrací venetoclaxu a s jeho zvyšující se koncentrací je vždy výraznější v kombinaci s BP-14. Podstatně výrazněji také klesá hladina antiapoptotického proteinu MCL-1, pokud byly buňky ovlivněny CDK inhibitorem. Vedle MCL-1 však při vyšších koncentracích obou látek (300 nM BP-14 a 30 nM venetoclax) v buňkách dochází také k vymizení XIAP.

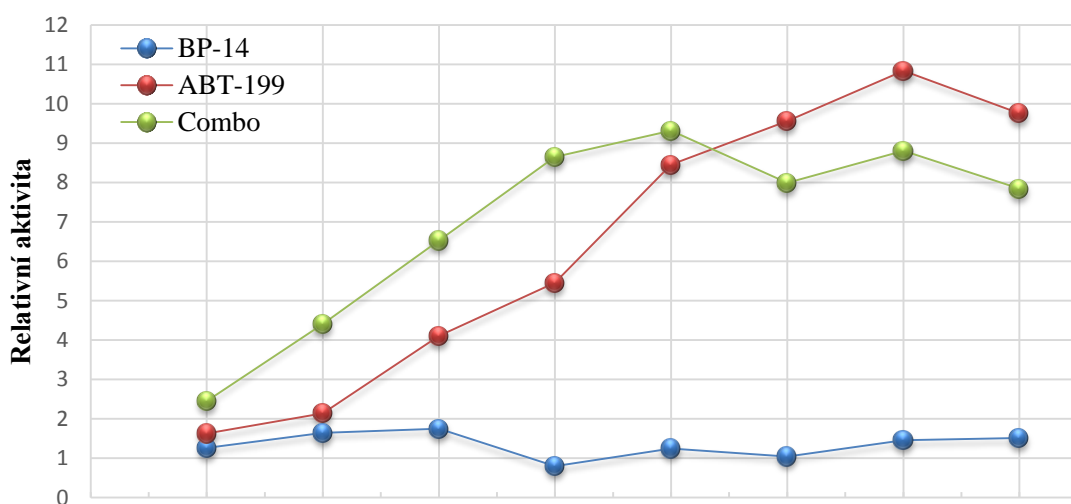


Obrázek 12: Hladiny některých proteinů souvisejících s apoptosou v buněčné linii OCI-Ly2 ovlivněné různými koncentracemi venetoclaxu (ABT-199) a BP-14 (A) a jejich kombinací (B) po dobu 24 hodin. Proteiny byly analyzovány immunoblottingem.

4.4 Aktivace caspas v buňkách ovlivněných testovanými látkami a jejich kombinací

Analýzy proteinů zapojených do apoptotické smrti v buněčné linii OCI-Ly2 vystavené působení venetoclaxu, BP-14 a jejich kombinaci, sledování cytotoxicity i vizuální kontrola ukazovaly na indukci apoptosy. Dalším provedeným experimentem bylo proto měření biochemické aktivity caspas-3/7, které jsou po depolarizaci mitochondrií aktivovány v cytoplasmě, a jejichž aktivita je jedním z uznávaných průkazů probíhající apoptosy.

Jak obě tyto látky samostatně, tak jejich kombinace byla proto aplikována na exponenciálně rostoucí buňky OCI-Ly2 po dobu 24 hod. Poté byly buňky sklizeny a v lyzátech byla měřena aktivita caspas s využitím specifického fluorescenčně značeného substrátu. Aktivita byla normalizována na hladinu změřenou v neovlivněných buňkách. Reprezentativní výsledky jsou uvedeny na **obrázku 13**. Podobně jako při analýze proteinů ani zde látka BP-14 nezpůsobovala žádné změny v aktivitě caspas v celém sledovaném koncentračním rozsahu. Naproti tomu venetoclax (ABT-199) jednoznačně způsoboval koncentračně závislou aktivaci již při 15 nM koncentraci. Ve vyšších dávkách pak již došlo k saturaci signálu. Buňky ovlivněné kombinací obou studovaných sloučenin vykazovaly vyšší aktivity caspas-3/7 již od nejnižších koncentrací. Zřetelný posun křivek závislosti aktivity pro venetoclax (ABT-199) samotný a jeho kombinaci s BP-14 jednoznačně svědčí o zesíleném působení.



Testovaná látka	Koncentrace (nM)								
	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50	125,00	250,00	500,00	
ABT-199	3,91	7,81	15,63	31,25	62,50	125,00	250,00	500,00	
BP-14	39,06	78,13	156,25	312,50	625,00	1250,00	2500,00	5000,00	

Obrázek 13: Relativní aktivita caspas-3/7 v lyzátech buněk OCI-Ly2 ovlivněných různými koncentracemi venetoclaxu, BP-14 a jejich kombinací.

5 DISKUZE

Během posledních několika desetiletí bylo dosaženo značných pokroků v léčbě lymfomů. Chemoterapie a optimalizace radioterapie sice značně vylepšila prognózu pacientů s lymfoproliferativním onemocněním, ale i přesto je léčba mnohdy nedostatečná. Mnoho cytostatik je ovšem limitováno nežádoucími účinky závislými na dávce. V současné době je studována a vyvíjena řada nových cílených léčiv, ať již preklinicky nebo klinicky. Nabízí se díky tomu stále více zajímavých možností pro kombinovanou léčbu.

Proteinová rodina BCL-2 je klíčovým regulátorem apoptotického procesu (Tsujimoto Y 1998). BCL-2 rodina obsahuje proapoptické a antiapoptické proteiny, posun rovnováhy směrem k této druhé skupině je mechanismem, kterým rakovinné buňky unikají apoptose. A proto se tato skupina stala důležitým terapeutickým cílem, který vedl k vývoji několika nových léků, jako je navitoclax (ABT-263), venetoclax (ABT-199) a ABT-737 (Delbridge AR *et al.* 2016). Právě venetoclax (ABT-199) je jedna z nejslibnějších nových látek, která byla schválena FDA v roce 2016 pro léčbu CLL. Účinně působí při léčbě leukemií (Pan R *et al.* 2014), MM (Kumar S *et al.* 2016) a lymfomů (Roberts AW *et al.* 2016). Venetoclax (ABT-199) není však aplikován v monoterapii, nýbrž v kombinacích (Souers AJ *et al.* 2013). Není účinný proti MCL-1, který je obvykle amplifikován v nádorech a je spojován s relapsem nádorů a chemorezistencí. Pro zvýšení účinnosti léčby se nabízí možnost kombinovat venetoclax (ABT-199) s látkami, které vedou ke snížení exprese antiapoptického proteinu MCL-1 (Leverson JD *et al.* 2015).

Nedávné studie zkoumaly účinnost kombinace venetoclaxu s radioterapií a radioimunoterapií (O'Steen S *et al.* 2017). Účinnost kombinace venetoclaxu a ozáření ¹³⁷Cs byla nejprve testována na buněčných liniích NHL, dále byla hodnocena účinnost na modelech myších xenograftů MCL a DLBCL. Nakonec byl u xenotransplantátů MCL a DLBCL kombinován venetoclax s radioimunoterapií namířenou proti antigenu CD20. Ve všech případech *in vivo* způsobila optimální kombinace dávky venetoclaxu a radioterapie či venetoclax v kombinaci s radioimunoterapií, synergický úbytek nebo eradikaci lymfomu.

Dalšími protinádorovými terapeutiky jsou CDK inhibitory, které jsou testovány téměř 20 let, ale teprve nedávno byly dva inhibitory schváleny pro klinické použití. Jedná se o palbociclib a ribociclib, které specificky inhibují především CDK4 a jsou účinné pouze v nádorech s funkčním proteinem Rb (Fry DW *et al.* 2004, Infante JR *et al.* 2016). Větší skupina inhibitorů CDK však inhibuje více enzymů z rodiny CDK, a jejich účinek souvisí nejen s inhibicí CDK1, CDK2 a CDK4, které regulují buněčný cyklus, ale zejména s CDK7 a CDK9, které regulují transkripci mRNA. Jejich inhibicí dochází k poměrně

rychlému poklesu hladin méně stabilních proteinů, jako je například antiapoptotický MCL-1 (Gojo I *et al.* 2002, Pepper C *et al.* 2001). Řada prací ukazuje, že právě inhibice CDK9 a následný pokles MCL-1 je podstatou mechanismu protinádorové aktivity této skupiny látek, do níž patří mimo jiné i flavopiridol, dinaciclib a BP-14 (Gucký T *et al.* 2013, Gregory GP *et al.* 2015, Gojo I *et al.* 2002, Pepper C *et al.* 2001).

Klinicky nejpokročilejší studie ze skupiny méně selektivních inhibitorů CDK jsou založeny na dinaciclibu. Dinaciclib je sice klinicky zkoumán jako experimentální léčivo na jiných malignitách (Kumar S *et al.* 2016, Feldmann G *et al.* 2011, Criscitiello C *et al.* 2014, Fabre C *et al.* 2014, Johnson AJ *et al.* 2012, Stephenson JJ *et al.* 2014, Mita MM *et al.* 2014, Gojo I *et al.* 2013), ale *in vitro* pokusy a pokusy na myších modelech již prokázaly také účinky na lymfomy (Gregory GP *et al.* 2015). Díky své schopnosti inhibovat více CDK může dinaciclib snižovat hladiny exprese antiapoptotických proteinů, jako je MCL-1, což může vést k apoptotické kaskádě. Ačkoliv dinaciclib jednoznačně není specifickým inhibitorem MCL-1, jeho schopnost rychle regulovat MCL-1 v několika typech buněk, se může uplatnit jako senzibilizace k jiným chemoterapeutickým činidlům, jako je venetoclax (ABT-199) nebo ke zvrácení chemorezistence (Varadarajan S *et al.* 2015, Kumar SK *et al.* 2015).

Podobně zřejmě funguje i marinopyrrol A (maritoclax), který se přímo váže na MCL-1 a je zaměřen na proteasomální degradaci v různých hematologických rakovinových buňkách a některých melanomových buňkách (Doi K *et al.* 2014, Pandey MK *et al.* 2013, Doi K *et al.* 2012). Naproti tomu dinaciclib je širokospektrální inhibitor CDK a bylo prokázáno, že redukuje hladiny MCL-1, pravděpodobně kvůli transkripční represi skrze CDK7 a CDK9 (Kumar SK *et al.* 2015, Feldmann G *et al.* 2011, Booher RN *et al.* 2014). Bylo prokázáno, že jak dinaciclib, tak maritoclax indukují apoptosu v buněčných liniích MEF a NSCLC (Non-small cell lung cancer). Zatímco dinaciclib je mnohem účinnější při snižování hladin MCL-1, ztráta MCL-1 maritoclaxem byla mnohem mírnější. Nicméně u buněk ošetřených maritoclaxem docházelo ke štěpení PARP, což svědčí o tom, že ztráta MCL-1 byla dostatečná k vyvolání apoptosy. Obě sloučeniny prokazatelně indukují apoptosu a jsou jednoznačně specifické pro buněčný typ, neboť k indukci apoptosy v MEF dochází i bez ohledu na stav MCL-1. Maritoclax také mění strukturální a funkční integritu mitochondrií a vede k akumulaci mitochondriálních ROS. Jak již bylo zmíněno, kombinace inhibitorů CDK a inhibitorů BCL-2 je velmi slibnou terapií onkologických pacientů. Proto byla na buněčných liniích H1299 otestována kombinace maritoclaxu a navitoclaxu (ABT-263), který inhibuje BCL-2, BCL-XL a BCL-X, ale neinhibuje MCL-1 (Varadarajan S *et al.*

2015). U ovlivněných buněk docházelo k potencování apoptosy, které bylo doprovázeno úplnou ztrátou MCL-1 a významným štěpením PARP.

Kombinační účinek dinaciclibu a ABT-737 byl testován na buněčných liniích maligních lidských gliomů (Jane EP *et al.* 2016). Tato kombinace vedla ke smrti buněk doprovázené ztrátou mitochondriálního transmembránového potenciálu, uvolňování cytochromu c, AIF (apoptosis inducing factor), aktivaci caspas a štěpení PARP. Dále byla testována kombinace dinaciclibu a ABT-199 (Li L *et al.* 2015). V této kombinaci byla také prokázána silná protinádorová aktivita.

V mé diplomové práci byl testován kombinační účinek venetoclaxu (ABT-199) a nově syntetizovaného BP-14 (CDK-inhibitor), který byl vyvinut v Laboratoři růstových regulátorů. V našich podmínkách venetoclax v souladu s očekáváním vyvolával v buňkách koncentračně závislou fragmentaci proteinu PARP (**Obrázek 12**), což je považováno za jeden z průvodních znaků apoptosy. Ta je spouštěna zablokovanou interakcí mezi proteiny s BH3 doménami a následnou depolarizací mitochondrií.

Proteiny MCL-1 a XIAP patří mezi antiapoptotické regulátory, proto pokles jejich expresních hladin v buňkách vystavených působení kombinace venetoclaxu a BP-14 je jasnou známkou nevratných změn, které vedou k apoptotické buněčné smrti. Apoptosu buněk OCI-Ly2 ovlivněných kombinací obou experimentálních látek dále potvrzuje specifická fragmentace proteinu PARP, jejímž produktem je mimo jiné fragment o velikosti cca 89 kDa, a zejména výrazný nárůst aktivity caspas, které jsou specificky aktivovány zejména během apoptosy (**Obrázek 13**).

Vzhledem ke strukturní odlišnosti dinaciclibu a BP-14 se dá očekávat, že obě dvě sloučeniny mohou mít i jiné vedlejší cíle kromě CDK, jejichž ovlivnění může přispět k cytotoxickému působení. Výsledky kombinovaného působení venetoclaxu s dinaciclibem a BP-14 jsou si však velmi podobné, což svědčí pro stejný mechanismus účinku obou kombinací. Mechanismus je tedy s velkou pravděpodobností dán právě inhibicí CDK7 a CDK9, která vede k poklesu hladiny antiapoptotického proteinu MCL-1.

6 ZÁVĚR

Na buněčných liniích odvozených od non-Hodgkinových lymfomů (Mino D21, SU DHL-4, HT a OCI-Ly2) byly testovány látky BP-14, venetoclax (ABT-199) a dinaciclib, ovlivněné po dobu 24 hodin. Byla stanovena cytotoxicita látek vyjádřená v hodnotách IC₅₀. Následně byl sledován kombinovaný cytotoxický účinek látek venetoclax-dinaciclib a venetoclax-BP-14. Ve všech testovaných lymfomových liniích byly zjištěny synergie v cytotoxickém působení. Pro sledování proteinových změn v buňkách ovlivněných testovanými látkami byla vybrána buněčná linie OCI-Ly2, neboť bylo zjištěno synergické působení pro obě kombinace v celém koncentračním rozsahu a byla ze všech linií nejcitlivější k venetoclaxu. Immunoblottingem byly analyzovány některé proteiny související s apoptosou. Buňky ovlivněné venetoclaxem vykazovaly nárůst antiapoptotického proteinu MCL-1 a XIAP. Právě MCL-1 je spojován s relapsem a chemorezistencí nádorů. Nicméně v buňkách vyvolával koncentračně závislou fragmentaci PARP, což je průvodním znakem apoptosy. Naopak u buněk ošetřených látkou BP-14 nebyla pozorována fragmentace PARP, ale docházelo k poklesu hladiny MCL-1. V kombinaci podstatně výrazněji klesala hladina MCL-1, docházelo k vymizení XIAP a byla pozorována fragmentace proteinu PARP již při nižších koncentracích. Výsledky měření aktivity caspas-3/7 také jednoznačně potvrdily synergismus u kombinace látek BP-14 a venetoclaxu. Vzhledem k prokázané synergii mezi venetoclaxem a CDK inhibitory se dá předpokládat, že se tato nebo podobné kombinace terapeutik mohou uplatnit v klinické praxi při léčbě lymfomů, případně i jiných nádorových onemocnění.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABT-199	Venetoclax
ABT-263	Navitoclax
ABVD	Adriamycin, bleomycin, vinblastin, dakarbazin
Ac-DEVD-AMC	Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylkumarin
AIF	Apoptosis inducing factor
ALCL	Anaplastic large-cell lymphoma
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
ALL	Acute lymphoblastic leukemia
AMC	7-amido-4-methylkumarin
AML	Acute myeloid leukemia
APS	Ammonium persulfate
BAD	BCL-2 antagonist of cell death
BCL	B-cell lymphoma
BCR	B-cell receptor
BEACOPP	Bleomycin, etoposid, adriamycin, cyklofosamid, vinkristin, prokarbazin, prednison
BH	Bcl-2 homology domain
BID	BCL-2-interacting domain death antagonist
BIK	BCL-2-interacting killer
BIM	BCL-2-interacting mediator of cell death
BL	Burkitt's lymphoma
BMF	BCL-2-modifying factor
BSA	Bovine serum albumine
BTK	Bruton's tyrosine kinase
BV	Brentuximab vedotin
CDK	Cyclin-dependent kinases
CI	Combination index
CLL	Chronic lymphocytic leukemia
COP	Cyklofosamid, vinkristin, prednison
COPP	Cyklofosamid, vinkristin, prokarbazin, prednison
CT	Computed tomography
CTLA	Toxic T-lymphocyte-associated antigen
DIN	Dinaciclib
DLBCL	Diffuse large B-cell lymphoma
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DTT	Dithiothreitol
ECL	Electrochemiluminescence
Fa	Fraction affected
Fas	Fas cell surface death receptor
FBS	Fetal bovine serum
FCM	Fludarabin, cyklofosamid, mitoxantron
FCR	Fludarabin, cyklofosamid, rituximab
FCS	Foetal calf serum
FDA	The Food and Drug Administration

FL	Follicular lymphoma
FND	Fludarabin, mitoxantron, dexamethason
GSI	γ -secretase inhibitors
HL	Hodgkin's lymphoma
HLA	Human leukocyte antigen
HRK	Harakiri
CHOEP	CHOP + etoposid
CHOP	Cyklofosamid, doxorubicin, vinkristin, prednison
ICN	Intracellular fragment of Notch1
IL	Interleukine
ILSG	International lymphoma study group
INF	Interferone
JAK	Janus kinase
mAb	Monoclonal antibodies
MCL	Mantle cell lymphoma
MHC	Major histocompatibility complex
MM	Multiple myeloma
MMAE	Monometyl aurystatin E
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NHL	Non-Hodgkin's lymphoma
NOXA	NADPH oxidase activator
NSCLC	Non-small cell lung cancer
PABC	p-aminobenzyloxy-carbonyl
PARP	Poly-ADP-ribose-polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PD	Programmed cell death
PET	Positron emission tomography
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PUMA	p-53 upregulated modulator of apoptosis
Rb	Retinoblastoma protein
REAL	Revised European-American lymphoma
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 medium
SCLC	Small cell lung cancer
SDS	Sodium dodecyl sulfate
STAT	Signal transducers and activators of transcription
TBS	Tris buffered saline
TBS-T	Tris buffered saline + Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine
TGF	Transforming growth factor
TM	Transmembrane domain
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
Tween 20	Polyoxyethylenesorbitan monolaurate, polysorbate 20
TYK	Tyrosine kinase

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adams JM, Cory S (2007): The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26 (9): 1324-1337.
- Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP, Smith SM, Boyd TE, Grant B, Kolibaba KS, Furman RR, Rodriguez S, Chang BY *et al.* (2013): Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J Clin Oncol* 31: 88-94.
- Aisenberg AC (2000): Historical review of lymphomas. *Br J Haematol* 109 (3): 466-476.
- Aklilu M, Kindler HL, Donehower RC, Mani S, Vokes EE (2003): Phase II study of flavopiridol in patients with advanced colorectal cancer. *Annals of Oncology* 14, 1270-1273.
- Arguello F, Alexander M, Sterry JA, Tudor G, Smith EM, Kalavar NT, Greene JF Jr, Koss W, Morgan CD, Stinson SF *et al.* (1998): Flavopiridol induces apoptosis of normal lymphoid cells, causes immunosuppression, and has potent antitumor activity *in vivo* against human leukemia and lymphoma xenografts. *Blood* 91 (7): 2482-2490.
- Asghar U, Witkiewicz AK, Turner NC, Knudsen ES (2015): The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 14 (2): 130-146.
- Attia P, Phan GQ, Maker AV, Robinson MR, Quezado MM, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Kammula US, Royal RE *et al.* (2005): Autoimmunity correlates with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4. *J Clin Oncol* 23 (25): 6043-6053.
- Badros AZ, Goloubeva O, Rapoport AP, Ratterree B, Gahres N, Meisenberg B, Takebe N, Heyman M, Zwiebel J, Streicher H *et al.* (2005): Phase II study of G3139, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with dexamethasone and thalidomide in relapsed multiple myeloma patients. *J Clin Oncol* 23 (18): 4089-4099.
- Balakrishnan K, Burger JA, Wierda WG, Gandhi V (2009): AT-101 induces apoptosis in CLL B cells and overcomes stromal cell-mediated Mcl-1 induction and drug resistance. *Blood* 113: 149-153.
- Bedikian AY, Millward M, Pehamberger H, Conry R, Gore M, Trefzer U, Pavlick AC, DeConti R, Hersh EM, Hersey P *et al.* (2006): Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. *J Clin Oncol* 24 (29): 4738-4745.
- Belada D, Trněný M a kolektiv Kooperativní lymfomové skupiny (2009): Diagnostické a léčebné postupy u nemocných s maligními lymfomy III. Čtvrté doplněné vydání. Vydavatel: HK Credit s.r.o. Hradec Králové.
- Benson C, White J, De Bono J, O'Donnell A, Raynaud F, Cruickshank C, McGrath H, Walton M, Workman P, Kaye S *et al.* (2007): A phase I trial of the selective oral cyclin-dependent kinase inhibitor seliciclib (CYC202; R-Roscovitine), administered twice daily for 7 days every 21 days. *Br J Cancer* 96 (1): 29-37.
- Bonavida B (2006): What signals are generated by anti-CD20 antibody therapy? *Curr Hematol Malig Rep* 1 (4): 205-213.
- Booher RN, Hatch H, Dolinski BM, Nguyen T, Harmonay L, Al-Assaad AS, Ayers M, Nebozhyn M, Loboda A, Hirsch HA *et al.* (2014): MCL1 and BCL-xL levels in solid tumors are predictive of dinaciclib-induced apoptosis. *PLoS One* 9 (10): e108371.
- Borden EC, Hogan TF, Voelkel JG (1982): Comparative antiproliferative activity *in vitro* of natural interferons alpha and beta for diploid and transformed human cells. *Cancer Res* 42: 4948-4953.
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of mikrogram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. *Analyt Biochem* 72: 248-254.

- Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powderly JD, Picus J, Sharfman WH, Stankevich E, Pons A, Salay TM, McMiller TL *et al.* (2010): Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106): in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* 28 (19): 3167-3175.
- Brinkmann K, Kashkar H (2014): Targeting the mitochondrial apoptotic pathway: a preferred approach in hematologic malignancies? *Cell Death Dis* 5 (3): e1098.
- Burdette-Radoux S, Tozer RG, Lohmann RC, Quirt I, Ernst DS, Walsh W, Eisenhauer EA (2004): Phase II trial of flavopiridol, a cyclin dependent kinase inhibitor, in untreated metastatic malignant melanoma. *Invest New Drugs* 22 (3): 315-322.
- Byrd JC, Brown JR, O'Brien S, Barrientos JC, Kay NE, Reddy NM, Coutre S, Tam CS, Mulligan SP, Jaeger U (2014): Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 371 (3): 213-223.
- Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, Grant B, Sharman JP, Coleman M, Wierda WG *et al.* (2013): Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 369 (1): 32-42.
- Byrd JC, Lin TS, Dalton JT, Wu D, Phelps MA, Fischer B, Moran M, Blum KA, Rovin B, Brooker-McEldowney M *et al.* (2007): Flavopiridol administered using a pharmacologically derived schedule is associated with marked clinical efficacy in refractory, genetically high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 109 (2): 399-404.
- Byrd JC, Peterson BL, Gabilove J, Odenike OM, Grever MR, Rai K, Larson RA; Cancer and Leukemia Group B (2005): Treatment of relapsed chronic lymphocytic leukemia by 72-hour continuous infusion or 1-hour bolus infusion of flavopiridol: results from Cancer and Leukemia Group B study 19805. *Clin Cancer Res* 11 (11): 4176-4181.
- Carlson BA, Dubay MM, Sausville EA, Brizuela L, Worland PJ (1996): Flavopiridol induces G1 arrest with inhibition of cyclin-dependent kinase (CDK) 2 and CDK4 in human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 56 (13): 2973-2978.
- Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, Morel P, Van Den Neste E, Salles G, Gaulard P *et al.* (2002): CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 346 (4): 235-242.
- Criscitello C, Viale G, Esposito A, Curigliano G (2014): Dinaciclib for the treatment of breast cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 23: 1305-1312.
- Cutler A, Brombacher F (2005): Cytokine therapy. *Ann NY Acad Sci* 1056: 16-29.
- Davids MS, Kim HT, Costello CL, Avigan D, Chen Y-B, Armand P, Alyea EP, Hedlund J, McSweeney PA, Liguori R *et al.* (2014): A multicenter phase I study of CTLA-4 blockade with ipilimumab for relapsed hematologic malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 124: abstract 3964.
- Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM (2001): Constitutive nuclear factor KB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* 194: 1861-1874.
- de Claro RA, McGinn K, Kwitkowski V, Bullock J, Khandelwal A, Habtemariam B, Ouyang Y, Saber H, Lee K, Koti K *et al.* (2012): U.S. Food and Drug Administration approval summary: brentuximab vedotin for the treatment of relapsed Hodgkin lymphoma or relapsed systemic anaplastic large-cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 18 (21): 5845-5849.
- Delbridge AR, Grabow S, Strasser A, Vaux DL (2016): Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nat Rev Cancer* 16 (2): 99-109.
- Deng J (2017): How to unleash mitochondrial apoptotic blockades to kill cancers? *Acta Pharm Sin B* 7(1): 18-26.

- Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD (1994): Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* 1(6): 447-456.
- Doi K, Li R, Sung SS, Wu H, Liu Y, Manieri W, Krishnegowda G, Awwad A, Dewey A, Liu X *et al.* (2012): Discovery of Marinopyrrole A (Maritoclax): as a Selective Mcl-1 Antagonist that Overcomes ABT-737 Resistance by Binding to and Targeting Mcl-1 for Proteasomal Degradation. *J Biol Chem* 287: 10224-10235.
- Doi K, Liu Q, Gowda K, Barth BM, Claxton D, Amin S, Loughran TP, Wang HG (2014): Maritoclax induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells with elevated Mcl-1 expression. *Cancer Biol Ther* 15: 1077-1086.
- Dreyling M, Jurczak W, Jerkeman M, Silva RS, Rusconi C, Trneny M, Offner F, Caballero D, Joao C, Witzens-Harig M *et al.* (2016): Ibrutinib versus temsirolimus in patients with relapsed or refractory mantle-cell lymphoma: an international, randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 387: 770-778.
- Dunn GP, Bruce AT, Sheehan KC, Shankaran V, Uppaluri R, Bui JD, Diamond MS, Koebel CM, Arthur C, White JM, Schreiber RD (2005a): A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat Immunol* 6 (7): 722-729.
- Dunn GP, Ikeda H, Bruce AT, Koebel C, Uppaluri R, Bui J, Chan R, Diamond M, White JM, Sheehan KC, Schreiber RD (2005b): Interferon-gamma and cancer immunoediting. *Immunol Res* 32 (1-3): 231-245.
- Ellis HM, Horvitz HR (1986): Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44 (6): 817-829.
- Fabre C, Gobbi M, Ezzili C, Zoubir M, Sablin M-P, Small K, Im E, Shinwari N, Zhang D, Zhou, H *et al.* (2014): Clinical study of the novel cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib in combination with rituximab in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 74: 1057-1064.
- Farrar MA, Schreiber RD (1993): The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol* 11: 571-611.
- Feldmann G, Mishra A, Bisht S, Karikari C, Garrido-Laguna I, Rasheed Z, Ottenhof NA, Dadon T, Alvarez H, Fendrich V *et al.* (2011): Cyclindependent kinase inhibitor Dinaciclib (SCH727965) inhibits pancreatic cancer growth and progression in murine xenograft models. *Cancer Biol Ther* 12: 598-609.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010): Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127 (12): 2893-2917.
- Flynn J, Jones J, Johnson AJ, Andritsos L, Maddocks K, Jaglowski S, Hessler J, Grever MR, Im E, Zhou H *et al.* (2015): Dinaciclib is a novel cyclin-dependent kinase inhibitor with significant clinical activity in relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 29 (7): 1524-1529.
- Földi E *et al.* (2010): *Lymfologie*, překlad 7. vydání. GRADA. Praha: 371-382.
- Forero-Torres A, Leonard JP, Younes A, Rosenblatt JD, Brice P, Bartlett NL, Bosly A, Pinter-Brown L, Kennedy D, Sievers EL *et al.* (2009): A Phase II study of SGN-30 (anti-CD30 mAb) in Hodgkin lymphoma or systemic anaplastic large cell lymphoma. *Br J Haematol* 146 (2): 171-179.
- Francisco JA, Cervený CG, Meyer DL, Mixan BJ, Klussman K, Chace DF, Rejniak SX, Gordon KA, DeBlanc R, Toki BE *et al.* (2003): cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. *Blood* 102 (4): 1458-1465.
- Fry DW, Harvey PJ, Keller PR, Elliott WL, Meade M, Trachet E, Albassam M, Zheng X, Leopold WR, Pryer NK *et al.* (2004): Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol Cancer Ther* 3 (11): 1427-1438.
- Fulchiero E, Jimeno A (2014): Nivolumab. *Drugs Today Barc* 50 (12): 791-802.

- Gandhi L, Camidge DR, Ribeiro de Oliveira M, Bonomi P, Gandara D, Khaira D, Hann CL, McKeegan EM, Litvinovich E, Hemken PM (2011): Phase I study of Navitoclax (ABT-263), a novel Bcl-2 family inhibitor, in patients with small-cell lung cancer and other solid tumors. *J Clin Oncol* 29: 909-916.
- Goard CA, Schimmer AD (2013): An evidence-based review of obatoclax mesylate in the treatment of hematological malignancies. *Core Evid* 8: 15-26.
- Gojo I, Sadowska M, Walker A, Feldman EJ, Iyer SP, Baer MR, Sausville EA, Lapidus RG, Zhang D, Zhu Y *et al.* (2013): Clinical and laboratory studies of the novel cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib (SCH 727965) in acute leukemias. *Cancer Chemother Pharmacol* 72 (4): 897-908.
- Gojo I, Zhang B, Fenton RG (2002): The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol induces apoptosis in multiple myeloma cells through transcriptional repression and down-regulation of Mcl-1. *Clin Cancer Res* 8 (11): 3527-3538.
- Grant S, Roberts JD (2003): The use of cyclin-dependent kinase inhibitors alone or in combination with established cytotoxic drugs in cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat* 6 (1): 15-26.
- Greenberg DB, Jonasch E, Gadd MA, Ryan BF, Everett JR, Sober AJ, Mihm MA, Tanabe KK, Ott M, Haluska FG (2000): Adjuvant therapy of melanoma with interferon-alpha-2b is associated with mania and bipolar syndromes. *Cancer* 89 (2): 356-362.
- Gregory GP, Hogg SJ, Kats LM, Vidacs E, Baker AJ, Gilan O, Lefebure M, Martin BP, Dawson MA, Johnstone RW *et al.* (2015): CDK9 inhibition by dinaciclib potently suppresses Mcl-1 to induce durable apoptotic responses in aggressive MYC-driven B-cell lymphoma *in vivo*. *Leukemia* 29 (6): 1437-1441.
- Gu Y, Masiero M, Banham AH (2016): Notch signaling: its roles and therapeutic potential in hematological malignancies. *Oncotarget* 7 (20): 29804-29823.
- Gucký T, Jorda R, Zatloukal M, Bazgier V, Berka K, Řezníčková E, Béres T, Strnad M, Kryštof V (2013): A novel series of highly potent 2, 6, 9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitors. *J Med Chem* 56 (15): 6234-6247.
- Guha M (2012): Cyclin-dependent kinase inhibitors move into Phase III. *Nat Rev Drug Discov* 11(12): 892-894.
- Hamid O, Robert C, Daud A, Hodi FS, Hwu WJ, Kefford R, Wolchok JD, Hersey P, Joseph RW, Weber JS *et al.* (2013): Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med* 369 (2): 134-144.
- Hann CL, Daniel VC, Sugar EA, Dobromilskaya I, Murphy SC, Cope L, Lin X, Hierman JS, Wilburn DL, Watkins DN, Rudin CM (2008): Therapeutic efficacy of ABT-737, a selective inhibitor of BCL-2, in small cell lung cancer. *Cancer Res* 68 (7): 2321-2328.
- Hodgkin T (1832): On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Med Chir Trans* 17: 68-114.
- Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, Verner E, Loury D, Chang B, Li S, Pan Z, Thamm DH, Miller RA *et al.* (2010): The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (29): 13075-13080.
- Hossain DMS, Ugarte F, Sawant A, Cai M, Sriram V, Pinheiro E, Sadekova S, Chackerian A (2016): Dinaciclib induces immunogenic cell death and enhances anti-PD-1 mediated tumor suppression. *Cancer Res* 76: abstract 562.
- Chanan-Khan A, Cramer P, Demirkan F, Fraser G, Silva RS, Grosicki S, Pristupa A, Janssens A, Mayer J, Bartlett NL *et al.* (2016): HELIOS investigators. Ibrutinib combined with bendamustine and rituximab compared with placebo, bendamustine, and rituximab for previously treated chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma (HELIOS) a randomised, double-blind, phase 3 study. *Lancet Oncol* 17 (2): 200-211.

- Chavez JC, Sahakian E, Pinilla-Ibarz J (2013): Ibrutinib: an evidence-based review of its potential in the treatment of advanced chronic lymphocytic leukemia. *Core Evid* 8: 37-45.
- Chawla-Sarkar M, Leaman DW, Borden, EC (2001): Preferential induction of apoptosis by interferon (IFN)-beta compared with IFN-alpha2: Correlation with TRAIL/Apo2l induction in melanoma cell lines. *Clin Cancer Res* 7: 1821-1831.
- Chawla-Sarkar M, Lindner DJ, Liu YF, Williams BR, Sen GC, Silverman RH, Borden EC (2003): Apoptosis and interferons: Role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis* 8: 237-249.
- Chou TC, Talalay P (1983): Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem. *Trends Pharmacol Sci* 4: 450-454.
- Chou TC, Talalay P (1984): Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 22: 27-55.
- Igney FH, Kramer PH (2002): Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol* 6: 907-920.
- Infante JR, Cassier PA, Gerecitano JF, Witteveen PO, Chugh R, Ribrag V, Chakraborty A, Matano A, Dobson JR, Crystal AS *et al.* (2016): Phase I Study of the Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor Ribociclib (LEE011): in Patients with Advanced Solid Tumors and Lymphomas. *Clin Cancer Res* 22 (23): 5696-5705.
- Jane EP, Premkumar DR, Cavaleri JM, Sutera PA, Rajasekar T, Pollack IF (2016): Dinaciclib, a Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Promotes Proteasomal Degradation of Mcl-1 and Enhances ABT-737-Mediated Cell Death in Malignant Human Glioma Cell Lines. *J Pharmacol Exp Ther* 356 (2): 354-365.
- Johns TG, Mackay IR, Callister KA, Hertzog PJ, Devenish RJ, Linnane AW (1992): Antiproliferative potencies of interferons on melanoma cell lines and xenografts: Higher efficacy of interferon beta. *J Natl Cancer Inst* 84: 1185-1190.
- Johnson AJ, Yeh Y-Y, Smith LL, Wagner AJ, Hessler J, Gupta S, Flynn J, Zhang X, Bannerji R, Grever MR *et al.* (2012): The novel cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib (SCH727965) promotes apoptosis and abrogates microenvironmental cytokine protection in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 26: 2554-2557.
- Jonasch E, Haluska FG (2001): Interferon in oncological practice: Review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *Oncologist* 6: 34-55.
- Jonasch E, Kumar UN, Linette GP, Hodi FS, Soiffer RJ, Ryan BF, Sober AJ, Mihm MC, Tsao H, Langley RG *et al.* (2000): Adjuvant high-dose interferon alfa-2b in patients with high-risk melanoma. *Cancer J* 6: 139-145.
- Kannan S, Sutphin RM, Hall MG, Golfman LS, Fang W, Nolo RM, Akers LJ, Hammitt RA, McMurray JS, Kornblau SM *et al.* (2013): Notch activation inhibits AML growth and survival: a potential therapeutic approach. *J Exp Med* 210: 321-337.
- Kaur G, Stetler-Stevenson M, Sebers S, Worland P, Sedlacek H, Myers C, Czech J, Naik R, Sausville E (1992): Growth inhibition with reversible cell cycle arrest of carcinoma cells by flavone L86-8275. *J Natl Cancer Inst* 84: 1736-1740.
- Kerbel RS, Kamen BA (2004): The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 4: 423-436.
- Kitada S, Kress CL, Krajewska M, Jia L, Pellicchia M, Reed JC (2008): Bcl-2 antagonist apogossypol (NSC736630) displays single-agent activity in Bcl-2-transgenic mice and has superior efficacy with less toxicity compared with gossypol (NSC19048). *Blood* 111: 3211-3219.

- Kitada S, Leone M, Sareth S, Zhai D, Reed JC, Pellecchia M (2003): Discovery, characterization, and structure-activity relationships studies of proapoptotic polyphenols targeting B-cell lymphocyte/leukemia-2 proteins. *J Med Chem* 46: 4259-4264.
- Kobos R, Terry W (2015): Advances in therapies for non-Hodgkin lymphoma in children. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2015: 522-528.
- Kogoshi H, Sato T, Koyama T, Nara N, Tohda S (2007): Gamma-secretase inhibitors suppress the growth of leukemia and lymphoma cells. *Oncol Rep* 18 (1): 77-80.
- Kořen J, Trněný M (2015): Hodgkinův lymfom - vývoj léčebných přístupů a současné trendy. *Klin Onkol* 28 (3): 87-94.
- Kumar S, Vij R, Kaufman JL, Mikhael J, Facon T, Pegourie B, Benboubker L, Gasparetto C, Amiot M, Moreau P *et al.* (2016): Venetoclax monotherapy for relapsed/refractory multiple myeloma: safety and efficacy results from a phase I study. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*: abstract 488.
- Kumar SK, LaPlant B, Chng WJ, Zonder J, Callander N, Fonseca R, Fruth B, Roy V, Erlichman C, Stewart AK (2015): Dinaciclib, a novel CDK inhibitor, demonstrates encouraging single agent activity in patients with relapsed multiple myeloma. *Blood* 125 (3):443-448.
- Lam LT, Pickeral OK, Peng AC, Rosenwald A, Hurt EM, Giltnane JM, Averett LM, Zhao H, Davis RE, Sathyamoorthy M *et al.* (2001): Genomic-scale measurement of mRNA turnover and the mechanisms of action of the anti-cancer drug flavopiridol. *Genome Biol* 2 (10): RESEARCH0041.
- Le Tourneau C, Faivre S, Laurence V, Delbaldo C, Vera K, Girre V, Chiao J, Armour S, Frame S, Green SR *et al.* (2010): Phase I evaluation of seliciclib (R-roscovitine), a novel oral cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with advanced malignancies. *Eur J Cancer* 46 (18): 3243-3250.
- Lee S, Margolin K (2011): Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cancers* 3 (4): 3856-3893.
- Lee S-Y, Kumano K, Nakazaki K, Sanada M, Matsumoto A, Yamamoto G, Nannya Y, Suzuki R, Ota S, Ota Y *et al.* (2009): Gain-of-function mutations and copy number increases of Notch2 in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci* 100: 920-926.
- Levenson JD, Phillips DC, Mitten MJ, Boghaert ER, Diaz D, Tahir SK, Belmont LD, Nimmer P, Xiao Y, Ma XM *et al.* (2015): Exploiting selective BCL-2 family inhibitors to dissect cell survival dependencies and define improved strategies for cancer therapy. *Sci Transl Med* 7 (279): 279-340.
- Li L, Pongtornpipat P, Tiutan T, Kendrick SL, Park S, Persky DO, Rimsza LM, Puvvada SD, Schatz JH (2015): Synergistic induction of apoptosis in high-risk DLBCL by BCL2 inhibition with ABT-199 combined with pharmacologic loss of MCL1. *Leukemia* 29 (8): 1702-1712.
- Li ZM, Jiang WQ, Zhu ZY, Zhu XF, Zhou JM, Liu ZC, Yang DJ, Guang ZZ (2008): Synergistic cytotoxicity of Bcl-xL inhibitor, gossypol and chemotherapeutic agents in non-Hodgkin's lymphoma cells. *Cancer Biol Ther* 7: 51-60.
- Lin X, Morgan-Lappe S, Huang X, Li L, Zakula DM, Verneti LA, Fesik SW, Shen Y (2007): 'Seed' analysis of off-target siRNAs reveals an essential role of Mcl-1 in resistance to the small-molecule Bcl-2/Bcl-XL inhibitor ABT-737. *Oncogene* 26 (27): 3972-3979.
- Lipson EJ, Drake CG (2011): Ipilimumab, an anti-CTLA-4 antibody for metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 17: 6958-6962.
- Liu G, Gandara DR, Lara PN Jr, Raghavan D, Doroshow JH, Twardowski P, Wilding G (2004): A phase II trial of flavopiridol (NSC #649890): in patients with previously untreated metastatic androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 10, 924-928.
- Lobry C, Ntziachristos P, Ndiaye-Lobry D, Oh P, Cimmino L, Zhu N, Araldi E, Hu W, Freund J, Abdel-Wahab O *et al.* (2013): Notch pathway activation targets AML-initiating cell homeostasis and differentiation. *J Exp Med* 210: 301-319.

- Lu P (2005): Staging and classification of lymphoma. *Semin Nucl Med* 35: 160-164.
- MacCallum DE, Melville J, Frame S, Watt K, Anderson S, Gianella-Borradori A, Green SR (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 Res* 65, 5399-5407.
- Mahoney KM, Freeman GJ, McDermott DF (2015): The next immune-checkpoint inhibitors: PD-1/PD-L1 blockade in melanoma. *Clin Ther* 37: 764-782.
- Malecki MJ, Sanchez-Irizarry C, Mitchell JL, Histen G, Xu ML, Aster JC, Blacklow SC (2006): Leukemia-associated mutations within the NOTCH1 heterodimerization domain fall into at least two distinct mechanistic classes. *Mol Cell Biol* 26: 4642-4651.
- Malumbres M, Barbacid M (2001): To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 1: 222-231.
- Malumbres M, Barbacid M (2005): Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 30: 630-641.
- Maly J, Alinari L (2016): Pembrolizumab in classical Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol* 97 (3): 219-227.
- Marcus R (2005): Use of 90Y-ibritumomab tiuxetan in non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Oncol* 32(1):36-43.
- McClue SJ, Blake D, Clarke R, Cowan A, Cummings L, Fischer PM, MacKenzie M, Melville J, Stewart K, Wang S *et al.* (2002): *In vitro* and *in vivo* antitumor properties of the cyclin dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovotine): *Int J Cancer* 102: 463-468.
- Meijer L, Borgne A, Mulner O, Chong JP, Blow JJ, Inagaki N, Inagaki M, Delcros JG, Moulinoux JP (1997): Biochemical and cellular effects of roscovotine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem* 243 (1-2): 527-536.
- Meng Y, Li Y, Li J, Li H, Fu J, Liu Y, Liu H, Chen X (2007): Gossypol and its combination with imatinib induce apoptosis in human chronic myeloid leukemic cells. *Leuk Lymphoma* 48: 2204-2212.
- Mita MM, Joy AA, Mita A, Sankhala K, Jou Y-M, Zhang D, Statkevich P, Zhu Y, Yao S-L, Small K *et al.* (2014): Randomized phase II trial of the cyclindependent kinase inhibitor dinaciclib (MK-7965) versus capecitabine in patients with advanced breast cancer. *Clin Breast Cancer* 14: 169-176.
- Mohamed AJ, Yu L, Backesjo CM, Vargas L, Faryal R, Aints A, Christensson B, Berglof A, Vihinen M, Nore BF *et al.* (2009): Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. *Immunol Rev* 228 (1): 58-73.
- Mohammad RM, Wang S, Aboukameel A, Chen B, Wu X, Chen J, Al-Katib A (2005): Preclinical studies of a nonpeptidic small-molecule inhibitor of Bcl-2 and Bcl-X (L) [(-)-gossypol] against diffuse large cell lymphoma. *Mol Cancer Ther* 4 (1): 13-21.
- Morgan TH (1917): The Theory of the Gene. *The American Naturalist*; 51: 513-544.
- Moskowitz CH, Ribrag V, Michot J-M, Martinelli G, Zinzani PL, Gutierrez M, De Maeyer D, Jacob AG, Giallella K, Anderson JW *et al.* (2014): PD-1 blockade with the monoclonal antibody pembrolizumab (MK-3475) in patients with classical hodgkin lymphoma after brentuximab vedotin failure: preliminary results from a phase 1b study (KEYNOTE-013). *Blood* 124: Abstract 209.
- Mosmann T (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65 (1-2): 55-63.
- Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL *et al.* (1996): X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381 (6580): 335-341.
- Musselman DL, Lawson DH, Gumnick JF, Manatunga AK, Penna S, Goodkin RS, Greiner K, Nemeroff CB, Miller AH (2001): Paroxetine for the prevention of depression induced by high-dose interferon alfa. *N Engl J Med* 344: 961-966.

- Nemunaitis JJ, Small KA, Kirschmeier P, Zhang D, Zhu Y, Jou YM, Statkevich P, Yao SL, Bannerji R (2013): A first-in-human, phase I, dose-escalation study of dinaciclib, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, administered weekly in subjects with advanced malignancies. *J Transl Med* 11: 259.
- Nguyen M, Marcellus RC, Roulston A, Watson M, Serfass L, Murthy Madiraju SR, Goulet D, Viallet J, Bélec L, Billot X *et al.* (2007): Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (49): 19512-19517.
- Novero A, Ravella PM, Chen Y, Dous G, Liu D. (2014): Ibrutinib for B cell malignancies. *Exp Hematol Oncol* 3: 4-11.
- O'Brien S, Moore JO, Boyd TE, Larratt LM, Skotnicki AB, Koziner B, Chanan-Khan AA, Seymour JF, Gribben J, Itri LM *et al.* (2009): 5-year survival in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia in a randomized, phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen. *J Clin Oncol* 27: 5208-5212.
- O'Brien SM, Cunningham CC, Golenkov AK, Turkina AG, Novick SC, Rai KR (2005): Phase I to II multicenter study of oblimersen sodium, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 23: 7697-7702.
- O'Day SJ, Hamid O, Urba WJ (2007): Targeting cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4): A novel strategy for the treatment of melanoma and other malignancies. *Cancer* 110: 2614-2627.
- O'Steen S, Green DJ, Gopal AK, Orozco JJ, Kenoyer AL, Lin Y, Wilbur DS, Hamlin DK, Fisher DR, Hyalarides MD *et al.* (2017): Venetoclax Synergizes with Radiotherapy for Treatment of B-cell Lymphomas. *Cancer Res* 77 (14): 3885-3893.
- Opydo-Chanek M, Gonzalo O, Marzo I (2017): Multifaceted anticancer activity of BH3 mimetics: Current evidence and future prospects. *Biochem Pharmacol* 136: 12-23.
- Otto T, Sicinski P (2017): Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 17 (2): 93-115.
- Pan Q, Sathe A, Black PC, Goebell PJ, Kamat AM, Schmitz-Draeger B, Nawroth R (2017): CDK4/6 Inhibitors in Cancer Therapy: A Novel Treatment Strategy for Bladder Cancer. *Bladder Cancer* 3(2): 79-88.
- Pan R, Hogdal LJ, Benito JM, Bucci D, Han L, Borthakur G, Cortes J, DeAngelo DJ, Debose L, Mu H *et al.* (2014): Selective BCL-2 inhibition by ABT-199 causes on-target cell death in acute myeloid leukemia. *Cancer Discov* 4 (3): 362-375.
- Pan Z, Scheerens H, Li SJ, Schultz BE, Sprengeler PA, Burrill LC, Mendonca RV, Sweeney MD, Scott KC, Grothaus PG *et al.* (2007): Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase. *Chem Med Chem* 2 (1): 58-61.
- Pandey MK, Gowda K, Doi K, Sharma AK, Wang H-G, Amin S (2013): Proteasomal degradation of Mcl-1 by maritoclax induces apoptosis and enhances the efficacy of ABT-737 in melanoma cells. *PLoS ONE* 8 (11): e78570.
- Papajík T, Ráida L, Indrák K (2005): REAL/WHO klasifikace nádorů lymfatické tkáni: 10 let fungování společného jazyka z pohledu klinické praxe. *Vnitř lék* 51: 690-698.
- Parry D, Guzi T, Shanahan F, Davis N, Prabhavalkar, D, Wiswell D, Seghezzi W, Paruch K, Dwyer MP, Doll R *et al.* (2010): Dinaciclib (SCH 727965), a novel and potent cyclin-dependent kinase inhibitor. *Mol Canc Therapeut* 9: 2344-2353.
- Pepper C, Thomas A, Hoy T, Fegan C, Bentley P (2001): Flavopiridol circumvents Bcl-2 family mediated inhibition of apoptosis and drug resistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 114 (1): 70-77.
- Purow B (2012): Notch inhibition as a promising new approach to cancer therapy. *Adv Exp Med Biol* 727: 305-319.

- Ramanarayanan J, Hernandez-Ilizaliturri FJ, Chanan-Khan A, Czuczman MS (2004): Pro-apoptotic therapy with the oligonucleotide Genasense (oblimersen sodium) targeting Bcl-2 protein expression enhances the biological anti-tumour activity of rituximab. *Br J Haematol* 127: 519-530.
- Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, Kipps TJ, Anderson MA, Brown JR, Gressick L *et al.* (2016): Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 374 (4): 311-322.
- Roberts AW, Seymour JF, Brown JR, Wierda WG, Kipps TJ, Khaw SL, Carney DA, He SZ, Huang DC, Xiong H *et al.* (2012): Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *J Clin Oncol* 30: 488-496.
- Roskoski R Jr (2016): Cyclin-dependent protein kinase inhibitors including palbociclib as anticancer drugs. *Pharmacol Res* 107: 249-275.
- Sanchez-Martinez C, Gelbert LM, Lallena MJ, de Dios A (2015): Cyclin dependent kinase (CDK): inhibitors as anticancer drugs. *Bioorg Med Chem Lett* 25 (17):3420-3435.
- Scapin G, Yang X, Prosser WW, McCoy M, Reichert P, Johnston JM, Kashi RS, Strickland C (2015): Structure of full-length human anti-PD1 therapeutic IgG4 antibody pembrolizumab. *Nat Struct Mol Biol* 22: 953-958.
- Senter PD, Sievers EL (2012): The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma. *Nat Biotechnol* 30: 631-637.
- Shelley MD, Hartley L, Groundwater PW, Fish RG (2000): Structure-activity studies on gossypol in tumor cell lines. *Anti-cancer drugs* 11: 209-216.
- Schlagbauer-Wadl H, Klosner G, Heere-Ress E, Waltering S, Moll I, Wolff K, Pehamberger H, Jansen B (2000): Bcl-2 antisense oligonucleotides (G3139) inhibit Merkel cell carcinoma growth in SCID mice. *J Invest Dermatol* 114 (4): 725-730.
- Schoenborn JR, Wilson CB (2007): Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* 96: 41-101.
- Schoenwaelder SM, Jarman KE, Gardiner EE, Hua M, Qiao J, White MJ, Josefsson EC, Alwis I, Ono A, Willcox A *et al.* (2011): Bcl-xL-inhibitory BH3 mimetics can induce a transient thrombocytopenia that undermines the hemostatic function of platelets. *Blood* 118 (6): 1663-1674.
- Schwartz GK, Ilson D, Saltz L, O'Reilly E, Tong W, Maslak P, Werner J, Perkins P, Stoltz M, Kelsen D (2001): Phase II study of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol administered to patients with advanced gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 19 (7): 1985-1992.
- Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, Dayton BD, Ding H, Enschede SH, Fairbrother WJ *et al.* (2013): ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med* 19 (2): 202-208.
- Stephenson JJ, Nemunaitis J, Joy AA, Martin JC, Jou Y-M, Zhang D, Statkevich P, Yao S-L, Zhu Y, Zhou H, (2014): Randomized phase 2 study of the cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib (MK-7965): versus erlotinib in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 83: 219-223.
- Tahir SK, Yang X, Anderson MG, Morgan-Lappe SE, Sarthy AV, Chen J, Warner RB, Ng SC, Fesik SW, Elmore SW *et al.* (2007): Influence of Bcl-2 family members on the cellular response of small-cell lung cancer cell lines to ABT-737. *Cancer Res* 67 (3): 1176-1183.
- Thomas S, Quinn BA, Das SK, Dash R, Emdad L, Dasgupta S, Wang XY, Dent P, Reed JC, Pellecchia M *et al.* (2013): Targeting the Bcl-2 family for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*; 17: 61-75.
- Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, Anderson MG, Chen J, Jin S, Johnson EF, Marsh KC, Mitten MJ, Nimmer P *et al.* (2008): ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res* 68 (9): 3421-3428.

- Tsujiimoto Y (1998): Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells* 11: 697-707.
- Varadarajan S, Poornima P, Milani M, Gowda K, Amin S, Wang HG, Cohen GM (2015): Maritoclax and dinaciclib inhibit MCL-1 activity and induce apoptosis in both a MCL-1-dependent and -independent manner. *Oncotarget* 6 (14): 12668-12681.
- Vogler M (2014): Targeting BCL2-Proteins for the Treatment of Solid Tumours. *Adv Med* 2014: 943648.
- Vogler M, Furdas SD, Jung M, Kuwana T, Dyer MJ, Cohen GM (2010): Diminished sensitivity of chronic lymphocytic leukemia cells to ABT-737 and ABT-263 due to albumin binding in blood. *Clin Cancer Res* 16 (16): 4217-4225.
- Vogler M, Walter HS, Dyer MJS (2017): Targeting anti-apoptotic BCL2 family proteins in haematological malignancies - from pathogenesis to treatment. *Br J Haematol* 178 (3): 364-379.
- Vogler M, Weber K, Dinsdale D, Schmitz I, Schulze-Osthoff K, Dyer MJ, Cohen GM (2009): Different forms of cell death induced by putative BCL2 inhibitors. *Cell Death Differ* 16 (7):1030-1039.
- Wang ML, Rule S, Martin P, Goy A, Auer R, Kahl BS, Jurczak W, Advani RH, Romaguera JE, Williams ME *et al.* (2013): Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med* 369: 507-516.
- Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP IV, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, Blacklow SC, Look AT, Aster JC (2004): Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 306: 269-271.
- Whittaker SR, Te Poele RH, Chan F, Linardopoulos S, Walton MI, Garrett MD, Workman P (2007): The cyclin-dependent kinase inhibitor seliciclib (R-roscovitine;CYC202) decreases the expression of mitotic control genes and prevents entry into mitosis. *Cell Cycle* 6: 3114-3131.
- Whittaker SR, Walton MI, Garrett MD, Workman P (2004): The Cyclin-dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine): inhibits retinoblastoma protein phosphorylation, causes loss of Cyclin D1, and activates the mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Res* 64: 262-272.
- Willander K, Dutta RK, Ungerback J, Gunnarsson R, Juliusson G, Fredrikson M, Linderholm M, Soderkvist P (2013): NOTCH1 mutations influence survival in chronic lymphocytic leukemia patients. *BMC Cancer* 13: 274.
- Willis RA (1948): Tumours of lymphoid tissue. In: Willis RA (ed): *Pathology of tumours*. St. Louis: Mosby.
- Wilson WH, Young RM, Schmitz R, Yang Y, Pittaluga S, Wright G, Lih CJ, Williams PM, Shaffer AL, Gerecitano J *et al.* (2015): Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nat Med* 21: 922-926.
- Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, Lesokhin AM, Segal NH, Ariyan CE, Gordon RA, Reed K *et al.* (2013): Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 369: 122-133.
- Ye BH, Rao PH, Chaganti RSK, Dalla-Favera R (1993): Cloning of bcl-6, the locus involved in chromosome translocations affecting band 3q27 in B-cell lymphomas. *Cancer Res* 53: 2732-2735.
- Younes A, Connors JM, Park SI, Fanale M, O'Meara MM, Hunder NN, Huebner D, Ansell SM (2013): Brentuximab vedotin combined with ABVD or AVD for patients with newly diagnosed Hodgkin's lymphoma: a phase 1, open-label, dose-escalation study. *Lancet Oncol* 14 (13): 1348-1356.
- Younes A, Thieblemont C, Morschhauser F, Flinn I, Friedberg JW, Amorim S, Hivert B, Westin J, Vermeulen J, Bandyopadhyay N *et al.* (2014): Combination of ibrutinib with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (RCHOP): for treatment-naïve patients with CD20-positive B-cell non-Hodgkin lymphoma: a non-randomised, phase 1b study. *Lancet Oncol* 15: 1019-1026.

Young RM, Staudt LM. (2013): Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. Nat Rev Drug Discov 12: 229-243.

Zhai D, Jin C, Satterthwait AC, Reed JC (2006): Comparison of chemical inhibitors of antiapoptotic Bcl-2-family proteins. Cell Death Differ 13: 1419-1421.