

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra anorganické chemie



Deriváty 2,4-diaminopyrimidinu jako ligandy v komplexních
sloučeninách přechodných kovů

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:
Studijní obor:

Bc. Roman Iliev
Chemie pro víceoborové studium - biologie

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Radka Křikavová, Ph.D

Olomouc 2015

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci sepsal samostatně pod odborným vedením Mgr. Radky Křikavové, Ph.D. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry anorganické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Vlastnoruční podpis

Chtěl bych tímto upřímně poděkovat vedoucí diplomové práce Mgr. Radce Křikavové, Ph.D., která mi poskytla cenné rady a kritické připomínky při jejím řešení a také za naměření NMR spekter. Dále bych chtěl poděkovat Pavle Richterové za provedení elementární analýzy, Mgr. Jakubu Hutyrovi za provedení termické analýzy, RNDr. Bohuslavu Drahošovi, Ph.D. za změření MS spekter a Mgr. Aleně Klanicové, Ph.D. za naměření IR spekter.

Obsah

1. ÚVOD.....	- 1 -
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	- 3 -
2.1 Buněčný cyklus	- 3 -
2.1.1 Interfáze	- 4 -
2.1.2 Mitóza	- 5 -
2.1.2.1 Profáze.....	- 6 -
2.1.2.2 Prometafáze.....	- 6 -
2.1.2.3 Metafáze	- 7 -
2.1.2.4 Anafáze.....	- 7 -
2.1.2.5 Telofáze.....	- 8 -
2.1.3 Cytokineze	- 8 -
2.2 Regulace buněčného cyklu	- 9 -
2.2.1 Cyklin-dependentní kinázy	- 10 -
2.2.2 Cykliny v průběhu cyklu.....	- 11 -
2.2.3 Kontrolní bod G1	- 12 -
2.2.4 Kontrolní bod G2	- 13 -
2.3 Vztah mezi strukturou a funkcí	- 14 -
2.4 Inhibitory cyklin-dependentních kináz.....	- 15 -
2.4.1 Vlastnosti inhibitorů	- 16 -
2.4.2 Endogenní inhibitory	- 17 -
2.4.3 Vybrané příklady inhibitorů.....	- 17 -
2.5 Mechanismy zastavení buněčného cyklu	- 19 -
2.5.1 Blokace transkripce.....	- 19 -
2.5.2 Úloha retinoblastomového proteinu.....	- 20 -
2.5.3 Vztah p53 k defektním buňkám.....	- 20 -
2.5.4 Vyřazení fosfatáz aktivujících Cdk.....	- 22 -
2.6 Význam modulace struktury.....	- 22 -
2.7 Pyrimidinové inhibitory.....	- 24 -
2.8 Rhodium, iridium a jejich „half-sandwich“ komplexy.....	- 27 -
5. ZÁVĚR.....	- 33 -
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	- 34 -

1. Úvod

Mechanismus zástavení dělení rakovinných buněk je často vysvětlován interakcí metalofarmaka s nukleobázemi DNA, čímž je blokována replikace a následně vyvolána apoptotická dráha končící sebedestrukci zasažených buněk. Přestože jsou léčiva s antiproliferačními účinky na bázi komplexů platiny stále nejpoužívanější, ubírá se výzkum na vývoj jiné kategorie léčiv, u kterých by byly minimalizovány vedlejší nežádoucí účinky (např. nefrotoxicita nebo neurotoxicita) či buněčná rezistence jako v případě *cis*-platnatých léčiv. Výzkum je soustředěn i na rozšíření aplikačního pole působnosti látek (testování na mnoha typech nádorových linií). [1, 2]

Pravděpodobně jeden z možných terapeutických cílů nových potenciálních metaloterapeutik, je podobně jako u *cis*-Pt(II) léčiv DNA. V současnosti studovaná třída chemických sloučenin, tzv. „half-sandwich“ komplexy, ovšem může ovlivnit i jiné biologické procesy, což může mít za důsledek jiný mechanismus účinku. Přestože je mediální chemie těchto látek na počátku své potenciální éry, již přinesla pozitivní výsledky cytotoxických studií na velkém počtu studovaných nádorových linií. Kromě interakce s bázemi DNA jsou studovány tzv. interkalační mechanismy (vmezeření mezi báze DNA) nebo např. vznik reaktivního singletového kyslíku (vyvolání buněčného stresu nádorových buněk). Cílem studia jsou strukturální parametry těchto komplexů, které ovlivňují cytotoxický účinek a jejich cílená modifikace. Široký aplikační potenciál a poměrně nízké cytotoxické koncentrace posouvají tento typ komplexních sloučenin do popředí zájmů. [3-8]

Buněčnou smrt je také možné vyvolat signální drahou spojenou s vyřazením enzymů, které mají na starost regulaci buněčného cyklu. Enzymy, které řídí kontrolní a proliferační mechanismy dělení, tzv. cyklin-dependentní kinázy (Cdk), jsou jedním z dalších studovaných terapeutických cílů. Inhibicí Cdk je možno docílit zastavení buněčného cyklu. Výzkum, který se věnuje tomuto antiproliferačnímu mechanismu přináší pozitivní výsledky testováním jak přírodních, tak syntetických látek. Bioisostericou metodou jsou vyvíjeny strukturální motivy, u kterých je snaha zvýšit cytotoxický účinek modulací struktury sloučenin. [9-15]

Cílem diplomové práce je vypracovat literární rešerši týkající se buněčného dělení, vlastností a účinků Cdk. Rešerše se dále zabývá strukturálními parametry inhibitorů Cdk, mechanismu jejich účinků a celkovému dopadu inhibice Cdk na proces buněčného dělení. Součástí teoretické části jsou informace týkající se vybrané skupiny Cdk inhibitorů:

pyrimidinových Cdk inhibitorů s důrazem na strukturní parametry, které úzce souvisí s biologickou aktivitou. Literární rešerše se zaměřila také na polosendvičové komplexy rhodia a iridia jako nových potenciálních léčiv proti rakovině, jejich strukturním parametrům a studiu vztahu mezi strukturou a antiproliferační aktivitou.

Experimentální část je věnována přípravě 2,6-diamino-4-*R*-pyrimidinovým derivátům a následné syntéze polosendvičových komplexů obecného složení [Cp*MLCl₂], kde M je Ir(III) nebo Rh(III). Cílem bylo zjistit, zda a jak se připravené ligandy vážou na atom zvolených přechodných kovů. Připravené organické ligandy a komplexní sloučeniny byly charakterizovány metodami elementární analýzy, hmotnostní spektrometrií, infračervenou spektroskopií, nukleární magnetickou rezonancí, termickou analýzou a vodivostním měřením. Pro přehled jsou níže uvedeny cíle diplomové práce v bodech:

- a) Vypracovat literární rešerši týkající se problematiky buněčného cyklu, role cyklin-dependentních kináz (Cdk) a jejich inhibitorů, derivátů pyrimidinu jako inhibitorů Cdk.
- b) S využitím odborných literárních zdrojů syntetizovat organické ligandy na bázi derivátů 2,4-diaminopyrimidinu.
- c) Připravené organické látky použít pro syntézu komplexních sloučenin vybraných přechodných kovů (Rh, Ir).
- d) Získané látky charakterizovat dostupnými metodami a data interpretovat.

2. Teoretická část

Obecná definice buňky, jako základního stavebního kamene živých organismů, je již dávno zažitá. Důmyslně propracovaný prostor využívající kaskády funkčně na sebe navazujících procesů (např. zastavení buněčného cyklu či blokaci replikace DNA), vyzdvihuje buňku do vyšší sféry bádání. Jako základní kámen s sebou nese rozmanité vlastnosti, které jsou pro mnohé typy buněk podobné. Především schopnost rozmnožování, čili předání vlastní genetické informace následující generaci. [16, 17]

2.1 Buněčný cyklus

Omnis cellula e cellula neboli „buňky vznikají jen z buňky“. Tak zní doplnění dlouho vyvíjené a uznávané buněčné teorie Rudolfem Virchowem, podle které jsou všechny organismy tvořeny buňkami. Buňky jsou si chemickým složením velmi blízké, což vede myšlenky směrem k prapůvodní buňce, kdy opakovaným dělením se po generace vyvíjely nové různě kombinované genotypy odrážející se navenek odlišnými fenotypy. Dle této doktríny každá buňka tedy vzniká dělením mateřské buňky. Komplexní systém buněk (organismus) funguje na základě vzájemné interakce specializovaného množství typů buněk, jejichž výsledná spolupráce uvádí v chod celý živý organismus. [16-18]

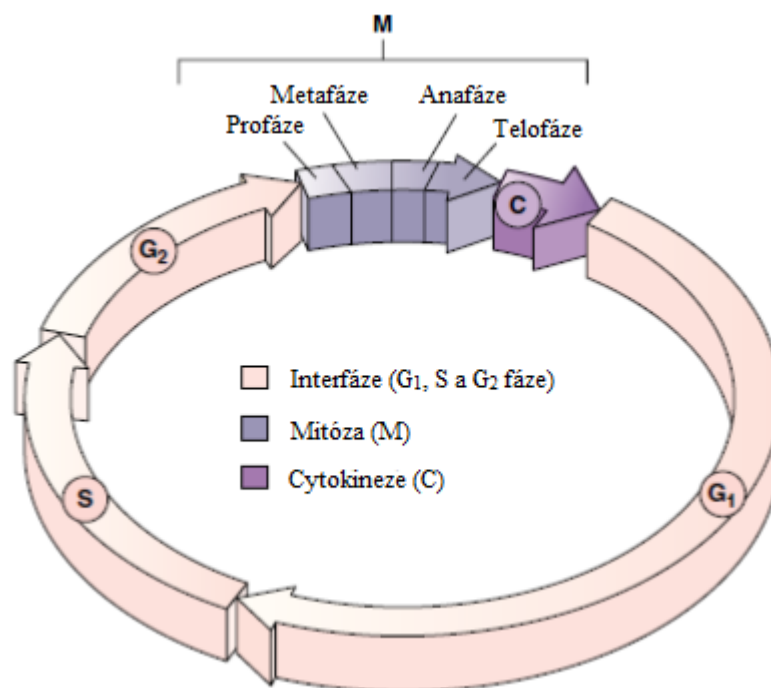
Jednou z nejzákladnějších vlastností buňky je schopnost rozmnožování (buněčného dělení). Nejdůležitějším úkolem buněk je prostřednictvím buněčného cyklu zkopírovat veškerou genetickou informaci a předat ji následující generaci.

Buněčný cyklus (Obr. č. 1) je uspořádaný sled pečlivě kontrolovaných akcí, které ve výsledku dávají vznik nové populaci buněk. S ohledem na širokou škálu typů buněk je třeba brát v potaz i odlišnou dobu trvání či četnost buněčných cyklů, které mohou probíhat. Veškeré tyto informace jsou zašifrovány v DNA jednotlivých buněk. Jako názorný příklad poslouží epitelové buňky výstelky tenkého střeva, které se rozdělí minimálně jedenkrát za den. Oproti tomu nervové a svalové buňky se nedělí. Různé typy buněk mají fixovány genetické informace v DNA, ovšem pod jinými kódy, které z nich dělají unikátní základní stavební a morfologicky odlišné kameny. [16-19]

2.1.1 Interfáze

Dělení buněk vyžaduje určité požadavky na dostatek materiálů pro replikaci jednotlivých komponent buňky. Většina času buněčného cyklu je soustředěna do tzv. interfáze, kdy se buňka nedělí, ale roste. Duplikuje se její obsah a celkově se zvětšuje její objem. Tento úsek znázorněný na Obr. č. 1 je obdobím, kdy materiál nutný pro replikaci a syntézu jaderné DNA a veškerých komponent, je buněčnými mechanismy organizovaným způsobem využíván.

Součástí buněčného cyklu jsou kontrolní body nacházející se na rozhraní fází. G1/S bod kontroluje, zda je buňka ve stavu schopném iniciovat replikaci DNA v S-fázi a G2/M bod, který je lokalizován před vlastními mechanismy mitózy. Níže budou popsány jednotlivé úseky podrobněji. [16-19]



Obr. č. 1: Buněčný cyklus. Většinu času je buňka v tzv. interfázi (G₁, S a G₂ fáze), během které roste, zmnožuje organely a replikuje svou DNA. Poměrně kratší časový interval zabírá mitóza neboli jaderné dělení. Posledním krokem je rozdělení na dvě mateřské buňky, tzv. cytokineze. [19]

Při popisu částí cyklu bude nejvhodnější začít bodem, kdy se buňka právě rozdělila. Nacházíme se tedy nyní za bodem C (cytokineze; rozdělení mateřské buňky na dvě dceřině). Následujícím obdobím je G₁ fáze, během které dorůstá dceřiná buňka do velikosti buňky mateřské. Zděděné komponenty, které byly předány ve formě rozložených částí, jsou zde

sestavovány do funkční podoby, které dále mají za úkol syntetizovat řadu regulačních a strukturních proteinů, včetně enzymů a dalších důležitých částí. Příznivé podmínky a vhodné působení okolních růstových faktorů dovolí buňce projít kontrolním G1 bodem a vstoupit do S-fáze. Jinou možností je vstup do tzv. klidového stádia (G0), kdy se buňka nedělí.

V případě, že je dovoleno postoupit přes kontrolní body G1 fáze, cyklus se nyní nachází v replikační části cyklu, kdy je zmnožen obsah DNA (tzv. S-fáze). I zde je pečlivě kontrolována správnost a úplnost replikačních kroků specializovanými komplexy, jimž bude věnována samostatná kapitola. Ve chvíli, kdy je ukončena kontrola replikace, posouváme se do fáze G2.

Obdobně jako v G1-fázi, i zde probíhá dále růst buňky a duplikace zbývajících organel. Pojmy G1 a G2 fáze si zjednodušeně představme jako časové intervaly, které jsou v podstatě určeny pro buňku jako nadstandardní. Jak již bylo zmíněno, právě tyto části interfáze bývají mnohdy časově nejnáročnější. Postupným dovršením veškerých genetických prepisů, různých syntéz a zvětšování objemu buňky se postupně chýlíme ke konci G2-fáze, pro kterou je typická kondenzace duplikované DNA do formy chromozomů, které lze v této formě pozorovat i světelným mikroskopem. Fází G2 končí interfázni část buněčného cyklu. Finální oddíl cyklu zaujímá tzv. M-fáze (mitotická). [16-19]

2.1.2 Mitóza

Stěžejním cílem mitózy (Obr. č. 2), jaderného dělení, je vytvoření dvou geneticky identických kopií mateřské buňky (do jádra dceřiné buňky jsou přesně rozděleny zdvojené chromozomy). Jelikož je jaderný genom (celá genetická informace buňky) rozložen mezi určitý počet chromozomů, je nutné, aby rozdělení bylo striktně přesné. Jednodušší organely opatřené např. jen membránou mohou být duplikovány vcelku. Komplikovanější organely, jako Golgiho systém či endoplazmatické retikulum, jsou nuceny podstoupit fragmentaci na menší částice, které v této podobě zvyšují šanci na rovnoměrnější rozdělení mezi dceřiné buňky. [16-21]

Mateřská buňka na konci S-fáze má již zmnoženy jednodušší organely, komplexně složitější organely jsou rozloženy na menší oddíly, mimo jádro je zdvojena centrální jednotka mikrotubulární sítě – centrozom – ze které vybíhají svazky mikrotubulárních vláken. Centrozomy, původně lokalizované u jednoho jádra, hrají důležitou roli během transportu organel a sesterských chromatid při dělení jádra. Jako počátek mitózy se označuje zviditelnění DNA do podoby kondenzovaných chromozomů. Kondenzací DNA je sice znemožněna

transkripce genů, zvýhodněný je ovšem transport a distribuce jaderného genomu v podobě chromozomů prostřednictvím mikrotubulů mitotického vřeténka. [16-21]

Obecně je mitóza dělena na 5 dílčích kroků, které budou popsány podrobněji níže.

2.1.2.1 Profáze

Počátkem úvodní fáze mitózy jsou dva centrozomy, lokalizované původně v blízkosti původního jádra, postupně směřovány k opačným pólům buňky. Centrozomy jsou zmnoženy již koncem S-fáze. Jedná se o centrální organely cytoskeletu, ze kterých vybíhají svazky mikrotubulů, které v závislosti na kolísání mezi přidáváním a odbouráváním tubulinových jednotek, mění svoji orientaci a délku v prostoru buňky. Prostřednictvím proteinů jsou centrozomy podél mikrotubulů přesunuty každý zvlášť k pólům buňky; pohyb je realizován asociovanými proteiny centrozomů, které jsou poháněny hydrolýzou energetické molekuly ATP. Vznikají tak tzv. póly mitotického vřeténka. Svazky mikrotubulů interagují za vzniku mitotického vřeténka.

Jaderný genom, v interfázi rozvolněná DNA, je po replikaci ve formě chromozomů, které jsou tvořeny stejnými (sesterskými) chromatidami. Chromatidy jsou vnitřně spojeny pomocí proteinů. V pozdní profázi jsou z vnější strany každé sesterské chromatidy v oblasti centromery (speciální sekvence DNA chromozomu, zúžené místo) uspořádány unikátní proteinové komplexy do podoby tzv. kinetochoru, na které se poté vážou tubulinová vlákna vedoucí z centrozomu. [16-21]

2.1.2.2 Prometafáze

Lamina jaderného obalu, která se nachází pod vnitřní jadernou membránou, je tvořena sítí intermediálních filament. Její funkce je především stabilizace jaderného obalu. Procesem fosforylace jaderné laminy je vyvolána její depolymerizace, která má za následek rozpad struktur tvořících jaderný obal včetně jaderných pórů. Finální produkty rozpadu jsou uzavřeny ve váčcích a volně rozptýleny v cytosolu.

Nyní jsou replikované chromozomy zpřístupněny mikrotubulům dělicího vřeténka, které se mohou pomocí kinetochorových mikrotubulů navázat na specializované proteinové komplexy – kinetochory (dva na jednom chromozomu). Sesterské chromatidy, které jsou z vnitřní strany stále spojeny jinými proteiny, jsou připojeny k oběma pólům dělicího vřeténka ze strany vnější. [18-21]

2.1.2.3 Metafáze

Pravděpodobně kombinací pohybů mikrotubulárních motorových proteinů (poháněny hydrolýzou ATP) a polymerací/depolymerizací tubulinových podjednotek svazků vřeténka je umožněn pohyb napojených chromozomů směrem do poloviční vzdálenosti od obou pólů vřeténka (centrozomů). Vytvářejí tak charakteristický útvar typický pro metafázi, a to tzv. metafázovou destičku. Neustálým pohybem je upravována jejich poloha až do doby, kdy jsou chromozomy srovnány do ekvatoriální roviny, která je kolmá na centrum mitotického vřeténka. [18-21]

2.1.2.4 Anafáze

Chromozomy stabilizované mitotickým vřeténkem, resp. párovými kinetochorovými mikrotubuly, jsou stále srovnány v ekvatoriální rovině. Jelikož jsou sesterské chromatidy spojeny po celé délce proteinovými interakcemi, je třeba je rozdělit. Spojení je rozrušeno aktivními proteolytickými enzymy. Uvolňují se tak samostatné dceřiné chromozomy, které jsou synchronizovaně taženy směrem k pólům buňky.

Segregace (pohyb) dceřiných chromozomů se děje dvěma způsoby:

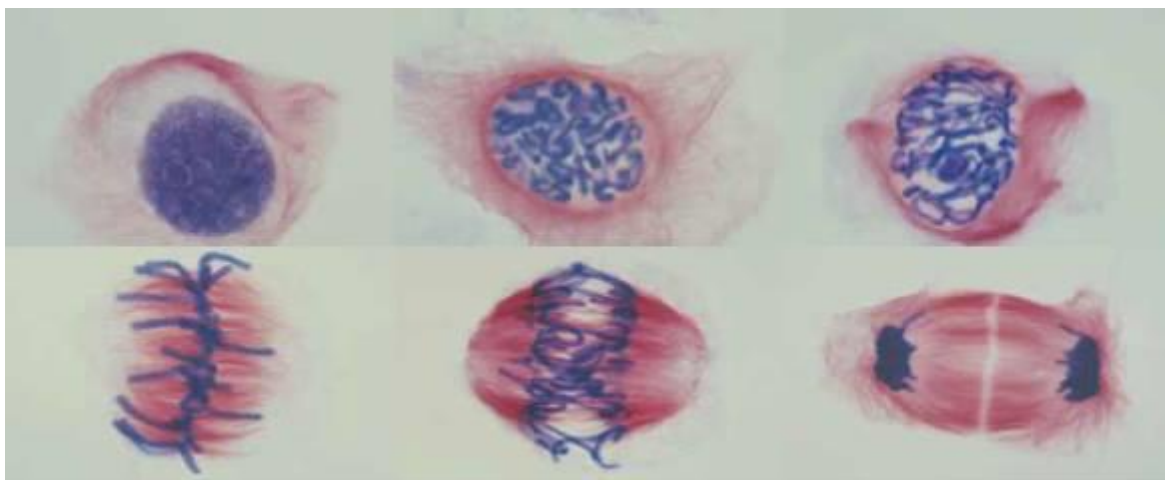
- a) Anafáze A: Na kinetochorovém konci mikrotubulů dochází k částečné depolymerizaci. Zkracováním vedoucího vlákna ztrátou tubulinových podjednotek spojením s prací mikrotubulárních motorových proteinů na kinetochoru jsou dceřiné chromozomy od sebe oddalovány směrem k jednotlivým centrozomům. Pohyb je možný také napojením chromozomu přímo na motorové proteiny kinetochoru, které se posunují podél kinetochorového svazku.
- b) Anafáze B: Vzdalování pólů mitotického vřeténka je možné tehdy, dochází-li na volných koncích polárních mikrotubulů k polymeraci. Posun pólů urychluje segregaci chromozomů.

Anafáze A a B jsou pohyby probíhající prakticky současně. Postupnou ztrátou tubulinových podjednotek s příspěvkem zároveň se oddalujících pólů mitotického vřeténka je urychlena segregace dceřiných chromozomů. Konec anafáze je charakterizován kompletním rozdělením chromozomů na stejné skupiny, ovšem každá je soustředěna na opačné straně buňky. [18-21]

2.1.2.5 Telofáze

Kolem každého pólu mitotického vřeténka je shromážděna sada dceřiných chromozomů. Telofáze je částí mitózy, kdy se vytváří kolem budoucích jader jaderný obal. V podstatě se jedná o obrácený postup, který proběhl během prometafáze.

Rozptýlené membránové váčky obsahující části jaderné membrány se v první fázi shlukují kolem chromozomu. Pro připomenutí: v prometafázi byly pomocí kináz fosforylovány části membrány, tzv. laminy. Tím byla vyvolána depolymerizace a celkový rozpad jaderné membrány. Během telofáze nastupují na scénu jiné enzymy, tzv. fosfatázy, které hydrolyticky odstraňují fosforylové skupiny z těchto váček, přesněji z lamin. Výsledkem je fúze těchto váček, které postupně vytvářejí nový jaderný obal: vnější a vnitřní jaderný obal, který je z vnitřní strany vyztužen intermediálními filamenty (laminami). Komunikace jádra je zajištěna jadernými póry, skrz které pronikají proteiny a jiné látky podporující růst jádra. Poslední část připadá na dekonenzaci chromozomů, které se tímto způsobem stávají interfázni jadernou hmotou. V této podobě je možná obnova transkripce DNA. [18-21]



Obr. č. 2: Fáze mitózy. Levý horní obrázek znázorňuje interfázi, pro kterou je charakteristická dekonenzovaná DNA. Vedlejší fáze se nazývá prometafáze (začátek kondenzace DNA do podoby chromozomů). V profázi je rozložen jaderný obal a chromozomy jsou zpřístupněny mikrotubulárnímu aparátu. Následuje metafázní srovnání do ekvatoriální polohy. Během anafáze jsou kombinovanými pohyby od sebe odděleny sesterské chromatidy. Ve finální telofázi dochází k vytvoření nových jaderných obalů a dekonenzaci chromozomů. [20]

2.1.3 Cytokineze

Posledním krokem je rovnoměrná distribuce veškerého materiálu dceřiným buňkám. Proces cytokineze (rozdělení cytoplasmy mateřské buňky) je finální fází před přechodem buněk do interfáze. Cytoskelet, proteiny, orgány, membrány a rozložené části složitějších struktur jsou rozděleny následujícím způsobem.

Pod cytoplazmatickou membránou jsou z vnitřní strany situovány proteiny, které jsou asociovány s aktinovými a myozinovými vlákny. Probíhají kolmo kolem dělicího vřeténka. Přejídná struktura – mitotické vřeténko – má kromě segregace chromozomů další neméně důležitou funkci. Určuje totiž pozici rýhovacího žlábků, který vzniká postupnou kontrakcí aktinových a myozinových vláken. Kruhová síť vláken – tzv. kontraktilní prstenec – se pohybem aktinových a myozinových vláken proti sobě stahuje a vytváří dělicí rýhu. Pozice a načasování cytokineze je určena dělicím vřeténkem (ekvatoriální rovina). Je tak zajištěna co nejvíce identická dělba jader a ostatních komponent mateřské buňky.

Kontraktilní pohyby obou typů vláken trvají do doby, než dojde k úplnému rozdělení mateřské buňky na dvě dceřiné. Koncem cytokineze přecházejí dceřiné buňky do interfáze. Cyklus se může dále opakovat podle potřeby dělení typu buňky. [18-20]

2.2 Regulace buněčného cyklu

Veškeré děje probíhající v buňce je potřeba řídit. Koordinaci má na starost tzv. centrální regulační systém, který se stará prakticky o všechny procesy, které jsou pro život buňky důležité. Buněčný cyklus není výjimkou a má svou vlastní regulaci. [18]

Každý krok (fáze) buněčného dělení má své dané pořadí, které má sice proměnlivý časový interval trvání, ale v cyklu má svou pevnou – neměnnou – pozici. Regulační systém plní funkci načasovaného aktivátoru enzymů a proteinů, které jsou nezbytné pro provedení každého procesu. Není-li aktivovaných látek třeba, musí systém zajistit jejich deaktivaci. Úlohou je dohled na dodržování správného průběhu po sobě jdoucích kroků.

V minulosti bylo rozmnožování buněk chápáno jako cyklický sled procesů, který si buňka zřejmě kontrolovala nějakým způsobem sama. Otázkou zůstalo, jakým mechanismem. Izolací nových proteinů a enzymů se posunulo chápání o veliký krok dále. Novinkou bylo zjištění, že cyklus je na rozhraní fází kontrolován (kontrolní body) určitými aktivovanými enzymy, které po splnění daných podmínek (podle fáze, do které vstupuje), pustí buňku do další části cyklu. Objevem bylo také zjištění, že regulační systém řídí kroky buněčného cyklu aktivací (fosforylací nebo defosforylací) klíčových proteinů, které spouštějí či regulují replikaci DNA během S-fáze, mitózu a cytokinezi. [18-20]

2.2.1 Cyklin-dependentní kinázy

Mnoho proteinů, které jsou nezbytné pro správné fungování dějů probíhajících během interfáze a mitózy je potřeba aktivovat či deaktivovat procesem fosforylace. K tomuto účelu existují v buňce specializované enzymy – cyklin-dependentní kinázy.

Procesem fosforylace je pomocí enzymů – kináz – katalyzován přenos fosfátové skupiny na určitý postranní řetězec aminokyseliny cílového proteinu. Ve většině případů se jedná o napojení na hydroxylovou skupinu postranně lokalizovaného serinu (Ser), threoninu (Thr) či tyrosinu (Tyr). Výsledkem kovalentní vazby fosforylové skupiny je změna (deformace) konformace. Dvojnásobný negativní náboj fosfátu může také přitahovat kladné části jiných molekul a tím narušit jejich stabilitu (např. rozpad jaderné laminy). [10-14, 19-22]

Jestliže jsou enzymy aktivované vazbou fosforylové skupiny již nepotřebné, nastupují do akce tzv. fosfatázy, které deaktivují enzym defosforylací. Obecně jsou kinázy přítomny v průběhu celého cyklu; aktivovány jsou pouze v určité době.

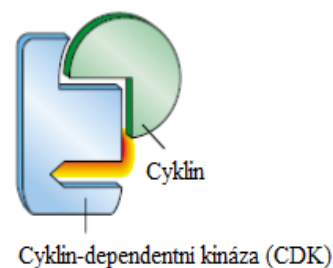
V průběhu buněčného cyklu byly objeveny speciální proteiny, které se vyskytovaly v periodicky oscilující koncentraci. Dostaly název cykliny. Samy o sobě nejsou enzymově aktivní, ovšem navázáním na specifické proteinkinázy vytvářejí komplex, který už je zajímavější. Představme si regulační komplex, který je zodpovědný za fosforylaci (aktivaci) jiných důležitých proteinů spojených s interfázními a mitotickými ději.

Komplex cyklin/cyklin-dependentní kinázy (cyklin-Cdk) je regulační molekula buněčného dělení. Skládá se z katalytické podjednotky (kináza) a regulační podjednotky (cyklin). Aby byla kináza funkční, je nutné navázání cyklinu.

V této formě ještě není komplex aktivní. Předpokládá se, že vázaný cyklin pomáhá nalézt proteiny, které budou fosforylovány.

Je potřebná fosforylace pomocí aktivační kinázy, která naváže na jedno či více míst komplexu fosfátové aktivační skupiny. Jelikož je vázána na komplex i fosfátová skupina v místě, které ruší enzymovou aktivitu kinázy, přichází na řadu selektivní aktivační proteinfosfatáza (cdc25), která zbaví komplex inhibiční fosfátové skupiny. V této formě je již cyklin-Cdk enzymaticky aktivní. [18, 22]

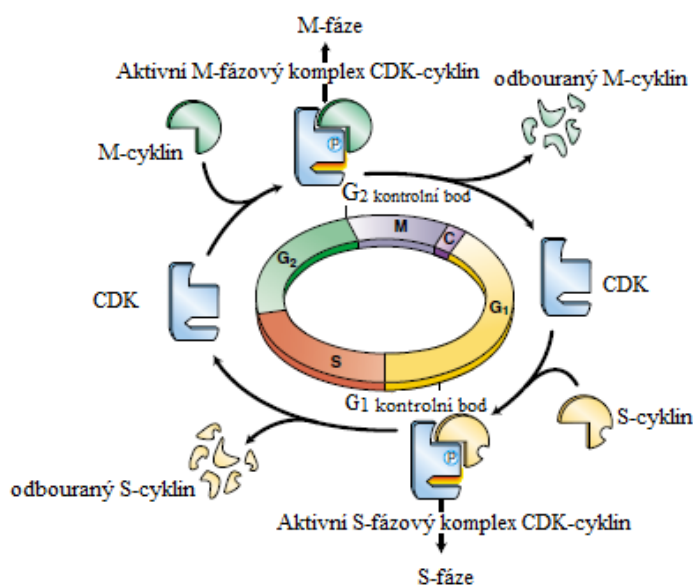
Níže budou specifikovány a popsány tři důležité body buněčného cyklu, během kterých cyklin-Cdk kontrolují podle charakteru fáze možný následující vstup či dokončení kroku cyklu. Vysvětlen bude fakt kolísání koncentrace cyklinů během celého cyklu. [18-21]



Obr. č. 3 Schéma komplexu Cdk-cyklin [19]

2.2.2 Cykliny v průběhu cyklu

Cdk jsou přítomny během celého buněčného procesu. Jejich koncentrace je konstantní. Cykliny – adiční proteiny Cdk – jsou během cyklu několikrát odbourávány a dle potřeby opět resyntetizovány (Obr. č. 4). Je třeba poznamenat, že existuje několik druhů cyklinů, které se vážou na Cdk v kontrolních bodech. Výsledkem je fakt, že každý bod je kontrolován odlišnými typy komplexů cyklin-Cdk (G1 kontrolní bod má v komplexech jiné cykliny než komplex v G2). Průchod body a fázové mechanismy (např. rozpad jaderného obalu) jsou řízeny různě kombinovanými cyklin-Cdk komplexy (viz Obr. č. 5). [18, 19]



Obr. č. 4: Kontrola buněčného cyklu. Fáze cyklu jsou kontrolovány Cdk, které jsou přítomny během celého cyklu. V závislosti na fázi dochází ke spojení s odlišným regulačním partnerem. Jakmile je splněn daný úkon, dochází k rozložení komplexu Cdk-cyklin. Převzato a upraveno z [19].

Při pokusech o vysvětlení, jestli je nějakými látkami ovlivněn buněčný cyklus, byl izolován tzv. MPF (mitosis-promoting factor – mitózu podporující faktor). Následnou identifikací bylo zjištěno, že se jedná o jednu proteinkinázu, která je aktivována vazbou cyklinu. MPF kináza je aktivována začátkem mitózy a fosforyluje proteiny, které se účastní kondenzace chromozomů, rozpadu jaderného obalu mateřského jádra nebo polymerace/depolymerace mikrotubulů. Experimenty byla potvrzena zajímavá informace, podle které dostaly cykliny své pojmenování.

Náhlý vzrůst koncentrace cyklinu před vstupem do M-fáze a rychlý pokles na konci M-fáze se periodicky opakuje (v případě MPF). Množství cyklinu je během buněčného cyklu regulováno:

- degradací ubikvitin-dependentním proteolytickým systémem ke konci mitózy
- postupnou syntézou ihned po rozdělení buňky pokračující celou interfází

Oscilace koncentrace cyklinů je využitelná pro možné načasování začátku a konce mitózy. Postupnou akumulací cyklinu se zvyšuje jeho koncentrace a pomáhá tak načasovat počátek mitózy. Jelikož postupně dochází k úbytku aktivních komplexů, snižuje se také řídicí aktivita. Téměř nulová aktivita MPF a nulová koncentrace cyklinů signalizují ukončení jaderného dělení. [18-20]

2.2.3 Kontrolní bod G1

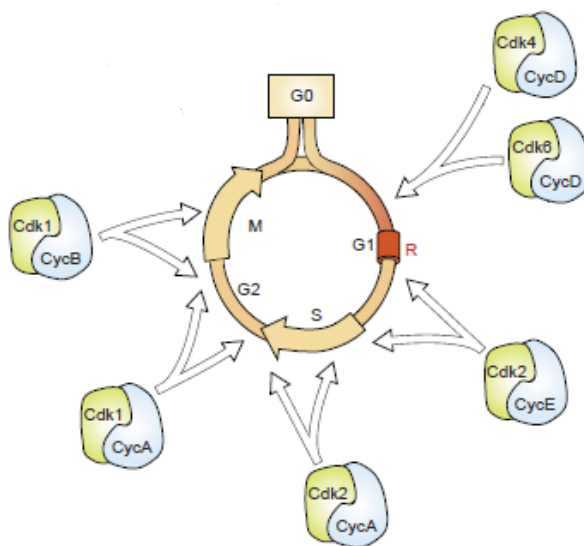
Časový interval začínající koncem cytokineze je prostorem pro správný růst buňky. Dorůstání buňky do dostatečné velikosti je závislé na dostatku živin a faktorech extracelulárního prostředí. V případě, že je buňka ohledně velikosti vyhovující, přichází na řadu kontrolní mechanismy DNA. Důležité je zdržet se v této fázi tak dlouho, dokud nebudou splněny všechny záležitosti. Přejít G1/S je nejčastějším místem, kde dochází k zastavení buněčného cyklu v případě nevyhovujících podmínek.

Bod G1 je lokalizován na konci G1-fáze; před vstupem do S-fáze. Aktivita Cdk kináz fungujících v tomto bodě rozhoduje o tom, jestli buňka vstoupí do syntetické fáze cyklu (bude povolena replikace DNA v případě, že není poškozena či opravena) nebo se dělení opozdí či vstoupí do klidové fáze G0 a dělit se nebude.

Pokud buňka dorostla do vhodné velikosti, DNA je nepoškozená a okolní podmínky přispívají pro další postup, buňka postupuje do S-fáze. Zde tzv. S-fázový komplex cyklin-Cdk kináz aktivuje fosforylací proteiny a enzymy účastníci se mechanismů replikace DNA. Následně dochází k odbourání vázaného cyklinu a Cdk kináza zaujímá neaktivní klidový stav.

G1-fáze, resp. G1 kontrolní bod je prozatím nejlépe prostudovaným úsekem, kde je zabráněno replikaci DNA z důvodu poškození DNA. Přestože není znám přesný mechanismus, poškození vyvolává zvýšené množství a aktivitu genového regulačního proteinu p53. Aktivovaný protein p53 stimuluje přepis (transkripci) genu, který kóduje protein p21, který působí jako inhibiční protein. Opakovanou transkripcí a následnou translací je zvýšena koncentrace proteinu p21, který inhibuje komplexy cyklin-Cdk kináz G1 kontrolního bodu (viz 2.5.3). Postupu do S-fáze je takto zabráněno a buňka setrvává v G1-fázi do té doby, než se poškozená DNA opraví.

Prostřednictvím signální dráhy indukované poškozenou DNA je buňce zabráněno povolit replikaci vadné DNA. Buňka tak snižuje šanci vzniku mutací, které mohou být nebezpečné. Problém nastává tehdy, není-li aktivován protein p53 nebo je zmutovaný či úplně chybí. Finálně tak není zablokován S-fázový komplex cyklin-Cdk a může dojít k propuštění buňky s poškozenou DNA do S-fáze. Replikací defektní DNA je podmíněno pravděpodobné zvýšení vzniku mutací, a tím produkce buněk, které se mohou později stát rakovinnými. V případě úspěšného průchodu G1 kontrolním bodem je buňce předurčeno bezproblémové dokončení cyklu. [18-21, 23, 24]



Obr. č. 5: Vybrané Cdk-cyklin komplexy účastní se klíčových kroků buněčného dělení. Cdk4/6-cyklin D fosforylují pRb (retinoblastomový protein), který v hypofosforylované formě je neaktivní a váže na sebe transkripční faktory E2F (viz kapitola 2.5.3). Průchod S-fází je řízen Cdk2-cyklin A/E. Druhá fáze dorůstání buňky je pod kontrolou Cdk1-cyklin A. Počáteční kroky mitózy (spiralizace chromatinu či fosforylace jaderné laminy) má na starost Cdk-cyklin B. Schéma je upraveno a pro přehlednost zjednodušeno. [24]

2.2.4 Kontrolní bod G2

Premitotická G2-fáze je poslední část interfáze, během které se dokončuje příprava na mitotické operace. Pokud jsou zdvojené organely a ostatní nutné struktury včetně jiných potřebných sloučenin v dostatečném množství a je-li mateřská buňka vhodně dorostlá, dostává se ke kontrolnímu bodu G2, kde je i vyhodnocena správně dokončená replikace DNA.

V kapitole 2.2.2 byl představen tzv. MPF (mitózu podporující faktor) jako kináza, která je aktivována vazbou mitotického cyklinu a fosforylací tak enzymaticky aktivována. Aktivní komplex dále řídí fosforylací dalších klíčových proteinů účastnících se hlavních dějů probíhajících v procesu mitózy. Fosforylace proteinů účastnících se dějů mitózy má za následek např.:

- ❖ kondenzaci chromozomů během profáze
- ❖ prometafázní depolymeraci jaderné laminy (rozpad jaderného obalu)
- ❖ mikrotubulární pohyb motorových proteinů s dceřinými chromozomy

Začátek mitózy je načasován syntézou mitotických cyklinů, jejichž koncentrace se zvyšuje před vstupem do fáze jaderného dělení. Jakmile buňka úspěšně projde mitózou, dochází k okamžitému poklesu koncentrace cyklinu, který je degradován v proteasomech. Pro upřesnění je vhodné doplnění informace, že regulační podjednotky komplexů – cykliny – jsou označovány vazbou molekul ubikvitinu (globulární protein regulující rozklad jiných proteinů) a cíleně transportovány do organel (proteasomů), kde probíhá samotná degradace. [10-13, 18-21, 24]

2.3 Vztah mezi strukturou a funkcí

Pro správnou funkci komplexů Cdk-cyklin je nutné, aby byla dodržena určitá nezbytná pravidla. Berme v potaz, že jakýkoliv zásah do chemické struktury vyvolává změnu celkového stavu molekuly. V našem případě se jedná o bílkovinné domény samotných Cdk nebo jejich komplexů, které svou velikostí umožňují poměrně snadné navázání nežádoucích molekul. Buněčné prostředí není domovem pouze Cdk, cyklinů a jejich komplexů, ale domovem řady jiných jak molekul, tak celých struktur, které mohou asociovat s regulačními jednotkami buněčného cyklu, což je jeden z příkladů inhibice funkce či sestavení komplexů. Zásah či interakce do struktury má zásadní vliv na funkci. [18-20]

Aktivace Cdk začíná navázáním regulační podjednotky cyklinu. Následnou fosforylací na různých místech komplexu je postupně měněna konformace a ve finálním odstranění inhibičních fosfátů specifickou fosfatázou je komplex zaktivován (viz. 2.2.1). Pokud cdc25 (fosfatáza odpovědná za odstranění inhibujících fosfátových skupin komplexu Cdk-cyklin) je vyřazena z funkce, není tak komplex aktivní a nemůže vykonávat svou přiřazenou funkci. Hyperfosforylovaný komplex není funkční, jelikož nejsou odstraněny fosfátové skupiny na místech, které by změnilly tvar komplexu tak, aby konformace byla vyhovující.

Komplex Cdk-cyklin svou strukturní stavbou umožňuje vazbu substrátu a ATP. Výsledkem je cílená fosforylace substrátu. Pokud je ovšem specifická lokace komplexu konformačně zneprístupněna vazbou jiné částice, nedochází k plnění primárně určené funkce. Podobná situace může nastat v případě, kdy se mimikující molekula naváže na místa zodpovědná za spojení Cdk a cyklinu. V tomto případě nedojde k sestavení bílkovinného komplexu.

Uvedené příklady byly cíleně vybrány, aby naznačily možné situace, ke kterým může docházet ve velmi rušném buněčném prostředí. Důvodem výběru je také skutečnost, že většina jak přirozených tak syntetických inhibitorů působí výše zmíněnými mechanismy. Provázanost buněčných struktur a látek má za následek vznik propojených signálních drah, které ve výsledku dělají buňku organizovaným komplexně řízeným systémem. [18-22, 25]

2.4 Inhibitory cyklin-dependentních kináz

Než se dostaneme k samotným inhibitorům Cdk-cyklin komplexů, připomeňme důležitou roli molekuly ATP jako tzv. energetické molekuly. Energie skrytá v makroergické vazbě je uvolňována při hydrolýze ATP na ADP a P_i , který je v našem případě kinázami přenášen na substrát. Vazbou P_i na Ser, Thr či Tyr vzniká kovalentní vazba a postupně dochází ke konformačním proteinovým změnám. Fosforylací mohou být substráty (jako např. enzymy) aktivovány či deaktivovány. Opět je třeba vyzdvihnout vztah mezi strukturou a funkcí: zaleží, na kterém místě/místech dochází k vazbě fosfátu/fostátů na substrát, což s sebou nese odlišnou změnu konformace. [18-22, 25]

ATP jako biomolekula je využívána prakticky ve všech dějích probíhajících od replikace DNA, přes transkripci do podoby RNA, včetně následné translace do struktur cílových proteinů. Hydrolýzou ATP jsou ovládány některé membránové kanály a poháněny motorové proteiny fungující jako přenašeče. Kapitola 2.2.1 věnovaná mitóze poukazuje na roli fosforylace při rozpadu jaderné laminy či tvorbě mitotického vřeténka. [10-13, 25]

Následující podkapitoly jsou věnovány vlastnostem inhibitorů a příkladům mechanismů, kterých se účastní komplexy cyklin-Cdk. Zmíněny budou i důsledky inhibice komplexů Cdk-cyklin, které se účastní především transkripce cílových genů a generace nádorových supresorů.

2.4.1 Vlastnosti inhibitorů

Přestože existuje několik set druhů Cdk a mnoho druhů cyklinů, lze z informací získaných RTG analýzou monokrystalů Cdk struktur vyvodit určité závěry. V centru zájmu zkoumání je především vazebné místo pro ATP v T-kliče mezi kinázovou a cyklinovou podjednotkou komplexu. Výsledky výpočetního modelování 3D struktury ATP-vazebného místa poskytly údaje, které shrnují nároky na potenciální inhibitory. [10-14, 25, 26]

Je nutno brát v potaz, že se bavíme o bílkovinných makrosloučeninách tvořených velkým množstvím molekul proteinů různě kombinovaných v lineárním řetězci a následným sbalováním do sekundárních a terciárních struktur vytvářející domény. Obrovský povrch těchto kináz v sobě uchovává sekvence proteinů, které fungují jako signální struktury pro napojení regulačních cyklinů či inhibicí. Signální sekvence pro degradaci cyklinu je součástí bílkovinné struktury cyklinu. [20,21]

Informace interpretované z údajů RTG-analýzy do jisté míry charakterizují strukturní požadavky na inhibitory, kterými je možno zablokovat ATP-vazebné místo. Obecně jsou uváděny tyto základní společné vlastnosti inhibitorů:

- planární heterocykly o nízké molekulové hmotnosti
- vazba na Cdk prostřednictvím hydrofobních interakcí a vodíkových můstků
- soupeření o vazebné místo s ATP

Výše zmíněné charakteristiky se týkají především vazebného místa. V zájmu výzkumu je ovšem kromě efektivity inhibice i schopnost průniku membránami, relativní stabilita v prostředí organismu a co nejnižší toxicita.

Pro velký počet druhů kináz je společnou funkcí fosforylace substrátu. Přestože se vzájemně od sebe liší strukturou a způsobem autoregulace fosforylací, odlišnými substráty, které fosforylují, i tak existuje mezi nimi jistá homologie (viz 2.2.1). Je třeba upozornit, že vnitřní buněčný prostor obsahuje obrovské množství ATP (je nutno fosforylovat mnoho proteinů), ke kterému proteiny chovají velmi silnou afinitu – proto je často uváděn mechanismus vazby jako kompetice mezi inhibitorem a přirozeným substrátem ATP. [24-27]

2.4.2 Endogenní inhibitory

V závislosti na fázi buněčného cyklu jsou skládány komplexy Cdk-cyklin, které po složení a aktivaci fosforylují cílené substráty. Jakmile je úkol patřičně splněn, dochází k rozkladu na jednotlivé Cdk a cykliny. Cdk zůstávají inaktivní a cykliny jsou označeny signálními proteiny (ubikvitiny) a transportovány do proteasomů (rozklad na aminokyseliny či větší sekvence využitelné pro jinou syntézu). [10-13, 18-21]

Přirozené inhibitory rozpoznávají specifická místa komplexu a vazbou tak mění konformaci, jejímž výsledkem je např. rozpad komplexu. Jinou možností je kompletní blokáce komplexu, která znemožní vazbu ATP a následnou fosforylaci substrátu. Přirozené inhibitory jsou členěny na 2 rodiny:

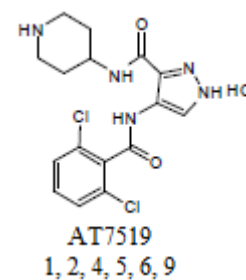
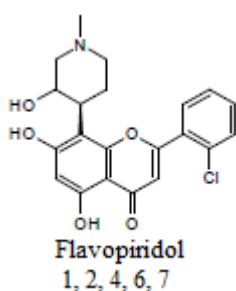
- Cip/Kip (např. p21^{CIP1}, p27^{KIP2}; p = protein): pan-specifické – inhibují široké spektrum Cdk. Zástupci této rodiny se převážně vážou na komplex Cdk2-cyklin a tím je inaktivují.
- INK4 (např. p15^{INK4b}, p16^{INK4a}) – specifické – inhibice Cdk 4 a Cdk 6. Vážou se na monomerní Cdk, čímž brání vazbě aktivujícího cyklinu. [21, 22, 28]

2.4.3 Vybrané příklady inhibitorů

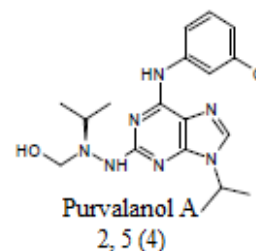
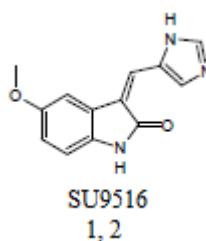
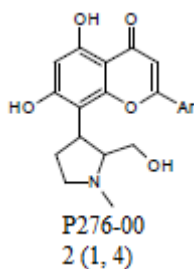
Tabulka č. 1 uvádí vybrané zástupce Cdk inhibitorů, které jsou v různých fázích klinických testů. Látky s širším inhibičním polem působení patří do skupiny tzv. pan-specifických inhibitorů. Druhou skupinu pak tvoří selektivní inhibitory.

Tab. č. 1: Zástupci pan-specifických a selektivních inhibitorů. Pod názvem inhibitorů jsou uvedeny Cdk kinázy, které jsou blokovány. Čísla v závorce uvádějí kinázy, které sice jsou inhibovány, ovšem mnohem méně a při vyšší dávce inhibitoru. Všechny látky inhibují ATP-vazebné místo kinázy. [10-14, 30]

Pan-specifické



Selektivní



Ze strukturního hlediska se jedná o různé látky od flavonoidů přes purinové deriváty, thiazoly, diaminopyridiny či indoliny. Existují i přírodní izolované látky, které vykazují Cdk inhibiční vlastnosti (např. staurosporin a butyrolakton I izolované z plísníových kultur). Zmíněné příklady jsou jen zlomkem obrovského množství typů látek inhibujících Cdk. [10-14, 27, 30]

Výzkum a vývoj nových inhibitorů je možný cílenou modifikací již prostudovaných látek, jejichž struktura a interakce s Cdk je popsána prostřednictvím údajů RTG analýzy vypěstovaných monokrystalů systému Cdk-inhibitor. Záměnou atomů, funkčních skupin či jinak upravenou strukturou vznikají nové motivy, které se liší prostorovým uspořádáním atomů, což má za následek lišící se fyzikálně-chemické vlastnosti oproti původnímu motivu. Vědecký směr, který několikakrokovými, mnohdy náročnými syntézami vytváří nové skelety, odvozené od templátové látky, se nazývá bioisosterická strategie. [10-14, 30-33, 35, 36]

První inhibitory, které vstoupily do klinických testů, byly přírodní deriváty flavonů (flavopiridol) a purinů (roskovitin), které se staly jedním z motivů pro přípravu odlišných bioisosterů. Následně synteticky připravená analoga byla cíleně modifikována pro zlepšení inhibičních vlastností (farmakologického účinku), zvýšení metabolické stability a snížení nežádoucích účinků. Oproti první generaci inhibitorů se vědečtí pracovníci zaměřili na zvýšení selektivity. V tabulce č. 1 je ukázáno např. odlišné spektrum inhibice flavopiridolu, který inhibuje kinázy účastnící se G1, G1/S až G2/M částí buněčného cyklu včetně kináz kooperujících s transkripcí, oproti P276-00, který v nanomolárních koncentracích inhibuje Cdk2, ale v mikromolárních koncentracích je schopen menší inhibice Cdk1/4. [10-14, 30]

Bioisosterickou strategií je možno vytvořit mnoho skeletů, které kombinací navázání či odebrání různých postranních řetězců mohou zásadně ovlivnit jejich fyzikálně-chemické vlastnosti. Za využití počítačového modelování s pomocí údajů RTG analýzy bylo vytvořeno velké množství prekonceptů využitelných pro syntézu obrovské škály látek s potenciální inhibiční aktivitou (jak pan-specifickou, tak selektivní). [30-33]

2.5 Mechanismy zastavení buněčného cyklu

Kapitoly zabývající se buněčným cyklem a jeho regulací (2.1 a 2.2) zahrnují informace, které lze využít pro pochopení spojitých interakcí mezi Cdk-cyklin komplexy a fosforylovanými substráty.

Stěžejním cílem této kapitoly jsou zjednodušené popisy prozkoumaných signálních drah, které mají za následek zamezení transkripce, pozastavení buněčného cyklu či jeho úplnou zástavu nebo vyvolání programované buněčné smrti. Inhibitory, které jsou prozatím k dispozici, působí tak, aby ve výsledku vyvolaly zmíněný/zmíněné proces/y.

2.5.1 Bloky transkripce

Genom (veškerá genetická informace organismu) je zakódována v DNA v podobě sekvencí deoxyribonukleotidů. Nutným krokem pro získání požadované sekvence kódující žádaný protein je proces transkripce spojený s následnou translací.

Procesem transkripce jsou vlákna dvoušroubovice DNA (deoxyribonukleotidy) na specifických místech od sebe oddělena – slouží tak jako matrice (vzor) pro vytvoření ribonukleotidového vlákna (skládání řetězce probíhá podle pravidla komplementarity – párování bází). Pořadí těchto ribonukleotidů, transkript (mRNA – messenger RNA) je transportován z jádra do cytosolu buňky, kde je proteinovými strukturami (ribozómy) zpracováván do podoby cílového proteinu procesem translace (překlady). Vzniklý protein je dále transportován a zpracován v závislosti na úkonu, který má vykonávat. [17-20]

Děje spojené s dráhou proteosyntézy (výroby proteinů) jsou zprostředkovány proteinovými enzymy, které vyžadují fosforylaci svých aminokyselinových částí. Změna konformace pak iniciuje daný proces. Inicie a prodlužování vznikajícího transkriptu jsou řízeny Cdk7-cyklin H a Cdk9-cyklin T.

Pokud jsou kinázy či jejich komplexy s cyklinem inhibovány, nemůže docházet k fosforylaci substrátu, čímž je znemožněna transkripce. Bez transkriptů není možné vyrobit proteiny, které jsou dále potřebné pro specifické funkce, jako je např. replikace DNA. [28, 37-40]

2.5.2 Úloha retinoblastomového proteinu

Objevem proteinu Rb (retinoblastomový protein) byl popsán mechanismus, kterým jsou na podnět růstových signálů stimulovány transkripce genů potřebných pro postup S-fázi. Rb protein byl ve větším množství detekován u nádorových buněk retiny (sítnice oka), mimo jiné byl nalezen i v jiných typech rakovinných buněk.

V jádře se Rb váže do komplexu s transkripčními faktory proteinové rodiny E2F, které stimulují transkripci genů potřebných pro průchod S-fázi (2.2.3). V případě, že je buňka v klidové fázi – nedělí se – je komplex Rb-E2F v hypofosforylované podobě (=stav, ve kterém E2F faktory nemohou umožnit transkripci genů). Pokud jsou přijatelné podmínky pro dělení, signálními extracelulárními drahami se navyšuje koncentrace Cdk4/6-cyklin D, které částečně fosforylují komplex Rb-E2F. Vazba fosfátů na AMK Rb proteinu mění jeho konformaci, čímž dochází k částečnému uvolnění E2F proteinů, které řídí transkripci cyklinu E. Asociací Cdk2 a cyklinu E vzniká komplex, který fosforyluje komplex Rb-E2F – dochází ke kompletnímu uvolnění E2F faktorů (transkripce genů pro průchod S-fázi). Průběh S-fáze a řízení exprese genů účastnících se replikace DNA má na starost komplex Cdk2-cyklin A. E2F proteiny jsou během mitózy zpětně vázány do komplexu s Rb proteinem speciálními fosfatázami, které zajišťují defosforylaci Rb proteinu.

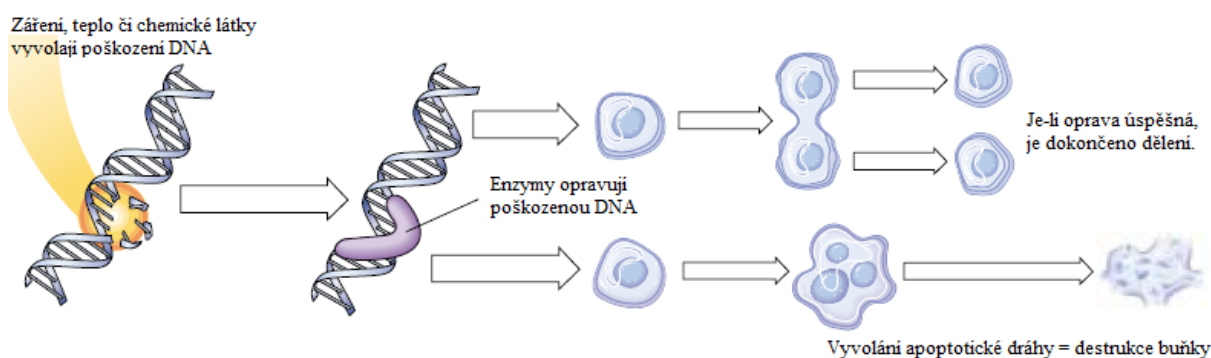
Inhibicí Cdk a Cdk-cyklin komplexů odpovědných za tyto aktivace, nedochází ke kontrolovanému uvolnění E2F proteinů – nelze tak vyrobit proteinové struktury (cyklin A, E) provázející buňku přechodem G1/S a průchodem S-fázi buněčného cyklu. Pro nádorové buňky jsou typické mutace genů (Cdk4/6, cyklin D), které zodpovídají za fosforylaci Rb proteinu nebo mutace vlastního proteinu Rb. [40-43]

2.5.3 Vztah p53 k defektním buňkám

Pozastavení buněčného cyklu nebo vyvolání apoptózy při rozsáhlejším poškození DNA je možné také signální kaskádou, v jejímž čele stojí jaderný transkripční faktor - protein p53 (Obr. č. 6). p53, označován jako „strážce genomu“, se velkou měrou podílí na stimulaci exprese proteinů, které umožňují zdržení před nebo v S-fázi. Získaný čas buňka investuje do mechanismů reparační DNA (v případě malého poškození).

Genová exprese transkripčního faktoru p53 je stimulována poškozenou DNA. Takto aktivovaný p53 je uvolněn ze svého zpětnovazebného regulačního proteinu MDM2 (mouse double minute 2) a váže se na oblast DNA, která kóduje přirozený inhibitor Cdk – p21

z inhibiční rodiny Cip/Kip (viz. 2.4.2). Kromě p21 řídí expresi dalších proteinů vyvolávajících signální dráhu končící apoptózou. Transkripce a translace je syntetizován protein p21, který interakcí blokuje S-fázové komplexy (Cdk2-cyklin), čímž je buněčný cyklus pozastaven. Dráha spojená s expresí p53, resp. p21 se podílí dále na inhibici replikace DNA, reparaci DNA a regulaci transkripce. Vyvolané kontrolní mechanismy se tak snaží o zvýšení genové stability organismu. V případě, že je poškození rozsáhlé a reparační kroky nestačí, je vyvolána signální kaskáda startující sled organizovaných degradačních procesů buňky – apoptózy. [44-46]



Obr. č. 6: Role proteinu p53. Poškozením DNA je aktivován p53, který v případě malého poškození stimuluje pozastavení buněčného cyklu. Pokud je oprava možná a úspěšná, buňka dále pokračuje v cyklu a dokončí jej. V případě poškození, na které oprava nestačí, jsou prostřednictvím p53 exprimovány jiné geny, které situaci vyřeší vyvoláním signální kaskády končící programovanou buněčnou smrtí – v případě správného fungování p53. Pokud je ale defektní, či schází, je situace naprosto jiná. Rakovinná buňka má totiž vyvinuty mechanismy, kterými „obchází“ kontrolní body související s opravou DNA (buňka může mít poškozeny geny kódující cykliny účastníci se fosforylace replikačních proteinů nebo např. proteiny replikačního opravného aparátu). Výsledkem je průchod buňky s poškozenou DNA a její další množení. Převzato a upraveno z [19].

Podobně jako u pRb existuje i zde zpětnovazebná interakce. Zmíněný MDM2 je exprimován transkripčním p53, ale zároveň vazbou na p53 jej ubiquitínuje (označí pro degradaci). Ve výsledku je ve zdravé buňce udržována nízká hladina aktivního p53. Situace se mění poškozením DNA či celkově nevyváženou homeostází buňky. Hromadící se p53 v buňce je důkazem fyziologické odpovědi na stres, kterému je buňka vystavena.

V případě scházejícího či poškozeného p53 buňka nestimuluje opravy DNA a replikací je zmnožena defektní DNA nesoucí chyby v genomu. Absencí p53 není stimulována exprese p21, který by blokací buněčného cyklu umožnil opravy nebo indukci apoptózy. Množením těchto buněk dochází k hromadění mutací v genomu. Zhruba u 50 % druhů rakovin je právě p53 mutován či schází. [40-43]

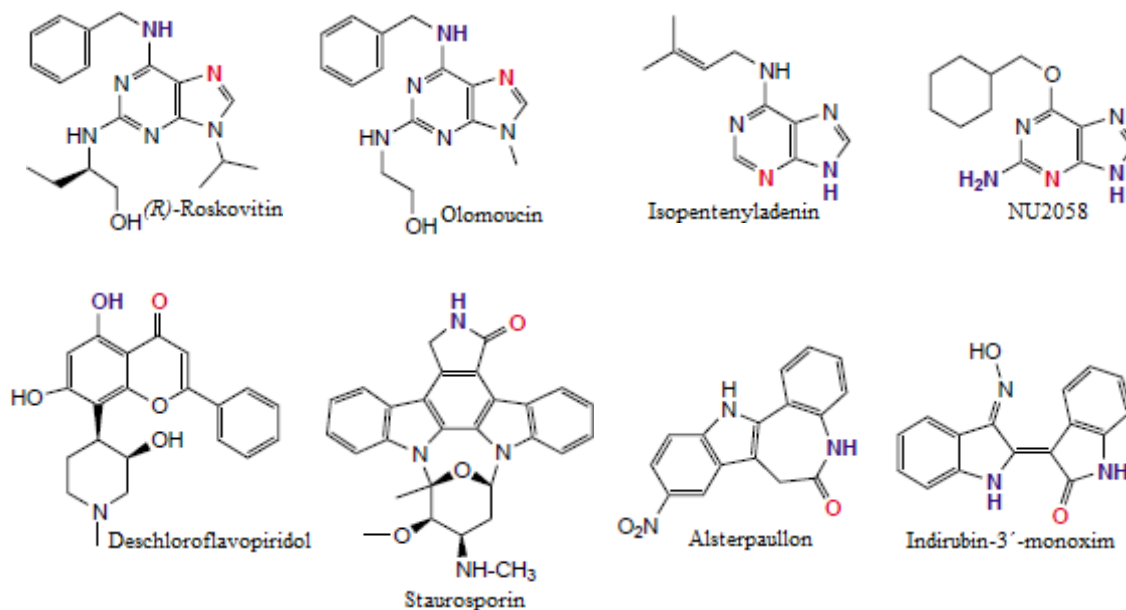
2.5.4 Vyřazení fosfatáz aktivujících Cdk

Aktivující fosfatázy zmiňované v kapitole 2.2.1 jsou nutné pro převedení Cdk-cyklin komplexu na aktivní konformační formu odstraněním inhibičních fosfátových skupin bránících navázání ATP do T-smyčky komplexu.

Experimentální práce s různými typy nádorových buněk nasvědčují možnosti vzniku tumorových buněk tím, že aktivita cdc25 je mnohonásobně zvýšena. Fosfatáza tak může defosforylací měnit vlastnosti Cdk a Cdk-cyklin komplexů, což může vyvolat nežádoucí aktivitu Cdk nesprávně načasovanou aktivací či deaktivací. Jako potenciální terapeutický cíl jsou cdc25 fosfatázy zajímavé z hlediska nezávislosti na hladině ATP, který jako přirozený substrát Cdk snižuje účinnost inhibitorů kináz. [13, 25, 47]

2.6 Význam modulace struktury

S využitím moderních postupů a s nimi spojenými měřicími metodami se chemie inhibitorů posouvá velkým krokem vpřed. Především monokrystalová RTG analýza poskytuje informace týkající se vazebných interakcí, které jsou využitelné pro modelování dalších sloučenin. Mnoho informací je získáno právě krystalizací inhibitorů s Cdk2 či Cdk4. Vědecké práce věnované prvním generacím inhibitorů jsou využívány k cílené modifikaci již účinných sloučenin. Kromě nich se věda zabývá i přípravou čistě syntetických látek, které našly své uplatnění v roli inhibitorů. Na obrázku č. 7 jsou uvedeny vybrané příklady inhibitorů Cdk se zvýrazněnými atomy účastnící se vazebných interakcí s aminokyselinami vazebného místa. [10, 25, 26]

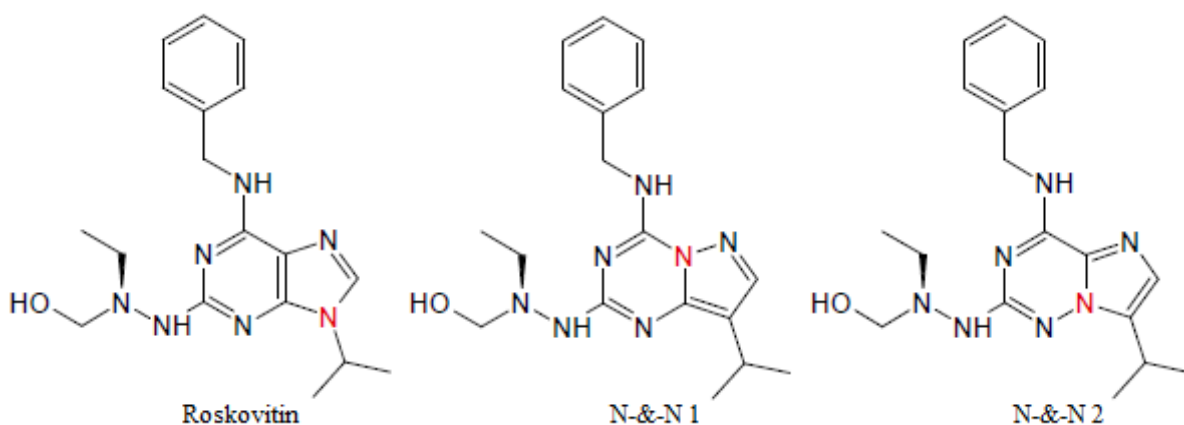


Obr. č. 7: Vybrané struktury inhibitorů Cdk. [26]

Ve strukturách jsou barevně vyznačeny atomy dusíku, vodíku nebo kyslíku charakterizující donorové či akceptorové atomy pro vodíkové vazby. Barevně označené atomy interagují vodíkovými vazbami s kyslíkovými nebo dusíkovými atomy Leu83 (leucin 83) a Glu81 (kyselina glutamová 81) – červené = akceptorové, modré = donorové. Smyslem výběru je poukázat na zásadní rozdíl z hlediska interakce s kinázou: všimněme si odlišného vázání (*R*)-Roskovitinu a jeho derivátu *N*⁶-isopentenyladeninu či látky s označením NU2058. Změna struktury má za následek odlišné interakce, které se dále projevují i mírou vazby. Mnoho látek podobného typu se tak liší i orientací ve vazebném místě kinázy. Deschloroflavopiridol, staurosporin, alsterpaullon a indirubin-3'-monoxim reprezentují typy struktur, které jsou účinnými inhibitory Cdk. [26]

Purinové inhibitory byly využity pro syntézu velké škály látek odlišných strukturních parametrů, které se od sebe lišily jak umístěním, počtem a kombinací postranních řetězců, tak pozicí a počtem dusíkových atomů. [30, 48-50]

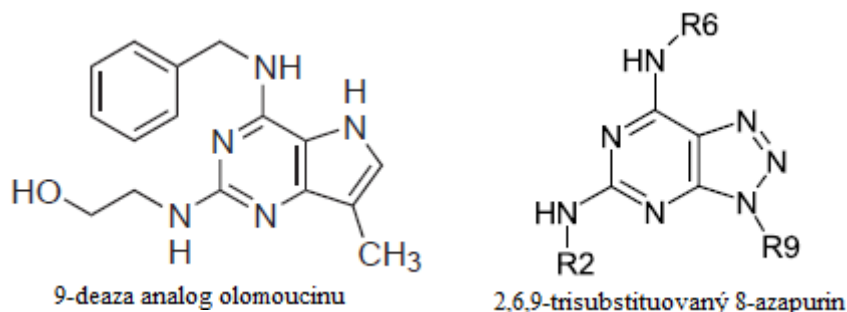
2,6,9-trisubstituované puriny byly jako bioisostery inspirací pro přípravu triazinů. V jejich struktuře se zachovává počet dusíkových atomů, ale mění se jejich poloha. Výsledkem několika-krokových syntéz jsou např. níže uvedené strukturní motivy (Obr. č. 8). Vyšší inhibiční aktivity ve srovnání s výchozím purinovým derivátem roskovitinem bylo dosaženo v případě pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinu, který nemá atom dusíku v poloze 9, ale v poloze 5. [48-50]



Obr. č. 8: Roskovitinové bioisostery. Struktury lišící se polohou dusíkového atomu v základním heterocyklickém motivu. Poloha a typ vázaných řetězců je zachován. Obecně lze tyto struktury pojmenovat (pokud vázané řetězce označíme R^1 - R^3) jako: 2,6,9-trisubstituovaný purin, pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazin a imidazo[2,1-*f*]-1,2,4-triazin. V porovnání s roskovitinem přemístění atomu dusíku z polohy 9 do polohy 5 způsobilo zvýšení inhibiční aktivity látky N-&N 1. Inhibitor N-&N 2 je účinností srovnatelný s roskovitinem. [48]

Další možností je cílené odstranění dusíkového N9 atomu z heterocyklu, jak byl připraven -9-deaza analog olomoucínu. Zajímavou strukturní modifikací je také vnesení pátého

dusíku do polohy 8 purinového skeletu (Obr. č. 9). Vnesení pátého dusíku mělo ovšem za výsledek snížení inhibiční aktivity. [48-50]

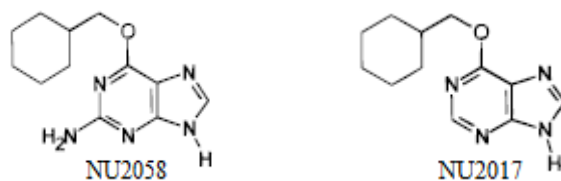


Obr. č. 9: Chemické struktury 9-deaza olomoucínu [49] a 2,6,9-trisubstituovaného 8-azapurínu. [50]

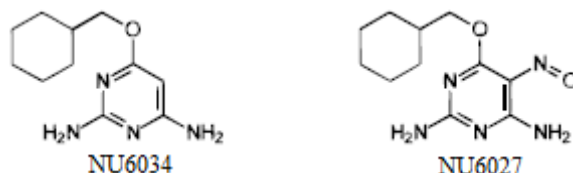
2.7 Pyrimidinové inhibitory

Purinové inhibitory a jejich bioisosterické analogy včetně dalších chemických tříd jsou dobrými příklady, jak souvisí struktura s aplikačním potenciálem. Inhibice je závislá kromě charakteru planárního heterocyklu a jeho okolí i na typu a počtu možných interakcí mezi inhibitorem a proteinovým skeletem ATP-vazebného místa kinázy. Roli hraje umístění a počet donor-akceptorových atomů pro nekovalentní interakce jak kinázového skeletu, tak samotné interagující látky. Velká pozornost je dlouhá léta věnována purinům a jejich analogům. [9, 51-54]

Ve strukturách roskovitinu a jeho analogů je v poloze 6 vázán benzylamin. Jako cyklická nenasycená vedlejší skupina napodobuje ribózovou část přirozeného substrátu kináz – ATP. Úvahy nad úpravou struktur se zaměřily i na tuto část molekuly. Daly tak vzniku dalším derivátům, které ve své struktuře mají polohu 6 upravenou vazbou cyklohexylmethylovou skupinou (NU2058 a NU2017). Oproti benzylaminu je tento nasycený cyklus židličkové konformace vázán přes atom kyslíku (Obr. č. 10). [9, 51-54] Látky NU2058 a NU2017 jsou inhibitory Cdk1 a Cdk2. Účinnějším je NU2058 díky více možnostem interakce s aminokyselinovou páteří Cdk2 kinázy. 2-NH₂ skupina interaguje s kyslíkovým atomem karbonylu Leu83 a zároveň s amido skupinou Leu83 interaguje atom N3. V poloze 9N s karbonylovou skupinou Glu81. Podobné možnosti tvorby vodíkových můstků využívá i NU2017, kde je ovšem absencí 2-NH₂ snížena inhibiční účinnost [9,52].



Obr. č. 10: Příklady O^6 -substituovaných purinů. Látky NU2058 a NU2017 jsou inhibitory Cdk1 a Cdk2. [9, 52]

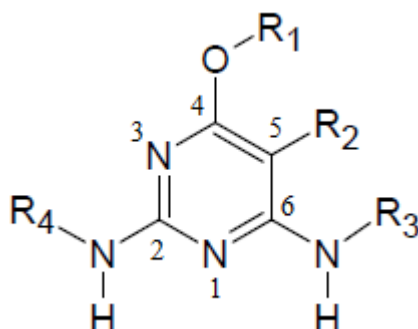


Obr. č. 11: Příklady O^4 -substituovaných pyrimidinů. Látka NU6034 je dle zdrojů poměrně neúčinná, přestože se zdá, že ve své struktuře s sebou nese interakční prvky v podobě dusíkového atomu a dvou $-NH_2$ skupin. Její analog, NU6027 má v poloze 5 vázanou nitroso skupinu, která mění původní charakter molekuly. [9,52]

Z důvodu studia vodíkových interakcí s aktivními místem Cdk a srovnání s O^6 -substituovanými deriváty guaninu byly připraveny také O^4 -substituované deriváty pyrimidinu. Látka NU6034 (Obr. č. 11) se ukázala jako poměrně neúčinná, přestože se zdá, že ve své struktuře s sebou nese interakční prvky v podobě dusíkového atomu a dvou $-NH_2$ skupin. Analog této látky, specifický pyrimidinový inhibitor Cdk 1 a Cdk 2 - NU6027 - se stal pilotní sloučeninou pro mnohé strukturální modifikace. NU6027 má v poloze 5 vázanou nitroso skupinu. Vznikající intramolekulární vodíková vazba upravuje geometrii pro interakční vodíkovou vazbu aminoskupiny a stává se tak vyhovující pro stereochemii kinázové páteře aktivního místa. Kyslíkový atom současně interaguje s Lys33, resp. s jeho $-NH_2$ skupinou [9,52]. Prakticky všechny polohy (2, 4, 5, 6) byly syntetickými metodami upravovány. Rozšířil se tak počet analogických látek dle vzoru NU6027, které byly testovány jako inhibitory Cdk 1 a 2. Tabulka č. 2 uvádí stručný přehled vybraných testovaných látek s různě upravenou strukturou, která úzce souvisí s účinností a inhibiční koncentrací.

Pro možnosti vytvoření vodíkových vazeb s aminokyselinovou páteří jsou cílem modifikace především pozice 2, 5 a 6, jejichž cílem je do postranního skeletu zavést atomy/atomové skupiny vhodné pro vodíkové interakce, které jsou jedním z kritérií pro účinnost inhibitoru.

Co se týče substituce polohy 4, je známo mnoho derivátů, ale z výsledků plyne, že pokud je ATP-mimikující (ribózová) část molekuly obsazena šestičlenným nasyceným či nenasyceným cyklem inhibitoru, mnohem lépe je obsazena část vazebného místa. [9, 51-54]



Obr. č. 12: Strukturní vzorec 2,4,5,6-tetrasubstituovaného pyrimidinu.

Tab. č. 2: Vybrané příklady strukturálních typů testovaných látek. (a) IC_{50} μ M. (b) procentuální inhibice 10 μ M koncentrací. (c) procentuální inhibice 100 μ M koncentrací. IC_{50} (koncentrace látky, která způsobí inhibici 50 % testovaných biologických subjektů). [9, 53, 54]

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	IC ₅₀ (μ M) nebo % inhibice	
				<i>Cdk1</i>	<i>Cdk2</i>
cyklohexylmethyl	NO	H	H	2,9 \pm 0,1 (a)	2,2 \pm 0,6 (a)
cyklohexylmethyl	H	H	H	4 \pm 5 (b)	7 \pm 3 (b)
cyklohexylmethyl	NO	CO ₂ CH ₃	H	8 \pm 2 % (c)	6 \pm 5 % (c)
cyklohexylmethyl	NO	COCH ₃	H	36 \pm 4 % (c)	28 \pm 2 (c)
cyklohexylmethyl	CH=NOCH ₃	H	H	13 \pm 13 % (b)	13 \pm 6 % (b)
cyklohexylmethyl	CHO	H	H	35 \pm 3 % (b)	43 \pm 3 % (b)
Látky inhibující Cdk2 (hodnota IC₅₀ je uvedena v nM)					
cyklohexylmethyl	NO ₂	H	H	8,3 \pm 5,6	
cyklohexylmethyl	NO	H	C ₆ H ₇ NO ₂ S	1 \pm 0,3	
<i>Sec</i> -butyl	CHO	H	C ₆ H ₇ NO ₂ S	0,77	
<i>Sec</i> -butyl	CH=NOH	H	C ₆ H ₇ NO ₂ S	7,4	
C ₆ H ₇ NO ₂ S = benzensulfonamid					

Substituentem v poloze 4 (R₁) je ve většině případů cyklohexylmethyl, který je díky své možné židličkové konformaci schopen svou strukturou přizpůsobit tak, aby vyplnil část vazebného místa, která je přirozeně obsazena cukernou složkou ATP. Aromatické cykly tuto vlastnost nemají, a proto jsou méně účinné. Vyšší potřebná koncentrace je dále zaznamenána u derivátů, kde je vázán flexibilní alifatický řetězec (např. *n*-pentyl). Jedním z parametrů účinnosti inhibitorů je schopnost vyplnění vazebného místa.

Podobná aktivní konformace jako u nitroso skupiny (NU6027) byla předpokládána adicí formylu do pozice 5 (R₂). Vysoké aplikované inhibiční koncentrace jsou důkazem vyvrácení tohoto předpokladu. Výsledky RTG analýzy odhalily odlišnou stereochemii formylové skupiny, která neumožňuje prostorovou aktivaci sousedící 6-NH₂ pro vodíkové interakce.

Podobných výsledků bylo dosaženo i u C5-kyano derivátů. Vysoké inhibiční koncentrace jsou zaznamenány i u motivů, kde R₂ polohu zaujímají např. oximy nebo ketony. U těchto látek byly předpokládány teoreticky nové možnosti interakčních vazeb. Ze sterických důvodů objemnější skupiny (např. fenylová) snížily aktivitu testovaných látek. Teoretické zvýšení vazebných možností N⁶-acylací (R₃) také přineslo v porovnání s NU6027 výsledky v podobě vysokých inhibičních koncentrací.

V řádech nanomolárních koncentrací jsou účinné inhibitory, které v poloze N² (R₄) mají navázanou benzensulfonamidovou skupinu, která dává tomuto úseku molekuly lipofilní charakter a zároveň nese atomy schopné vyššího počtu interakcí s aminokyselinami vazebného místa. Aromatický systém této skupiny přispívá hydrofobními interakcemi k vyšší stabilitě.

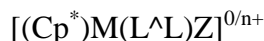
Účinnost inhibitoru je spojena s typem heterocyklu a jeho strukturního okolí. Vodíkové interakce jsou spojeny s přítomností, počtem, umístěním a orientací akceptorových či donorových atomů/skupin. Modifikací může být docíleno změny stereochemie, která ovlivňuje výslednou aktivitu. Částečně lipofilní (hydrofobní) charakter sloučeniny přispívá ke stabilizačním interakcím a zároveň souvisí s prostupností skrz buněčné membrány. [9, 53, 54]

2.8 Rhodium, iridium a jejich „half-sandwich“ komplexy

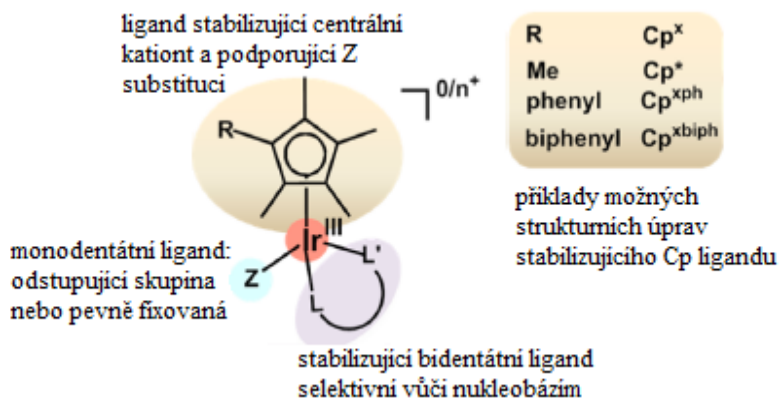
Léčiva s antiproliferačními účinky na bázi *cis*-platiny *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂] patří mezi nejpoužívanější látky v boji proti rakovinným buňkám. Mechanismus účinku je založen na vazbě s bázemi DNA, čímž dochází k blokaci replikace a následnému vyvolání apoptotické dráhy končící smrtí buňky. Terapeutickým cílem ovšem nejsou pouze rakovinné buňky, ale i zdravé, což je jeden z nežádoucích vedlejších účinků (např. onemocnění ledvin, jater, zažívacího traktu nebo úbytku kostní dřeně). V rámci problematiky minimalizace vedlejších účinků a snížení potřebné koncentrace účinné látky pro eliminaci rakovinných buněk je část vědeckých prací soustředěna na vývoj nových léčiv. Do popředí zájmů se dostávají komplexní sloučeniny prvků lehkých a těžkých platinových kovů, zejména pak ruthenia, osmia, iridia a rhodia. [1-7, 55]

Část současné komplexní chemie se zabývá přípravou tzv. „half-sandwich“ neboli polosendvičových komplexů. V případě komplexů iridia a rhodia (M) jsou na centrální atom v oxidačním stavu M^{+III} koordinovány ligandy se specifickými vlastnostmi. Zvýšení aplikačního potenciálu tohoto typu látek je spojeno s kombinatorikou typů vázaných ligandů,

které charakteristicky ovlivňují výsledné vlastnosti komplexní sloučeniny. Obecně lze zapsat v současnosti studované „half-sandwich“ komplexy, kde $M = \text{Ir}^{\text{III}}$ nebo Rh^{III} následovně:



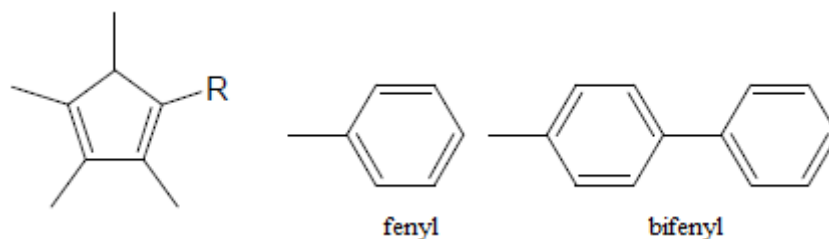
Na centrální atom M je η^5 -vazbami vázán cyklopentadienylový aniont společně s bidentátním ligandem. Jako Z je zde označen odstupující ligand (např. ve vodném prostředí). Na Obr. č. 13 je uvedeno obecné schéma takto popsané komplexní sloučeniny. Jedná se o obecné znázornění „half-sandwich“ komplexu iridia (III). [7]



Obr. č. 13: Schéma iriditého „half-sandwich“ komplexu. Převzato a upraveno z [7]

Centrálním atomem je v tomto případě Ir^{III} . Pentahapto vazbami je na něj navázán cyklopentadienylový aniont, který může být různě substituován. Vazbou bidentátního ligandu, jež hraje velkou roli týkající se reaktivity, a Z skupiny se stabilizuje pseudooktaedrická stereochemie. [7]

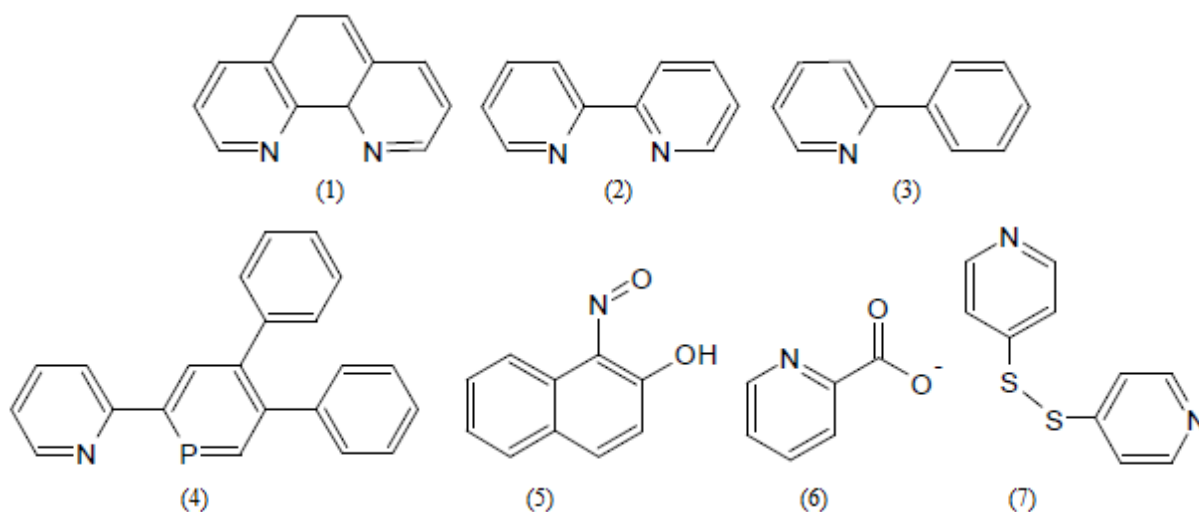
Stabilizující Cp (cyklopentadienylový aniont) bývá často substituovaný do podoby Cp^* (1,2,3,4,5-pentamethylcyklopentadienylový aniont). Methylové skupiny jsou elektronově bohaté a přispívají tak ke zvýšení elektronové hustoty na kovovém atomu, čímž je podporováno rychlejší uvolnění Z skupiny. [7, 8]



Obr. č. 14: R-zbytky zvyšující účinnost half-sandwich komplexů.

Cytotoxické studie prokázaly závislost inhibiční účinnosti komplexu na charakteru substituce Cp ligandu. Deriváty Cp*, které jsou substituovány fenylovou nebo bifenylovou skupinou (Obr. č. 14), prokazují vyšší cytotoxický účinek. Vazba arenů na Cp* zvyšuje nepolární charakter ligandu. Upravený stabilizující ligand celkově zvyšuje hydrofobicitu resp. lipofilitu komplexní sloučeniny. Nepolární část komplexu je nesmírně důležitá při transportu skrz cytoplazmatickou membránu živočišných buněk, které jsou tvořeny lipofilními řetězci mastných kyselin. Prostupnost do buněk je jedním ze sledovaných parametrů, které ovlivňují biologickou účinnost léčiva. Neméně důležitá je schopnost Cp* ligandu interkalace (včlenění do dvoušroubovice DNA), což má za následek omezení replikace. [8, 62]

Bidentátní ligandy jsou v mnoha případech vázány na centrální atom prostřednictvím N-donorových atomů. Záměnou neutrálního N^N za záporně nabitý C^N ligand je docíleno zvýšení hydrofobního charakteru komplexu, odlišného prostorového uspořádání, pevnější vazbou na nukleobázi a celkově zvýšením lipofily. C^N analoga jsou významná z hlediska zvýšení aktivity a snížení hodnoty IC₅₀. Kromě těchto analog jsou známy i P^N, N^O, O^O nebo S^S ligandy (Obr. č. 15). [7, 8, 56-59, 63]



Obr. č. 15: Vybrané strukturální motivy L^L ligandů. (1) fenantrolin, (2) 2,2'-bipyridyl, (3) fenylypyrimidin, (4) 2-(2'-pyridyl)-4,6-difenylyfosfinin, (5) 1-nitroso-2-naftol, (6) pikolinát, (7) 4,4'-dipyridyldisulfid [7, 8, 56-59, 63]

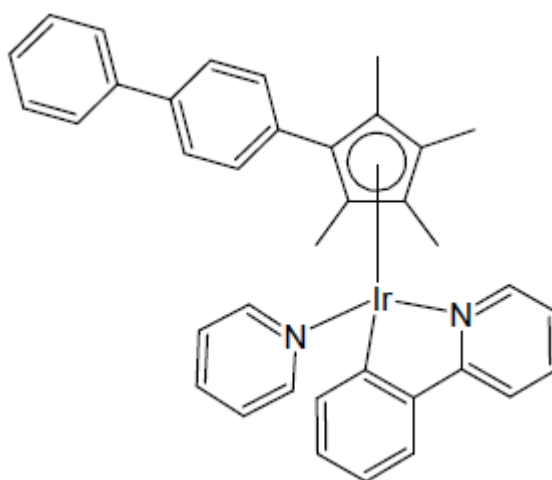
Na příkladu komplexu $[(Cp^*)Ir(N^{\wedge}N)Z]$, kde $N^{\wedge}N$ je bipyridyl (bpy) a Z je Cl, budou demonstrovány výsledky modulace Cp^* , $N^{\wedge}N$ a Z . Komplex $[(Cp^*)Ir(bpy)Cl]$ nevykazuje cytotoxicitu na A2780 (buněčná linie karcinomu vaječníku). Záměnou bpy za $C^{\wedge}N$ analog se stal komplex cytotoxický ($IC_{50} = 18,8 \mu M$) aktivní díky urychlení hydrolýzy zvýšením negativního náboje na centrálním atomu a mnohem silnější vazbou na DNA (80-50% inhibice testovaných buněk 50 μM koncentrací). Ještě výraznější cytotoxicity bylo dosaženo substitucí methylové skupiny na Cp^* kruhu bifenylovým zbytkem (Cp^{xbiph}). Tento příspěvek k vyšší lipofilitě a usnadnění odštěpení Z společně se záměnou chloridové odstupující skupiny za pyridin (py) vedl ke snížení IC_{50} až na 0,1 μM . $[(Cp^{xbiph})Ir(C^{\wedge}N)py]$ má oproti výchozímu komplexu lipofilnější charakter, který usnadňuje transport a akumulaci v buňkách (zároveň je zvětšen úsek pro interkalaci DNA, což také zvyšuje účinek). Pro srovnání závislosti strukturálních parametrů na hodnotě IC_{50} jsou uvedeny v tabulce č. 3 příklady $[(Cp^*)Ir(N^{\wedge}N)Z]$ modifikací testovaných na buněčné linii A2780 v porovnání s *cis*-platinou ($IC_{50} = 1,2 \mu M$). [7, 62, 65]

Tab. č. 3: Souvislost strukturálních parametrů komplexů s hodnotou IC_{50} (A2780 – buněčná linie rakoviny vaječníku). [7, 62, 65]

Komplex	Cp^x	$L^{\wedge}L$	Z	IC_{50} (μM)
1	Cp^*	$N^{\wedge}N$	Cl	>100
2	Cp^*	$C^{\wedge}N$	Cl	18,8
3	Cp^{xbiph}	$C^{\wedge}N$	Cl	0,7
4	Cp^{xbiph}	$C^{\wedge}N$	py	0,12

Cp^* = 1,2,3,4,5-pentamethylcyklopentadienyl
 Cp^{xbiph} = bifenyltetramethylcyklopentadienyl
 $L^{\wedge}L$ = bidentátní ligand

$N^{\wedge}N$ = 2,2'-bipyridyl (bpy)
 $C^{\wedge}N$ = fenylpyridin (phpy)
 py = pyridin



Obr. č. 16: $[(Cp^{xbiph})Ir(C^{\wedge}N)py]$.

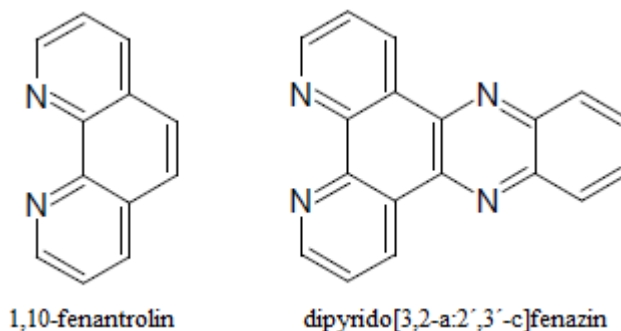
Mírou úspěšné vazby na báze DNA (především na guanin) je rychlost, s jakou odstupuje Z skupina. Záměnou halogenidového aniontu za pyrimidin se urychlila aktivace komplexu pro vazby s purinovými nukleobázemi. Vyšší aktivity lze také dosáhnout rozšířením plochy planárního bidentátního L^ΛL ligandu. Měření cytotoxické aktivity takto upravených komplexů byly porovnány se svými dvoujadernými komplexy propojenými např. pyrazinem nebo 4,4'-bipyridylem. (viz tabulka č. 4). [7, 8, 62, 65]

Tab. č. 4: Srovnání hodnot IC₅₀ v závislosti na velikosti planárního L^ΛL mono- a dinukleárních komplexů. Substituce phen za bppz (1) přináší znatelné zvýšení aktivity při testování na MCF-7 (buněčná linie rakoviny prsu) a HT-29 (buněčná linie rakoviny tračníku). Dvoujaderné komplexy 3 a 4: v závislosti na můstkové skupině a typu linie vykazují nízké hodnoty IC₅₀ (v případě HT-29 v porovnání s mono-komplexem až 4x nižší hodnota). (3) [{(Cp*)Ir(dppz)}₂(μ-pyr)]⁴⁺; (4) [{(Cp*)Ir(dppz)}₂(μ-4,4'-bpy)]⁴⁺ [7, 62, 65]

Komplex	Cp ^x	L ^Λ L	Z	IC ₅₀ (μM)		μ-můstek
				MCF-7	HT-29	
1	Cp*	phen	Cl	>100	>100	
2	Cp*	dppz	Cl	2,3	7,4	
3	Cp*	dppz	Cl	3,5	1,8	pyr
4	Cp*	dppz	Cl	3,1	3,8	bpy

phen = 1,10-fenantrolin
dppz = dipyrido[3,2-a:2',3'-c]fenazin

pyr = pyrazin
bpy = 4,4'-bipyridin



Obr. č. 17: Struktury porovnávaných N^ΛN ligandů phen a dppz.

Kombinací ligandů lze zformovat komplexní částici do takové podoby, která je mnohonásobně účinnější. Výše zmíněné charakteristiky ligandů jsou spojeny s mírou stability a reaktivity. Inhibice replikace je v některých případech spojena s rychlostí hydrolyzy odstupující skupiny. Typ bidentátního a stabilizujícího Cp* ligandu souvisí s pevností a stálostí vazby s nukleobázemi a konečně velikost nepolárního (lipofilního) úseku molekuly je příčinou rychlého a snadného průniku do buňky včetně inhibiční interkalace DNA. [7, 8, 56-61]

Výše demonstrováné modifikace jsou známy i u strukturně podobných komplexů rhodia, kde bylo navýšení cytotoxicity dosaženo zejména koordinací velkých planárních L^L ligandů, jako např. dppz. Chemie polosendvičových komplexů iridia a rhodia je na začátku své potenciální éry. Výjimečnost komplexů tkví kromě vázaného ligandového okolí také v inertním stabilním d⁶ nízkospinovém stavu centrálního atomu. V závislosti na charakteru ligandu zaujímá čtvercovou (vazba monodentátních ligandů) nebo pseudo až oktaedrickou stereochemii (kombinované vázání mono- a bidentátních ligandů). [3, 7, 8, 56, 57]

Studie zaměřené na buněčné linie rakovin např. prsu, tlustého střeva, prostaty, vaječníku, varlat, kůže či leukémie poukazuje na široké spektrum inhibovaných typů buněk, na které působí nízké až extrémně nízké koncentrace (v řádech μM a až nM) inokulovaného léčiva. Komplexy Ir(III) a Rh(III) by mohly překonat klinické problémy doprovázející platnatá léčiva i ze stránky rezistence a nežádoucích vedlejších účinků. [3-8, 55, 56, 65]

Podobně jako u *cis*-Pt(II) léčiv je charakteristická vazba zmíněných polosendvičových komplexů na báze dvoušroubovice DNA (guanin). Společně s interkalací (včleněním mezi báze DNA) dochází k zamezení replikace DNA – opravné mechanismy nestačí na rozsáhlou blokaci dvoušroubovice DNA. Zvýšení interkalace bylo dosaženo přípravou dimerizovaných komplexů. Jinou možností, jak destabilizovat homeostázi buňky, je fotochemická generace singletového kyslíku některými N^N, N^O a C^N vázanými ligandy, které jsou citlivé na světlo. Vznikající singletový kyslík je zástupcem tzv. reaktivních forem kyslíku, které vyvolávají a zvyšují buněčný stres. Interakční kaskádou tak vznikají jiné formy reaktivních částic, které destabilizují buněčné prostředí a jeho struktury (např. proteiny nebo DNA). Dalším způsobem, jakým lze vyvolat apoptotickou dráhu, je rozpoznání ATP-vazebního místa proteinkináz a její inhibice. Své uplatnění našly některé komplexy v roli biologických přenašečů např. vitamínů či hormonů. Využívány jsou i pro luminiscenční značení molekul. [3-8, 56-65]

Přestože je chemie organokovových polosendvičových komplexních sloučenin teprve na začátku, již dnes je slibným cílem pro vývoj léčiv. Široko spektrální biologická aplikace dělá z těchto komplexů nadějná potenciální léčiva, která by mohla být zdokonalena na takovou úroveň, jež by předčila odolnost buněk a snížila vedlejší nežádoucí vlivy na minimum či je úplně odstranila.

5. Závěr

Literární rešerše diplomové práce je věnována buněčnému cyklu a jeho řídicím regulačním jednotkám cyklin-dependentním kinázám Cdk. Vedle mechanismu účinku *cis*-platnatých léčiv, tedy interakcí s DNA, je možno zastavit buněčný cyklus inhibicí specifických Cdk. Inhibitory Cdk jsou slibnou skupinou látek pro studie zabývající se možnostmi zástavy množení studovaných nádorových linií. Narůstají počty a typy potenciálních biologicky aktivních látek založených na inhibici Cdk.

Polosendvičové komplexy Rh(III) a Ir(III) vykazují cytotoxickou aktivitu na různých typech testovaných lidských nádorových linií s mechanismem účinku pravděpodobně odlišným od aktuálně používaných metaloterapeutik. V současnosti proto představují intenzivně studovanou skupinu koordinačních sloučenin jako potenciálních léčiv rakoviny. Probíhají rozsáhlé studie vztahu struktury a aktivity a jsou definovány strukturní požadavky či nutné modifikace pro navýšení protinádorové aktivity.

V rámci experimentální části byly připraveny organické ligandy na bázi derivátů 2,4-aminopyrimidinu (L_{1-4}), které byly použity pro syntézy komplexních sloučenin Rh(III) a Ir(III). Výsledné komplexy, stejně jako ligandy byly charakterizovány metodami elementární (prvkové) analýzy (EA), NMR spektroskopií (NMR), infračervenou spektroskopií (IČ), hmotnostní spektrometrií (MS), termickou analýzou (TG) a měřením molární vodivosti. Navržená koordinace ligandu v komplexních sloučeninách $[Cp^*M(L_{1-4})Cl_2]$, kde M je Rh(III) nebo Ir(III), přes N1 atom heterocyklu ligandu byla potvrzena z údajů 1H NMR a ^{13}C NMR spekter ligandů a komplexů.

Přípravené komplexní sloučeniny by do budoucna mohly být podrobeny testům cytotoxicity na různých typech lidských nádorových linií. V případě negativních výsledků lze tyto pilotní látky dále modifikovat. V polohách 2 a 6 situované aminoskupiny nabízejí možnosti rozšíření původního monodentátního ligandu do formy bidentátní či tridentátní, čímž by mohlo být teoreticky dosaženo vyšší stability a možné změny odstupující skupiny. Další nabízenou modulací je možnost substituce Cp^* ligandu, čímž by bylo dosaženo pravděpodobně vyšší akumulace v testovaných buňkách zvýšenou lipofilitou látek. Studována může být biologická aktivita: např. interakce s DNA, často studované pole inhibičních vlastností na Cdk2 a její následky (např. kumulace p53) nebo např. sledování vlivu inokulované dávky na segregaci chromozomů.

6. Seznam použitých zkratk

ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
A2780	nádorová linie rakoviny vaječníku
AMK	aminokyselina
cdc25	rodina fosfatáz
Cdk	cyklin-dependentní kináza
Cip/Kip	rodina inhibitorů cyklin-dependentních kináz
DNA	2-deoxyribonukleová kyselina
DMF	N, N' - dimethylformamid
EA	elementární analýza
E2F	rodina transkripčních faktorů
HT-29	nádorová linie rakoviny tračníku
IC ₅₀	koncentrace, kdy dochází k 50% inhibici dané biologické aktivity
IČ	infračervená spektroskopie
INK4	rodina inhibitorů cyklin-dependentních kináz
MCF-7	nádorová linie rakoviny prsu
MDM2	Mouse double minute 2 (protein)
MPF	mitózu podporující faktor
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
RNA	ribonukleová kyselina
RTG	rentgenová strukturní analýza
TG	termogravimetrie
TLC	tenkovrstvá chromatografie

7. Literatura

- [1] Dabrowiak J.C.: *Metals in Medicine*, Wiley, 2009. ISBN: 978-0-470-68196-1
- [2] Gielen M., Tiekink E. R. T.: *Metallotherapeutic Drugs and Metal-based Diagnostic Agents*, Eley, 2005. ISBN: 0-470-86403-6
- [3] Medici S. et al.: *Coord. Chem. Rev.* 284, (2015). 329-350
- [4] Hearn J. M. et al.: *ACS Chem. Biol.* 8, (2013). 1335-1343
- [5] Novohradsky V. et al.: *Metallomics* 6, (2014). 682-690
- [6] Liu Z. et al.: *Inorg. Chem.* 50, (2011). 5777-5783
- [7] Liu Z. et Sadler P. J.: *Acc. Chem. Res.* 47, (2014). 1174-1185
- [8] Romero-Canelón I. et Sadler P. J.: *Inorg. Chem.* 52, (2013). 12276-12291
- [9] Arris Ch. E. et al.: *J. Med. Chem.* 43, (2000). 2797-2804
- [10] Fisher P. M. et al.: *Progress in Cell Cycle Research* 5, (2003). 235-248
- [11] Kryštof V. et Uldrijan S.: *Current Drug Targets* 11, (2010). 291-302
- [12] Lapenna S. et Giordano A.: *Nat. Rev. Drug Disc.* 8, (2009). 547-566
- [13] Carnero A.: *British Journal of Cancer* 87, (2002). 129-133
- [14] Kryštof V. et al.: *Cell. Mol. Life Sci.* 62, (2005). 1763-1771
- [15] Peyressatre M. et al.: *Cancer* 7, (2015). 179-237
- [16] Postlethwait J. H. et Hopson J. L.: *Modern Biology*, Holt Rinehart and Winston, 2006. ISBN: 0-03-065178-6
- [17] Fried G. H. et Hademenos G. J.: *Biology*, 2nd edition, McGraw-Hill Companies, 1998. ISBN: 0070224056
- [18] Alberts, B. et al.: *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd., Ústí nad Labem: Espero, 2005. ISBN 80-902906-2-0
- [19] Raven P. H. et Johnson G. B.: *Biology*, 6th edition, McGraw-Hills Companies, 2001
- [20] Purves K. et al.: *Life: The Science of biology*, 7th edition, Sinauer Associates, 2004
- [21] D'Urso G. et Datta S.: *Stem Cell Biology, chapter 4: Cell cycle control, checkpoints and Stem cell biology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. ISBN: 0-87969-575-7/01
- [22] Creighton T. E.: *Encyclopedia of Molecular biology*, John Wiley & Sons, Inc. 1999. ISBN: 0-471-15302-8
- [23] Hartwell L. H. et Weinert T. A.: *Science* 246, (1989). 629-634
- [24] Malumbres M. et Barbacid M.: *Trends in biochemical sciences* 30, (2005). 630-641
- [25] Kryštof V. et Strnad M.: *Chem. Listy* 95, (2001). 295-300

- [26] Knockaert M. et al.: *Trends in biochemical sciences* 23, (2002). 417-425
- [27] Shapiro G. I.: *J Clin Oncol* 24,(2006). 1170-1783
- [28] Sherr Ch. J.: *Cancer research* 60, (2000). 3689-3695
- [29] Pavletich N. P.: *J. Mol. Biol.* 287, (1999). 821-828
- [30] Popowycz F. et al.: *J. Med. Chem.* 52, (2009). 655-663
- [31] Hampl F. et Paleček J.: *Farmakochemie*, VŠCHT Praha, (2009). 38-48
- [32] Havlíček L. et al.: *J. Med. Chem.* 40, (1999). 408-412
- [33] Galons H. et al.: *Expert Opin. Ther. Patents* 20, (2010). 377-404
- [34] Dai Y. et Grant S.: *Current Opinion in Pharmacology* 3, (2003). 362-370
- [35] Houzé S. et al.: *Molecules* 19, (2014). 15237-15257
- [36] Liao J.: *J. Med. Chem.* 50, (2007). 409-424
- [37] McInnes C.: *Drug Discovery Today* 13, (2008). 875-881
- [38] Paprskářová M. et al.: *J. Cell. Biochem.* 107, (2009). 428-437
- [39] Węsierka-Gądek J. et Kryštof V.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1171, (2009). 228-241
- [40] Leitch A. E. et al.: *British Journal of Pharmacology* 158, (2009). 1004-1016
- [41] Dyson N.: *Genes & Development* 12, (1998). 2245-2262
- [42] Poznic M.: *J. Biosci.* 34, (2009). 305-312
- [43] Malumbres M. et Carnero A.: *Progress in Cell Reaserch* 5, (2003). 5-18
- [44] Dates S. et Vousden K. H.: *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, (1996). 8-12
- [45] Uldrijan S. et al.: *Chem. Listy* 96, (2002). 145-149
- [46] Uldrijan S. et al.: *Klinická onkologie* 14, (2001). 25-30
- [47] Pestell K. E. et al.: *Oncogene* 19, (2000). 6607-6612
- [48] Bettayeb K. et al.: *Mol. Cancer Ther.* 7, (2008). 2713-2724
- [49] Čapek P. et al.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 68, (2003). 779-791
- [50] Havlíček L. et al.: *Bioorg. Med. Chem.* 13, (2005). 5399-5407
- [51] Whitfield H. J. et al.: *Chem. Commun.*, (2003). 2802-2803
- [52] Hardcastle I. R. et al.: *J. Med. Chem.* 47, (2004). 3710-3722
- [53] Mesquiche V. et al.: *Bioorg. Med. Chem. Lett* 13, (2003). 217-222
- [54] Marchetti F. et al.: *Org. Biomol. Chem.* 8, (2010). 2397-2407
- [55] Trávníček Z. et al.: *J. Inorg. Biochem.* 105, (2011). 937-948
- [56] Cao R. et al.: *J. Med. Chem.* 56, (2013). 3636-3644
- [57] Ruiz J. et al.: *Dalton Trans.* 41, (2012). 12847-12856

- [58] Wirth S. et al.: *J. Biol. Inorg. Chem.* 15, (2010). 429-440
- [59] De Krom I. et al.: *Chem. Eur. J.* 19, (2013). 3676-3684
- [60] Liu Z. et al.: *Organometallics* 33, (2014). 5324-5333
- [61] Siu-Kit Leung et al.: *Inorg. Chem.* 49, (2010). 4984-4995
- [62] Nazif M. A. et al.: *J. Inorg. Biochem.* 103, (2009). 1405-1414
- [63] Ying-Feng Han et al.: *Dalton Trans.* 39, (2010). 7119-7124
- [64] Tönnemann J. et al.: *Eur. J. Inorg. Chem.*, (2013). 4558-4562
- [65] Liu Z. et al.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, (2014). 3941-3946
- [66] Geary W. J.: *Coord. Chem. Rev.* 7, (1971). 81-122
- [67] Kania P.: *INFRAČERVENÁ SPEKTROMETRIE*.
Dostupné z: old.vscht.cz/anl/lach1/7_IC.pdf (8.4.2015)
- [68] Shannon R. D.: *Solid State Communications* 6, (1968). 139-143