

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2011

Jana Navrátilová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Genotoxické působení roskovitinu

Diplomová práce

Jana Navrátilová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2011

Vedoucí práce: doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala sama v průběhu magisterského studia pod vedením doc. RNDr. Vladimíra Kryštofa, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 10. 5. 2011

.....
Bc. Jana Navrátilová

Za dokončení své diplomové práce bych chtěla touto cestou poděkovat všem lidem, kteří mi byli podporou a mají podíl na jejím úspěšném završení. Jedná se o mého vedoucího, doc. RNDr. Vladimíra Kryštofa, PhD. a Mgr. Martina Mistríka, PhD. za odborné vedení, laborantku Ditu Parobkovou a v neposlední řadě mé rodiče, kteří mě po celou dobu studií podporovali.

Souhrn

Jednou ze skupin v současnosti intenzivně vyvíjených léčiv jsou inhibitory cyklin-dependentních kináz (CDK). Klinickým zkoušením bezpečnosti a účinnosti prochází dnes nejméně dvacet různých inhibitorů CDK, včetně roskovitinu. Na rozdíl od řady klasických cytostatik, která přímo poškozují DNA, roskovitin zastavuje proliferaci buněk a způsobuje jejich smrt skrze inhibici enzymů nezbytných pro buněčné dělení a přežívání - CDK. Není tedy přímo genotoxický a jeho působením by nemělo primárně docházet k poškození DNA. Přesto se v některých odborných publikacích objevují informace, které genotoxický potenciál roskovitinu naznačují. K opravám poškozené DNA slouží několik odlišných mechanismů, aktivovaných podle povahy poškození a momentálního stavu buňky. Homologní rekombinace patří k nejpřesnějšímu typu opravy poškozené DNA. Cílem práce bylo posoudit, jak syntetické inhibitory CDK ovlivňují homologní rekombinaci a zjistit vztahy mezi selektivitou inhibitorů vůči jednotlivým isoformám CDK a jejich schopností blokovat HR.

Summary

Development of human cancer is linked to deregulation and hyperactivation of enzymes called cyclin-dependent kinases (CDKs). CDKs are key regulators necessary for the cell cycle control. Their hyperactivity leads to uncontrolled proliferation and promotes cancer development. Currently they seem to be important targets for cancer treatment and indeed many CDK inhibitors, including roscovitine, undergo clinical trials in patients. In contrast to classical DNA-damaging cytostatics, roscovitine blocks proliferation of cancer cells and induces selectively their apoptosis, both via inhibition of CDKs. Despite relatively well-known mechanism of its action, roscovitine is sometimes suspected of being genotoxic.

Damaged DNA can be repaired by several routes, depending on the lesion itself and on other cellular factors. Repair of double stranded breaks through homologous recombination (HR) is a preferred way, dependent on presence of suitable template and activity of certain CDKs. The aims of this work were to describe effects of some CDK inhibitors on HR and to analyze relationships between selectivity of CDK inhibitors and their interference with HR.

Obsah

1.	Cíle práce	8
2.	Úvod.....	10
2.1	Poškození DNA	11
2.2	Dvouvláknové zlomy.....	12
2.3	Odpověď buňky na poškození DNA	12
2.3.1	Oprava DNA zprostředkovaná ATM	13
2.3.2	Ataxia telangiectasia and Rad3 related (ATR).....	15
2.4	Mechanismus opravy DSBs.....	16
2.4.1	Nonhomologous end joining (NHEJ).....	16
2.4.2	Homologní rekombinace	17
2.5	Buněčný cyklus a jeho regulace	19
2.6	Cyklin dependentní kinázy (CDK)	21
2.6.1	CDK a homologní rekombinace.....	22
2.6.2	Charakterizace použitých inhibitorů CDK.....	23
3.	Materiál a metody	27
4.	Pracovní postupy.....	31
4.1	Kultivace buněk.....	31
4.2	Lyzace vzorků.....	31
4.3	Elektroforetická separace a Western Blotting	31
4.4	Test toxicity	32
4.5	Ověření vlivu zvolených koncentrací CDKi na buněčný cyklus.....	32
4.6	Transfekce linie pro analýzu homologní rekombinace.....	32
4.6.1	Postup transfekce.....	33
4.6.2	Cytometrická analýza a hodnocení	34
5.	Výsledky	36
5.1	Charakterizace účinku použitých inhibitorů na buněčný cyklus	36
5.2	Cytometrická analýza homologní rekombinace	38
5.3	Analýza hladiny proteinu Rad51 pomocí SDS PAGE a Western Blot	39
6.	Diskuze	41
7.	Závěr	45
8.	Seznam použitých zkratk	46
9.	Seznam použité literatury	48
10.	Přílohy.....	57

1. Cíle práce

1. Vypracovat rešerši na téma homologní rekombinace a její ovlivnění inhibitory cyklin dependentních kináz
2. Testovat vliv inhibitorů cyklin dependentních kináz na homologní rekombinaci v reportérové linii HR-GFP a posoudit vztah jejich selektivity a účinku
3. Posoudit zapojení proteinu Rad51 v inhibici/ovlivnění homologní rekombinace inhibitory cyklin dependentních kináz

Teoretická část

2. Úvod

Na všechny živé organismy neustále působí různé vlivy z jejich okolí. Tyto vlivy mohou být příčinou narušení celistvosti a stálého vnitřního prostředí. Každý organismus se snaží zachovat svou genetickou informaci komplexní a nezměněnou ji přenášet do další generace. Úplná genetická informace je základem pro plně funkční buňky a následně celý organismus. Udržet integritu je přitom jednou ze základních vlastností všech organismů. Její součástí je nejen bezchybná replikace, ale také plně funkční síť proteinů zajišťujících opravu poškození. Velké množství látek má účinky, které nějakým způsobem poškozují genetickou informaci nebo narušují procesy spojené s její replikací. Tyto látky mají tzv. genotoxický účinek.

Buňky na poškození DNA reagují různými způsoby. Specifické signální dráhy zastaví buněčný cyklus a tím poskytnou opravným mechanismům dostatek času pro reparaci vzniklých škod. Pokud je poškození neopravitelné, přejdou buňky do stádia senescence nebo je u nich spuštěn proces apoptózy, tzv. buněčné programované smrti.

Vzrůstající incidence nádorových onemocnění je primární motivací vývoje moderních léčiv, cílených specificky na mechanismy alterované v nádorech. V rakoviných buňkách je záměrně vyvoláváno poškození radioterapií či chemoterapií. Radioterapie i běžná chemoterapie indukují celkové poškození DNA v nádorech. Protinádorová léčiva poškozují DNA, blokují replikaci nepřímo skrze inhibici prekurzorů biosyntézy nebo narušují hormonální stimulaci růstu. Cílem je zničit dané buňky. Obě metody poškozují nejen buňky rakovinné, ale mají vysokou toxicitu i pro zdravé buňky v zasažené tkáni. Proto se v dnešní době vyvíjí metody, které by specificky zasahovaly pouze rakovinné buňky.

Jednou ze skupin v současnosti intenzivně vyvíjených léčiv jsou inhibitory cyklin-dependentních kinas (CDK). Klinickým zkoušením bezpečnosti a účinnosti prochází dnes nejméně dvacet různých inhibitorů CDK, včetně roskovitinu, u jehož objevu stali také olomoučtí vědci. Na rozdíl od řady klasických cytostatik, která poškozují DNA a indukují smrt nádorových buněk, roskovitin zastavuje jejich proliferaci a způsobuje smrt skrze inhibici enzymů nezbytných pro proliferaci a přežívání - CDK. Není tedy přímo genotoxický a jeho působením by nemělo primárně docházet k poškození DNA. Přesto se v některých odborných publikacích objevují informace, které genotoxický potenciál roskovitinu naznačují. Jedná se například o akumulaci nádorového supresoru p53, který je klíčovou molekulou v odpovědi na poškození DNA, nebo zvýšená

fosforylace histonu H2AX, považovaná za jeden z nepřímých důkazů zlomu DNA. Vysvětlení může spočívat např. v zastavení replikace, která je závislá na CDK2 (a tedy i citlivá k roskovitinu), s následným rozpadem replikačních vidlicek a indukci buněčné smrti.

Další možností, kterou se zabývá tato diplomová práce, je omezení schopnosti opravovat zlomy DNA homologní rekombinací. Negativní vliv některých inhibitorů CDK na tento opravný mechanismus byl sice popsán, není však zatím zcela jasné, jaký je přesný mechanismus a vztah mezi selektivitou těchto inhibitorů a jejich cytotoxickou aktivitou. Na tyto otázky se částečně pokouší odpovědět tato práce.

2.1 Poškození DNA

Existuje mnoho exogenních i endogenních činitelů. Někteří poškození vyvolávají přímo, jiní zprostředkovaně skrze účinky reaktivních radikálových částic, jejichž tvorbu iniciují. Jako poškození tedy nazýváme fyzické abnormality vznikající na DNA. Zahrnujeme sem depurinaci nebo depyrimidinaci, alkylace způsobující zesíťování molekuly DNA, oxidace bází, případně vznik dimerů thiminu. Zvláště nebezpečné jsou jednovláknové a dvouvláknové zlomy a v krajním případě fragmentace celých chromozomů. K narušení genetické informace dochází jak přirozeně, tak jej lze indukovat cíleně. Struktura DNA i samotných chromozomů může být porušena oxidačním či mechanickým stresem (Haber, 2000). Spontánní zlomy na chromozomech mohou vzniknout během procesu replikace. Při meioze dochází k programované aktivaci endonukleáz, které následně fragmentují DNA, aby mohla proběhnout výměna homologních úseků. Uměle je možné poškození vyvolat pomocí látek zvaných mutageny. Mezi nejběžnější patří záření (UV nebo ionizující) a chemické látky.

Každý typ poškození musí být opraven, neboť změny v genetické informaci mohou mít karcinogenní charakter (Khanna & Jackson, 2001). Různé typy poškození vyžadují a zahrnují rozdílné mechanismy oprav. Aby buňky mohly efektivně reagovat a opravovat vznikající poškození, musely vyvinout specifickou síť kontrolních, regulačních a signálních drah. Skrze tyto mechanismy mají pod kontrolou důležité pochody jako replikace a mitotické dělení, které jsou nejvíce citlivé pro vznik a kumulaci genetických mutací.

2.2 Dvouvláknové zlomy

Mezi nejzávažnější poškození vznikající na šroubovici DNA patří zlomy zasahující obě vlákna. Dvouvláknové zlomy (double strand breaks, DSBs) jsou velmi nebezpečné. Mohou se objevit jako důsledek ozáření buněk ionizujícím zářením, po expozici některým radiomimetickým látkám a chemoterapeutikům, při mechanickém stresu. Fyziologicky vznikají jako intermediáty např. při V(D)J rekombinaci (Basing & Alt, 2004). Vytvářeny jsou zde specifickými enzymy topoizomerázami, které odvíjí dvouvláknovou šroubovici před replikační vidličkou a umožňují tak dalším enzymům replikačnímu komplexu postupovat podél vlákna. Tyto zlomy jsou ovšem ihned opraveny a nezpůsobují buňce žádné riziko.

DSBs indukované v G_1 fázi jsou opraveny pomocí nehomologního spojení konců, zatím co reparace DSBs vznikajících v S a G_2 fázi buněčného cyklu probíhá homologní rekombinací. Jsou-li DSBs ponechány bez opravy, dochází k zástavě buněčného cyklu, indukci apoptotické dráhy nebo mitotické smrti buňky v důsledku ztráty genetického materiálu (Olive, 1998). Pokud by buňka toto poškození opravila nesprávně, povede to k mutacím a genomové nestabilitě. Protože důsledkem jsou chromozomové fragmentace, translokace, inverze, delece a vznik acentrických chromozomů. Naproti tomu složitý mechanismus opravy a extrémní cytotoxicita pro buňku dělá z DSBs vynikající nástroj pro léčbu nádorů (Allan & Travis, 2005).

2.3 Odpověď buňky na poškození DNA

Eukaryotické buňky vyvinuly řadu mechanismů pro rychlou a účinnou detekci a opravu chyb. Tato evolučně konzervovaná signální dráha (DNA damage response, DDR) zastavuje postup buněčného cyklu a indukuje opravy DNA (Zhou & Elledge, 2000). Jedná se o typickou signálně-transdukční dráhu (Obr. č. 1). Úlohu signálu hraje poškození. Signál zachycují proteiny (MRN, p53BP, MDC1), které se následně váží na DNA a aktivují transduktory signálu (ATM/ATR). Protein kinázová kaskáda amplifikuje a šíří signál k cílovým efektorovým proteinům. Celá kaskáda je selektivní, rychlá, specifická a vysoce účinná (Jackson, 2002). DDR a její správné fungování jsou kritickým faktorem, kterým buňka předchází vzniku rakoviny v důsledku nestability genomu (Bartek *et al.*, 2007; Gorgoulis *et al.*, 2005). Jakýkoliv zásah do těchto procesů vede k přežití buněk s geneticky nestabilní DNA.

Jakmile je v buňce detekováno poškození DNA, je aktivován některý z kontrolních bodů buněčného cyklu, tzv. checkpoint. Jedná se o jakési „uzlové body“, které jsou kontrolovány skrze specifické proteiny. Je-li v dělicí se buňce něco v nepořádku, kontrolní mechanismy to zachytí a cyklus spolu s replikací jsou v těchto bodech zastaveny. Buňka tak získá potřebný čas pro opravu poškození.

2.3.1 Oprava DNA zprostředkovaná ATM

ATM (Ataxia telangiectasia mutated) je protein patřící do skupiny PI3K kináz (phosphatidyl inositol-3-kinázy (Abraham, 2004). Do této skupiny náleží mimo ATM i ATR, DNA-PK, hSMG1 a mTOR (Shiloh, 2003). ATM primárně reaguje na DSBs (Lee & Paull, 2007). V buňce, jež není vystavena stresovým podmínkám, se vyskytuje ve formě inaktivních dimerů. V tomto uspořádání je katalytické místo blokováno těsnou vazbou obou podjednotek. Disociací na jednotlivé monomery a autofosforylací Ser-1981 se kináza stává aktivní (Bakkenist & Kastan, 2003). Pro svou aktivaci zároveň vyžaduje specifický komplex proteinů.

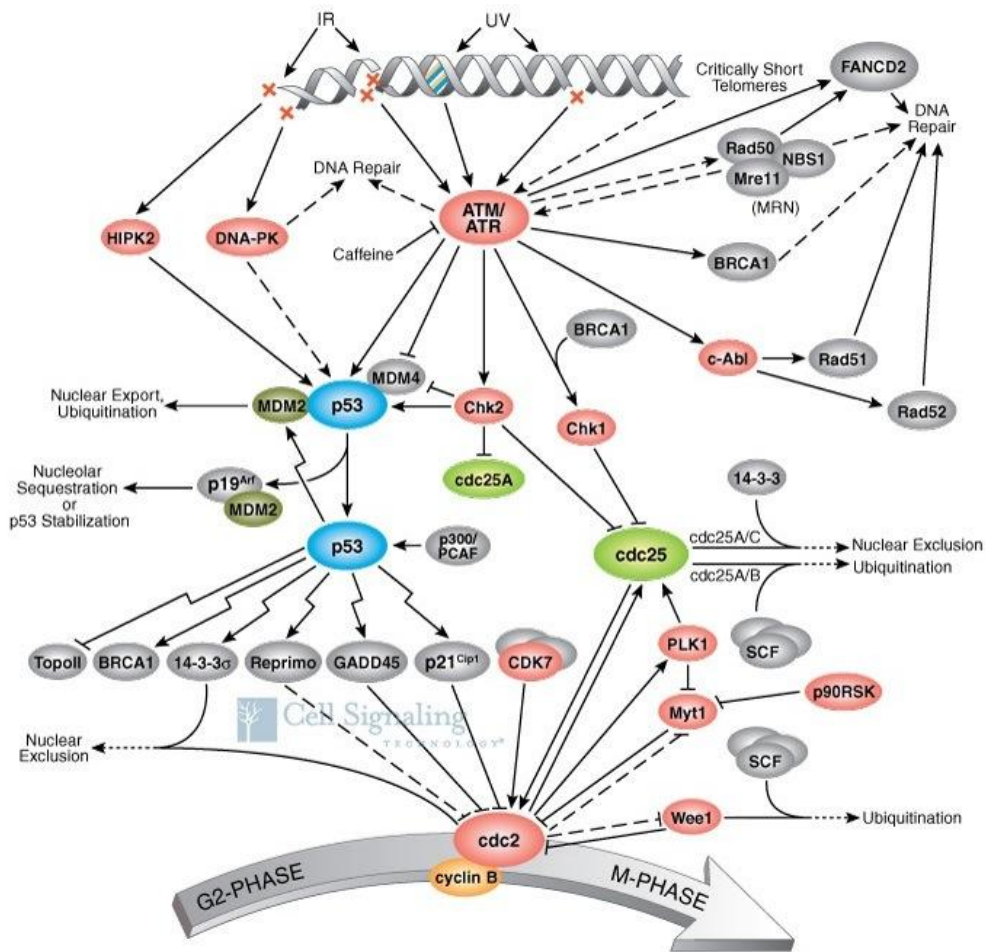
Jedná se o tzv. MRN komplex (van den Bosch *et al.*, 2003). Ten funguje jako primární senzor a rozpoznává DSB poškození. Jsou to heterotrimerně spojené proteiny Mre11 (meiotic recombination 11), Rad50 a Nbs1 (nibrin, Nijmegen breakage syndrom). Celý komplex migruje na dvouvláknový zlom a vytváří na něm mikroskopicky viditelné jaderné fokusy. Dalším úkolem komplexu je držet konce zlomů blízko sebe, což usnadňuje následnou opravu. Nbs1 pak přímo interaguje s ATM a napomáhá její lokalizaci na DSB (Kitagawa *et al.*, 2004). Zároveň má schopnost ATP dependentně odvíjet dsDNA a zprostředkovává vazbu komplexu na DNA. Mre11 vykazuje 5'→3' exonukleázovou aktivitu, která je využívána k lokální resekci konců zlomu.

Jakmile je na DSB vázán MRN komplex s ATM, nasedá MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint) a posléze p53BP (p53 binding protein) (Becker-Jensens *et al.*, 2005). MDC1 vyžaduje pro svou vazbu na DNA fosforylovaný H2AX. Histon H2A je přirozenou součástí nukleozomů. Jeho varianta, H2AX, se odlišuje přítomností dlouhého C-koncového „ocásku“ se specifickým SQEY-COOH motivem (Coster & Goldberg, 2010). Právě na serinových reziduích tohoto motivu probíhá fosforylace důležitá pro další DDR odpověď. Fosforylovaná forma, γ -H2AX, se objevuje již po několika minutách po detekci poškození. Plní funkci v lokalizaci, ukotvení a aktivaci

DDR faktorů a slouží jako marker DNA poškození (Sedelníková *et al.*, 2003). Na γ -H2AX se přímo váže MDC1 (Stucki *et al.*, 2005). Dochází k další vazbě MRN komplexu a další ATM. Signál se takto šíří od zlomu dál. MDC1 také váže na vzniklý fokus ubiquitin ligázu E3 (RNF8). RNF8 vytváří na γ -H2AX polyubiquitinové řetězce, které jsou následně rozeznávány 53BP nebo komplexem BRCA1.

Mezi cílové substráty ATM patří proteiny lokalizované v jádře; CHK2 (checkpoint kinase), proteiny p53, BRCA1 (breast carcinoma), RPA (replication protein A), SMC1 (structural maintenance of chromosome 1), NBS1, kináza Artemis a histon H2AX (Lee & Paull, 2007). CHK2 funguje jako „hlídač“ v S fázovém checkpointu. Její aktivita je podmíněna fosforylací od ATM kinázy na Thr-68 (Matsuoka, 2000). Fosforylovaným substrátem CHK2 je fosfatáza Cdc25C na Ser-216. Jde o fosforylaci s inaktivujícím vlivem, jenž napomáhá její vazbě na proteiny rodiny 14-3-3. Takto inhibovaná Cdc25C není schopna odštěpit fosfát z Tyr-15 kinázy Cdc2. Důsledkem je blok kinázové aktivity s následným zastavením cyklu před mitotickou fází (O'Connell *et al.*, 2000).

Protein p53 je jeden z nejdůležitějších tumor supresorů v buňce. Jedná se o protein s funkcí transkripčního faktoru. Zprostředkovává zastavení buněčného cyklu, opravu poškozené DNA, stabilizaci genomu, inhibici angiogeneze a indukci apoptózy. Přirozeně je lokalizován v jádře v malém množství. Jeho akumulace je důsledkem DNA poškození. Fosforylace zprostředkované kinázami ATM, ATR, CHK2 na N-konci chrání protein před vazbou Mdm2. Mdm2 náleží do skupiny ubiquitin ligáz (Stommel & Wahl, 2004) a zprostředkovává transport p53 z buněčného jádra do cytoplazmy a následnou degradaci. Stabilizovaný p53 může následně zprostředkovat expresi svého cílového proteinu p21^{WAF1/CIP1}. Tím zastavuje buňku v G₁, jelikož p21 jako přirozený inhibitor deaktivuje komplex CDK2/cyklin E zodpovědný za průchod do S fáze.



Obr. č. 1: Schema DNA Damage Response (Převzato z www.cellsignal.com, Cell signaling technology)

2.3.2 Ataxia telangiectasia and Rad3 related (ATR)

Je důležitým proteinem vykazujícím sekvenční homologii s příbuznou ATM. Dohlíží a kontroluje poškození na replikačních vidličkách. ATR primárně zastavuje replikační vidličky a je senzitivní na poškozenou DNA v S fázi (Cliby *et al.*, 2002). Když dojde ke kolapsu replikační vidličky v důsledku ozáření buněk UV, vznikají na DNA léze, a ty způsobí zastavení DNA polymerázy. Ovšem DNA helikáza pracuje dále (Flynn & Zhou, 2010). Zformují se jednovláknové přesahy. Na ně se váže specifický RPA replikační protein A, který napomáhá aktivaci ATRIP komplexu (Zhou & Elledge, 2003). Je také součástí opravy DSBs. Shiotani a Zhou (2009) dokázali, že dlouhé přesahy tvořené nukleázami v rámci DSB jsou hlavním faktorem aktivace ATR. Naproti

tomu dochází k zeslabení vazby a aktivace druhé ATM. Specifickými cíly této kinázy jsou protein p53, histon H2AX a CHK1.

2.4 Mechanismus opravy DSBs

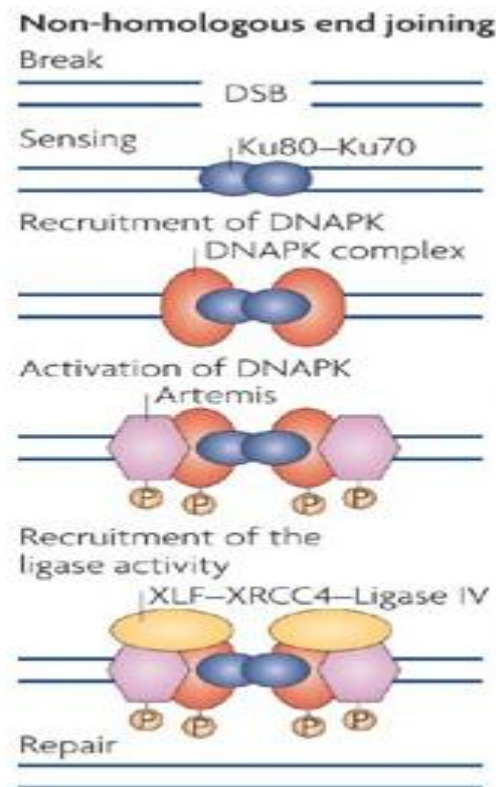
U eukaryotických systémů byly identifikovány dva rozdílné mechanismy opravy DNA poškození při DSBs. První možností opravy je homologní rekombinace, druhou jednoduché nehomologní spojení konců pomocí ligázy (Takata *et al.*, 1998). Oba mechanismy kompetují mezi sebou (Haber, 2000). Máme ovšem jen velmi málo poznatků o tom, jak si vlastně buňka vybírá cestu opravy. Rozhodujícím faktorem je pravděpodobně to, který z proteinových komplexů (KU nebo Rad51) nasedne na ssDNA (Haber, 1999).

2.4.1 Nonhomologous end joining (NHEJ)

Tato cesta je založena na spojení tupých konců DNA vznikajících při DSBs (Obr. č. 2). NHEJ typ opravy může probíhat v celém buněčném cyklu. Nejvíce se uplatňuje v G1 fázi, kdy není přítomna homologní sekvence DNA pro opravu pomocí homologní rekombinace. K tomu způsobu opravy není vyžadována (Khanna & Jackson, 2001). Nepostradatelnými funkčními proteiny jsou heterodimer Ku, DNA dependentní proteinkináza (Jeggo, 1997) interagující s DNA ligázou IV (Critchlow *et al.*, 1997; Grawunder *et al.*, 1997). Čtvrtým nezbytným prvkem je proteinový produkt genu XRCC4 (Li *et al.*, 1995).

DSBs jsou rozeznány Ku komplexem složeným z proteinových podjednotek Ku70 a Ku80 (Critchlow & Jackson, 1998). Zformovaný Ku tvořící strukturu otevřeného prstence nasedá na konce DNA se sekvenční nespecifitou (Dynam & Yoo, 1998). Asociací heterodimerního proteinu Ku s katalytickou podjednotkou DNA-PK_{cs} vzniká aktivní holoenzym DNA-PK (Smith & Jackson, 1999). Ten vykazuje Ser/Thr kinázovou aktivitu, která je zacílená na XRCC4 (Leber *et al.*, 1999) a replikační faktor A2 (Wang *et al.*, 2001). Jako poslední nasedá komplex proteinů DNA ligáza IV/XRCC4/XLF. Ligační enzym opět spojí zlom mezi oběma konci (Critchlow *et al.*, 1997). Ne vždy je možná přímá ligace. Někdy dochází ke „zpracování“ konců nebo kratší polymeraci před tím, než NHEJ započne. Pokud buňka opraví poškození touto cestou, ztrácí část

genetické informace. Vznikají delece různých velikostí. Proto je tato oprava nazývána error-prone.



Obr. č. 2: Schema NHEJ opravy DSBs (upraveno podle Misteli & Soutoglou, 2009)

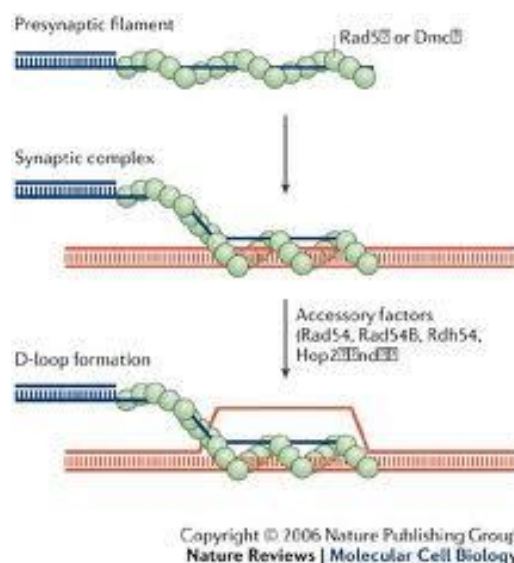
2.4.2 Homologní rekombinace

Jedná se o vysoce konzervovaný mechanismus, který se uplatňuje nejen při tvorbě nových genetických kombinací, ale i při error-free opravě DSBs. Při vzniku gamet meiózou (pachytene Profáze I) vytváří mechanismem crossing overu nové kombinace genetického materiálu (Paques & Haber, 1999). Patří tak mezi činitele udržující genetickou variabilitu. Významnou úlohu hraje při opravě DSBs poškození. Meiotická rekombinace je ale 100 – 1000 krát častější než mitotická (Sung & Klein, 2006). Rozdíl mezi nimi je právě v událostech probíhajících při překřížení chromatid. Právě u mitotické rekombinace je překřížení blokováno specifickými helikázami.

Nepostradatelnými faktory regulujícími HR jsou produkty genů z rodiny Rad52. Proteiny patří do skupiny rekombináz, mezi nimiž hraje primární důležitost Rad51. Existují dva typy opravy DSBs homologní rekombinací. Jedná se o synthesis-dependent strand annealing (SDSA) a DSB repair (Sung & Klein, 2006). DSB repair probíhá klasickou cestou přes Hollidayovu strukturu. Na rozdíl od toho při SDSA nevzniká

překřížení. Dochází k invazi a syntéze 3' konce poškozeného vlákna, ale poté je homologní vlákno přemístěno. K dosyntetizování druhého vlákna je následně využito polymerační reakce na základě komplementarity bazí.

Jako první v sekvenci událostí homologní rekombinace dochází k resekci na 5' koncích zlomů. Nukleolytická funkce je připisována MRN komplexu (Trujilo *et al.*, 1998). Jednovláknové přesahy jsou pokrývány proteinem RPA. Ten chrání vzniklé ssDNA sekvence před tím, aby nedocházelo k jejich vzájemnému spojení (Lyndaker & Alani, 2009). Zároveň představuje výzvu pro samotný Rad51, který musí pro zdárný průběh HR nasednout na ssDNA. Rad52 přímo interaguje s Rad51 a umožňuje jeho vazbu na ssDNA (Symington, 2002). Usnadňuje tak vznik presynaptických filament. Polymerizací se vytváří pravotočivá vysoce organizovaná filamenta okolo vláken nukleové kyseliny (Sung & Robertson, 1995). Jsou známa jako presynaptická filamenta. Místo se tak stává katalytickým centrem, které se následně zapojuje do rekombinační reakce. Presynaptický komplex hledá homologní dsDNA a tu váže za vzniku synaptického komplexu (Obr. č. 3). Za pomoci Rad54, Rad54B, Rdh54 a Hop2-Mnd1 zprostředkovává invazi poškozeného vlákna do homologního úseku sesterské chromatidy. Na templátové dsDNA se vytváří specifická D-loop. Následuje syntéza od 3' konce poškozeného vlákna podle komplementární sekvence, přičemž dochází k posunu celé struktury. Konce jsou poté spojeny ligací katalyzovanou DNA ligázou I. Vzniká Hollidayova struktura. Ta je rozštěpena a vzniklé zářezy jsou spojeny ligázou.



Obr. č. 3: Tvorba synaptického komplexu a hledání homologní sekvence zprostředkované Rad51 a pomocnými proteiny (převzato z Sung & Klein, 2006).

Homologní rekombinace je regulována několika typy proteinů. Jako první regulátor je známý tumor supresor BRCA2 (Moihan *et al.*, 2001). Je prokázáno, že fyzicky interaguje s Rad51 a napomáhá při jeho rekombinázové aktivitě (Sung & Klein, 2006). Na C-konci se nachází Rad51 vazebná doména. Právě její fosforylace zprostředkovaná CDK2 negativně reguluje asociaci BRCA2 s Rad51 (Esashi *et al.*, 2005). Pravděpodobně v HR hraje důležitou úlohu i BRCA1. Dodnes není zcela jasné, jakým mechanismem se do regulace opravy oba proteiny zapojují. Welsh *et al.* (2000) předpokládají interakci BRCA2 s histon acetylázou a BRCA1 s histon deacetylázou. Bochar *et al.* (2000) zase uvažují o interakci BRCA1 s chromatin remodelujícím komplexem. Zhong *et al.* (1999) prokázal interakci BRCA1 s MRN komplexem. Jelikož se MRN zapojuje do obou opravných mechanismů DSBs, je pravděpodobné, že je BRCA1 zapojen ve více procesech. Navíc je členem signální dráhy DDR. Dalším členem DDR, který je spjat s HR, je ATM. Přímou fosforylací proteinů RPA a BRCA1 reguluje rekombinaci (Rotman & Shiloh, 1999). Tyrosin kináza c-Abl modulující aktivitu Rad51 je aktivována také ATM. V neposlední řadě se také podílí na alternaci chromatinové struktury prostřednictvím interakce s histon acetylázami a remodelujícím komplexem. Dalším typem regulačních proteinů je skupina enzymů nazývaná helikázy. Dokážou potlačit nevhodnou rekombinaci. Jejich úloha je rozpoznat a napomoci při ději, kdy migrují větve (branch migration) v Hollidayově struktuře.

2.5 Buněčný cyklus a jeho regulace

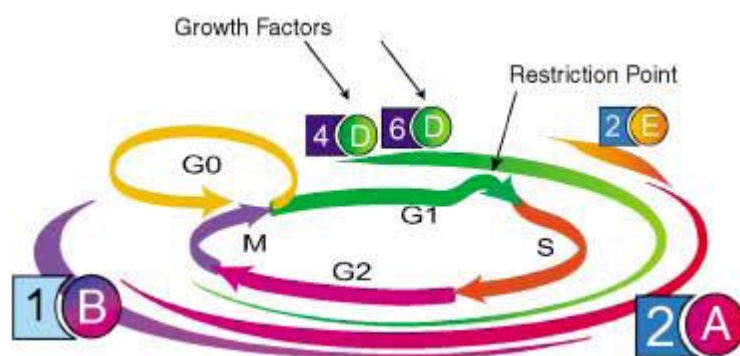
Buněčným cyklem se rozumí sled událostí, které vedou k efektivnímu zmnožení genetické informace za účelem její rovnoměrné distribuce do dceřiných buněk (Sielecky *et al.*, 2000). V průběhu cyklu buňky prochází čtyřmi základními fázemi (Obr. č. 4). Kritické je jejich správné načasování a pořadí. Kontrolu nad tímto provádí mašinerie mnoha specifických regulačních proteinů. V každé fázi se nachází jakýsi uzel, kontrolní bod, kterým buňka projde do další fáze jen tehdy, je-li všechno v pořádku. Není-li, dochází v tomto bodě k zástavě cyklu a nápravě škod.

Buňky jsou v normálním stavu v tzv. G_0 fázi. Jsou metabolicky aktivní, ale nedochází u nich k dělení (Toogood, 2001). Rozhodujícím faktorem pro vstup do buněčného cyklu jsou růstové a faktory a mitogenní signály, které buňka přijímá od svého okolí (Lukas *et al.*, 1996). Díky nim může opustit klidový stav a vstoupit do G_1 fáze. Během ní se připravuje na budoucí replikaci a dělení (roste, syntetizuje potřebné

složky a orgány). Dostatek růstových faktorů indukuje expresi cyklinů typu D (Kato, 1999). Ten asociuje s kinázami CDK4 a CDK6. Specifickým substrátem pro komplex cyklin D/CDK4 je protein retinoblastomu, RB (Dowdy *et al.*, 1993). Tumor supresor RB je negativní regulátor buněčné proliferace. Svou vazbou blokuje transkripční faktory, důležité pro expresi genů proliferace (Weintraub *et al.*, 1995). Fosforylace proteinu RB má inhibiční charakter, uvolňuje pRB z vazby na transkripční faktory typu E2F/DP. Tento děj je zásadní pro další průchod cyklem. Uvolněné transkripční faktory umožňují expresi regulovaných genů. Mezi nimi je gen pro cyklin typu E. Funkční komplex cyklin E/CDK2 přenáší signál dál. Fosforyluje své substráty a tím zprostředkovává aktivaci replikačních faktorů (Jackson *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1998). Oba komplexy kooperují a společně směřují buňku skrze restriční bod do S fáze (Planas-Silva & Weiberg, 1997).

Projde-li buňka restričním bodem, pro další postup již nepotřebuje stimulaci růstovými faktory. Během S fáze proběhne replikace genetické informace. Na počátku této fáze je ještě aktivní komplex cyklin E/CDK2. Ukázalo se, že je kritickým faktorem pro duplikaci centrozomu (Lacey *et al.*, 1999). Cyklin E je poté velmi rychle degradován a v komplexu cyklin E/CDK2 je nahrazen cyklinem typu A. Zdrbné dokončení S fáze kontroluje cyklinA/CDK2 (Sielecky, 2000). Protein cdc6, esenciální faktor pro start replikace, je fosforylován cyklinem A/CDK2. Fosforylace slouží jako signál pro transport tohoto proteinu ven z jádra, což zabraňuje rereplikaci (Petersen *et al.*, 1999). Když je replikace dokončena a DNA je bezchybně zdvojena, dojde k průchodu přes druhý kontrolní bod a postupuje dále do G₂.

Komplex cyklin B/CDK1 je syntetizován již v pozdní S fázi, avšak díky fosforylaci zprostředkované Wee1 kinázou je držen v inaktivní formě. Během G₂ fáze dochází k jeho aktivaci. Za tu je zodpovědná specifická fosfatáza cdc25, která odstraňuje inhibiční fosfát. Komplex je též nazýván mitosis promoting factor. Buňka vstupuje do mitózy. Správná segregace chromozomů a dokončení cyklu je řízeno jak cyklinem A/CDK1 tak cyklinem B/CDK1.



Obr. č. 4: Schema buněčného cyklu (Převzato z Huwe *et al.*, 2003)

2.6 Cyklin dependentní kinázy (CDK)

CDK jsou klíčové regulátory buněčné proliferace (Sanchez & Dynlacht, 2005), ale hrají úlohu i při transkripci. Jedná se o serin/threoninové kinázy, které kontrolují správné načasování a pořadí jednotlivých fází cyklu. Řídí tak průchod buněk buněčným cyklem (Pines, 1995). Fungují jako molekulové přepínače. Jejich aktivita je přísně regulována, a to na několika úrovních (Morgan, 1995). Prvním stupněm regulace je nekovalentní vazba specifické aktivační podjednotky, cyklinu. Hladina těchto proteinů během cyklu osciluje. Naproti tomu, koncentrace kináz jsou stabilní. Samotné cykliny jsou regulovány pomocí rychlé syntézy a ubiquitinem zprostředkované proteazomové degradace (King, 1996). Jeho vazbou na CDK dochází ke strukturní změně v oblasti D-loop kinázy, a je zpřístupněno aktivní místo pro substrát. V různých fázích buněčného cyklu jsou exprimovány různé typy cyklinů a vytváří se různé typy komplexů cyklin/CDK.

Druhou regulační úroveň představují posttranslační modifikace, především fosforylace. Komplex CDK/cyklin musí být aktivován specifickou CAK kinázou (Kaldis, 1999). Funkci CAK plní komplex CDK7/cyklin H (Nigg, 1996). Negativní fosforylace je zprostředkována další skupinou kináz, mezi ně patří Wee1 (Fattaey & Booher, 1997). Tato inhibiční fosforylace může být zrušena fosfatázou cdc25 (Draetta & Eckstein, 1997).

V buňkách se vyskytují také přirozené proteinové inhibitory CDK. Lze je rozdělit do dvou skupin. Do první spadají CDK inhibující proteiny (CKI) z rodin Cip/Kip a INK4 (Lee & Yang, 2001). Skupina Cip/Kip inhibitorů sdružuje proteiny rodiny p21, a to p21, p27 a p57. Váží se na obě jednotky komplexu (cyklin i CDK)

a vytváří trimer. Toto uspořádání je neaktivní a je zablokován průchod z G₁ fáze (Russo *et al.*, 1996). Overexprese inhibitorů p21 (WAF1) a p27 (Kip1) specificky zabraňuje funkci komplexů cyklinu D s CDK4 a CDK6. Protein p21 je přímo aktivován proteinem p53, jako reakce na výskyt poškozené DNA. P27 je aktivován TGF-β (Transforming growth factor β). INK4 sdružuje rodinu proteinů příbuzných p16 (p16, p15, p18, a p19) (Sherr & Roberts, 1995).

Mutace v těchto klíčových supresorových proteinech vede k deregulaci a hyperaktivitě CDK. Následkem toho je nekontrolovatelná buněčná proliferace, která následně může přejít až v karcinogenezi a vznik nádoru (Vermeulen *et al.*, 2003). K nejčastějším typům mutací patří bodové mutace, převážně delece, inserce a záměny nukleotidů, které mají za následek vznik nefunkčního proteinového produktu. Lokus INK4/ARF bývá v mnoha případech rakoviny deletován. Je-li v buňce právě nedostatečné množství proteinu p14^{ARF}, kodovaného právě tímto lokusem, dochází k nadměrné aktivitě ubiquitin ligázy Mdm2. Důsledkem je degradace p53 a také potlačená exprese dalšího supresoru, p21^{WAF}, již p53 řídí. Samotný gen, kódující protein p21 podléhá také bodovým mutacím. Protein p16 inhibující komplex cyklin D/CDK4 je druhým produktem téhož lokusu. Exprese genu kódujícího protein retinoblastomu bývá často regulována na epigenetické úrovni. Jedná se o mechanismy, které zprostředkovávají metylace ostrůvků CpG, které se nacházejí v promotorových oblastech. Aktivitu retinoblastomu může také potlačit nadměrná exprese interagujících onkogenů, které vytěsňují z vazby příslušné transkripční faktory. Ztrátou aktivity RB, dochází ke ztrátě kontroly nad restričním bodem. Buňky tak mohou proliferovat i v nepříznivých podmínkách.

2.6.1 CDK a homologní rekombinace

Systém regulující buněčný cyklus je s největší pravděpodobností důležitý i pro některé mechanismy DDR. CDK2 tvoří komplex cyklin A1/CDK2, jehož cílovými substráty jsou např. p53 (Wang *et al.*, 1995), BRCA1, BRCA2 (Esashi, 2005) a KU komplex (Diederichs *et al.*, 2004). Všechny tyto proteiny hrají důležitou roli v DDR. Je prokázáno, že buňky, u kterých je CDK2 vyřazena pomocí knock-downu, mají zeslabenou schopnost a proteinovou kapacitu pro opravu DNA poškození (Deans *et al.*, 2006). Naproti tomu ale CDK2 není pro DDR esenciální a její funkci mohou zastat jiné proteinkinázy, zejména CDK1 (Santamaria *et al.*, 2007). Obecně lze říci, že inhibice

CDK, také vede ke snížení exprese specifických cyklinů skrze hypofosforylaci proteinu RB, který není schopen uvolnit transkripční faktory E2F (Federico *et al.*, 2010). CDK9 je součástí NHEJ opravy. Bylo prokázáno, že jejím substrátem je Ku komplex, který je v tomto mechanismu zapojen (Liu *et al.*, 2010).

Z důvodů uvedených v předchozích odstavcích je v současnosti pozornost zaměřena na malé nízkomolekulární ATP kompetitivní sloučeniny, které působí jako CDK inhibitory (Huwe *et al.*, 2003; Noble *et al.*, 2004). Jde o polycyklické heteroaromatické ligandy, které vstupují do aktivního místa kinázy a soutěží s ATP o vazbu na ni. Díky těmto látkám by mohla být léčba rakoviny účinnější, více specifická pro nádorové buňky a tím i méně toxická pro buňky normální. Hlavním mechanismem protinádorového působení je přímé zastavení buněčného cyklu prostřednictvím inhibice CDK1, 2, 4 a 6, a částečně také CDK7. Inhibice některých dalších CDK, zapojených zejména do regulace transkripce mRNA, jako je CDK7 a 9, pak snižuje úroveň transkripce řady genů. Pokles exprese některých genů má pak negativní vliv na životaschopnost nádorových buněk; jedná se zejména o antiapoptotické geny (např. survivin nebo Mcl-1). V posledních letech se však objevily experimentální důkazy o tom, že inhibice CDK může vyvolávat poškození DNA a navíc ovlivňovat také schopnost buněk toto poškození opravovat (Liu *et al.*, 2011).

2.6.2 Charakterizace použitých inhibitorů CDK

Flavopiridol a roskovitin byly nedávno použity ve dvou studiích, které analyzovaly vztah CDK a homologní rekombinace (Federico *et al.*, 2010, Ambrosini *et al.*, 2008). Společným závěrem obou prací bylo konstatování, že inhibice CDK snižuje úroveň HR a tímto nepřímým mechanismem vyvolává v buňce genotoxický stres. Zatím však nebylo jednoznačně vysvětleno, jakým mechanismem CDK inhibitory poškození DNA vyvolávají a která CDK je za tento jev zodpovědná primárně. Oba použité inhibitory jsou totiž schopny inhibovat hned několik CDK. Cílem této práce bylo tedy posoudit vztah selektivity inhibitorů CDK a jejich účinku na HR a pokusit se pochopit zapojení proteinu Rad51. Pro studii byly vybrány jak sloučeniny strukturně a funkčně blízké roskovitinu (pyrazolopyrimidiny LGR 1404 a 1406), tak i inhibitory vysoce specifické pro CDK9 (např. CAN508 a DRB), a samozřejmě také roskovitin a flavopiridol.

Roscovitin náleží do skupiny purinových derivátů (Havlíček *et al.*, 1997). Chemicky se jedná o 2,6,9 trisubstituovaný derivát purinu. Jde o malou molekulu, jež specificky inhibuje cyklin dependentní kinázy. Mechanismus inhibice CDK roscovitinem je založen na kompetici ATP a roscovitinu v aktivním místě (Meijer *et al.*, 1997). Jde o inhibitor s vysokou selektivitou pro kinázy CDK1, 2, 5, 7 a 9 (Bach *et al.*, 2005). Způsobuje zastavení buněčného cyklu v G₁ fázi a blokuje také přechod z G₂ do mitotické fáze v důsledku inhibice CDK1 a CDK2. Vysoké dávky roscovitinu indukují proces apoptózy v nádorových buňkách (Hahntow *et al.*, 2004). Současně indukuje akumulaci tumor supresorového proteinu p53 v jádře, který následně jako transkripční faktor spouští expresi genů pro CDKi, konkrétně p21^{WAF1} (Ljungman *et al.*, 2001). Vysoké dávky CDKi obecně redukuje expresi negativního regulátoru Mdm2 a samotného p21^{WAF1} (Demidenko & Blagosklonny, 2004).

Flavopiridol náleží do skupiny semi-syntetických flavonoidů. Jde o analog přirozeně se vyskytujícího alkaloidu rohitukinu. Je to selektivní inhibitor CDK vykazující *in vitro* aktivitu proti CDK1, CDK2, CDK4 a CAK (Sedláček *et al.*, 1996). Způsobuje apoptózu a zástavu buněčného cyklu v G₁ a G₂/M, což koresponduje s inhibicí CDK1 a CDK2 (Wierger *et al.*, 2005). Při koncentraci 6 nM dokáže zainhibovat pozitivní transkripční elongační faktor b (P-TEF b), který je složen z CDK9/cyklinu T1 (Chao *et al.*, 2000). Carlson *et al.* (1999) prokázali, že je schopen potlačit expresi cyklinu D.

DRB náleží do skupiny inhibitorů se selektivitou pro CDK7 a CDK9. Zároveň je schopen inhibovat i kaseinové kinázy I a II (Shugar, 1994). Obě cyklin dependentní kinázy citlivé k DRB jsou vyžadovány pro fosforylaci koncové karboxylové domény (CTD) velké podjednotky RNA polymerázy II. V koncentracích vyšších než 40 μM inhibuje více než 50 % syntézy mRNA, čímž dochází k výraznému potlačení transkripce *in vivo*. U buněk s takto zablokovanou transkripcí je navozen signál smrti zprostředkávající apoptózu (te Poele *et al.*, 1999).

CAN508 náleží do skupiny pyrazolových derivátů. Byl navržen a syntetizován na katedře organické chemie Univerzity Palackého v Olomouci jako potenciální inhibitor CDK (Kryštof *et al.*, 2006). Tento *para* isomer měl ze všech testovaných skupin pyrazolů nejnižší hodnoty IC₅₀ v *in vitro* testech proti CDK2. Jednalo se o čistou kompetitivní inhibici proti ATP a dosahoval hodnoty inhibiční konstanty 13,3 μM. Je to selektivní inhibitor CDK9/cyklin T1. Testování inhibice bylo podrobeno dalších sto protein-kináz, jejichž inhibice CAN508 byla velmi slabá nebo žádná. Antiproliferativní

účinky byly ověřovány cytometrickou analýzou. CAN508 neovlivňuje buněčný cyklus, byl pouze pozorován rozdíl v S-fázové populaci buněk, která byla méně barvena BrdU.

LGR 1404 náleží do skupiny pyrazolo-pyrimidinů (Jorda *et al.*, 2011). Základní *in vitro* testy potvrdily nejen cytostatický, ale také vysoce cytotoxický efekt dané látky na testované buněčné linie. Následovaly testy selektivity pro CDK, kdy jednoznačně převládala inhibice cyklin dependentních kináz nad ostatními. Slabá inhibice byla prokázána pro GSK3B, MEK a MSK1. Naměřené hodnoty IC_{50} byly srovnatelné s roscovitinem. Základem cytostatického účinku je schopnost 1404 inhibovat fosforylaci klíčového proteinu RB, tím negativně ovlivnit aktivitu CDK2 a CDK4. Výsledkem je blok buněčného cyklu v G_1 . Tato sloučenina vykazuje i schopnost indukovat apoptózu.

LGR 1406 je dalším derivátem roscovitinu ze skupiny pyrazolo-pyrimidinů (Kryštof *et al.*, 2006). Jeho schopnost inhibovat CDK1, 2 a 4 je mírně vyšší než u roscovitinu (Sroka *et al.*, 2009). Ve srovnávacích *in vitro* testech s roscovitinem prokázal pětkrát silnější antiproliferativní účinky ($IC_{50}=3,0 \mu M$). Jeho účinek na buněčný cyklus byl sledován cytometrickou analýzou. Data potvrdila, že inhibitor 1406 je schopen úplně zablokovat přechod do S-fáze při koncentraci $5 \mu M$, zatímco $20 \mu M$ roscovitin pouze zpomalí průchod buněčným cyklem. Mechanismus bloku S fáze vychází z inhibice S-fázového cyklinu A, jehož expresi 1406 potlačuje. Ovlivňuje také signální dráhu spojenou s fosforylací proteinu retinoblastoma. Potlačením exprese cyklinu E dochází k inhibici fosforylace Rb, na níž je závislé uvolnění E2F, jež pomáhají průchodu skrze restriční bod do S.

Experimentální část

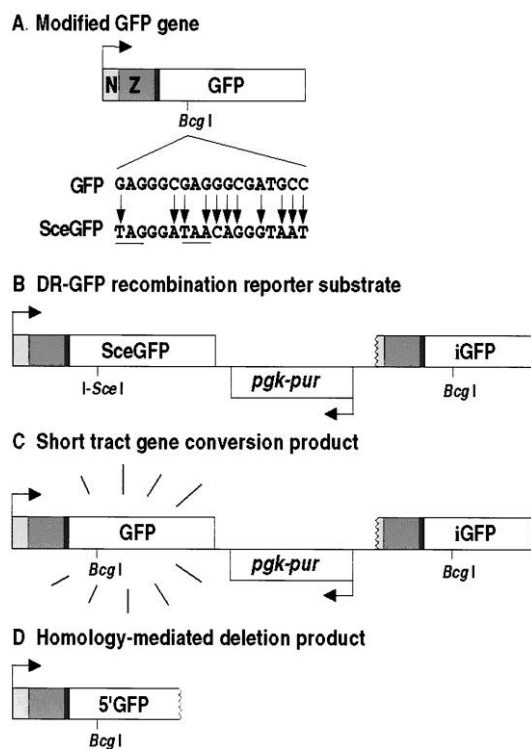
3. Materiál a metody

Biologický materiál:

- Buněčná linie HR-GFP (U2OS) (zdroj: LGI, PřF UP Olomouc)
- Plazmid pc52 s genem pro RFP
- Plazmid pcKA s genem pro I-Sce1
- Plazmid pcDNA 3,1 T

Pro vytvoření stabilně transfekované linie HR-GFP byla zvolena linie U2OS odvozená z lidského osteosarkomu. Ta nese zainkorporovaný plazmid DR-GFP (Obr. č. 5). DR-GFR byl navržen a vytvořen týmem Larryho Thompsona (Pierce *et al.*, 1999) speciálně pro analýzu homologní rekombinace. Plazmid tvoří tři geny. Prvním genem na DR-GFP je modifikovaný gen značovaný jako SceGFP vytvořený zdokonalením EGFP_i (Clontech). Byla provedena fúze tohoto genu s jaderně-lokalizující sekvencí (Donoho *et al.*, 1998) a DNA vazebnou doménou typu zinkového prstu z GAGA2 transkripčního faktoru (Pedone *et al.*, 1996). V samotném GFP genu muselo být vytvořeno specifické restrikční místo pro endonukleázu I-Sce1. Takto upravený gen byl vnesen do vektoru pCAGGS (Niwa *et al.*, 1991). Fragment iGFP představující homologní sekvenci pro opravu pomocí HR má 812 bp. Od prvního genu SceGFP je vzdálen 3,7 kb (Pierce *et al.*, 1999). Mezi oběma geny GFP leží gen pgk-pur zajišťující rezistenci buněk na puromycin pro následnou selekci eukaryotních buněk.

Plazmid pc52 nese gen pro červený fluorescenční protein. Plazmid pcKA (pCβASce) má vnesený gen pro restrikční endonukleázu I-Sce1, jejíž exprese je řízena kuřecím β-aktin promotorem a zesílena hCMV enhacerem (Richardson *et al.*, 1998). Oba plazmidy obsahují gen pro ampicilinovou rezistenci pro selekci v bakteriálních buňkách. Plazmid pcDNA 3.1 T obsahuje pouze gen pro rezistenci v bakteriích, ampicilin, a také geneticin pro selekci v eukaryotních buňkách.



Obr. č. 5: Schema konstruktů DR-GFP a mechanismus opravy pomocí HR
(Převzato z Pierce *et al.*, 1999)

Přístrojové vybavení:

- Centrifuga BR4i multifunkční, Jouan
- Flowbox s vertikálním prouděním vzduchu TC 48, Gelaire
- Fluorescenční mikroskop Olympus BX50
- Inkubátor CO₂, Sanyo
- Kývačka Minirocker MR-1, BioSan
- Magnetické míchadlo s ohřevem RCT basic safety control
- Průtokový cytometr Cell Lab QuantaTM, Beckman Coulter
- Spektrofotometr Helios β, UNICAM
- Termoblok PHMT-PSC-18, Grant-Boekel
- Zdroj napětí CPX 400A
- Ultrazvukový homogenizátor Sonopuls HD2200, Bandelin
- Aparatura pro elektroforetickou separaci Mini Protean, BioRad
- Aparatura pro mokřý elektroblotting, BioRad
- Fluoroscanner Ascent, LabSystem

Chemikálie:

- Elektroforéza, western blot:

AA+BIS AA; Tris/HCl pH=8,9 a 7,6; APS; deionizovaná voda, TEMED, SDS 10%, SDS 3x nanášecí pufr na elektroforézu (0,31 M Tris/HCl, 50% glycerol, 4% SDS, 5% 2-merkapt ethanol, 0,05% bromfenolová modř), ELFO pufr (25 mM Tris/HCl, 192 mM glycin, 0,1% SDS), standard molekulové váhy Dual Color (Sigma-Aldrich), blotovací pufr (15,6 mM Tris/HCl, 120 mM glycin), Coomasie red, kit ECL+ (Pierce), 5% mléko v PBS/Tween

- Kultivace buněk:

DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) - standardní kultivační médium, penicilin, streptomycin, fetální sérum (Sigma), glutamin, rozmrazovací médium, Trypsin/EGTA, Ethanol 70% (v/v), ethanol 96%

- Lyzace vzorků

PMSF 10 mM, Aprotinin, Dithiothreitol (DTT), Leupeptin, RIPA pufr (20 mM Tris/HCl pH=7,4, 100 mM NaCl, 2 mM NaF, 5 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0,2% Nonidet P40), Triton X-100, Tween 20, PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 6,5 mM Na₂HPO₄), led

- Transfekce:

Fugene6 (Roche), DMEM

Použité inhibitory cyklin dependentních kináz

- DRB, 5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazol (Sigma-Aldrich)
- Flavopiridol, 2-(2-chlorofenyl)-5,7-dihydroxy-1-methylpiperidin-4-yl)chromen-4-on (Sigma-Aldrich)
- Roscovitin, 6-benzylamino-2-(R)-(1-ethyl)-2-hydroxyethylamino)-9-isopropylpurin (syntetizován v LRR, Havlíček et al., 1997)
- CAN508, 4-[(3,5-diamino-1H-pyrazol-4-yl)diazenyl]fenol (syntetizován na katedře org. chemie, Kryštof *et al.*, 2006)
- LGR 1404, 7-benzylamino-5(R)-[2-(hydroxymethyl)propyl]amino-3-isopropyl-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (syntetizován v Laboratoři růstových regulátorů AV ČR, v.v.i., Jorda *et al.*, 2011)
- LGR 1406, N-5-(2-aminocyklohexyl)-N-7-benzyl-3-isopropyl-1(2)H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5,7-diamin (syntetizován na Ústavu experimentální botaniky AV ČR,

v.v.i., Havlíček *et al.*, číslo patentového spisu: EP 02007163.5)

- LGR 1407, *N*-5-(4-aminocyklohexyl)-*N*-7-benzyl-3-isopropyl-1(2)*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-5,7-diamin (syntetizován na Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Havlíček *et al.*, číslo patentového spisu: EP 02007163.5)

Použité protilátky

- Rad51, rabbit polyclonal antibody (D2209, Santa Cruz Biotechnology) 1:400
- α -Tubulin, mouse monoclonal antibody (T6199, Sigma-Aldrich), 1:500
- RAM/px, rabbit polyclonal anti mouse conjugated to HRP (P0260, DakoCytomation), 1:1000
- SWAR/px, swine polyclonal anti rabbit conjugated to HRP (P0217, DakoCytomation), 1:1000

4. Pracovní postupy

4.1 Kultivace buněk

U2OS buněčná linie nese stabilně transfekovaný DR GFP konstrukt (Pierce *et al.*, 1999). Byla kultivována v klasickém DMEM s 10% FS ve středních kultivačních lahvích při 37 °C. Jako selekční činitel byl přidáván do média puromycin (1,5 µM).

4.2 Lyzace vzorků

Treatované buňky byly odstraněny z Petriho misky pomocí škrabky a přeneseny do centrifugačních 15 ml zkumavek. Centrifugace probíhala 10 minut při 4 °C a 1000 g. K promytí byl využit roztok PBS. Vzorek byl ponechán při -80 °C přes noc. Pelety byly zmrazeny v tekutém dusíku a poté lyzovány s použitím RIPA pufru s inhibitory (1 µg/ml aprotin, 1 µg/ml leupeptin, 1 mM PMSF, 1 mM DTT) 30 minut na ledu. Následovala sonifikace (10 s, 3 cykly). Vzorky byly centrifugovány 25 minut při 4 °C a 14000 g. Byl odebrán supernatant a přenesen do nové mikrozkušavky. Celkový obsah proteinů v lyzátu byl stanoven metodou Bradfordové a změřen spektrofotometricky. Jako poslední krok byl přidán nanášecí pufr a s využitím termobloku byl denaturován při 95 °C 5 minut.

4.3 Elektroforetická separace a Western Blotting

Vzorky byly po předchozí denaturaci naneseny na SDS-polyakrylamidový gel (5% zaostřovací gel pH=6,8 + 10% dělicí gel pH=8,8). Separovány byly při napětí 80-120 V přibližně 120 minut. Gel byl vyjmut z elektroforetické aparatury a přenesen s nitrocelulózovou membránou do aparatury pro blotting. Blotování probíhalo při max. proudu 270 mA 2 hodiny. Komůrka byla chlazena kazetou s ledem. Membrány s proteiny byly nařezány podle potřeby a blokovány v 5% mléku s PBS/0,1% Tween minimálně 1 hodinu na kývačce. Byla nanesena primární protilátka. Inkubace trvala přes noc při 4 °C. Po propláchnutí následovala hodinová inkubace se sekundární protilátkou při laboratorní teplotě. Po opětovném propláchnutí v PBS a PBS/Tween byla detekována chemiluminiscence značených sekundárních protilátek. Detekční roztok (kit ECL) byl nalit na membrány a poté proběhla vizualizace chemiluminiscence na specifický citlivý film nebo CCD kamerou.

4.4 Test toxicity

Buňky byly vysazeny na 96 jamkovou misku v hustotě 10 000 buněk/jamku. Byly 3 hodiny ponechány v inkubátoru a poté byly přidány inhibitory v následujících koncentracích 0,4; 1,2; 3,7; 11,1; 33,3 a 100 $\mu\text{mol/l}$ v jamce. Jednotlivé koncentrace byly v triplikátech. Inkubace s inhibitory trvala 56 hodin. Bylo přidáno 100 μl calceinu (1 mg/ml, ředěný 1:500 v PBS) do každé jamky. Inkubace trvala 1 hodinu v inkubátoru a poté následovalo měření počtu živých buněk barvených Calceinem AM flourometricky.

4.5 Ověření vlivu zvolených koncentrací CDKi na buněčný cyklus

K ovlivněným vzorkům byl asi hodinu před sklizením přidán 5-bromo-2'-deoxyuridin v koncentraci 10 μM . Sklizení proběhlo tripsinizací do centrifugačních zkumavek a následovalo dvojitě promytí v 0,5% roztoku BSA/PBS/0,5% Tween 20 a fixace 96% vychlazeným metanolem. Nejméně hodinu byly vzorky ponechány na ledu. Poté byly fixované vzorky opět promyty. Následovala půlhodinová inkubace v 2 M HCl/ 0,5% Triton X-100. Kyseliny byla neutralizována promytím v 0,1M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (pH = 8,5) a 1% BSA /PBS/0,5% Tween 20. Inkubace protilátky anti-BrdU-FITC probíhala 1 hodinu ve tmě při laboratorní teplotě. Následovalo opětovné promytí v roztoku BSA/PBS/0,5% Tween 20. Buněčný pelet byl rozsuspendován v 1 ml PBS. Přidána byla RNáza (200 $\mu\text{g/ml}$) a propidium jodid (10 $\mu\text{g/ml}$). Po půlhodinové inkubaci ve tmě za laboratorní teploty byly vzorky analyzovány na průtokovém cytometru Cell Lab Quanta SC MPL, Beckman Coulter. Měřena byla pozitivní fluorescence FL3 na propidium jodid a FL1 na BrDU.

4.6 Transfekce linie pro analýzu homologní rekombinace

Byla využita buněčná linie nesoucí konstrukt DR-GFP upravený pro tento účel. DR-GFP plasmid zkonstruoval tým profesora Larryho Thompsona (Obr. č. 5, Pierce *et al.*, 1999). Konstrukt nese 2 geny pro zelený fluorescenční protein. První gen obsahuje cílenou mutaci v oblasti BcgI (SceGFP). Jedná se o dva stop kodony, které brání jeho přirozené expresi. V tomto genu je také vytvořeno specifické restrikční místo pro endonukleázu I-Sce1. Z druhého genu na DR-GFP byl vnesen jen fragment (iGFP) umožňující v průběhu HR přepis komplementárního úseku. Pro transfekci byla využita

transfekční reagentie firmy Roche, Fugene6. Transfekcí byly vneseny dva typy plasmidů, s geny pro RFP a restriční endonukleázu I-Sce1. Jakmile došlo k ektopické expresi genů pro I-Sce1, tato rozpoznala své restriční místo v upraveném GFP. Došlo k vytvoření DSB v daném restričním místě. Opravila-li buňka zlom v GFP pomocí homologní rekombinace s homologní sekvencí iGFP, došlo ke vzniku plně funkčního genu pro zelený fluorescenční protein. Ten je markerem homologní rekombinace.

4.6.1 Postup transfekce

Bylo vysazeno po 350 tisíci buněk na 1 Petriho misku (ø 10 cm) tak, aby následující den byla konfluence 30 %. Vždy je nutné mít dvě základní kontroly, RFP:pp (pcDNA3,1T) 1:4 a RFP:I-Sce1:pp 1:3:1. K nim se následně bude vztahovat hodnocení míry rekombinace. Další počet misek se odvíjí od požadovaného počtu testovaných látek. Pro každou další látku jsou dvě transfekční misky, RFP 1:4 s RFP:I-Sce1 1:3:1.

Potřebný počet misek:

1. neovlivněný vzorek negativní
2. neovlivněný vzorek pozitivní
3. ovlivněný vzorek I. negativní
4. ovlivněný vzorek I. pozitivní
5. ovlivněný vzorek II. negativní
6. ovlivněný vzorek II. pozitivní
-atd.

Druhý den bylo vyměněno médium za růstové DMEM bez antibiotik. Do sterilních 1,5 ml mikrozkušavek byla připravena transfekční směs, poklepem promíchána a inkubována 15 minut při RT.

Transfekční směs (1 miska):

250 µl DMEM (čisté bez FS, RT)

15 µl Fugene6

5 µg plasmidů (dodržen hmotnostní poměry jednot. plasmidů)

RFP: pp 1 µg RFP + 4 µg pcDNA 3,1 T

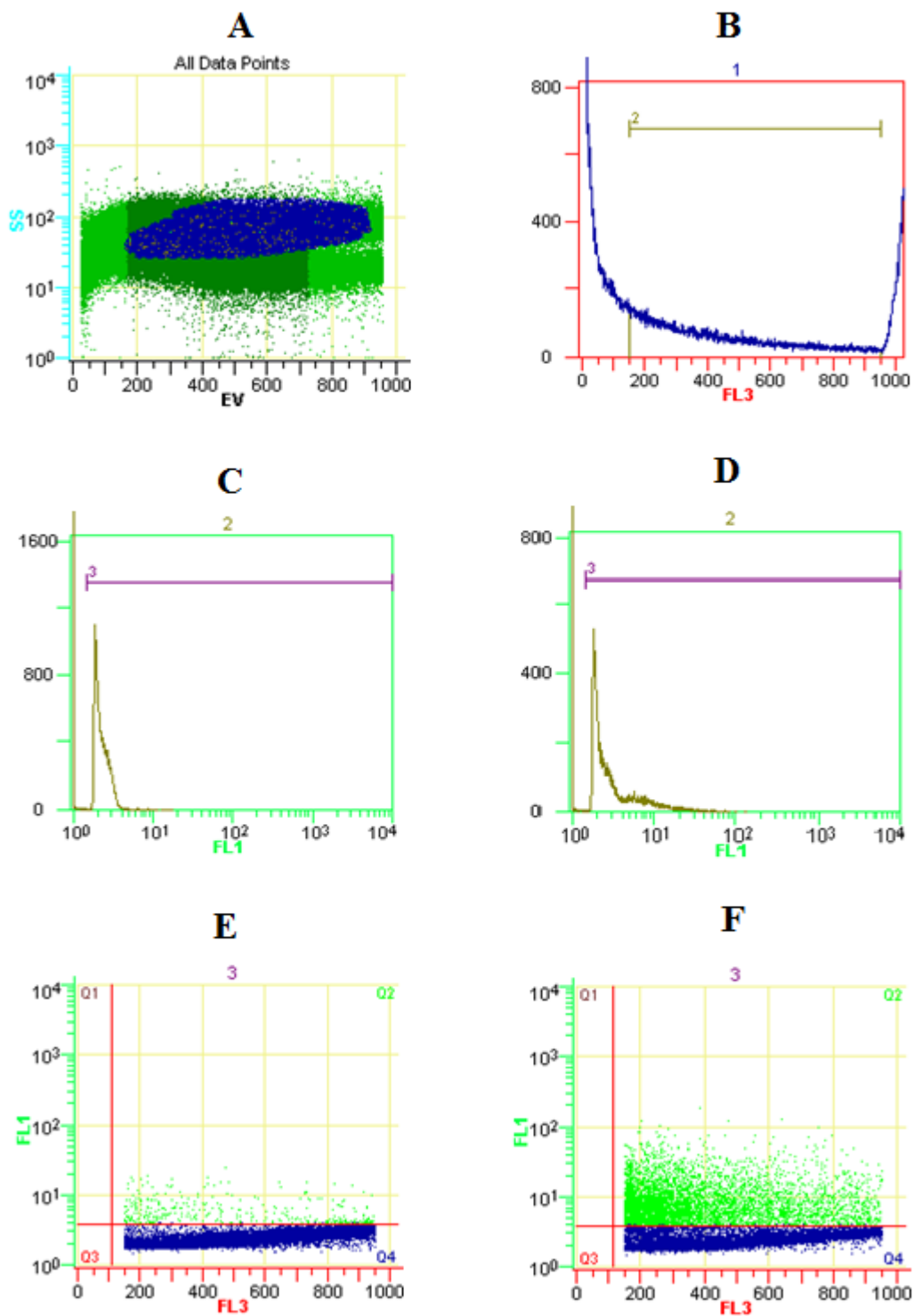
RFP:I-Sce1:pp 1 µg RFP + 3 µg I-Sce1 + 1 µg pcDNA 3,1 T

Poté byla směs po kapkách připipetována do média k buňkám. Transfekce trvala 16 – 18 hodin. Po uplynutí této doby bylo médium s transfekční směsí odstraněno a vyměněno za klasické růstové. Do média byly přidány CDKi v požadovaných koncentracích (předem určené pomocí testů cytotoxicity přímo na U2OS).

4.6.2 Cytometrická analýza a hodnocení

Transfekované buňky byly ztripsinizovány a sklizeny do centrifugačních zkumavek. Centrifugace probíhala při 4 °C, 1000 g, 10 minut. Médium bylo odsáto a vzorky promyty PBS. Pelet byl rozsuspendován v průtokové tekutině cytometru. Pro analýzu každého vzorku bylo měřeno 300 000 buněk. S pomocí cytometru Beckman Coulter byly detekovány buňky pozitivní na červený signál. Z nich se následnou selekcí selektovaly buňky pozitivní na signál zelený.

Protokol pro měření byl nastaven podle kontrolních vzorků pozitivních na červenou fluorescenci RFP 1:4 a následně zelenou fluorescenci GFP ve vzorku I-Sce1 1:3:1. Z celkového počtu 300 000 buněk byla na základě změřené velikosti (SS, Size scatter) a elektronického objemu (EV, Electronic volume) pro další analýzu vybrána jednotná populace ohraničená regionem 1 (Obr. č. 6A). Takto byly z analýzy odfiltrovány případné shluky buněk a nebuněčné částice. U takto vyselektovaných buněk byla měřena červená fluorescence. Její míra byla měřena na lineární ose. Důvodem byl výběr úzkého rozmezí (region 2), kde byla fluorescence lineární (Obr. č. 6B). Buněčné částice detekované v tomto rozmezí byly proměřeny na pozitivitu zeleného signálu. Zelená fluorescence byla na logaritmické škále (Obr. č. 6C a 6D). Výsledkem je graf s kvadranty rozdělujícími pozitivní buňky s červenou a zelenočervenou fluorescencí (Obr. č. 6E a 6F). Kvadranty byly nastaveny vždy nejprve u dvou kontrolních vzorků. U červeně pozitivních buněk RFP 1:4 byly osa rozdělující kvadranty Q4 a Q2 nastavena tak, aby Q2 obsahoval 1 % buněk (Obr. č. 9). Jedná se o vzorek s minimální zelenou fluorescencí. Jedno procento vyjadřuje spontánní míru homologní rekombinace. U vzorku obsahujícím červeno-zelené buňky byla osa nastavena na přesně stejnou hodnotu jako u předchozího vzorku (Obr. č. 11). Rozdělí se tak obě populace a získáme procento rekombinujících buněk. U vzorků ovlivněných inhibitory CDK je postup stejný.



Obr. č. 6: Postup cytometrické analýzy homologní rekombinace v jednotlivých krocích (**A, B, C, E**) a příklady výsledných posuzovaných populací buněk (**E,F**). **E)** kontrolní vzorek transfekovaný pouze RFP s nulovou hodnotou zelené fluorescence (negativní kontrola), **F)** zelená fluorescence ve vzorku transfekovaném RFP a I-Sce1, kde HR opravuje GFP (pozitivní kontrola).

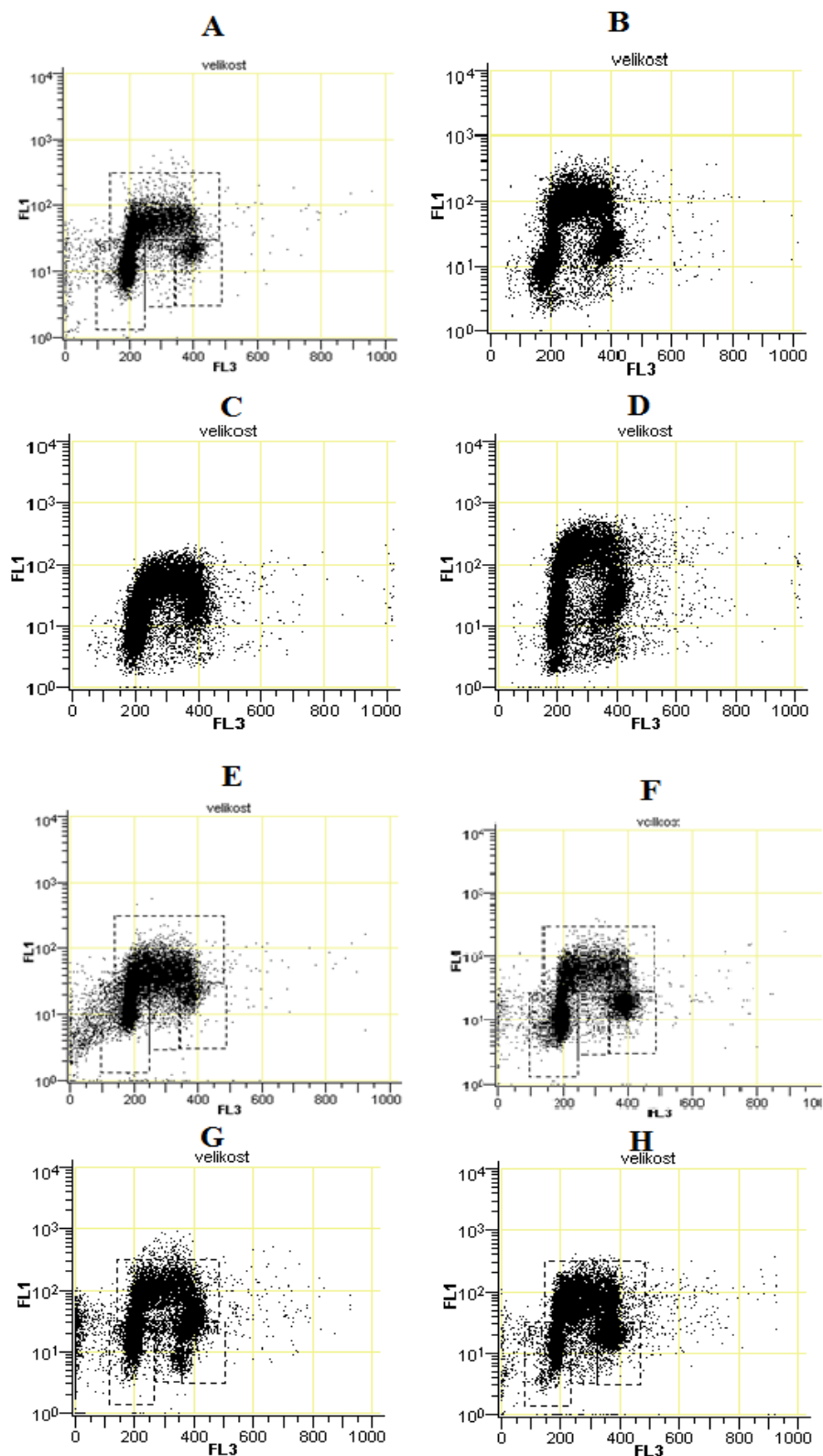
5. Výsledky

5.1 Charakterizace účinku použitých inhibitorů na buněčný cyklus

Použité inhibitory CDK ovlivňují průchod buněčným cyklem. To znesnadňuje posouzení jejich vlivu na homologní rekombinaci, jež je závislá na regulačním aparátu buněčného cyklu. Nejprve proto byla stanovena cytotoxicita použitých látek na buněčnou linii HR GFP, ve které se později sledovala. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 1. Hledali jsme nejvyšší koncentrace, při kterých dané látky ještě výrazně neovlivňují zastoupení jednotlivých fází buněčného cyklu. Na základě těchto naměřených hodnot byly zvoleny následující koncentrace; 10 μM roscovitin, 0,1 μM flavopiridol, 25 μM DRB, 25 μM CAN508, 5 μM LGR 1404, 2 μM LGR 1406 a 10 μM LGR 1407. Těmito koncentracemi byly vzorky z linie HR GFP ovlivněny po dobu 48 hodin. Následovala cytometrická analýza vlivu inhibitorů na průchod buněčným cyklem s dvojitým značením PI a BrdU. Ta potvrdila, že zvolené koncentrace neovlivňují ani nezastavují buněčný cyklus (Obr. č. 12-19) a mohou tedy být použity pro analýzu homologní rekombinace.

Látka	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/l}$)
Roscovitin	22,55
Flavopiridol	0,27
DRB	52,95
CAN508	78,25
LGR 1404	12,27
LGR 1406	11,48
LGR 1407	49,09

Tab. č. 1: Cytotoxicita použitých inhibitorů CDK vůči linii HR GFP zjištěné v třídením testu



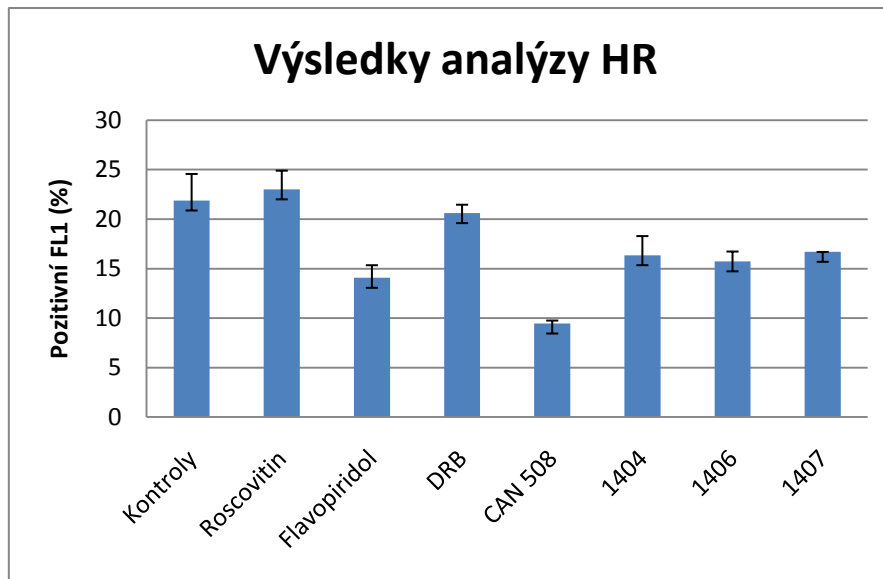
Obr. č. 7: Charakterizace vlivu zvolených koncentrací CDKi na buněčný cyklus. Na obrázku **A**) je neovlivněný kontrolní vzorek, dále vzorky ovlivněné **B**) 10 μM roskovitinem, **C**) 0,1 μM flavopiridolem, **D**) 25 μM DRB, **E**) 25 μM CAN508, **F**) 5 μM LGR 1404, **G**) 2 μM LGR 1406, **H**) LGR 1407.

5.2 Cytometrická analýza homologní rekombinace

Celkem bylo testováno sedm vybraných CDKi na jejich potenciální vliv na snížení homologní rekombinace. Byly vybrány CDKi inhibující selektivně více CDK a inhibitory specifické pro CDK9. Použité koncentrace byly zvoleny tak, aby neovlivňovaly proliferaci buněčné linie HR-GFP (viz kapitola 4.1). Nesmí zastavovat buněčný cyklus nebo být cytotoxické. Transfekce byla provedena ve třech opakováních. Výsledky jednotlivých pokusů jsou vyjádřeny jako procentuální podíl zeleně fluoreskujících buněk (Tab. č. 2). Jedná se tedy o buňky, ve kterých proběhla oprava nefunkčního genu SceGFP homologní rekombinací. Podíl zeleně fluoreskujících buněk se pohyboval okolo 23 %. Roscovitin a DRB neměly v použitých koncentracích na snížení úrovně homologní rekombinace žádný vliv. Snížení rekombinace u vzorku ovlivněného 25 μ M DRB činilo 5 %. Látky LGR 1404, LGR 1406 a LGR 1407 snižovaly rekombinaci ve stejné míře zhruba o čtvrtinu. Největší pokles byl zaznamenán u vzorků ovlivněných flavopiridolem a CAN508. Flavopiridol snížil procento rekombinujících buněk o 43,9 %. CAN508 byl ještě účinnější, rekombinace poklesla o 53,9 % (souhrn Obr. č. 8).

	Úroveň homologní rekombinace (%)	Průměrná odchylka (%)
Kontrola	21,89	2,69
Roscovitin	23,01	1,9
Flavopiridol	14,08	1,28
DRB	20,61	0,86
CAN508	9,46	0,31
LGR 1404	16,36	1,94
LGR 1406	15,74	1
LGR 1407	16,7	0

Tab. č. 2: Vliv inhibitorů CDK na úroveň HR vyjádřené jako procentuální podíl zeleně fluoreskujících buněk (I-Sce1 pozitivních) v analyzované populaci

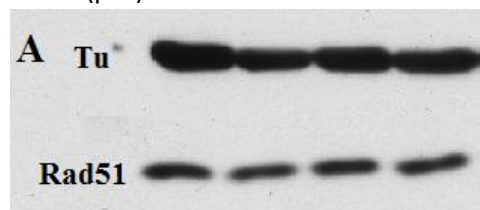


Obr. č. 8: Grafické znázornění vlivu inhibitorů CDK na úroveň HR vyjádřené jako procentuální podíl zeleně fluoreskujících buněk v analyzované populaci.

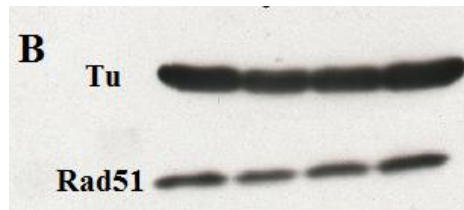
5.3 Analýza hladiny proteinu Rad51 pomocí SDS PAGE a Western Blot

Linie HR-GFP byla ovlivněna studovanými CDKi po dobu 48 hodin (Obr. č. 9). Sledována byla hladina proteinu Rad51 a vliv CDKi na ni v buňkách. Až na flavopiridol nesnižoval žádný z použitých CDKi hladinu tohoto proteinu (Obr. č. 9A, 9B, 9C). Flavopiridol v koncentraci 0,1 μ M byl účinný (Obr. č. 9D). Proto byly v dalším experimentu ovlivněny buňky flavopiridolem ve třech časových intervalech; 6, 24 a 48 hodin (Obr. č. 10A). Snížení hladiny Rad51 oproti kontrolním neovlivněným vzorkům (K24 a K48) o 45 % je pozorovatelné po 24 hodinách. Pro porovnání byla provedena transfekce specifickou siRNA umlčující protein Rad51 (Obr. č. 10B). Pokles v hladině proteinu o 41 % se projevil také zhruba 24 hodin od transfekce.

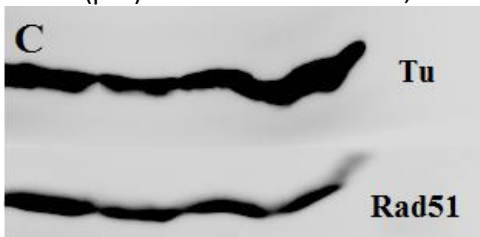
Roscovitin	-	+	+	+
Konc. (μM)	-	5	10	20



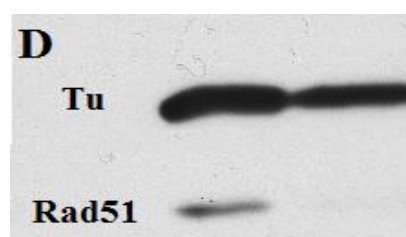
LGR 1404	-	+	+	-
Konc. (μM)	-	2,5	5	-



DRB	+	+	-	-
LGR 1406	-	-	+	+
Konc. (μM)	25	50	2,5	5

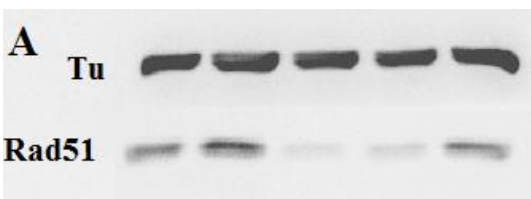


0,1 μM Flavopiridol	-	+
-----------------------------------	---	---

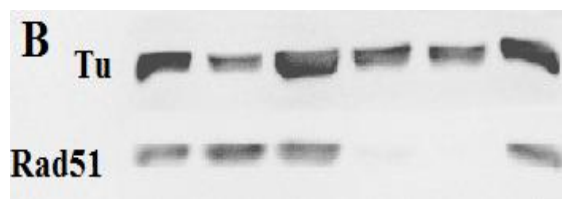


Obr. č. 9: Vliv jednotlivých CDKi ve zvolených koncentracích na hladinu proteinu Rad51. Linie HR-GFP byla jednotlivými koncentracemi ovlivněna po dobu 48 hodin.

Flavopiridol 0,1 μM	-	+	+	+	-
Čas (hod)	24	6	24	48	48



siRNA Rad51	-	-	+	+	+	-
RISC Free	-	+	-	-	-	-
Čas (hod)	48	48	6	24	48	48



Obr. č. 10: Časová závislost vlivu flavopiridolu (Obr. A) a specifické siRNA umlčující protein Rad51

6. Diskuze

Inhibitory cyklin dependentních kináz jsou vyvíjeny jako možná moderní protinádorová cytostatika, která jsou podstatně šetrnější k normálním buňkám v zasažené tkáni. Skrze specifický mechanismus inhibice blokují proliferaci nádorových buněk. Způsob, jakým inhibují růst nádoru, spočívá ve více či méně selektivní inhibici skupiny kináz řídících buněčný cyklus a regulujících transkripci, tzv. CDK. Mechanismus jejich působení na molekulární úrovni je poměrně dobře znám, ale nedávno se objevily překvapivé experimentální důkazy o tom, že inhibice CDK může vyvolávat poškození DNA a navíc ovlivňovat také schopnost buněk toto poškození opravovat (Liu *et al.*, 2011). Flavopiridol a roskovitin byly nedávno použity ve dvou studiích, které analyzovaly vztah CDK a homologní rekombinace (Crescenzi *et al.*, 2005, Ambrosini *et al.*, 2008). Oba použité inhibitory jsou však schopny inhibovat hned několik CDK, proto není zcela jednoznačně vysvětleno, jakým mechanismem CDK inhibitory poškození DNA vyvolávají a která CDK je za tento jev zodpovědná primárně.

Homologní rekombinace je důležitým způsobem oprav dvouvláknových zlomů DNA, nezbytným pro udržování stability genomu. Její proces je závislý na buněčném cyklu a aktivitě CDK; probíhá pouze během syntetické a G₂ fáze, kdy jsou v buňce přítomny homologní sekvence.

Zapojení CDK1 v regulaci HR v savčích buňkách je však nejednoznačné z důvodu částečného překryvu funkcí CDK1 a CDK2 (Santamaria *et al.*, 2007). Jednoznačné vysvětlení studií s roskovitem a flavopiridolem navíc komplikuje skutečnost, že oba tyto inhibitory blokují i CDK9 regulační aktivitu transkripce a tím snižují i hladinu Rad51 (Crescenzi *et al.*, 2005, Ambrosini *et al.*, 2008).

Studovali jsme proto vliv různě selektivních inhibitorů CDK na homologní rekombinaci, abychom objasnili vztah jejich účinku a selektivity k HR. Využili jsme k tomu specifické reportérové linie připravené speciálně pro tento typ analýzy. Jakmile byla transfekcí vyvolána indukce dvouvláknových zlomů v konstrukt DR GFP pomocí ektopicky exprimované restriční endonukleázy I-Sce1, DSBs byly potenciálně opraveny homologní rekombinací. Následující den byly vzorky ovlivněny inhibitory CDK po dobu 56 hodin.

Crescenzi *et al.* (2005) vytvořili specifické vektory exprimující negativně dominantní CDK1 a CDK2 (nd-K1 a nd-K2). Společnou kotransfekcí s I-Sce1 sledovali

pokles homologní rekombinace o 40 % s dn-K1 a až o 50 % s dn-K2. Zároveň provedli opačný experiment, kdy vnášeli zvýšené množství CDK2. To vedlo k signifikantnímu nárůstu HR. Prokázali takto zapojení cyklin dependentních kináz 1 a 2 v procesu homologní rekombinace. Autoři také pozorovali 30% pokles rekombinace v HeLa linii transientně transfekované I-Sce1 po ovlivnění 10 μ M roscovitinem. Pokles HR v HR-GFP ovlivněné 10 μ M roscovitinem nebyl pozorován. Nutno podotknout, že Crescenzi ve své publikaci udává, že použitá koncentrace roscovitinu (10 μ M) signifikantně potlačovala proliferaci buněk. Je důležité si uvědomit, že homologní rekombinace je na proliferaci závislá a pro věrohodné posouzení vlivu CDKi buňky proliferovat musí! To z důvodu, že po vnesení I-Sce1 endonukleázy musí transfekovaná linie projít minimálně několika buněčnými cykly, aby homologní rekombinace vůbec mohla proběhnout. V této práci byl roscovitin rovněž použit v koncentraci 10 μ M, ale máme ověřeno, že nemá vliv na buněčný cyklus linie HR-GFP (viz. Kapitola 4., str. 38).

Analogy roscovitinu LGR 1404, 1406 a 1407 inhibovaly homologní rekombinaci zhruba ve stejné míře. Jde o skupinově selektivní inhibitory CDK s vyšší účinností na CDK1 a CDK2 než má roscovitine (Jorda *et al.*, 2011, Sroka 2010), což prokázalo i cytometrické měření. V průměru snižovaly HR o 25 % více než samotný roscovitin. Také další použitá inhibitor CDK, flavopiridol, vykazoval negativní vliv na HR. Flavopiridol patří mezi vysoce účinné inhibitory CDK, jehož vliv na poškození DNA byl popsán nedávno (Liu *et al.*, 2011, Ambrosini *et al.*, 2008). Za primární cíl flavopiridolu se považuje CDK9, ovšem jeho schopnost inhibovat ostatní CDK může výrazně přispívat k jeho protinádorovému působení (Chao *et al.*, 2000, Carlson *et al.* 1999).

Minimální účinek na snížení homologní rekombinace vykazovaly i selektivní inhibitory CDK9. Pokles rekombinace pro inhibitor DRB činil 4,82 %. Oproti tomu druhý selektivní inhibitor CAN508 snižoval míru homologní rekombinace až o 54 %. Je to pravděpodobně dáno různou biochemickou specifikou obou sloučenin. Je např. pravděpodobné, že nukleosidový analog DRB může inhibovat celou řadu ATP-vazebných proteinů. Navíc DRB je sice schopen vyvolat rychlou stabilizaci proteinu p53 nutného k zablokování dráhy HR, ale už nemá potřebný potenciál k indukci fosforylace p53 na Ser-15 (Turinetti *et al.*, 2009). Právě tato fosforylace p53 je klíčová pro potlačení exprese Rad51. U CAN508 zase nelze vyloučit jeho částečný inhibiční vliv na CDK2, která je v homologní rekombinaci zapojena. CDK9 má vztah spíše k mechanismu NHEJ. To ověřili Liu *et al.* (2010), když zkoumali zapojení CDK9

v opravě DNA. Díky koimunoprecipitaci proteinových komplexů a analýze na hmotnostním spektrometru identifikovali precipitovaný protein v komplexu s CDK9 jako Ku70. Ten je součástí heterodimeru Ku, jenž slouží jako senzor DSB. Jeho katalytická činnost je zaměřena na helikázové odvíjení ssDNA. Na tento komplex se následně váže katalytická podjednotka DNA dependentní proteinkinázy a nastává NHEJ.

Pro pochopení mechanismu působení inhibitorů CDK na opravy zlomů DNA byla také analyzována hladina proteinu Rad51 v ovlivněných buňkách. Již dříve Ambrosini *et al.* (2008) sledovali hladinu proteinu Rad51 v linii HCT116 p53^{+/+} ošetřené 20 nM inhibitorem topoisomerázy I (SN38) v kombinaci s 300 nM flavopiridolem v různých časových intervalech. Protein p53 je klíčový inhibitor opravy DNA, který blokuje homologní rekombinaci, jež je na Rad51 závislá. Inhibitor flavopiridol indukuje časově závislý nárůst hladiny p53 a zároveň indukuje jeho fosforylaci na Ser-15. Fosforylovaný p53 je schopen potlačit expresi Rad51, ale také s ním fyzicky interaguje (Restle *et al.*, 2005). Aktivní metabolit SN38 stabilizuje komplex topoisomerázy s DNA, replikační vidlička kolabuje a dochází ke vzniku zlomů a permanentnímu zastavení cyklu v G₂. Již po prvních 5 hodinách se fosforylovaná forma p53 vážala na Rad51. Pokles Rad51 pozorovali už po 5 hodinách expozice. Proto byl proveden časový experiment. Vzorokly linie HR-GFP byly stejnou koncentrací (0,1 μM) ovlivněny po dobu 6, 24 a 48 hodin. Pokles v hladině proteinu byl detekovatelný až po 24 hodinách. Je pravděpodobné, že linie HR-GFP, která je stabilně transfekovaná, může na dané látky reagovat odlišným způsobem než „wild type“ HCT116. Použitá koncentrace flavopiridolu v našem experimentu je na rozdíl od Ambrosiniho třetinová. To může souviset s poklesem hladiny Rad 51 až po 24 hod. oproti 6 hod. u Ambrosiniho.

Ambrosini *et al.* (2008) zároveň ověřovali možnost, že flavopiridol jako neselektivní CDK inhibitor potlačuje expresi Rad51 mechanismem inhibice CDK9. Proto využili selektivní inhibitor CDK9 DRB v 50 mM koncentraci, což je koncentrace extrémě vysoká. Linie HCT116 p53^{+/+} byla ovlivněna DBR po dobu 5, 10, 15 a 24 hodin. Pokles Rad51 je pozorovatelný po 10 hodinách a po 15 hodinách je jeho hladina téměř na nulové hodnotě. Vzhledem k použité koncentraci jsou však popsány výsledky ve vztahu k CDK nejednoznačné a těžko vysvětlitelné.

Experimenty shrnuté v této diplomové práci využívaly různě selektivní inhibitory CDK v koncentracích, které výrazně neovlivňují proliferaci buněk. Přestože je HR závislá na aktivitě CDK, které proliferaci regulují, některé z testovaných látek

schopnost provádět rekombinaci přesto snižovaly. Poněkud překvapivě měly negativní vliv na HR také inhibitory transkripční kinázy CDK9. Ze všech studovaných látek však pouze flavopiridol výrazně redukoval expresi proteinu Rad51 (Obr. č. 10A). Žádný z dalších použitých inhibitorů CDK hladinu Rad51 v buňkách neměnil. Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že inhibitory CDK potlačují homologní rekombinaci nezávisle na proteinu Rad51 (Jorda *et al.*, 2011, příloha I).

7. Závěr

V posledním desetiletí bylo připraveno velké množství inhibitorů CDK, z nichž přibližně dvacet je studováno v klinických experimentech jako možná protinádorová léčiva. Mechanismus jejich působení je spojen s blokem proliferace a indukci apoptózy. Nedávné experimenty však dokazují jejich schopnost indukovat dvouvlákové zlomy DNA a narušovat jejich opravy homologní rekombinací. Cílem této práce bylo zhodnocení vlivů některých inhibitorů CDK na míru homologní rekombinace a posouzení vztahů mezi jejich selektivitou a účinností. Jednoznačným a primárním zjištěním této práce je nezávislost působení inhibitorů CDK na homologní rekombinaci na hladině proteinu Rad51. Tato nově zjištěná schopnost inhibitorů CDK může být při jejich dalším klinickém vývoji využita pro zvyšování citlivosti nádorových buněk pro klasická cytostatika poškozující DNA, případně pro terapii některých nádorových onemocnění s inaktivovanými mechanismy pro opravy zlomů DNA. Některé ze získaných výsledků byly použity v publikaci, charakterizující buněčné účinky jednoho z inhibitorů použitých v této diplomové práci (**příloha I**).

8. Seznam použitých zkratek

AA	akrylamid
APS	ammonium persuphate
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	adenosin trisfosfát
ATR	Ataxia and Rad3 related
BRCA	Breast carcinoma
BrDU	bromdeoxyuridin
CAK	CDK activating protein kinase
CBM	cyclin binding motif
Cdc	fosfatáza
CDK	cyklin dependentní kinázy
CDKi	inhibitory cyklin dependentních kináz
CHK	checkpoint kinase
CTD	carboxy terminal domain
DDR	DNA damage response
DMEM	Dulbeco's modified eagle medium
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNA-PK	DNA dependentní proteinkináza
DNA-PK _{cs}	katalytická podjednotka DNA dependentní proteinkinázy
DSB	double strand break
DTT	dithiotreitol
dsDNA	double strand DNA
EGTA	ethylenglycol tetraacetic acid
ELFO	elektroforetická separace
EV	electronic volume
FS	fetální sérum
G ₁	gap (mezera)
GFP	green fluorescent protein
GSK	glykogen syntaza kináza
H2AX	typ histonu
HCl	kyselina chlorovodíková
HR	homologous recombination

IC	inhibiční koncentrace
M	mitotická fáze buněčného cyklu
MDC	mediator of DNA damage checkpoint
MEK	mitogen activated protein kinase kinase
Mre11	meiotic recombination
MRN	komplex proteinů Mre/Rad50/NBS1
MSK1	mitogen and stress-activated protein kinase
mRNA	meditorová ribonulkeová kyselina
NBS	Nijmegen breakage syndrom
NHEJ	non homologous end joining
nM	nanomolární koncentrace
p53BP	p53 binding protein
PIK3	fosfatidyl inositol-3 kináza
PMSF	phenylmethane sulphonylfluorid
P-TEF	pizotivní transkripční elongační faktor
RB	retimoblastom
RFP	red fluorescent protein
RPA	replication protein A
RT	room temperature
S	syntetická fáze buněčného cyklu
SDS	sodium dodecyl sulphate
SDSA	synthesis dependent strand annealing
SMC	Structural maitenance of chromosome
SS	size scatter
ssDNA	single strand DNA
TEMED	tetrametylen diamin
TGF	transforming growth factor
Thr	threonin
Tyr	tyrosin
UV	ultrafialové záření

9. Seznam použité literatury

Abraham, R. T. (2004): PI3-kinase related kinases: 'big' players in stress-induced signaling pathways. *DNA Repair* 3, 883–887.

Allan, J. M. & Travis, L. B. (2005): Mechanisms of therapy-related carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer* 5, 943–955.

Ambrosini, G., Seelman, L. S., Quin, L. X. & Schwartz, G. K. (2008): The cyclin dependent kinase inhibitor Flavopiridol potentiates the effect of Topoisomerase I poison by suppressing Rad51 expression by p53 dependent manner. *Cancer Research* 68/7: 2312-2320.

Bach, S., Knockaert, M., Reinhardt, J., Lozach, O., Schmitt, S. *et al.*, (2005): Roscovitin target, protein kinase and pyridoxal kinase. *Journal of Biological Medicine* 35, 31208-31219.

Bakkenist, C. J. & Kastan, M. B. (2003): DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421/6922, 499–506.

Bártek, J., Lukáš, J. & Bártková, J. (2007): DNA damage response as a anti-cancer barrier: damage threshold and the concept of conditional haploinsufficiency. *Cell Cycle* 6, 2344 – 2347.

Bassing, C. H. & Alt, F. W. (2004): The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks. *DNA Repair* 3, 781–796.

Baumann, P. & West, S. C. (1998): Role of the human Rad51 protein in homologous recombination and double strand breaks repair. *TIBS* 23, 247-251.

Bekker-Jensen, S. *et al.* (2005): Dynamic assembly and sustained retention of 53BP1 at the sites of DNA damage are controlled by Mdc1/NFBD1. *Journal of Cell Biology* 170, 201–211.

Bochar, D. A. *et al.* (2000): BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. *Cell* 102, 257–265.

van den Bosch, M., Bree, R. T. & Lowndes, N. F. (2003): The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes. *EMBO Reports*; 4:844-9.

Carlson, B., Lahusen, T., Singh, S., Loaiza-Perez, A., Worland, P. J., *et al.* (1999): Down regulation of cyclin D1 by transcriptional repression in MCF-7 human breast carcinoma cell induced by flavopiridol. *Cancer Research* 59, 4634 – 4641.

Chang, T., Tsai, L., Hung, M., Chu, L., Chu, J. & Chen, Y. (1997): Effects of transcription and translation inhibitors on a human gastric carcinoma cell line. *Biochemical Pharmacology* 53, 969 - 977.

Chehab, N. H., Malikzay, A., Appel, M. & Halazonetis, T. D. (2000): Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G1 by stabilizing p53. *Genes Development* 14/3, 278 – 88.

Chao, S. H., Fujinaga, K., Marion, J. E., Taube, R., Sausville, E. A. *et al.* (2000): *Biol. Chem.*, 275, 28 345 – 28348.

Chen, J., Saha, P., Kornbluth, S., *et al.* (1996): Cyclin binding motifs are essential for the function of p21CIP1. *Molecular Cell Biology* 16 : 4673 - 4682 .

Cliby, W. H., Lewis, K. A., Lilly, K. K. & Kaufmann, S. H. (2002): S phase and G2 arrest induced by DNA topoisomerase I poisons are dependent on ATR kinase function. *Journal of Biological Chemistry* 277, 1599 – 1606.

Coster, G. & Goldberg, M. (2010): The cellular response to DNA damage, a focus on MDC and its interacting proteins. *Nucleus* 1(2), 166-178.

Crescenzi, E., Palimbo, G. & Brady, H. M. J (2005):Roscovitin modulates DNA repair and senescence: implication for combination chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 11/22: 8158-8171.

Critchlow, S. E., Bowater, R. P. & Jackson, S. P. (1997): Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Curr. Biol.* 7, 588–598.

Critchlow, S. E. & Jackson, S. P. (1998): DNA end joining: from yeast to man. *Trends in Biochemical Science* 23, 394 – 398.

Diederichs, S., Baumer, N., Ji, P., *et al.* (2004): Identification of interaction partners and substrates of the cyclin A1-2 complex. *J Biol Chem*; 279: 33727–41.

Deans, A. J., Khanna, K. K., McNees, C. J., Mercurio, C., Heierhorst, J., McArthur, G. A. (2006): CDK2 functions in normal DNA repair and is a therapeutical target in breast cancer deficient cancer. *Cancer Res* 66(16): 8219-26.

Demidenko, Z. N. & Blagosklonny, M. V. (2004): Flavopiridol induces p53 via initial inhibition of Mdm2 and p21, and independently of p53, sensitize apoptotic-reluctant cells to tumor necrosis factor. *Cancer Res.* 64(10), 3653-60.

Donoho, G., Jasin, M. & Berg, P. (1998): Analysis of gene targeting and intrachromosomal homologous recombination stimulated by genomic double-strand breaks in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* 18(7), 4070-8.

Draetta, G. & Eckstein, J. (1997): Cdc25 Protein Phosphatases in Cell Proliferation. *Biochim. Biophys. Acta* 1332, 53-63.

van Dyck, E., Stasyak., A. Z., Stasiak, A. & West, C. S. (1999): Binding of DSB in DNA by human Rad52 protein. *Nature* 398, 728-731.

Dynan, W. S. & Yoo, S. (1998): Interaction of Ku protein and DNA dependent protein kinase catalytic subunit with DNA. *Nucleic Acid Research* 26, 1551 – 1559.

Dowdy, S. F.; Hinds, P. W.; Louie, K.; Reed, S. I.; Arnold, A.; Weinberg, R. A. (1993): Physical Interaction of the Retinoblastoma Protein with Human D Cyclins. *Cell*, 73, 499-511.

Esashi, F. Christ N, Gannon *et al.* (2005): CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature* 434, 598–604.

Fattaey, A. & Booher, R. N. (1997): Myt1: A Weel-Type Kinase that Phosphorylates Cdc2 on Residue Thr14. *Progress in Cell Cycle Research* 3, 233-240.

Federico, M., Symond, C. E., Baggela, L., Rizzolio, F., Fanale, D., Russo, A. & Giordano, A. (2010): R-roscovitin (Selicilib) prevents DNA damage-induced cyclin A1 upregulation and hinders non-homologous end joining DNA repair. *Molecular Cancer* 9/208,

Flynn, R. L. & Zou, L. (2010): ATM a master conductor of cellular responses to DNA replication stress. *Trends Biochem Sci.* 36(3), 133-40.

Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T. E., Mann, M. & Lieber, M.R. (1997): Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature*, 388, 492–495.

Gorgoulis, V. G., Vassiliou, L. V., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A. & Liloglou, T. (2005): Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesion. *Nature* 434, 907 – 913.

Haber, J. E. (1999): DNA repair. Gatekeepers of recombination. *Nature* 398, 665–667.

Haber, J. E. (2000): Partners and pathways repairing a double-strand breaks. *Trends in Genetics* 16/6, 259 – 264.

Hahntow, I. N., Schneller, F., Oelsner, M., Weick, K., Ringshausen, I., Fend, F., Peschel, C. & Decker, T. (2004): Cyclin-dependent kinase inhibitor Roscovitine induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 18, 747 – 755.

Havlíček, L., Hanuš, J., Veselý, J., Leclers, S., Shaw, G. & Strnad, M. (1997): Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *J Med Chem* 40(4), 408-12.

Huertas, P., Cortes-Ledesma, F., Sartori, A. A., Aguilera, A. & Jackson, S. P. (2008): CDK targets Sae2 to control DNA end resection and homologous recombination. *Nature* 455, 689-693.

Huwe, A., Mazitschek, R., Giannis, A. (2003): Small molecules as inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Angewandte Chemie* 42, 2122 – 2138.

Jackson, P. K.; Chevalier, S.; Phillippe, M.; Kirschner, M. W. (1995): Early Events in DNA Replication Require Cyclin E and are Blocked by p21CIP1. *J. Cell. Biol.*, 130, 755-769.

Jackson, S. (2002): Sensing and repairing DNA double strand breaks. *Carcinogenesis* 23/5, 687 – 696.

Jeggo, P. A. (1997): DNA-PK: at the cross-roads of biochemistry and genetics. *Mutat. Res.*, 384, 1–14.

Jeggo, P.A. (1998): DNA breakage and repair. *Adv. Genet.* 38, 185–218.

Jorda, R., Havlíček, L., McNae, I. L., Walkinshaw, M. D., Voller, J. *et al.* (2011): Pyrazolo[4,3-d]pyrimidine bioisostere of Roscovitine: Evaluation of a novel selective inhibitor of cyclin-dependent kinases with antiproliferative activity. *J Med Chem.* 54, 2980-2993.

Kaldis, P. (1999): The CDK-Activating Kinase (CAK): From Yeast to Mammals. *Cell. Mol. Life Sci* 55, 284-296.

Kato J. (1999): Induction of S phase by G1 regulatory factors. *Front Biosci* 4, 787-792.

Kitagawa, R., Bakkenist, C. J., McKinnon, P. J. & Kastan, M. B. (2004): Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway. *Genes Dev* 18: 1423–1438.

King, R. W.; Deshaies, R. J.; Peters, J. & Kirschner, M. W. (1996): How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 274, 1652-1658.

Khanna, K. K. & Jackson, S. P. (2001): DNA double strands breaks: signalling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics* 27, 247 – 254.

Kryštof, V., McNae, I. W., Walkinshaw, M. D., Fischer, P. M., Muller, P. *et al.* (2005): Antiproliferative activity of olomoucine II, A novel 2,6,6-trisubstituted purine cyclin dependent kinase inhibitor. *Cellular and Molecular Life Science* 62, 1763-1771.

Kryštof, V., Cankař, P., Fryšová, I., Slouka, J., Kontopidis, G. *et al.* (2006): 4-Arylazo-3,5-diamino-1H-pyrazole CDK Inhibitors: SAR Study, Crystal Structure in Complex with CDK2, Selectivity, and Cellular Effects *J. Med. Chem.*, 49, 6500-6509.

Lacey, K.; Jackson, P. K.; Stearns, T. (1999): Cyclin-Dependent Kinase Control of Centrosome Duplication. *Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 2817-2822.

Lavin, M. & Kozlov, S. (2007): ATM activation and DNA damage response. *Cell Cycle* 6, 931-942.

Leber, R., Wise, T. W., Mizuta, R. & Meek, K. (1999): The XRCC4 gene product is a target for and interact with the DNA protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 1794 – 1801.

Lee, M. H. & Yang, H. Y. (2001): Negative regulators of cyclin-dependent kinases and their roles in cancers. *Cell Mol Life Sci* 58 : 1907 - 1922 .

Lee, J. H. & Paull, T. T. (2007): Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene* 26/56, 7741 –7748.

Levine, A. J. (1997): p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323–331.

Li, Z., Otevrel, T., Gao, Y., Cheng, H. L., Seed, B., Stamatou, T. D., Taccioli, G. E. & Alt, F. W. (1995): The XRCC4 gene encodes a novel protein involved in DNA double-strand break repair and V(D)J recombination. *Cell* 83, 1079–1089.

Liu, N., Lamerdin, J. M., Tebbs, R. S., Schild, D., Tucker, J. D. *et al.* (1998): XRCC2 and XRCC3, new human Rad51 family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. *Molecular Cell* 1, 783-793.

Liu, H., Herrmann, C. H., Chiang, K., Sung, T. L., Moon, S. H., Donehower, A. L. & Rice, A. P. (2010): 55K isoform of CDK9 associates with KU70 and is involved in DNA repair. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, doi:10.1016.

Liu, X., Shi, S., Lam, F., Pepper, C., Fischer, P. M. & Wang, S. (2011): CDKi-71: a novel CDK9 inhibitor, is preferentially cytotoxic to cancer cell, when compared with flavopiridol. *International Journal of Cancer*, doi: 10.1002/ijc.26127.

Ljungman, M., O'Hagan, H. M., Paulsen, M. T. (2001): Induction of ser15 and lys382 modifications of p53 by blockage of transcription elongation. *Oncogene* 20, 5964 – 5971.

Lukas, J.; Bartkova, J.; Bartek, J. (1996): Convergence of mitogenic signaling cascades from diverse classes of receptors at the cyclin D-cyclin-dependent kinase: pRb-controlled G1 checkpoint. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6917-6925.

Lyndaker, A. M. & Alani, E. (2009): "A tale of tails: insights into the coordination of 3' end processing during homologous recombination". *Bioessays* 31 (3): 315–321.

Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K. & Elledge, S. J. (2000): ATM phosphorylates CHK2 in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 97, 10389-94.

Meijer, L., Borgne, A., Mulner, O., Chong, J. P., Blow, J. J. *et al.* (1997): Biochemical and cellular effect of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin dependent kinases cdc2, CDK2 and CDK5. *Eur J Biochem.* 243(1-2), 527-36.

- Misteli, T. & Soutoglou, E. (2009): The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(4):243-54
- Morgan, D. O. (1995): Principles of CDK Regulation. *Nature* 375, 131-134.
- Moynahan, M. E., Pierce, A. J. & Jasin, M. (2001): BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Mol. Cell* 7, 263–272.
- Nigg, E. A. (1996): Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? *Curr Opin Cell Biol* 8: 312 - 317.
- Niwa, H., Yamamura, K. & Miyazaki, J. (1991): Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *J Radiat Res* 32 Suppl 2, 235-47.
- O'Connell, M. J., Walworth, N. C. & Carr, A. M. (2000): The G2-phase DNA-damage checkpoint. *Trends Cell Biol.* 10, 296–303.
- Olive, P. L. (1998): The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiat. Res.* 150: 42–51.
- Paques, F. & Haber, J. E. (1999): Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 349–404.
- Pedone, P. V., Ghirlando, R., Clore, G. M., Glonenborn, A. M. *et al.* (1996): The single Cys2-His2 zinc finger domain of the GAGA protein flanked by basic residues is sufficient for high-affinity specific DNA binding. *Proc Natl Sci Acad USA* 93(7), 2822-6.
- Petersen, B. O., Lukas, J., Sorensen, C. S., Bartek, J., Helin, K. (1999): Phosphorylation of mammalian CDC6 by Cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *EMBO Journal* 18, 396 – 410.
- Pierce, A. J., Johnson, R. D. & Thompson, L. H. (1999): XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes and Dev.* 13, 2633-2638.
- Pines, J. (1995): Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases: Theme and Variations. *Adv. Cancer Res* 55, 181-212.
- Planas-Silva, M. D.; Weinberg, R. A. (1997): The Restriction Point and Control of Cell Proliferation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 768-772.

te Poele, R. H., Okorokov, A. L. & Joel, S. P. (1999): RNA synthesis block by 5, 6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) triggers p53-dependent apoptosis in human colon carcinoma cells. *Oncogene* 18(42), 5765-72.

Restle, A., Janz, C. & Weissmuller, L. (2005): Differences in the association of p53 phosphorylated on serine 15 and key enzymes of homologous recombination. *Oncogene* 24(27), 4380-7.

Richardson C, Moynahan ME, Jasin M. (1998): Double strand break repair by interchromosomal recombination: suppression of chromosomal translocation. *Genes Dev.* 12(24), 3831-42.

Rotman, G. & Shiloh, Y. (1999): ATM: a mediator of multiple responses to genotoxic stress. *Oncogene* 18, 6135–6144.

Russo, A. A., Jeffery, P. D., Patten, A. K., et al (1996): Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* 382, 325 - 331 .

Sanchez, I. & Dynlacht, B. D. (2005): New insights into cyclins, CDKs, cell cycle control. *Semin Cell Dev Biol.* 16(3), 311-21.

Santamaría, D., Barrière, C., Cerqueira, A., Hunt, S., Tardy, C. *et al.* (2007): CDK1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* 448(7155), 811-5.

Savio, M., Cerri, M., Cazzalini, O., Perruca, P., Stivala, L. A. Picherri, P. et al. (2006): Replication-dependent DNA damage response triggered by roscovitine induces an uncoupling of DNA replication proteins. *Cell Cycle* 5/18, 2153-2159.

Sedelnikova, O. A., Pilch, D. R., Redon, C. & Bonner, W. M. (2003): Histone H2AX in DNA damage and repair. *Cancer Biol Ther* 2: 233–235.

Sedlacek, H. H.; Czech, J.; Naik, R.; Kaur, G.; Worland, P.; Losiewicz, M.; Parker, B.; Carlson, B.; Smith, A. (1996): Flavopiridol a New Kinase Inhibitor for Tumor Therapy. *Int. J. Oncol.* 9, 1143-1168.

Shapiro, G. I. (2006): Cyclin dependent kinase pathways as a target for cancer treatment. *Journal of Clinical Oncology* 11, 1770 - 1783.

Shiloh, Y. (2003): ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat. Rev. Cancer* 3, 155–168.

Shiotani, B. & Zou, L. (2009): Single-stranded DNA orchestrates an ATM-to-ATR switch at DNA breaks. *Mol. Cell* 33, 547–558.

Sherr, C. J. & Roberts, J. M. (1995): Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9, 1149±1163.

Shugar, D. (1994): Development of inhibitors of protein kinases CKI and CKII and some related aspects, including donor and acceptor specificities and viral protein kinases. *Cell Mol Biol Res.* 40(5-6), 411-9.

Sielecky, T. M., Boylan, J. F., Benfield, P. A. & Grainor, T. (2000): Cyclin dependent kinase inhibitors, useful targets in cell cycle regulation. *Journal of Medicinal Chemistry* 43, doi:10.1021.

Smith, G. C. M. & Jackson, S. P. (1999): The DNA protein kinase. *Genes & Development* 13, 913 – 934.

Sroka, I. M., Heiss, E. H., Havlíček, L., Ttzke, F., Aristei, Y., Pechan, P., Kubbutat, M. H. G., Strnad, M. & Dirsch, V. M. (2009): A novel roscovitin derivative potently induces G1-phase arrest in PDGF-BB-activated vascular smooth muscle cells. *Molecular Pharmacology Fast Forward*, doi:10.1124.

Stommel, J. M. & Wahl, G. M. (2004): Accelerated MDM2 autodegradation induced by DNA-damage kinases is required for p53 activation. *EMBO J.* 23, 1547–1556.

Stucki, M., Clapperton, J., Mohammad, D., Yaffe, M., Smerdon, S. & Jackson, S. (2005): MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* 123:1213-26.

Sung, P. & Klein, H. (2006). "Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 (10): 739–750.

Sung, P. & Roberson, D. L. (1995): DNA strand exchange mediated by a RAD51–ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA. *Cell* 82,453–461.

Symington, L. S. (2002): Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 630–670.

Takata, M., Sasaki, M. S., Sonoda E., Morison, C., Hashimoto, M., *et al.* (1998): Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO Journal* 17/18, 5497 – 5508.

Toogood, P. L. (2001): Cyclin dependent kinase inhibitors for treating cancer. *Med Res Rev* 21/6, 487-498.

Trujillo, K. M., Yuan, S. S. F., Lee, E. & Sung, P. (1998): Nuclease activity in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11 and p95. *Journal of Biological Chemistry* 273, 21447-21450.

Turinetto, V., Porcedda, P., Orlando, L., de Marchi, M., Amoroso, A. & Giachino, C. (2009): The cyclin dependent kinase inhibitor 5, 6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazol induces nongenotoxic, DNA replication-independent

apoptosis of normal and leukemic cells, regardless of their p53 status. *BMC Cancer* 9/281, 1-13.

Vermeulen, K., Berneman, Z. N. & Van Bockstaele, D. R. (2003): The cell cycle: a review of regulation, deregulation and a therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 36(3), 131-49.

Wang, H., Guan, J., Wang, H., Perrault, A. R., Wang, Y. & Iliakis, G. (2001): Replication protein A2 fosphorylation after DNA damage by the coordinated action of ATM and DNA protein kinase. *Cancer Research* 61, 8854-8563.

Wang, Y. & Prives, C. (1995): Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclindependent kinases. *Nature* 376, 88–91.

Weintraub, S. J., Chow, K. N., Luo, R. X., Zhang, S. H. He, S. & Dean, D. C. (1995): Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. *Nature* 375:812–815.

Welsh, P. L., Owens, K. N. & King, M. C. (2000): Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet.* 16, 69–74.

Wierger, A.; Perabo, F. G.; Burgemeister, S.; Haase, L.; Schmidt, D. H.; *et al.* (2005): Flavopiridol, an inhibitor of cyclin-dependent kinases, induces growth inhibition and apoptosis in bladder cancer cells in vitro and in vivo. *Anticancer Res.* 25(6B), 4341-4347.

Zhong, Q. *et al.* (1999): Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science* 285, 747–750.

Zou, L. & Stillman, B. (1998): Formation of a preinitiation complex by S-phase cyclin CDK-dependent loading of Cdc45p onto chromatin. *Science* 280, 593-596.

Zhou, B. B & Elledge, S. J. (2000): The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408:433–439.

Zou, L. & S. J. Elledge, S. J. (2003): Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 300:1542–1548.

Internetové zdroje:

www.cellsignalling.com

10. Přílohy

Jorda, R., Havlíček, L., McNae, I. W., Walkinshaw, M. D., Voller, J., Sturc, A., Navrátilová, J., Kuzma, M., Mistrík, M., Bártek, J., Strnad, M., Kryštof, V. (2011): Synthesis and biological evaluation of 3,5,7-trisubstituted pyrazolo[4,3-d]pyrimidines, novel selective inhibitors of cyclin-dependent kinases with antiproliferative activity. *J Med Chem.* 54, 2980-2993.

Pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine Bioisostere of Roscovitine: Evaluation of a Novel Selective Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases with Antiproliferative Activity[†]

Radek Jorda,[‡] Libor Havlíček,^{‡,§} Iain W. McNae,^{||} Malcolm D. Walkinshaw,^{||} Jiří Voller,[⊥] Antonín Šturc,[‡] Jana Navrátilová,[‡] Marek Kuzma,[#] Martin Mistrík,[∞] Jiří Bártek,[∞] Miroslav Strnad,[‡] and Vladimír Kryštof^{*,‡}

[‡]Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacký University and Institute of Experimental Botany ASCR, Šlechtitelů 11, 78371 Olomouc, Czech Republic

[§]Isotope Laboratory, Institute of Experimental Botany ASCR, Videnska 1083, 142 20 Prague, Czech Republic

^{||}Structural Biochemistry Group, University of Edinburgh, Michael Swann Building, King's Buildings, Edinburgh, EH9 3JR, Scotland

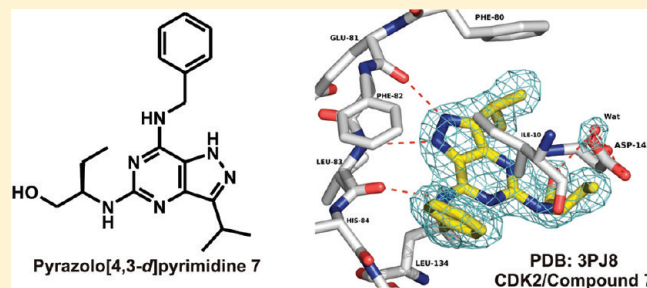
[⊥]Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Department of Growth Regulators, Palacký University, Šlechtitelů 11, Olomouc, CZ-783 71, Czech Republic

[#]Laboratory of Molecular Structure Characterization, Institute of Microbiology ASCR, Videnska 1083, 142 20 Prague, Czech Republic

[∞]Laboratory of Genome Integrity and Institute of Molecular and Translational Medicine, Palacký University, Šlechtitelů 11, 78371 Olomouc, Czech Republic

S Supporting Information

ABSTRACT: Inhibition of cyclin-dependent kinases (CDKs) with small molecules has been suggested as a strategy for treatment of cancer, based on deregulation of CDKs commonly found in many types of human tumors. Here, a new potent CDK2 inhibitor with pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine scaffold has been synthesized, characterized, and evaluated in cellular and biochemical assays. 7-Benzylamino-5(*R*)-[2-(hydroxymethyl)propyl]amino-3-isopropyl-1(2*H*)-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine, compound 7, was prepared as a bioisostere of the well-known CDK inhibitor roscovitine. An X-ray crystal structure of compound 7 bound to CDK2 has been determined, revealing a binding mode similar to that of roscovitine. Protein kinase selectivity profile of compound 7 and its biological effects (cell cycle arrest, dephosphorylation of the retinoblastoma protein, accumulation of the tumor suppressor protein p53, induction of apoptosis, inhibition of homologous recombination) are consistent with CDK inhibition as a primary mode of action. Importantly, as the anticancer activities of the pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine 7 exceed those of its bioisostere roscovitine, compound 7 reported here may be preferable for cancer therapy.



INTRODUCTION

A growing body of evidence has linked abnormal protein phosphorylation patterns with pathogenesis of various human diseases and encouraged the search for compounds capable of specifically inhibiting protein kinases. Indeed, therapeutic success of several kinase inhibitors that had been approved for the treatment of particular cancer type(s) during recent years established protein kinases as an important class of novel drug targets. Among the 518 human genes encoding protein kinases, cyclin-dependent protein kinases (CDKs) have originally attracted attention because of their frequent deregulation in cancer.^{1,2} Cyclin-dependent kinases, listing at least 13 members in humans, are serine/threonine kinases that participate mainly in processes of cell cycle control, transcription, and postranscriptional modifications but also in cell differentiation and cell death.^{3,4}

During the past decade many CDK inhibitors have been developed and characterized. Some of the most efficient ones entered clinical trials as candidate drugs against various types of cancer^{5,6} and/or advanced to preclinical evaluation of potential value in treatment of other diseases linked with CDK deregulation, such as neurodegenerative and cardiac disorders, viral and protozoan infections, glomerulonephritis or other types of chronic inflammation.^{3,7–10} The purine heterocycle became one of the first systematically investigated scaffolds of CDK inhibitors (due to a possibility of variable substitutions mainly at positions 2, 6, and 9), leading to the discoveries of olomoucine and roscovitine.^{11–13} Roscovitine is a pan-selective CDK

Received: January 21, 2011

Published: March 21, 2011

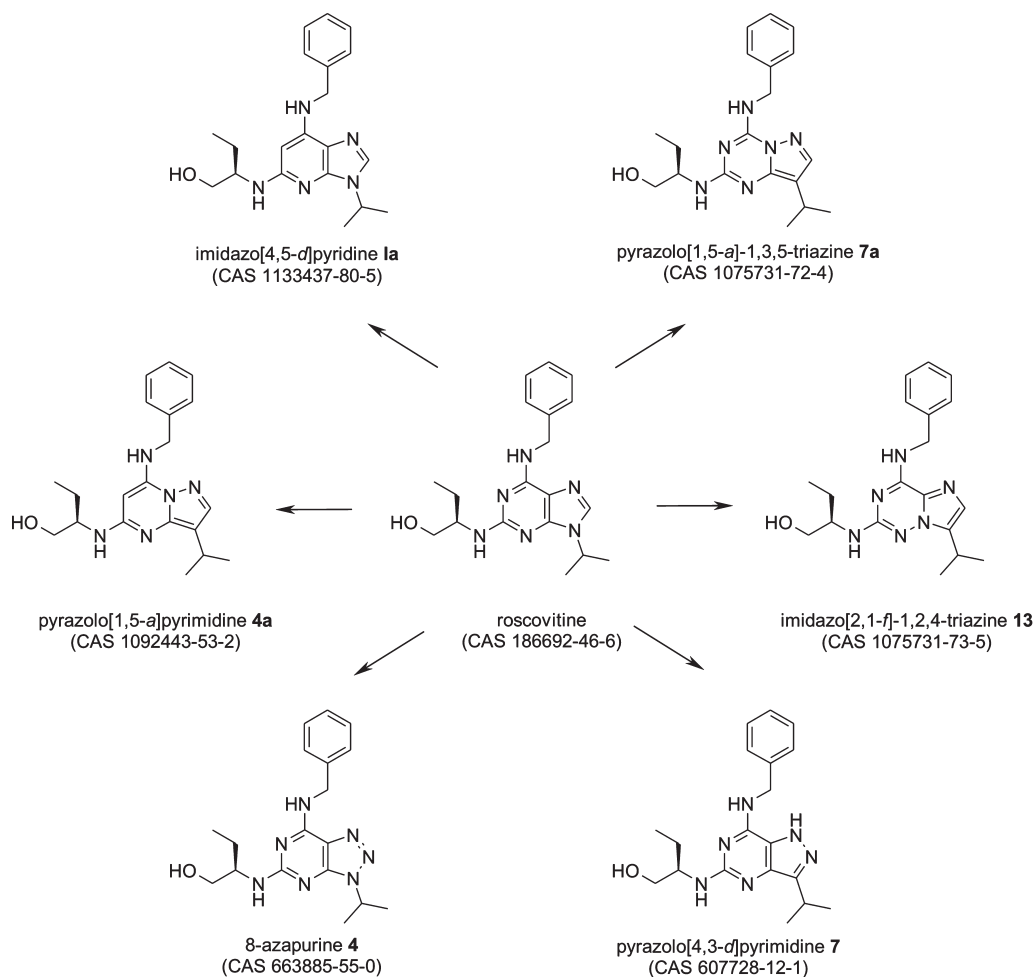


Figure 1. Structure of roscovitine and its known bioisosteres.^{26,30,39,42} CAS numbers indicate Chemical Abstracts Service compound identifiers.

inhibitor with multiple effects on cell proliferation, cell cycle progression, p53 expression, and p53-dependent transcription and/or induction of apoptosis in cancer cells.¹⁴ Because of these effects, (*R*)-roscovitine was among the first CDK inhibitors that entered clinical trials.

Inspired by the success of roscovitine, further exploration of purine-derived CDK inhibitors has been mainly oriented toward either modifications of the roscovitine molecule in its substitutable positions or, more recently, redistribution of nitrogen atoms of the purine scaffold. Both these directions have led not only to the large number of purine inhibitors derived from roscovitine^{15–22} but also to libraries of compounds with alternative core heterocyclic skeleton structure with side chain types of roscovitine: pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidines,^{23,24} pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazines,^{25–27} imidazo[2,1-*f*]-1,2,4-triazines,^{25,26} pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines,^{28–34} imidazo[1,2-*a*]pyrazines,^{35,36} triazolo[1,5-*a*]pyrimidines,^{37,38} imidazo[4,5-*d*]pyridines³⁹ and pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidines.⁴⁰

In this study, we describe synthesis of a novel bioisostere of roscovitine with the pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine core. The 3,7-disubstituted pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidines were previously described as CDK inhibitors,⁴¹ and we have found that introduction of the third substituent to position 5 led to development of a new class of potent purine-related CDK inhibitors. The representative 3,5,7-trisubstituted pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine **7** has been

evaluated in diverse biological assays in comparison with roscovitine as a reference molecule. Our results demonstrate that a change in a position of a single nitrogen atom can alter CDK inhibitory properties of this class of compounds, analogous to some other purine bioisosteres (Figure 1).^{23,25,26,33,39,42}

RESULTS AND DISCUSSION

Chemistry. We have previously described synthesis of 5,7-di(4-methoxybenzyl)amino-3-isopropyl-1(2)*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine that was prepared as an analogue of microtubule-interfering drug myoseverin.⁴³ A key assumed intermediate of the synthetic route was 5,7-dichloro-3-isopropyl-1(2)*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine. However the intermediate was not isolated and characterized. An attempt to synthesize pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine analogue of roscovitine, i.e., the compound with different 5,7-substituents in contrast to 5,7-disubstituted myoseverin derivative, via the same synthetic approach was not successful. Therefore, we developed a completely new synthetic route outlined in Scheme 1. This synthetic approach is simple, and all intermediates are easily detectable and isolatable, with the exception of the final compound **7**. The last reaction step gives only poor yield of the desired compound even in a complex reaction mixture, and therefore, compound **7** has to be isolated by a column chromatography.

Scheme 1

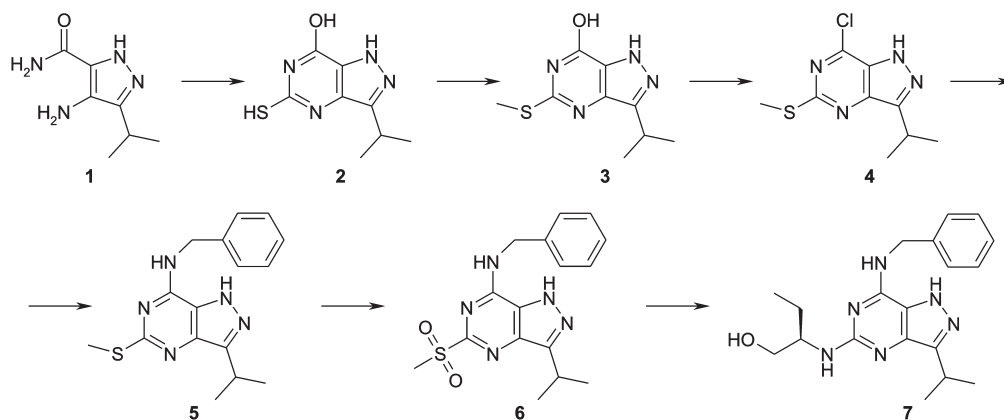


Table 1. Inhibition of Proliferation in a Panel of Human Cancer Cell Lines by Compound 7

human tumor cell lines		IC ₅₀ (μM), ^a 7
origin	type	
breast	MCF-7	7.5 ± 2.3
	HBL-100	11.3 ± 2.4
	BT-474	8.5 ± 0.5
colon	HT-29	6.6 ± 1.9
	HCT-116	11.0 ± 1.8
multiple myeloma	RPMI-8226	3.6 ± 0.3
	U266	4.9 ± 0.1
leukemia	K-562	7.7 ± 0.8
	CEM	3.8 ± 0.8
	HL-60	7.1 ± 0.5
osteosarcoma	HOS	7.5 ± 1.9
melanoma	G-361	4.8 ± 1.6
cervix	HeLa	6.9 ± 1.7
lung	A-549	7.1 ± 2.1
epidermis	A-431	7.7 ± 0.3

^a Average ± SD values from three determinations.

Anticancer Cytotoxicity. For a comparison of pyrazolo[4,3-*d*]-pyrimidines with purines, the antiproliferative activity of compound 7 was tested on a panel of human cell lines representing a range of tumor types (Table 1). Determination of proliferation clearly showed stronger activity of compound 7 over roscovitine. This result was further confirmed through testing on the NCI60 panel (Figure S2 in Supporting Information),⁴⁴ where compound 7 showed a higher activity than both racemic *R,S*-roscovitine and *R*-roscovitine in all three assay end points (GI₅₀, TGI, LC₅₀) (Table 2). All the observed differences in the activity are statistically highly significant ($p < 10^{-7}$, one-sided Wilcoxon paired test). In contrast to roscovitine, compound 7 showed not only cytostatic (GI₅₀, TGI) but also significant cytotoxic (LC₅₀) effect against the majority (74.6%) of the NCI60 cell lines in the concentration range applied. The observed comparable median activities of compound 7 toward the cell lines with either the wild-type or mutant p53 (7.5 vs 10.4, 23.2 vs 26.4, and 55.8 vs 66.5 μM for GI₅₀, TGI, and LC₅₀,

respectively) are consistent with the accepted opinion that p53 status does not play a major role in resistance to CDK inhibitors.^{45–47}

In order to identify compounds with similar effects on the NCI60 cell lines, we calculated Pearson correlation coefficients (r) of the activity patterns (GI₅₀ values for the individual cell lines) of compound 7 and 16 533 other compounds tested on the NCI60 panel (see Experimental Section for the criteria of compound selection). Calculations were carried out on a log–log scale. The analysis identified 2*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine CGP-57380⁴⁸ ($r = 0.66$, rank 1, $p = 1.0 \times 10^{-8}$), an inhibitor of MNK1. MNK1 is a positive regulator of the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E), which besides its role in translation also regulates distribution of cyclin D1 mRNA.⁴⁹ Treatment with MNK1 inhibitor leads to a decrease of the cellular content of cyclin D1.^{49,50} A strong correlation was observed for the cells with both the wild type ($N = 16$, $r = 0.71$, $p = 0.0022$) and mutant p53 gene ($N = 43$, $r = 0.63$, $p = 7.0 \times 10^{-6}$). It is tempting to speculate that the observed similarity in the activity patterns of the two compounds might stem from an effect on CDK activity, directly in the case of compound 7 and indirectly in the case of MNK1 inhibitor. On the other hand, comparison with experimentally validated (IC₅₀ < 100 μM) inhibitors of cyclin-dependent kinases 1 and 2 and related kinases (CDKs 4, 5, 7, 8, 9 and/or glycogen synthase kinase-3β) included in BindingDB (33 compounds, 37 activity patterns)^{51,52} shows that GI₅₀ pattern of compound 7 is distinctly different. This observation suggests that other factors beyond the known shared molecular target(s) influence the resulting biological activity. Figure 2 shows signed coefficients of determination r^2 (measure of variability explained by a regression line) calculated separately for the cell lines with the wild-type and mutant p53 gene. The cumulation of the data points along the x axis indicates various degrees of similarity in the activity of compound 7 and the individual CDK/GSK3B inhibitors against the cell lines expressing wild-type p53. On the other hand, the activity pattern of compound 7 on the p53 mutant cell lines was distinctly different (low signed r^2). A possible explanation of this difference might be a generally high sensitivity of certain p53 wild type cell lines to chemical insults. Similar results were obtained when rank sum correlation was used instead of Pearson's correlation for calculation of signed coefficient of determination (not shown). We conclude that growth inhibitory activity of compound 7 differs

Table 2. Cytostatic and Cytotoxic Effects of Compound 7 and *R,S*- and *R*-Roscovitine against NCI60 Panel^a

	GI ₅₀ (μM)		TGI (μM)		LC ₅₀ (μM)	
	median	range	median	range	median	range
7	10.2	3.0–23.8 (0/59)	25.9	10.6–60.8 (0/59)	65.3	39.1 to >100 (15/59)
<i>R,S</i> -roscovitine	17.9	4.6–57.8 (0/59)	58.1	20.9 to >100 (14/59)	>100	51.9 to >100 (39/59)
<i>R</i> -roscovitine	19.3	4.9 to >100 (1/52)	>100	14 to >100 (36/53)	>100	82.0 to >100 (50/53)

^a Given are median and range of GI₅₀, TGI, and LC₅₀ together with proportion of the cell lines for which the end point was not reached at the highest concentration tested (100 μM) (data in parentheses).

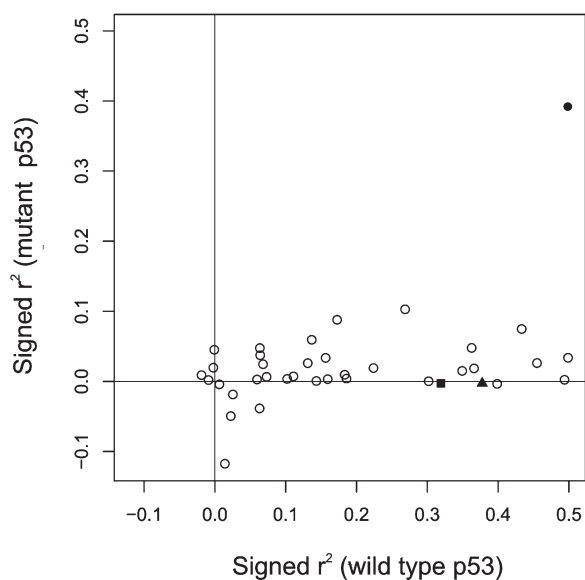


Figure 2. Effect of p53 status on relation (expressed as signed coefficient of determination r^2) between GI₅₀ patterns of compound 7 and individual inhibitors of CDKs and/or GSK3B. Black circle designates MNK-1 inhibitor.⁴⁸ Black triangle designates *R*-roscovitine, and black square designates racemic roscovitine.

from those of other structurally diverse CDK inhibitors, including its isomer roscovitine, and this difference is typically more pronounced when only the cell lines harboring mutant p53 are considered.

Kinase Selectivity of Compound 7. The kinase selectivity of compound 7 was determined in enzyme assays with recombinant CDK2/cyclin E, CDK5/p35, CDK7/cyclin H/MAT1, and CDK9/cyclin T1. The IC₅₀ values for compound 7 were comparable to that of roscovitine (Table 3), but isomer 7 showed generally better efficiency in CDK inhibition with IC₅₀ values in the submicromolar range (Figure S1). In the following experiment the selectivity of compound 7 was tested against a panel of purified recombinant human protein kinases at a single concentration of 10 μM. The assays confirmed that compound 7 inhibits preferentially CDKs (Table 3). In addition to potent inhibition of CDKs, moderate inhibition was observed for GSK3B, stress-activated protein kinases PRAK and MSK1, and mitogen-activated kinase MEK, and these activities may contribute to the observed antiproliferative effects of compound 7.

Crystal Structure of Compound 7 with CDK2. The crystal structure of compound 7 in complex with CDK2 has been determined at 1.96 Å resolution. Compound 7 binds in the narrow cleft between the N- and C-terminal domains of CDK2.

Table 3. Kinase Selectivity Profile for Compound 7 and Its Purine Analogue Roscovitine

protein kinase	kinase inhibition (%) ^a		IC ₅₀ (μM) ^b	
	7	roscovitine	7	roscovitine
CDK1/cyclin B	84	70	nd	nd
CDK2/cyclin A	97	94	nd	nd
CDK2/cyclin E	98	95	0.04	0.22
CDK5/p35	95	85	0.20	0.94
CDK7/cyclin H/MAT1	96	87	0.16	0.48
CDK9/cyclin T1	90	87	1.00	1.77
CK1	7	1	nd	nd
CK2	19	10	nd	nd
GSK3A	32	13	nd	nd
GSK3B	54	25	nd	nd
MEK1	58	38	nd	nd
PRAK	30	28	nd	nd
MSK1	39	29	nd	nd

^a In the presence of 100 μM ATP with 10 μM compound. ^b nd: not determined.

The electron density for the inhibitor is excellent with all its atoms being well-defined in density and allowing the unambiguous positioning of the inhibitor in the binding cleft (Figure 3A). The binding mode of compound 7 in the active site of CDK2 is near identical in the positioning of the pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine core when compared with other homologous ligand structures (Protein Data Bank codes 2A0C, 1G5S, 1W0X, 1CKP, 2A4L, 3DDP, 3NS9) with the pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine being sandwiched between the side chains of Leu134 and Ile10. Similar to other homologous ligand structures, compound 7 forms a conserved hydrogen bond pattern to the backbone carbonyl of Leu83 and to the backbone NH of this same residue. An additional conserved hydrogen bond is found at the backbone carbonyl of Glu81, yet this interaction is considerably shorter when compared to other similar ligand structures (2.77 Å compared to 3.18 Å for the roscovitine complex, PDB code 2A4L) (Figure 3A). Some variation between homologous structures is found in the positioning of the phenyl ring of the benzylamino group. In general this group is sandwiched between the side chain of Ile10 and the backbone of His83. This is also the case with compound 7, although the interaction of the His84 backbone carbonyl at the ortho position of the ring is longer in this structure (Figure 3A). A further difference in the binding mode is apparent when comparing the position of the hydroxymethylpropyl group. This group takes up a similar orientation to that found in the olomoucine II structure (PDB code 2A0C) and is rotated in the opposite direction to that found in the structure containing

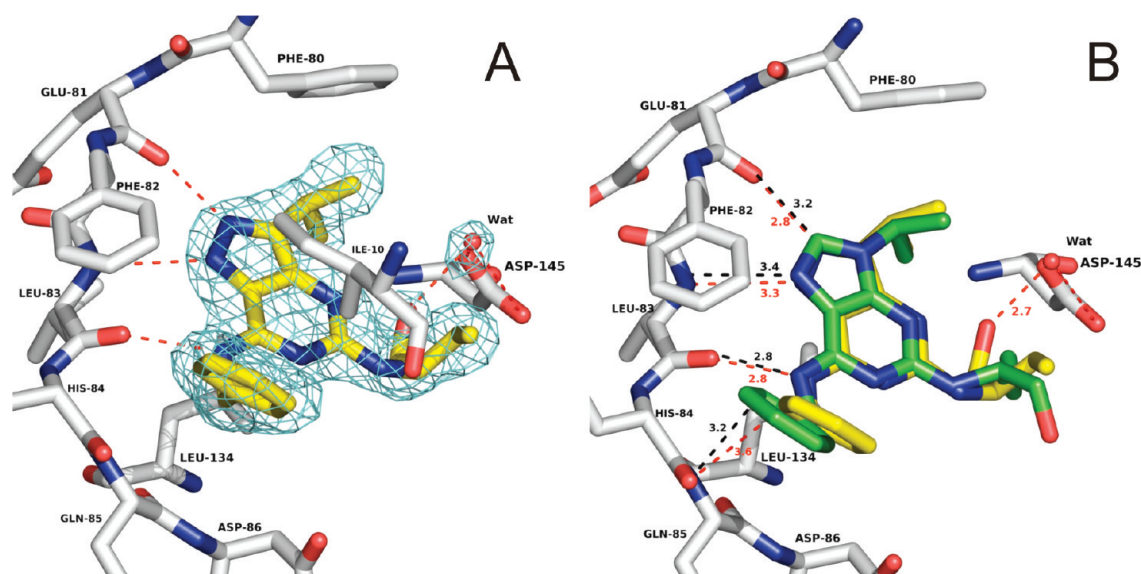


Figure 3. (A) Refined electron density for ligand compound 7 within the active site of CDK2. $2|F_o| - |F_c|$ density is colored cyan and is contoured at 1σ shown around the ligand and an interacting water molecule. Significant protein–ligand interactions are indicated by dashed red lines. (B) Overlay of compound 7 and roscovitine within the active site of CDK2.

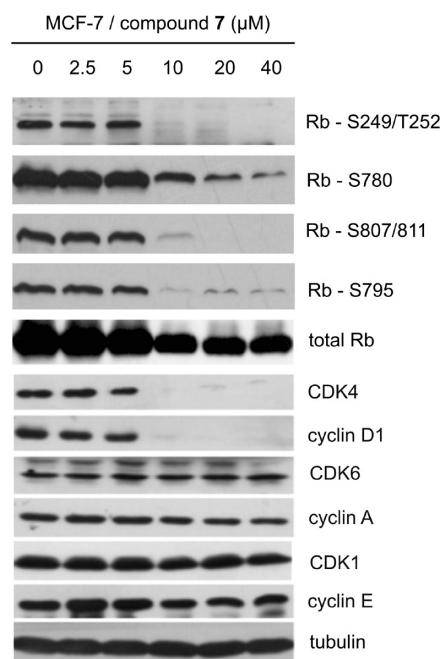


Figure 4. Immunoblot analysis of Rb phosphorylation and some cell cycle regulators. Asynchronous MCF-7 cells were exposed for 24 h to the indicated concentrations of compound 7. Tubulin levels are included as a control for equal protein loading.

roscovitine (PDB code 2A4L, Figure 3B). The hydroxyl atom of this group makes a strong hydrogen bond to a water molecule (water 71), which in turn forms strong interactions to the side chain of Asp145 (Figure 3). This bridging interaction is not observed in any of the homologous ligand/CDK2 complex structures. Therefore, although ligand compound 7 is reminiscent of other roscovitine-like ligands, these are significant differences in their respective binding modes that make compound 7 distinct.

Cellular Effects of Compound 7. When exponentially growing human MCF-7 breast cancer cells were treated with compound 7 for 24 h, a dose-dependent inhibition of retinoblastoma protein (Rb) phosphorylation at Ser249/Thr252, Ser807/811, Ser780, and Ser795 became apparent on immunoblots of total cellular proteins probed with phosphospecific antibodies. These results demonstrate the ability of compound 7 to affect the activities of CDK4 and CDK2 in proliferating cells. These CDKs play critical positive roles at the G_1/S transition by phosphorylating the Rb protein. Inhibition of cellular CDK activity and consequent Rb dephosphorylation causes cell cycle arrest in the G_1 phase. Similar observations have been published not only with roscovitine^{53–56} but also with roscovitine isomers imidazo[2,1-*f*]-1,2,4-triazine 13²⁵ and pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazine 7a.²⁵

Moreover, changes of protein abundance for some cell cycle regulators upstream of the Rb protein were monitored in MCF-7 cells treated with compound 7, compared with mock-treated controls. A significant reduction in CDK4 protein level was observed, and the abundance of cyclin D1, a positive regulator of CDK4, also diminished. In contrast, no changes in protein levels of CDK1, CDK6, and cyclins E and A were seen (Figure 4). This inhibitory pattern, consistent with the cell-cycle effects of compound 7, was observed in MCF-7 cells also upon treatment with roscovitine⁴⁶ and pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine BS-181.²⁸ On the other hand, human HT-29 colon cancer cells responded to roscovitine treatment by a decrease in cyclin A protein level, while the abundance of CDK4 remained unchanged.⁵⁴

Cell Cycle Analysis. The antiproliferative activity of compound 7 was verified by flow cytometry analysis of asynchronously growing MCF-7 cells and the multiple myeloma RPMI-8226 cell line, through double staining with propidium iodide and 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU). As shown in Figure 5, treatment with both compound 7 and roscovitine arrested the cell cycle progression in the G_2/M phase and resulted in decreased S-phase populations in the two cell lines. Upon treatment with higher concentrations of roscovitine and

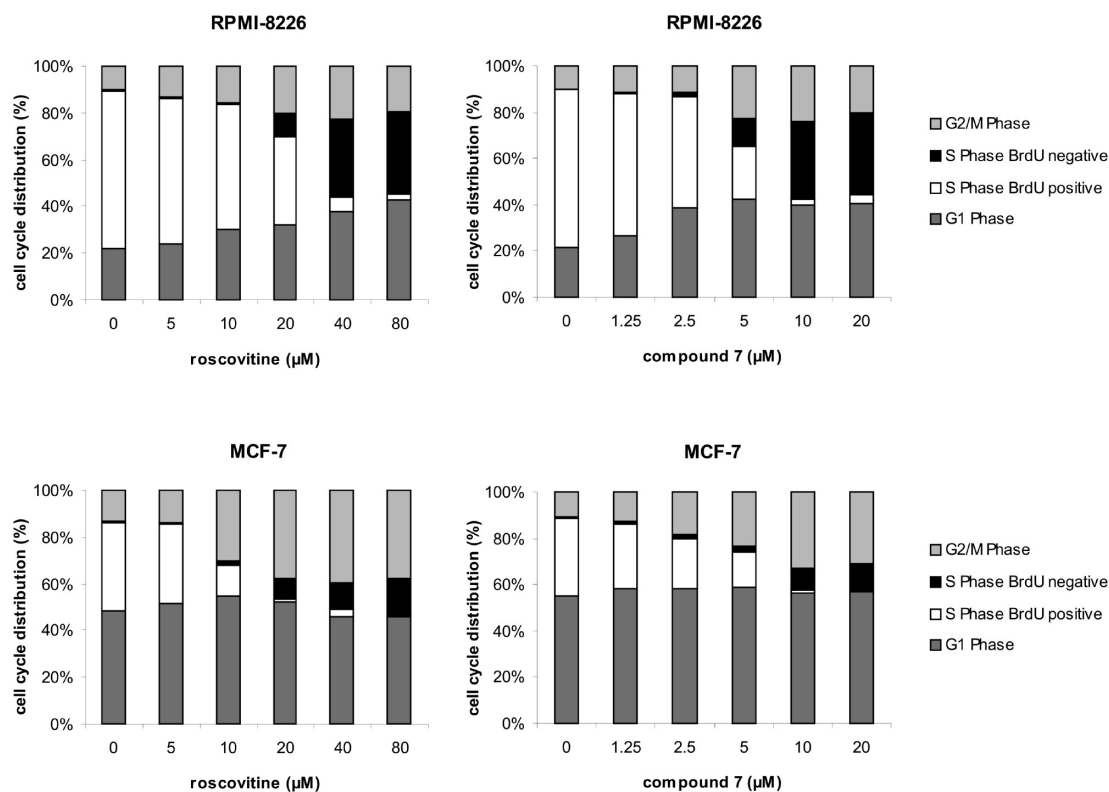


Figure 5. Compound 7 arrests cells at various stages of the cell cycle: flow cytometric analysis of BrdU and propidium iodide incorporation in RPMI-8226 and MCF-7 cells treated for 24 h with roscovitine and compound 7, respectively.

compound 7 the populations of cells actively replicating DNA (i.e., BrdU-positive cells) also decreased markedly. In addition, accumulation of RPMI-8226 cells in G₁ was found, an outcome not observed in MCF-7 cells. In summary, compound 7 arrested the cell cycle of two human cancer cell lines more efficiently than roscovitine, but both compounds displayed similar patterns of the cell-cycle blockade.

Besides cell cycle changes, increases of subG₁ population (indicative of apoptosis) upon treatment with the two compounds were also observed (Figure 5). Notably, compound 7 triggered apoptosis already after 24 h of treatment at compound concentrations above 10 μM in MCF-7, U266, and RPMI-8226 cells (Figure S3). These results correlate well with data on induction of apoptosis obtained by other apoptotic assays (see below and Figures 6 and S4).

Induction of Apoptosis. Most CDK inhibitors, including roscovitine, semisynthetic flavone flavopiridol,^{57–59} and 3-substituted indolinone compound SU9516,^{60,61} exert a strong proapoptotic effect on multiple myeloma cells through down-regulation of Mcl-1 protein.^{53,62–64} Therefore, we studied induction of apoptosis in multiple myeloma cell lines in more detail. Compound 7 induced apoptosis in the multiple myeloma cell line RPMI-8226, as documented by detection of a cleaved fragment of caspase-3 and its enhanced enzymatic activity, by fragmentation of poly(ADP ribose)polymerase 1 (PARP) and by down-regulation of antiapoptotic protein Mcl-1 (Figure 6C). As shown in Figure 6A, treatment with 20 μM compound 7 induced strong activation of caspases 3 and 7 as quantified by a biochemical assay. This result correlates well not only with the immunoblotting analysis, where the cleavage of caspase-3 zymogene was observed under the same experimental conditions, but also with

the flow cytometric detection of the caspase-3 fragment using the anticlaved caspase-3 (Asp175) antibody (Figure 6B,C). Monitoring of the cleavage of PARP, a nuclear target of caspase-3, further confirmed the above results. Taken together, our results clearly showed that compound 7 induces apoptosis in the RPMI-8226 multiple myeloma cell line in a concentration-dependent manner. Furthermore, consistent results were found also for another multiple myeloma cell line, U266 (Figure S5).

Induction of p53-Dependent Transcription. Treatment of cells harboring wild-type p53 with CDK inhibitors leads to accumulation of p53 and to an increase of p53-dependent transcription, as shown with roscovitine.^{65,66} A strong nuclear immunofluorescence signal of p53 was also evident in MCF-7 cells following treatment with compound 7 (Figure 7A). These results were then confirmed and extended by immunoblotting analyses of the levels of p53 and its targets, p21^{WAF1} and Mdm-2 (Figure 7C). We found that after 24 h incubations of proliferating MCF-7 cells with 20 μM roscovitine and 10 μM compound 7 the level of p53 was strongly increased. Moreover, the accumulated p53 was transcriptionally active, as indicated by the enhanced expression of the cell cycle inhibitory protein p21^{WAF1}, a well-established transcriptional target of p53.

Next, the effect of compound 7 on p53-dependent transcriptional activity was determined by the β-galactosidase activity measurement in the human melanoma cell line ARN8.⁶⁶ Compound 7 showed a dose-dependent activity effect on p53-regulated transcription, with the maximum impact observed between 10 and 20 μM (Figure 7B), while the maximal effect of roscovitine was observed at an approximately 1.5-fold higher concentration (data not shown).

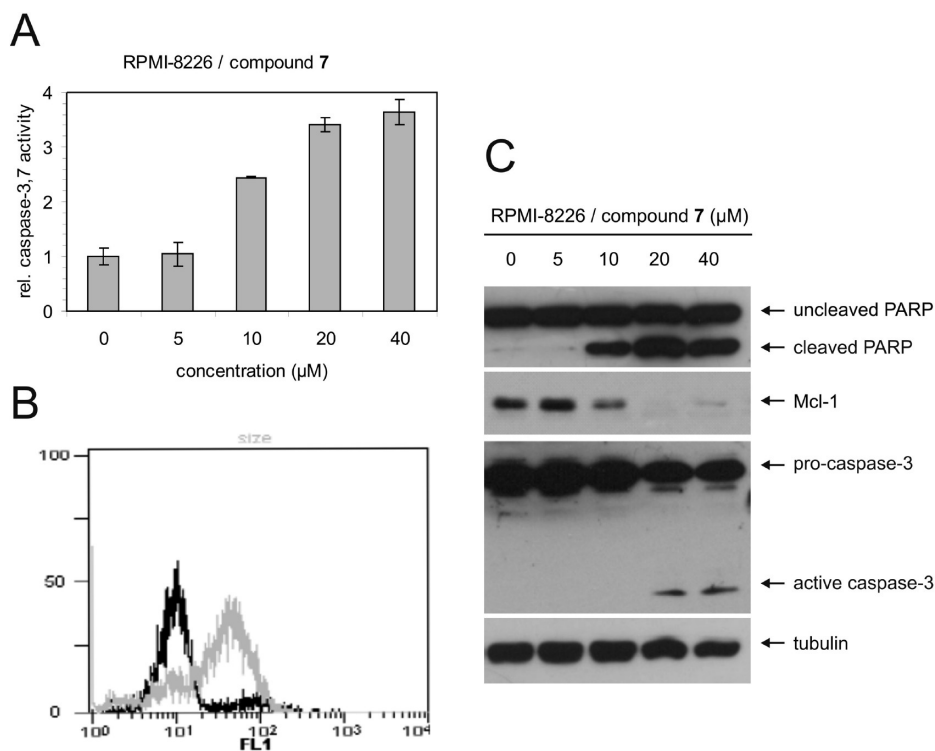


Figure 6. Compound 7 induces apoptosis in RPMI-8226 cell line after continuous 24 h treatment. (A) The activities of caspases 3 and 7 measured using a fluorogenic substrate Ac-DEVD-AMC in lysates of cells treated with increasing doses of compound 7. (B) Active fragment of caspase-3 (gray line) detected by flow cytometry using specific anticaspase-3 (Asp175) antibody in cells treated with 20 μ M compound 7. Black and gray lines indicate untreated and treated cells, respectively. (C) Fragmentation of PARP and caspase-3 and down-regulation of Mcl-1 detected by immunoblot analysis. Tubulin levels were monitored to verify equal protein loading.

Compound 7 Inhibits DNA Repair via Homologous Recombination Independently of RAD51 Protein Abundance.

Homologous recombination (HR) is important for DNA double strand break (DSB) repair, and its proper function is required for the maintenance of genomic stability and cell survival.⁶⁷ HR repair seems to be restricted only to S and G2 phases of the cell cycle, where homologous sequences are available, consistent with regulation of HR activity via CDK dependent mechanism(s). Indeed, in yeast, Sae2 protein phosphorylation by CDK was identified as an important HR regulator⁶⁸ and a similar CDK-dependent mechanism was proposed also for mammalian cells. However, in mammalian cells the identification of CDK(s) responsible for regulation of HR is rather problematic because studies with roscovitine or flavopiridol also showed rapid down-regulation of a core HR-pathway protein Rad51,^{69,70} the effect which may mask any other potential regulatory impact of CDK inhibition on HR. Moreover, Rad51 down-regulation seems unlikely to represent a physiological mode of HR regulation because Rad51 abundance is not markedly altered throughout G1, S, and G2 phases of the cell cycle.⁷¹ Thus, we examined whether compound 7 could be used as an alternative CDK inhibitor, possibly capable of modulating the HR process without affecting the Rad51 status. We selected the highest concentrations of roscovitine, flavopiridol, and compound 7 which do not yet affect the cell cycle progression (Figure S6) and assessed HR using an assay in which HR efficiency to repair DSB within a reporter plasmid in human cells is quantified through measurement of the repair-generated GFP fluorescence signal by flow cytometry.⁷² In parallel we monitored the RAD51 protein level by immunoblotting. In cells treated with compound 7 and

flavopiridol, the HR efficiency was reduced to 66% and 62% of control values, respectively (Figure 8A). Notably, at the drug concentrations used for the HR assay only flavopiridol caused a significant RAD51 decrease (Figure 8B). Treatment with roscovitine at a concentration not affecting the cell cycle did not influence HR significantly nor did it affect the RAD51 level (Figure 8). On the basis of these results, obtained particularly because of compound 7, we conclude that CDK inhibition can affect HR efficiency independently of effects on RAD51 protein abundance.

CONCLUSION

Compound 7 was prepared and characterized as a representative of a new group of CDK inhibitors, trisubstituted pyrazolo-[4,3-*d*]pyrimidines. In several biochemical and biological assays, the effects of compound 7 were compared with those of its bioisostere, roscovitine. These analyses showed similar kinase selectivity profiles of roscovitine and compound 7, yet apparently higher efficiency of the latter compound. The overall molecular and cellular effects of compound 7 were consistent with its ability to inhibit CDKs and, furthermore, revealed evidence for a role of CDKs in regulation of DNA repair by HR. The data suggest that blocking HR-mediated repair by compound 7 and perhaps also by other CDK inhibitors could potentially be exploited in cancer therapy in at least three scenarios: (i) to sensitize cancer cells to therapeutically used clastogens including ionizing radiation; (ii) as single agents to affect cancer cells preferentially, because of the tumor-specific oncogene-evoked replication stress and the ensuing constitutive DNA damage^{73–75} whose repair requires HR;

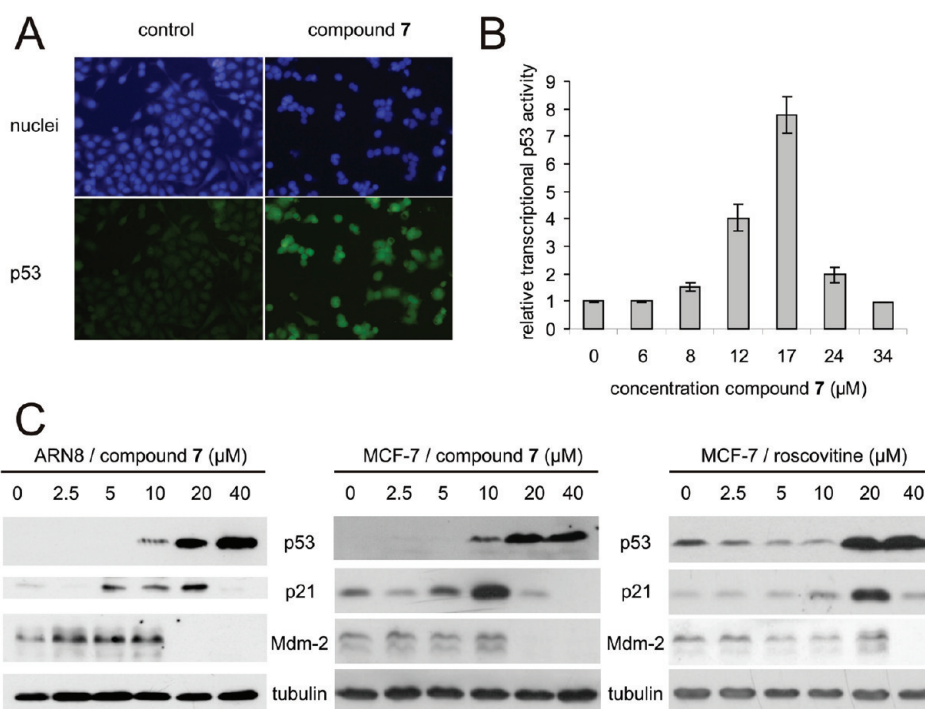


Figure 7. Induction of p53 in cells by compound 7. (A) Double labeling of asynchronous MCF-7 cells, treated with 10 μM compound 7 for 24 h, with anti-p53 antibody and DAPI. (B) Dose-dependent effect of 7 on p53-dependent transcription in ARN8 cells stably transfected with a p53-responsive β -galactosidase reporter construct and treated with 7 for 24 h. Fluorescence of cleaved product of 4-methylumbelliferone- β -D-galactopyranoside (MUG) was determined in lysed cells. Results represent the average \pm SD for three independent experiments. (C) Immunoblotting analysis of p53 and its targets, p21^{WAF1} and Mdm-2, in MCF-7 or ARN8 cells treated for 24 h with the indicated concentration of compound 7 and roscovitine, respectively. Tubulin is included as controls for equal protein loading.

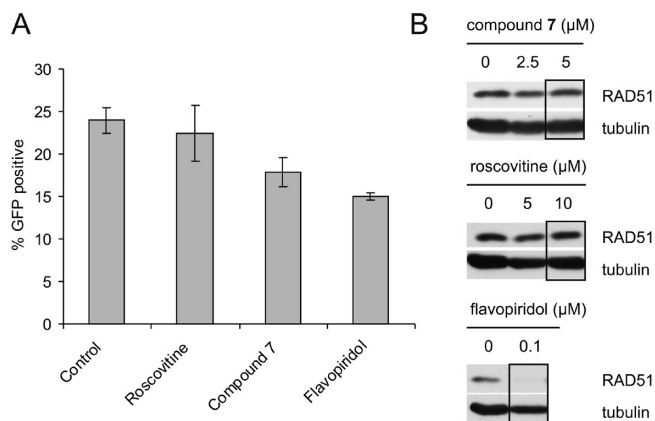


Figure 8. Compound 7 reduces homologous recombination. DR-U2OS-GFP cells expressing I-SceI nuclease to produce DSBs within the HR-reporter sequences were used to measure the GFP product as a readout for effects of CDK inhibitors on HR efficiency. (A) GFP level and its fluorescence intensity in DR-U2OS-GFP cells reflect the degree of successful HR-mediated recombination that was subject to modulation by roscovitine (10 μM), compound 7 (5 μM), or flavopiridol (0.1 μM) for 56 h. (B) Protein levels of RAD51 were analyzed by immunoblotting in DR-U2OS-GFP cells exposed to increasing concentrations of the drugs, as indicated. Frames highlight scenarios with drug concentrations used in the HR assay.

(iii) to selectively kill cancer cells that often harbor defects in DNA damage response pathways, taking advantage of the synthetic lethality principle.⁶⁷ Altogether, our present characterization of this novel trisubstituted pyrazolo[4,3-d]pyrimidine

warrants further evaluation of these purine-derived bioisosteres as potential new candidate anticancer drugs.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. Melting points were determined on a Kofler block and are uncorrected. NMR spectra were measured on a Bruker AVANCE III 400 MHz spectrometer (400.13 MHz for ¹H and 100.61 MHz for ¹³C) and a Bruker AVANCE III 600 MHz spectrometer (600.23 MHz for ¹H and 150.93 MHz for ¹³C) and a Varian Gemini 300 (300.1 MHz for ¹H and 75 MHz for ¹³C) in DMSO-*d*₆ or CDCl₃ at 303 K. The residual solvent signal was used as an internal standard (δ_{H} 2.500 and δ_{C} 39.60 for DMSO-*d*₆ or δ_{H} 7.265 and δ_{C} 77.00 for CDCl₃). ¹H NMR, ¹³C NMR, COSY, HSQC, and HMBC results were obtained using standard manufacturers' software (Topspin 2.1, Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten Germany). Chemical shifts are given in δ scale [ppm] and coupling constants in Hz. Digital resolution enabled us to report chemical shifts of protons to 3 and coupling constants to 1 and carbon chemical shifts to 2 decimal places. ESI or APCI mass spectra were determined using a Waters Micromass ZMD mass spectrometer (direct inlet, coin voltage 20 V). IR spectra were recorded on an FT-IR Nicolet 200 instrument with KBr tablet. Compound purity was determined by elemental analyses (0.4%) or LC-MS analysis and was confirmed to be >95% for all compounds. Merck silica gel Kieselgel 60 (230–400 mesh) was used for column chromatography.

Prepared Compounds. 4-Amino-5-isopropyl-1(2)*H*-pyrazole-3-carboxamide (**1**). **1** was prepared according to the published synthesis.⁴³ 3-Isopropyl-5-sulfanyl-1(2)*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-7-ol (**2**). A mixture of amide **1** (1.5 g, 9 mmol) and thiourea (3.8 g, 46 mmol) was fused (195 °C) for 30 min under argon atmosphere. After cooling, the reaction melt was suspended in water (20 mL) and the solution was

alkalized at 0 °C by 2 M NaOH solution to pH 12.3. The resulting dark solution was decolorized by carboraffin. The filtered solution was acidified by HCl to pH 5.7–6.0. After 1 h the product was filtered off, washed with cooled water, and dried at 80 °C/20 Torr. Yield 82%, mp >305 °C (dec). MS ESI⁻: [M - H]⁻ = 209.3. ¹H NMR (400 MHz, 303.1 K, DMSO-*d*₆) δ 1.225 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H, (CH₃)₂), 3.370 (sept, *J* = 6.9 Hz, 1H, CH), 12.116 (br s, 1H), 12.651 (br s, 1H), 13.842 (br s, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, 303.1 K, DMSO-*d*₆) δ 21.91 (q, (CH₃)₂), 24.08 (d, CH), 124.04 (s), 126.91 (s), 134.08 (s, C-9), 143.13 (s, C-9), 152.57 (s), 155.34 (s). Anal. (C₈H₁₀N₄O₅) C, H, N, S.

3-Isopropyl-5-methylsulfanyl-1(2)H-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-7-ol (3). Thiol **2** (16 g, 70 mmol) was added to a mixture of 50 mL of EtOH and 170 mL of water at 35 °C. The pH of the solution was adjusted to 9.3 by adding a water solution of 30% NaOH, and thus, thiol **2** was dissolved. During vigorous agitation dimethylsulfate (6.6 mL, 70 mmol) was added at 20 °C to the reaction mixture. The crystallized product was filtered off, washed (2×) with a mixture of EtOH/H₂O (1/2.5, 20 mL), and water. The product was dried at 80 °C/20 Torr. Yield 90%, mp 213–216 °C. MS ESI⁻: [M - H]⁻ = 223.3. ¹H NMR (600 MHz, 303.1 K, DMSO-*d*₆) δ 1.349 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H, (CH₃)₂), 2.531 (s, 3H, CH₃S), 3.216 (sept, *J* = 7.0 Hz, 1H, CH), 12.398 (s, 1H, NH or OH), 13.513 (s, 1H, NH or OH). ¹³C NMR (150 MHz, 303.1 K, DMSO-*d*₆) δ 12,94 (q, CH₃S), 21.69 (q, (CH₃)₂), 26.32 (d, CH), 125.08 (s), 136.91 (s, C-4), 149.48 (s, C-9), 151.94 (s, C-2), 153.51 (s). Tautomer: ¹H NMR (600 MHz, 303.1 K, DMSO-*d*₆) δ 1.369 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H, (CH₃)₂), 2.50* (s, 3H, CH₃S), 3.285 (sept, *J* = 7.0 Hz, 1H, CH), 11.959 (s, 1H, NH or OH), 13.770 (s, 1H, NH or OH). ¹³C NMR (150 MHz, 303.1 K, DMSO-*d*₆) δ 12,86 (q, CH₃S), 21.69 (q, (CH₃)₂), 24.74 (d, CH), 133.60 (s), 134.69 (s), 140.34 (s, C-9), 151.21 (s, C-2), 157.35 (s). HSQC readout was done.

7-Chloro-3-isopropyl-5-methylsulfanyl-1(2)H-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine (4). Dimethylaniline (30 mL) was dropped under nitrogen atmosphere into a mixture of thioether **3** (18 g, 80 mmol) and POCl₃ (120 mL) during 30 min. Then the reaction mixture was refluxed for 5 h (bath temperature of 108 °C). After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated under vacuum (the excess of POCl₃ was removed). Methyl *tert*-butyl ether (MTBE) (140 mL) was added, and during agitation water (50 mL) was added. The organic phase was separated off, and the water phase was extracted once more by MTBE. Combined organic phases were diluted by 70 mL of water and alkalinized by solid NaHCO₃ (2 g) to pH 7.5. The mixture was then agitated for 2 h. The organic phase was separated by carboraffin trituration and dried by MgSO₄. Crystallization from MTBE–heptane afforded (after drying at 70 °C/20 Torr) 16 g of a yellow product. Yield 80%, mp >170 °C (dec). MS ESI⁻: [M - H]⁻ = 241.3 (100%), 243 (30%). ¹H NMR (400 MHz, 303.1 K, CDCl₃) δ 1.500 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H, (CH₃)₂), 2.644 (s, 3H, CH₃S), 3.488 (sept, *J* = 7.0 Hz, 1H, CH). ¹³C NMR (100 MHz, 303.1 K, CDCl₃) δ 14.59 (q, CH₃S), 21.34 (q, (CH₃)₂), 27.12 (d, CH), 128.77 (s, C-6), 144.21 (s, C-5), 144.51 (s, C-4), 151.96 (s, C-9), 163.60 (s, C-2). Anal. (C₉H₁₁ClN₄S) C, H, N, Cl.

7-Benzylamino-3-isopropyl-5-methylsulfanyl-1(2)H-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine Hydrochloride (5). 7-Chloro derivative (8.5 g, 35 mmol), benzylamine (9 mL, 85 mmol), and triethylamine (23 mL, 230 mmol) in 50 mL of 1-butanol were heated with stirring at 100 °C for 3 h. The solution was evaporated to dryness in vacuum, and the residue was partitioned between H₂O and EtOAc. The combined organic phase was purified by carboraffin and dried with magnesium sulfate and evaporated. Product was dissolved in a mixture of 30 mL of MTBE, 10 mL of H₂O, and 4 mL of isopropanol. After acidification by 5 N HCl to pH 0.5, hydrochloride **5** crystallized. Product was filtered off, washed twice with a mixture of MTBE/2-propanol (7/3, 10 mL), and dried at 70 °C/20 Torr. Yield 11 g, 88%, mp 197–204 °C (after recrystallization from boiling EtOH, mp 205–210 °C). MS ESI⁻: [M - H]⁻ = 312.3 (100%), 348 (50%, M + Cl⁻). MS ESI⁺: 314.3 (100%, M + H⁺). IR (cm⁻¹): 1618, 1581, 1532, 1353, 1246, 1181, 1062, 924, 698. ¹H NMR (400 MHz,

303.1 K, CDCl₃) δ 1.340 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H, (CH₃)₂), 2.541 (s, 3H, CH₃S), 3.300 (sept, *J* = 7.0 Hz, 1H, CH), 4.762 (br s, 2H, NHCH₂), 6.658 (br s, 1H, NHCH₂), 7.213–7.277 (5H, m, H-ortho, H-meta, H-para), 11.615 (br s, H-7 or H-8). ¹³C NMR (100 MHz, 303.1 K, CDCl₃) δ 14.42 (q, CH₃S), 21.51 (q, (CH₃)₂), 26.01 (d, CH), 44.65 (t, NHCH₂), 127.53 (d, C-para), 127.79 (d, C-ortho), 128.62 (d, C-meta), 137.96 (s, C-ipso), 138.77 (s), 151.24 (s, C-9), 163.34 (s, C-2). Anal. (C₁₆H₁₉N₃S) C, H, N.

7-Benzylamino-3-isopropyl-5-methylsulfanyl-1(2)H-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin (6). Thioether **5** (liberated base, 8 g, 26 mmol) was dissolved in 40 mL of ethanol, and solution of 20 g of Oxone in 50 mL of H₂O was added at 45–50 °C. Oxygenation was checked by TLC (silica gel, MeOH/toluene, 1/9) and was completed in 30 min. Water (130 mL) and ethyl acetate (50 mL) were added. Product was extracted in the organic phase once more with 20 mL of ethyl acetate. The combined organic phase was purified by carboraffin and dried with magnesium sulfate and evaporated. Product was crystallized from methanol. Yield 7.5 g, 83%, mp 96 °C. MS ESI⁻: [M - H]⁻ = 344.3 (100%, M - H⁺). MS ESI⁺: 346.3 (100%, M + H⁺). IR (cm⁻¹): 1626, 1534, 1453, 1359, 1297, 1128 (SO₂), 1060, 926, 753. ¹H NMR (400 MHz, 303.1 K, CDCl₃) δ 1.325 (d, *J* = 5.0 Hz, 6H, (CH₃)₂), 3.222 (s, 3H, CH₃SO₂), 3.349 (br s, 1H, CH), 4.761 (br s, 2H, NHCH₂), 7.259–7.185 (3H, m, H-meta, H-para), 7.310 (2H, m, H-ortho). ¹³C NMR (100 MHz, 303.1 K, CDCl₃) δ 21.56 (q, (CH₃)₂), 26.14 (d, CH), 39.13 (q, CH₃SO₂), 45.17 (t, NHCH₂), 124.79 (s), 127.64 (d, C-para), 128.01 (d, C-ortho), 128.64 (d, C-meta), 137.27 (s, C-ipso), 150.68 (s), 151.39 (s), 157.79 (s, C-2). Anal. (C₁₆H₁₉N₃O₂S) C, H, N.

7-Benzylamino-5(R)-[2-(hydroxymethyl)propyl]amino-3-isopropyl-1(2)H-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine (7). Methylsulfone **6** (0.2 g, 0.58 mmol) and R-(–)-2-amino-1-butanol (2 mL, 23 mmol) were heated in sealed ampule for 3 h to 160 °C. Excess of the amine was evaporated at a temperature below 70 °C, and the residue was partitioned in CHCl₃/H₂O. The combined organic phases were dried with magnesium sulfate and evaporated. Product was purified by column flash chromatography on silica gel stepwise with 1%, 2%, 4%, and 6% MeOH in CHCl₃. Product was obtained in noncrystallizable amorphous colorless glass form. Yield 54 mg, 25%, [α]_D²⁵ +53 (c 1.35, CHCl₃). MS ESI⁺: [M + H]⁺ = 355.4 (100). MS ESI⁻: [M - H]⁻ = 353.3 (100). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) 0.85 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, CH₃CH₂), 1.32 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H, (CH₃)₂CH), 1.39–1.68 (m, 2H, CH₂CH₃), 3.16 (sept, *J* = 7.0 Hz, 1H, CH(CH₃)₂), 3.37–3.51 (m, 2H, CH₂OH), 3.78 (m, 1H, CHNH), 4.68 (br s, 2H, CH₂Ph), 5.74 (br s, 1H, NH), 7.26 (m, 1H, H-para), 7.34 (m, 2H, H-meta), 7.39 (m, 2H, H-ortho), 11.79 bs (1/2 H, NH), 13.28 bs (1/2 H, NH). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.6, 21.5, 21.6, 23.8, 25.9, 43.0, 54.2, 63.4, 126.9, 127.5, 128.3, 139.3, 147.1, 157.6. Anal. (C₁₉H₂₆N₆O) C, H, N.

Enzyme Inhibition Assay. CDK2/cyclin E kinase was produced in Sf9 insect cells via baculoviral infection and purified on a NiNTA column (Qiagen). CDK5/p35, CDK7/cyclin H/MAT1, and CDK9/cyclin T1 were purchased from ProQinase GmbH. The kinase reactions were assayed with 1 mg/mL histone H1 (for CDK2 and CDK5) or (YSPTSPS)₂KK peptide (for CDK7 and CDK9) in the presence of 15/0.15/1.5/1.5 μM ATP (for CDK2/CDK5/CDK7/CDK9), 0.05 μCi [^γ-³³P]ATP, and the test compound in a final volume of 10 μL, all in a reaction buffer (60 mM HEPES–NaOH, pH 7.5, 3 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂, 3 μM sodium orthovanadate, 1.2 mM DTT, 2.5 μg/50 μL PEG_{20,000}). The reactions were stopped by adding 5 μL of 3% aqueous H₃PO₄. Aliquots were spotted onto P-81 phosphocellulose (Whatman), washed 3× with 0.5% aqueous H₃PO₄, and finally air-dried. Kinase inhibition was quantified using digital image analyzer FLA-7000 (Fujifilm). The concentration of the test compounds required to decrease the CDK by 50% was determined from dose-response curves and designated IC₅₀.

Kinase Selectivity. All kinase assays were carried out by the SelectScreen Kinase Profiling Service in the presence of 100 μM ATP and 10 μM compound and performed according to the standard protocol of Invitrogen.

Crystallization and Structure Determination. Human recombinant CDK2 was purchased from ProQinase GmbH, and crystals were grown following the protocol of the supplier. The compound 7/CDK2 complex was prepared by transferring a coverslip containing a drop of native CDK2 crystals over a well solution of 35% PEG 6000 and equilibrating at 17 $^{\circ}\text{C}$ for 24 h. A single crystal of CDK2 was transferred from this drop into a 1 μL drop of 35% PEG 6000, 100 mM Na HEPES buffer (pH 7.5), 1 mM compound 7, and 5 mM DMSO and placed over a well of the same solution. Crystals were left to soak for 2 days. The crystal of about 0.1 mm in length was mounted in a 0.1–0.2 mm cryoloop (Hampton Research) and was flash-frozen in liquid nitrogen. The soaking solution acted as a cryoprotectant. All diffraction data were collected at 100 K (Cryostream) using a Rigaku Micro7 rotating anode generator and a Mar345 detector (MarResearch). Data processing was carried out using the programs MOSFLM and SCALA.⁷⁶ Initial structure solution was performed using the program PHASER⁷⁷ using an available CDK2 structure (PDB code 2A0C). The programs REFMAC⁷⁸ and PHENIX⁷⁹ were used for refinement, with manual refinement and waterfitting being performed by the program COOT.⁸⁰ Crystallographic processing and refinement statistics are summarized in Supporting Information (Table S1). Atomic coordinates have been deposited in the Brookhaven Protein Data Bank under the accession code 3PJ8.

Cell Maintenance and Cytotoxicity Assay. The cytotoxicity of the studied compounds was determined with cell lines of different histological origin. The cells, cultured in DMEM (supplemented with 10% fetal calf serum, 4 mM glutamine, 100 IU/mL penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin) in a humidified CO_2 incubator at 37 $^{\circ}\text{C}$, were redistributed into 96-well microtiter plates at appropriate densities for their respective cell sizes and growth rates. After preincubation, test compounds in 3-fold dilutions were added in triplicates. Treatment lasted for 72 h and then calcein AM solution was added. The fluorescence of the live cells was measured at 485 nm/538 nm (excitation/emission) with a Fluoroskan Ascent microplate reader (Labsystems). IC_{50} values, the drug concentrations reducing number of viable cells to 50%, were determined from the dose-response curves.

Immunoblotting. For direct immunoblotting, total cellular protein lysates were prepared by harvesting treated cells in Laemmli sample buffer. Proteins were separated on SDS-polyacrylamide gels and electroblotted onto nitrocellulose membrane. The blotted membranes were stained with 0.2% Ponceau-S in 1% aqueous acetic acid to verify equal protein loading, destained, and blocked in PBS and 0.1% Tween 20 (PBS-T) with 5% low fat milk or 3% bovine serum albumin (BSA). The membranes were then incubated with specific antibodies overnight at 4 $^{\circ}\text{C}$. After being washed three times in PBS-T, the membranes were incubated with a 1:2000 dilution of peroxidase-conjugated secondary antibodies. After another three washes in PBS-T, peroxidase activity was detected using ECL+ reagents (AP Biotech) according to the manufacturer's instructions.

Antibodies. Specific antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (antitotal pRb, clone 4H1, and anti-pRb antibodies phosphorylated at S780, S795, and S807/811), Sigma-Aldrich (anti-pRb phosphorylated at Ser249/Thr252, anti- α -tubulin, clone DM1A, peroxidase-labeled secondary antibodies), Santa Cruz Biotechnology (anti-Mcl-1, clone S-19, anti-PARP, clone F-2, anti-Mdm-2, clone SMP14, anti-RAD51, clone H-92, anti CDK1, clone B-6; anti-cyclin E, clone HE12), DAKO Cytomation (anti-caspase-3), Roche Applied Science (anti-5-bromo-2'-deoxyuridine-fluorescein, clone BMC 9318), Jackson ImmunoResearch Laboratory (fluorescein-conjugated Goat Anti-Mouse IgG), Beckman Coulter (anti-cleaved caspase-3) or were a generous gift from

Dr. B. Vojtěšek (anti-p53, clone DO-1, anti-p21^{WAF1}, clone 118, anti-CDK4, anti-cyclin D1, anti-CDK6, anti-cyclin A).

BrdU Incorporation and Cell Cycle Analysis. Subconfluent MCF-7 cells were treated with compound 7 or roscovitine at different concentrations for 24 h. The cultures were fed and pulse-labeled with 10 μM 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) for 30 min at 37 $^{\circ}\text{C}$ before harvesting. The cells were trypsinized, washed by PBS containing 1% BSA (PBS/BSA), fixed with ice-cold 70% ethanol, incubated on ice for 30 min, washed with PBS/BSA again, and resuspended in 2 M HCl for 30 min at room temperature in order to denature their DNA. Following neutralization with 0.1 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, the cells were harvested by centrifugation and washed with PBS/BSA containing 0.5% Tween-20. They were then stained with anti-BrdU fluorescein-labeled antibody (1:50) for 30 min at room temperature in the dark. The cells were then washed with PBS, incubated with propidium iodide (0.1 mg/mL) and RNase A (0.5 mg/mL) for 1 h at room temperature in the dark and finally analyzed by flow cytometry using a 488 nm laser (Cell Lab Quanta SC, Beckman Coulter).

p53-Dependent Transcriptional Activity. To measure p53-dependent transcriptional activity, β -galactosidase activity was determined in the human melanoma cell line ARN-8, stably transfected with a p53-responsive reporter construct pRGC Δ foslacZ.⁶⁶ After 24 h of incubation with the inhibitors the cells were permeabilized with 0.3% Triton X-100 for 15 min, and then 4-methylumbelliferon- β -D-galactopyranoside was added as a substrate to a final concentration of 80 μM . After 1 h the fluorescence was measured at 355 nm/460 nm (excitation/emission) with a Fluoroskan Ascent microplate reader (Labsystems).

Immunofluorescence. MCF-7 cells grown on coverslips were treated with increasing concentrations of compounds for 24 h. Slips were then rinsed in PBS, and cells were fixed in methanol/acetone (1:1) at -20°C for at least 1 h. The coverslips were then rehydrated in PBS for 10–20 min, rinsed with 10% fetal bovine serum, and incubated with the mouse monoclonal anti-p53 antibody (DO-1) for 1 h at room temperature. The samples were then washed three times with PBS before being incubated for 1 h with a secondary fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-mouse IgG antibody. After incubation the coverslips were rinsed three times in PBS and then the nuclei were stained by DAPI (MP Biomedicals). After the final wash by water the coverslips were mounted on microscope slides using Mowiol mounting medium (Calbiochem) and observed using a fluorescence microscope (Olympus BX50) coupled with a digital camera (Olympus DP71).

Caspase-3/7 Assay. The cells were harvested by centrifugation and homogenized in an extraction buffer (10 mM KCl, 5 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.2% CHAPS, inhibitors of proteases, pH 7.4) on ice for 20 min. The homogenates were clarified by centrifugation at 10000g for 30 min at 4 $^{\circ}\text{C}$. The proteins were quantified by the Bradford method and diluted to equal concentrations. Lysates were then incubated for 1 h with 100 μM Ac-DEVD-AMC as substrate in the assay buffer (25 mM PIPES, 2 mM EGTA, 2 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, pH 7.3). For negative controls, the lysates were supplemented with 100 μM Ac-DEVD-CHO as a caspase-3/7 inhibitor. The fluorescence of the product was measured using a Fluoroskan Ascent microplate reader (Labsystems) at 355 nm /460 nm (excitation/emission).

Flow Cytometry Analysis of Cleaved Caspase-3. RPMI-8226 cells were collected by centrifugation, and the pellets were resuspended in 4% formaldehyde solution for 10 min at 37 $^{\circ}\text{C}$. The cells were then permeabilized by adding ice-cold methanol to a final concentration of 90% and incubated for 30 min on ice. Subsequently the cells were rinsed in BSA/PBS, pelleted, resuspended in a few drops of BSA/PBS, and incubated for 10 min at room temperature. Then anticleaved caspase-3 antibody conjugated with Alexa Fluor 488 (Beckman Coulter) was added, and the cells were incubated for 1 h in the dark at room temperature. Finally the cells were washed in BSA/PBS, resuspended

again, and analyzed by flow cytometry using a 488 nm laser (Cell Lab Quanta SC, Beckman Coulter).

Homologous Recombination Assay. A U2OS clone containing a single complete copy of the integrated HR reporter hprt-DR-GFP was obtained from Pierce et al.⁸¹ DR-U2OS-GFP cells (3.3×10^5 per well) were seeded in 100 mm dishes and transfected with 1 μ g of pCKA-I-SceI plasmid using Fugene 6 reagent. Sixteen hours later, the medium was replaced with fresh medium containing tested compounds (5 μ M for compound 7, 10 μ M for roscovitine, 0.1 μ M for flavopiridol). Cells were harvested after 2 days for flow cytometric analysis on a Cell Lab Quanta SC cytometer (Beckman Coulter).

NCI60 Cytotoxicity Assay. Tests of toxicity on NCI60, a set of 59 human cancer cell lines derived from nine tissue types, were performed at the Developmental Therapeutics Program of the National Cancer Institute (Bethesda, MD, U.S.). The cytotoxicity of compound 7 was evaluated by measuring total cell protein using the sulforhodamine B method according to the standard protocol at time 0 and after 48 h. The highest concentration tested was 100 μ M. GI_{50} , TGI, and LC_{50} (concentration of a drug inducing 50% reduction of growth, total growth inhibition, and 50% reduction of initial cell population, respectively) were estimated from the dose-response curves.

Correlation Analysis of NCI60 Activity. The activity pattern (GI_{50} values for individual NCI60 cell lines) of compound 7 was correlated with the drug activity patterns in the DTP cancer screening data set, May 2009 release (http://dtp.nci.nih.gov/docs/cancer/cancer_data.html). Pearson correlation coefficients (r) were calculated on a log–log scale. Signed version of coefficient of determination is defined as $[r/abs(r)]r^2$. Only the activity patterns fulfilling following criteria were analyzed: (1) GI_{50} values for at least 50 cell lines, (2) GI_{50} reached against more than 50% of the cell lines tested, and (3) GI_{50} for the most sensitive cell line at least 5 times lower than GI_{50} for the most resistant cell line. Experimentally validated low molecular inhibitors of CDKs 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9 and glycogen synthase kinase-3 β with $IC_{50} < 100$ μ M were extracted from BindingDB.^{51,52} SDfile with the data was downloaded on November 17, 2009. Pubchem ID was used for conversion of BindingDB and NCI60 identifiers. Data manipulation and analysis was done in R 2.8.1.

■ ASSOCIATED CONTENT

S Supporting Information. Crystallographic data collection and refinement statistics, kinase inhibition curves, NCI60 screening of compound 7, cell cycle analysis of K562, U266, and DR-U2OS-GFP cells upon treatment with roscovitine, compound 7, and flavopiridol, and the influence of compound 7 on subG1 cell population in different cell lines. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Accession Codes

[†]PDB code 3PJ8.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +420585634854. Fax: +420585634870. E-mail: vladimir.krystof@upol.cz.

■ ACKNOWLEDGMENT

The authors thank J. Hudcová and D. Parobková for their technical assistance. Dr. B. Vojtěšek is acknowledged for the gift of antibodies. This work was supported by GACR Grants 204/08/S11, 301/11/P554, and 301/02/0475, GAAV Grant IAA50-1370902, IGAMZ Grants NS10282-3/2009 and NT/11065-5/

2010, the European Commission (Projects Infla-Care and CZ.1.05/2.1.00/01.0030), and Grant MSM6198959216 and Grant ED0007/01/01 of Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research. Cytotoxicity testing on NCI60 panel was done at the Developmental Therapeutics Program (DTP) of the National Cancer Institute (Bethesda, MD, U.S.).

■ ABBREVIATIONS USED

BrdU, 5-bromo-2'-deoxyuridine; CDK, cyclin-dependent kinase; CK, casein kinase; DSB, double strand breaks; SAR, structure–activity relationship; GI_{50} , growth inhibition 50%; GSK, glycogen synthase kinase; HR, homologous recombination; LC_{50} , reduction of initial cell population 50%; MEK1, MAPK/ERK kinase 1; MNK-1, MAPK-interacting kinase 1; MSK, mitogen- and stress-activated protein kinase; MTBE, methyl *tert*-butyl ether; MUG, 4-methylumbelliferon- β -D-galactopyranoside; NCI, National Cancer Institute; PARP, poly(ADP ribose)polymerase 1; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PDB, Protein Data Bank; PRAK, p38-regulated-activated protein kinase; Rb, retinoblastoma protein; TGI, total growth inhibition

■ REFERENCES

- (1) Malumbres, M.; Carnero, A. Cell cycle deregulation: a common motif in cancer. *Prog. Cell Cycle Res.* **2003**, *5*, 5–18.
- (2) Malumbres, M.; Barbacid, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 153–166.
- (3) Knockaert, M.; Greengard, P.; Meijer, L. Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol. Sci.* **2002**, *23*, 417–425.
- (4) Malumbres, M.; Barbacid, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 630–641.
- (5) Krystof, V.; Uldrijan, S. Cyclin-dependent kinase inhibitors as anticancer drugs. *Curr. Drug Targets* **2010**, *11*, 291–302.
- (6) Lapenna, S.; Giordano, A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, *8*, 547–566.
- (7) Krystof, V.; Chamrad, L.; Jorda, R.; Kohoutek, J. Pharmacological targeting of CDK9 in cardiac hypertrophy. *Med. Res. Rev.* **2010**, *30*, 646–666.
- (8) Leitch, A. E.; Haslett, C.; Rossi, A. G. Cyclin-dependent kinase inhibitor drugs as potential novel anti-inflammatory and pro-resolution agents. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *158*, 1004–1016.
- (9) Rossi, A. G.; Sawatzky, D. A.; Walker, A.; Ward, C.; Sheldrake, T. A.; Riley, N. A.; Caldicott, A.; Martinez-Losa, M.; Walker, T. R.; Duffin, R.; Gray, M.; Crescenzi, E.; Martin, M. C.; Brady, H. J.; Savill, J. S.; Dransfield, I.; Haslett, C. Cyclin-dependent kinase inhibitors enhance the resolution of inflammation by promoting inflammatory cell apoptosis. *Nat. Med.* **2006**, *12*, 1056–1064.
- (10) Wang, S.; Fischer, P. M. Cyclin-dependent kinase 9: a key transcriptional regulator and potential drug target in oncology, virology and cardiology. *Trends Pharmacol. Sci.* **2008**, *29*, 302–313.
- (11) Vesely, J.; Havlicek, L.; Strnad, M.; Blow, J. J.; Donella-Deana, A.; Pinna, L.; Letham, D. S.; Kato, J.; Detivaud, L.; LeClerc, S. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *224*, 771–786.
- (12) Havlicek, L.; Hanus, J.; Vesely, J.; LeClerc, S.; Meijer, L.; Shaw, G.; Strnad, M. Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 408–412.
- (13) Meijer, L.; Borgne, A.; Mulner, O.; Chong, J. P.; Blow, J. J.; Inagaki, N.; Inagaki, M.; Delcros, J. G.; Moulinoux, J. P. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *243*, 527–536.

- (14) Meijer, L.; Bettayeb, K.; Galons, H. (R)-Roscovitine (CYC202, Seliciclib). In *Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases as Anti-Tumor Agents*; Smith, P. J., Yue, E. W., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, 2006; pp 187–226.
- (15) Bettayeb, K.; Oumata, N.; Echalier, A.; Ferandin, Y.; Endicott, J. A.; Galons, H.; Meijer, L. CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Oncogene* **2008**, *27*, 5797–5807.
- (16) Chang, Y. T.; Gray, N. S.; Rosania, G. R.; Sutherlin, D. P.; Kwon, S.; Norman, T. C.; Sarohia, R.; Leost, M.; Meijer, L.; Schultz, P. G. Synthesis and application of functionally diverse 2,6,9-trisubstituted purine libraries as CDK inhibitors. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 361–375.
- (17) Gray, N. S.; Wodicka, L.; Thunnissen, A. M.; Norman, T. C.; Kwon, S.; Espinoza, F. H.; Morgan, D. O.; Barnes, G.; LeClerc, S.; Meijer, L.; Kim, S. H.; Lockhart, D. J.; Schultz, P. G. Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors. *Science* **1998**, *281*, 533–538.
- (18) Krystof, V.; McNaie, I. W.; Walkinshaw, M. D.; Fischer, P. M.; Muller, P.; Vojtesek, B.; Orsag, M.; Havlicek, L.; Strnad, M. Antiproliferative activity of olomoucine II, a novel 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 1763–1771.
- (19) Moravec, J.; Krystof, V.; Hanus, J.; Havlicek, L.; Moravcova, D.; Fuksova, K.; Kuzma, M.; Lenobel, R.; Otyepka, M.; Strnad, M. 2,6,8,9-Tetrasubstituted purines as new CDK1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2993–2996.
- (20) Oumata, N.; Bettayeb, K.; Ferandin, Y.; Demange, L.; Lopez-Giral, A.; Goddard, M. L.; Myrianthopoulos, V.; Mikros, E.; Flajolet, M.; Greengard, P.; Meijer, L.; Galons, H. Roscovitine-derived, dual-specificity inhibitors of cyclin-dependent kinases and casein kinases 1. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5229–5242.
- (21) Trova, M. P.; Barnes, K. D.; Alicea, L.; Benanti, T.; Bielaska, M.; Bilotta, J.; Bliss, B.; Duong, T. N.; Haydar, S.; Herr, R. J.; Hui, Y.; Johnson, M.; Lehman, J. M.; Peace, D.; Rainka, M.; Snider, P.; Salamone, S.; Tregay, S.; Zheng, X.; Friedrich, T. D. Heterobiaryl purine derivatives as potent antiproliferative agents: inhibitors of cyclin dependent kinases. Part II. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6613–6617.
- (22) Trova, M. P.; Barnes, K. D.; Barford, C.; Benanti, T.; Bielaska, M.; Burry, L.; Lehman, J. M.; Murphy, C.; O'Grady, H.; Peace, D.; Salamone, S.; Smith, J.; Snider, P.; Toporowski, J.; Tregay, S.; Wilson, A.; Wyle, M.; Zheng, X.; Friedrich, T. D. Biaryl purine derivatives as potent antiproliferative agents: inhibitors of cyclin dependent kinases. Part I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6608–6612.
- (23) Kim, D. C.; Lee, Y. R.; Yang, B. S.; Shin, K. J.; Kim, D. J.; Chung, B. Y.; Yoo, K. H. Synthesis and biological evaluations of pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidines as cyclin-dependent kinase 2 inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 525–532.
- (24) Zask, A.; Verheijen, J. C.; Curran, K.; Kaplan, J.; Richard, D. J.; Nowak, P.; Malwitz, D. J.; Brooijmans, N.; Bard, J.; Svenson, K.; Lucas, J.; Toral-Barza, L.; Zhang, W. G.; Hollander, I.; Gibbons, J. J.; Abraham, R. T.; Ayral-Kaloustian, S.; Mansour, T. S.; Yu, K. ATP-competitive inhibitors of the mammalian target of rapamycin: design and synthesis of highly potent and selective pyrazolopyrimidines. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5013–5016.
- (25) Bettayeb, K.; Sallam, H.; Ferandin, Y.; Popowycz, F.; Fournet, G.; Hassan, M.; Echalier, A.; Bernard, P.; Endicott, J.; Joseph, B.; Meijer, L. N-&N, a new class of cell death-inducing kinase inhibitors derived from the purine roscovitine. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 2713–2724.
- (26) Popowycz, F.; Fournet, G.; Schneider, C.; Bettayeb, K.; Ferandin, Y.; Lamigeon, C.; Tirado, O. M.; Mateo-Lozano, S.; Notario, V.; Colas, P.; Bernard, P.; Meijer, L.; Joseph, B. Pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazine as a purine bioisostere: access to potent cyclin-dependent kinase inhibitor (R)-roscovitine analogue. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 655–663.
- (27) Guzi, T. J.; Paruch, K. Pyrazolotriazines as Kinase Inhibitors. Patent WO 2005/082908, 2005.
- (28) Ali, S.; Heathcote, D. A.; Kroll, S. H.; Jogalekar, A. S.; Scheiper, B.; Patel, H.; Brackow, J.; Siwicka, A.; Fuchter, M. J.; Periyasamy, M.; Tollhurst, R. S.; Kanneganti, S. K.; Snyder, J. P.; Liotta, D. C.; Aboagye, E. O.; Barrett, A. G.; Coombes, R. C. The development of a selective cyclin-dependent kinase inhibitor that shows antitumor activity. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 6208–6215.
- (29) Chen, F. X.; Keertikar, K.; Kuo, S.; Lee, S.; Raghavan, R. R.; Wu, G. G.; Xie, J. Process and Intermediates for the Synthesis of (3-Alkyl-5-piperidin-1-yl-3,3a-dihydropyrazolo[1,5-*a*]-pyrimidin-7-yl)-amino Derivatives and Intermediates. Patent WO 2008/027220, 2008.
- (30) Heathcote, D. A.; Patel, H.; Kroll, S. H.; Hazel, P.; Periyasamy, M.; Alikian, M.; Kanneganti, S. K.; Jogalekar, A. S.; Scheiper, B.; Barbazanges, M.; Blum, A.; Brackow, J.; Siwicka, A.; Pace, R. D.; Fuchter, M. J.; Snyder, J. P.; Liotta, D. C.; Freemont, P. S.; Aboagye, E. O.; Coombes, R. C.; Barrett, A. G.; Ali, S. A novel pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine is a potent inhibitor of cyclin-dependent protein kinases 1, 2, and 9, which demonstrates antitumor effects in human tumor xenografts following oral administration. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 8508–8522.
- (31) Parratt, M. J.; Bower, J. F.; Williams, J. W.; Cansfield, A. D. Pyrazolopyrimidine Compounds and Their Use in Medicine. Patent WO 2004/087707, 2004.
- (32) Paruch, K.; Dwyer, M. P.; Alvarez, C.; Brown, C.; Chan, T. Y.; Doll, R. J.; Keertikar, K.; Knutson, C.; McKittrick, B.; Rivera, J.; Rossman, R.; Tucker, G.; Fischmann, T. O.; Hruza, A.; Madison, V.; Nomeir, A. A.; Wang, Y.; Lees, E.; Parry, D.; Sgambellone, N.; Seghezzi, W.; Schultz, L.; Shanahan, F.; Wiswell, D.; Xu, X.; Zhou, Q.; James, R. A.; Paradkar, V. M.; Park, H.; Rokosz, L. R.; Stauffer, T. M.; Guzi, T. J. Pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines as orally available inhibitors of cyclin-dependent kinase 2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6220–6223.
- (33) Snyder, J. P.; Liotta, D. C.; Barrett, A. G.; Coombes, R. C.; Ali, S.; Siwicka, A.; Brackow, J.; Scheiper, B. Selective Inhibitors for Cyclin-Dependent Kinases. Patent WO 2008/151304, 2008.
- (34) Williamson, D. S.; Parratt, M. J.; Bower, J. F.; Moore, J. D.; Richardson, C. M.; Dokurno, P.; Cansfield, A. D.; Francis, G. L.; Hebdon, R. J.; Howes, R.; Jackson, P. S.; Lockie, A. M.; Murray, J. B.; Nunns, C. L.; Powles, J.; Robertson, A.; Surgenor, A. E.; Torrance, C. J. Structure-guided design of pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines as inhibitors of human cyclin-dependent kinase 2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 863–867.
- (35) Paruch, K.; Guzi, T. J.; Dwyer, D. M.; Doll, R. J.; Girijavallabhan, V. M.; Mallams, A. K. Imidazopyrazines as Cyclin Dependent Kinase Inhibitors. Patent WO 2004/026877, 2004.
- (36) Yu, T.; Belanger, D. B.; Kerekes, A. D.; Meng, Z.; Tagat, J. R.; Espozite, S. J.; Mandal, A. K.; Xiao, Y.; Kulkarni, B. A.; Zhang, Y.; Curran, P. J.; Doll, R.; Sidiqi, M. A. Imidazopyrazines as Protein Kinase Inhibitors. Patent WO 2008/156614, 2008.
- (37) Richardson, C. M.; Williamson, D. S.; Parratt, M. J.; Borgognoni, J.; Cansfield, A. D.; Dokurno, P.; Francis, G. L.; Howes, R.; Moore, J. D.; Murray, J. B.; Robertson, A.; Surgenor, A. E.; Torrance, C. J. Triazolo[1,5-*a*]pyrimidines as novel CDK2 inhibitors: protein structure-guided design and SAR. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1353–1357.
- (38) Bower, J. F.; Cansfield, A.; Jordan, A.; Parratt, M.; Walmsley, L.; Williamson, D. Triazolo[1,5-*a*]pyrimidines and Their Use in Medicine. Patent WO 2004/108136, 2004.
- (39) Meijer, L.; Bettayeb, K.; Galons, H.; Demange, L.; Oumata, N. Perharidines as CDK Inhibitors. Patent WO 2009/034411, 2009.
- (40) Capek, P.; Otmar, M.; Masojdkova, M.; Votruba, I.; Holy, A. A facile synthesis of 9-deaza analogue of olomoucine. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2003**, *68*, 779–791.
- (41) Moravcova, D.; Krystof, V.; Havlicek, L.; Moravec, J.; Lenobel, R.; Strnad, M. Pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidines as new generation of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2989–2992.
- (42) Havlicek, L.; Fuksova, K.; Krystof, V.; Orsag, M.; Vojtesek, B.; Strnad, M. 8-Azapurines as new inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5399–5407.
- (43) Krystof, V.; Moravcova, D.; Paprskarova, M.; Barbier, P.; Peyrot, V.; Hlobilkova, A.; Havlicek, L.; Strnad, M. Synthesis and biological activity of 8-azapurine and pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine analogues of myoseverin. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 1405–1411.
- (44) Shoemaker, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 813–823.

- (45) McClue, S. J.; Blake, D.; Clarke, R.; Cowan, A.; Cummings, L.; Fischer, P. M.; MacKenzie, M.; Melville, J.; Stewart, K.; Wang, S.; Zhelev, N.; Zheleva, D.; Lane, D. P. In vitro and in vivo antitumor properties of the cyclin dependent kinase inhibitor CYC202 (*R*-roscovitine). *Int. J. Cancer* **2002**, *102*, 463–468.
- (46) Paprskarova, M.; Krystof, V.; Jorda, R.; Dzubak, P.; Hajduch, M.; Wesierska-Gadek, J.; Strnad, M. Functional p53 in cells contributes to the anticancer effect of the cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine. *J. Cell. Biochem.* **2009**, *107*, 428–437.
- (47) Payton, M.; Chung, G.; Yakowec, P.; Wong, A.; Powers, D.; Xiong, L.; Zhang, N.; Leal, J.; Bush, T. L.; Santora, V.; Askew, B.; Tasker, A.; Radinsky, R.; Kendall, R.; Coats, S. Discovery and evaluation of dual CDK1 and CDK2 inhibitors. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 4299–4308.
- (48) Knauf, U.; Tschoopp, C.; Gram, H. Negative regulation of protein translation by mitogen-activated protein kinase-interacting kinases 1 and 2. *Mol. Cell. Biol.* **2001**, *21*, 5500–5511.
- (49) Topisirovic, I.; Ruiz-Gutierrez, M.; Borden, K. L. Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E contributes to its transformation and mRNA transport activities. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 8639–8642.
- (50) Culjkovic, B.; Topisirovic, I.; Skrabanek, L.; Ruiz-Gutierrez, M.; Borden, K. L. eIF4E promotes nuclear export of cyclin D1 mRNAs via an element in the 3'UTR. *J. Cell Biol.* **2005**, *169*, 245–256.
- (51) Chen, X.; Lin, Y.; Liu, M.; Gilson, M. K. The binding database: data management and interface design. *Bioinformatics* **2002**, *18*, 130–139.
- (52) Liu, T.; Lin, Y.; Wen, X.; Jorissen, R. N.; Gilson, M. K. BindingDB: a Web-accessible database of experimentally determined protein–ligand binding affinities. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, D198–D201.
- (53) MacCallum, D. E.; Melville, J.; Frame, S.; Watt, K.; Anderson, S.; Gianella-Borradori, A.; Lane, D. P.; Green, S. R. Seliciclib (CYC202, *R*-roscovitine) induces cell death in multiple myeloma cells by inhibition of RNA polymerase II-dependent transcription and down-regulation of Mcl-1. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 5399–5407.
- (54) Whittaker, S. R.; Te Poele, R. H.; Chan, F.; Linardopoulos, S.; Walton, M. I.; Garrett, M. D.; Workman, P. The cyclin-dependent kinase inhibitor seliciclib (*R*-roscovitine; CYC202) decreases the expression of mitotic control genes and prevents entry into mitosis. *Cell Cycle* **2007**, *6*, 3114–3131.
- (55) Barrie, S. E.; Eno-Amoquaye, E.; Hardcastle, A.; Platt, G.; Richards, J.; Bedford, D.; Workman, P.; Aherne, W.; Mittnacht, S.; Garrett, M. D. High-throughput screening for the identification of small-molecule inhibitors of retinoblastoma protein phosphorylation in cells. *Anal. Biochem.* **2003**, *320*, 66–74.
- (56) Raynaud, F. I.; Whittaker, S. R.; Fischer, P. M.; McClue, S.; Walton, M. I.; Barrie, S. E.; Garrett, M. D.; Rogers, P.; Clarke, S. J.; Kelland, L. R.; Valenti, M.; Brunton, L.; Eccles, S.; Lane, D. P.; Workman, P. In vitro and in vivo pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships for the trisubstituted aminopurine cyclin-dependent kinase inhibitors olomoucine, bohemine and CYC202. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 4875–4887.
- (57) Blagosklonny, M. V. Flavopiridol, an inhibitor of transcription: implications, problems and solutions. *Cell Cycle* **2004**, *3*, 1537–1542.
- (58) Sedlacek, H. H. Mechanisms of action of flavopiridol. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2001**, *38*, 139–170.
- (59) Senderowicz, A. M. Flavopiridol: the first cyclin-dependent kinase inhibitor in human clinical trials. *Invest. New Drugs* **1999**, *17*, 313–320.
- (60) Lane, M. E.; Yu, B.; Rice, A.; Lipson, K. E.; Liang, C.; Sun, L.; Tang, C.; McMahon, G.; Pestell, R. G.; Wadler, S. A novel cdk2-selective inhibitor, SU9516, induces apoptosis in colon carcinoma cells. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 6170–6177.
- (61) Moshinsky, D. J.; Bellamacina, C. R.; Boisvert, D. C.; Huang, P.; Hui, T.; Jancarik, J.; Kim, S. H.; Rice, A. G. SU9516: biochemical analysis of cdk inhibition and crystal structure in complex with cdk2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *310*, 1026–1031.
- (62) Gojo, I.; Zhang, B.; Fenton, R. G. The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol induces apoptosis in multiple myeloma cells through transcriptional repression and down-regulation of Mcl-1. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 3527–3538.
- (63) Raje, N.; Kumar, S.; Hideshima, T.; Roccaro, A.; Ishitsuka, K.; Yasui, H.; Shiraishi, N.; Chauhan, D.; Munshi, N. C.; Green, S. R.; Anderson, K. C. Seliciclib (CYC202 or *R*-roscovitine), a small-molecule cyclin-dependent kinase inhibitor, mediates activity via down-regulation of Mcl-1 in multiple myeloma. *Blood* **2005**, *106*, 1042–1047.
- (64) Gao, N.; Kramer, L.; Rahmani, M.; Dent, P.; Grant, S. The three-substituted indolinone cyclin-dependent kinase 2 inhibitor 3-[1-(3*H*-imidazol-4-yl)-meth-(*Z*)-ylidene]-5-methoxy-1,3-dihydro-indol-2-one (SU9516) kills human leukemia cells via down-regulation of Mcl-1 through a transcriptional mechanism. *Mol. Pharmacol.* **2006**, *70*, 645–655.
- (65) David-Pfeuty, T.; Nouvian-Dooche, Y.; Sirri, V.; Roussel, P.; Hernandez-Verdun, D. Common and reversible regulation of wild-type p53 function and of ribosomal biogenesis by protein kinases in human cells. *Oncogene* **2001**, *20*, 5951–5963.
- (66) Kotala, V.; Uldrijan, S.; Horoky, M.; Trbusek, M.; Strnad, M.; Vojtesek, B. Potent induction of wild-type p53-dependent transcription in tumour cells by a synthetic inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 1333–1339.
- (67) Helleday, T. Homologous recombination in cancer development, treatment and development of drug resistance. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 955–960.
- (68) Huertas, P.; Cortes-Ledesma, F.; Sartori, A. A.; Aguilera, A.; Jackson, S. P. CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination. *Nature* **2008**, *455*, 689–692.
- (69) Ambrosini, G.; Seelman, S. L.; Qin, L. X.; Schwartz, G. K. The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol potentiates the effects of topoisomerase I poisons by suppressing Rad51 expression in a p53-dependent manner. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 2312–2320.
- (70) Deans, A. J.; Khanna, K. K.; McNeese, C. J.; Mercurio, C.; Heierhorst, J.; McArthur, G. A. Cyclin-dependent kinase 2 functions in normal DNA repair and is a therapeutic target in BRCA1-deficient cancers. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 8219–8226.
- (71) Chen, F.; Nastasi, A.; Shen, Z.; Brennehan, M.; Crissman, H.; Chen, D. J. Cell cycle-dependent protein expression of mammalian homologs of yeast DNA double-strand break repair genes Rad51 and Rad52. *Mutat. Res.* **1997**, *384*, 205–211.
- (72) Sartori, A. A.; Lukas, C.; Coates, J.; Mistrik, M.; Fu, S.; Bartek, J.; Baer, R.; Lukas, J.; Jackson, S. P. Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* **2007**, *450*, 509–514.
- (73) Bartkova, J.; Horejsi, Z.; Koed, K.; Kramer, A.; Tort, F.; Zieger, K.; Guldborg, P.; Sehested, M.; Nesland, J. M.; Lukas, C.; Orntoft, T.; Lukas, J.; Bartek, J. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* **2005**, *434*, 864–870.
- (74) Gorgoulis, V. G.; Vassiliou, L. V.; Karakaidos, P.; Zacharatos, P.; Kotsinas, A.; Liloglou, T.; Venere, M.; DiTullio, R. A., Jr.; Kastrinakis, N. G.; Levy, B.; Kletsas, D.; Yoneta, A.; Herlyn, M.; Kittas, C.; Halazonetis, T. D. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* **2005**, *434*, 907–913.
- (75) Halazonetis, T. D.; Gorgoulis, V. G.; Bartek, J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* **2008**, *319*, 1352–1355.
- (76) Evans, P. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2006**, *62*, 72–82.
- (77) McCoy, A. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D.; Winn, M. D.; Storoni, L. C.; Read, R. J. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40*, 658–674.
- (78) Murshudov, G. N.; Vagin, A. A.; Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **1997**, *53*, 240–255.
- (79) Adams, P. D.; Afonine, P. V.; Bunkoczi, G.; Chen, V. B.; Davis, I. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Hung, L. W.; Kapral, G. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Oeffner, R.; Read, R. J.; Richardson, D. C.; Richardson, J. S.; Terwilliger, T. C.; Zwart, P. H. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 213–221.

(80) Emsley, P.; Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 2126–2132.

(81) Pierce, A. J.; Johnson, R. D.; Thompson, L. H.; Jasin, M. XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 2633–2638.