

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Pyrazolopyrimidinové inhibitory CDK:
antiproliferační a proapoptické vlastnosti**

Diplomová práce

Bc. Eva Řezníčková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2010

Vedoucí práce: Mgr. Radek Jorda

„Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 5. května 2010

Podpis.....

Děkuji svému školiteli Mgr. Radku Jordovi za odborné vedení mé diplomové práce, cenné rady a trpělivost a doc. RNDr. Vladimíru Kryštofovi, Ph.D. za poskytnuté konzultace. Dále děkuji celému kolektivu Laboratoře růstových regulátorů Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého a Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. za umožnění zpracování tématu mé diplomové práce na tomto pracovišti. V neposlední řadě děkuji za vstřícnost a praktické rady také Janě Hudcové, Olze Hustákové a Ditě Parobkové z téhož pracoviště.

Souhrn

Cyklin dependentní kinázy (CDK) jsou skupinou enzymů, která je zapojena v řadě buněčných procesů, zejména v regulaci buněčného cyklu a transkripce. Díky velmi časté deregulaci buněčného cyklu spojené s hyperaktivitou právě CDK u nádorových onemocnění, se stala tato skupina proteinkináz novým potenciálním terapeutickým cílem pro léčbu rakoviny. Inhibitory cyklin-dependentních kináz jsou strukturně velmi rozmanité sloučeniny, jejichž mechanismus účinku je nejčastěji založen na kompetici s molekulou ATP o vazebné místo kinázy. Teoretická část diplomové práce shrnuje poznatky o vývoji a vlastnostech nových inhibitorů CDK, zejména purinových a roskovitinových bioisosterů. Experimentální část diplomové práce se zabývá stanovením biologických účinků dvou nových pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinových inhibitorů CDK na buněčnou linii HCT-116 se zaměřením na aktivaci nádorového supresoru p53, aktivaci apoptotické dráhy, změny v regulaci buněčného cyklu a také vlivu testovaných látek na úroveň replikace a transkripce.

Summary

Cyclin-dependent kinases are a group of enzymes involved in many cellular processes mainly in regulation of cell cycle and transcription. Deregulation of the cell cycle connected with CDK hyperactivity is very common in tumor diseases and that is why this group of proteinkinases has become a new potential therapeutic target for a treatment of cancer. Inhibitors of cyclin-dependent kinases are structurally very various chemical compounds and they act as ATP-competitive inhibitors of CDK. The theoretical part of diploma thesis summarizes knowledge about development and properties of new CDK inhibitors especially purine and roscovitine bioisosteres. The experimental part of diploma thesis is focused on biological effects of two new pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine CDK inhibitors in the HCT-116 cell line with the intention of activation of tumor suppressor p53, activation of apoptosis, changes in regulation of cell cycle and level of replication and transcription.

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	9
2.1	Cyklin-dependentní kinázy.....	9
2.2	Inhibitory cyklin dependentních kináz	10
2.2.1	Vlastnosti inhibitorů CDK.....	10
2.2.2	Účinky inhibitorů CDK	11
2.3	Vývoj inhibitorů CDK.....	12
2.3.1	Purinové CDK inhibitory	12
2.3.2	Roskovitin.....	14
2.3.3	Purinové bioisostery	16
2.3.4	Roskovitinové bioisostery	20
2.4	Inhibitory CDK v klinických fázích testování.....	22
2.5	Moderní možnosti využití inhibitorů CDK	25
3	CÍL PRÁCE.....	28
4	MATERIÁL	29
4.1	Přístrojové vybavení.....	29
4.2	Použité chemikálie.....	29
4.3	Použité roztoky	30
4.4	Použité protilátky.....	30
4.5	Použité inhibitory CDK.....	31
4.6	Buněčná linie	32
5	METODIKA.....	33
5.1	Kinázový inhibiční test.....	33
5.2	Kultivace, sklizení a lyzace buněk	33
5.3	SDS-PAGE a western blotting	34
5.4	Fluorimetrické stanovení aktivity kaspázy 3 a 7	34

5.5	Cytometrické techniky.....	35
5.5.1	Analýza buněčného cyklu.....	35
5.5.2	Detekce cyklinů B1 a A2 a fosforylovaného histonu H3	35
5.5.3	Inkorporace 5-bromo-2'-deoxyuridinu.....	36
5.6	Izolace radioaktivně značené DNA, RNA a mRNA	36
5.7	Imunocytochemie	36
6	VÝSLEDKY.....	38
6.1	Stanovení inhibiční aktivity vybraných pyrazolopyrimidinů	38
6.2	Aktivace nádorového supresoru p53	39
6.3	Aktivace apoptózy	41
6.4	Změny v regulaci buněčného cyklu.....	44
6.4.1	Analýza buněčného cyklu.....	44
6.4.2	Detekce cyklinů B1 a A2 a fosforylovaného histonu H3	46
6.4.3	Změny ve fosforylaci proteinu Rb.....	49
6.5	Regulace replikace a globální transkripce	50
7	DISKUZE.....	53
8	ZÁVĚR.....	56
9	POUŽITÁ LITERATURA.....	57
10	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	66

1 ÚVOD

Tradiční postupy využívané pro léčbu maligních onemocnění s sebou často přinášejí problémy v podobě závažných vedlejších účinků nebo vytvoření rezistence, proto se výzkum stále zaměřuje na hledání nových potencionálních terapeutických cílů (Kryštof *et* Uldrijan, 2010). Bylo prokázáno, že společnou vlastností nádorových buněk je deregulace buněčného cyklu způsobená změnami v expresi pozitivních a negativních regulátorů cyklin-dependentních kináz, které mají za následek jejich hyperaktivitu (Carnero, 2002). Inhibitory cyklin-dependentních kináz jsou strukturně velmi rozmanité chemické sloučeniny, které dokáží účinně inhibovat aktivitu komplexů CDK a tak regulovat jejich funkci (Fischer *et al.*, 2003). Díky této vlastnosti se inhibitory CDK dostaly do centra zájmu jako látky využitelné pro léčbu maligních onemocnění a řada z nich se již nachází v klinických fázích testování. Proto se zájem vědců zaměřuje na hledání stále nových inhibitorů CDK vykazujících lepší fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti, které by zlepšovaly jejich terapeutický potenciál.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Cyklin-dependentní kinázy

Cyklín-dependentní kinázy (CDK) patří do rodiny serin-threoninových proteinkináz. V odpovědi na různé signály se účastní fosforylace substrátů zapojených zejména v regulaci buněčného cyklu a transkripce (Malumbres *et al.*, 2007). Strukturně si jsou všechny CDK velmi podobné, což je dáno velkou mírou sekvenční homologie. Všechny CDK jsou tvořeny dvěma doménami. Velká C-terminální doména je tvořena zejména α -helixy, zatímco menší N-terminální doména je tvořena převážně strukturou β -skládaných listů. Mezi těmito dvěma částmi se nachází ATP-vazebné místo (Knockaert *et al.*, 2002).

Aktivita CDK závisí na řadě faktorů, zejména na syntéze a degradaci pozitivních regulátorů cyklinů, syntéze, vazbě a degradaci inhibitorů CDK, fosforylaci a defosforylaci, a také na subcelulární lokalizaci. Pro plnou aktivitu CDK je nezbytná vazba cyklinu, přítomnost CDK-aktivační kinázy (CAK) a odstranění inhibiční fosforylace (Carnero, 2002).

Kromě pozitivních regulátorů CDK jako jsou cykliny a CAK, byla objevena celá řada přirozených negativních regulátorů (CDK inhibitorů) (De Azevedo *et al.*, 1996). Tyto inhibitory CDK se dělí do dvou rodin: Cip/Kip a INK4. Rodina Cip/Kip zahrnující např. proteiny p21, p27 a p57, inhibuje široké spektrum CDK, zatímco rodina inhibitorů INK4 specificky inhibuje CDK4 a CDK6 (Denicourt *et Dowdy*, 2004).

CDK se účastní celé řady buněčných procesů, zejména kontroly buněčného cyklu, ale také apoptózy, transkripce a diferenciací (Tab. I) (Fischer *et al.*, 2003).

Deregulace buněčného cyklu je jednou z hlavních událostí, která provází přeměnu normální buňky v buňku nádorovou a přispívá k rozvoji rakoviny (Trova *et al.*, 2009). Tyto změny jsou navozeny zvýšenou expresí pozitivních regulátorů CDK a/nebo sníženou expresí negativních regulátorů CDK v nádorových buňkách, které mají za následek ztrátu kontroly nad CDK (Carnero, 2002). Hyperaktivita CDK může být následkem inaktivace proteinových inhibitorů CDK patřících do rodiny INK4 a Cip/Kip způsobená např. delecí nebo bodovou mutací genů. U některých druhů nádorových onemocnění dochází k overexpresi cyklinů A, B, D nebo E nebo k deregulaci samotných CDK způsobené overexpresí, translokací nebo genovou amplifikací. U některých onemocnění byla také pozorována overexprese CDK-aktivujících fosfatáz Cdc25 (Malumbres *et Carnero*, 2003; Kryštof *et Uldrijan*, 2010).

Tab. I: Cyklin-dependentní kinázy a jejich funkce (podle Kasten et Giordano, 2001; Knockaert et al., 2002; Loyer et al., 2008; Malumbres et al., 2007)

komplex		funkce
CDK	cyklin	
CDK1	A	regulace buněčného cyklu (přechod S/G2)
	B	regulace buněčného cyklu (přechod G2/M); dokončení mitózy
CDK2	E	regulace buněčného cyklu (přechod G1/S); duplikace centrozómu
	A	regulace replikace DNA; inaktivace G1 transkripčních faktorů
CDK3		regulace buněčného cyklu
CDK4	D	regulace buněčného cyklu (přechod G1/S, průchod S)
CDK5		diferenciace a migrace neuronů a nervové signální dráhy; apoptóza
CDK6	D	regulace buněčného cyklu (přechod G1/S, průchod S)
CDK7	H	regulace transkripce; CDK-aktivační kináza (CAK)
CDK8	C	regulace transkripce
CDK9	T	regulace transkripce
CDK10		regulace buněčného cyklu (přechod G2/M)
CDK11	L	regulace transkripce; sestřih pre-mRNA; apoptóza
CDK12	L	sestřih pre-mRNA
CDK13	L	sestřih pre-mRNA

2.2 Inhibitory cyklin dependentních kináz

S objevením významné úlohy CDK pro vznik nádorových onemocnění započalo intenzivní hledání chemických látek, které by fungovaly jako inhibitory CDK (Kryštof *et* Uldrijan, 2010).

2.2.1 Vlastnosti inhibitorů CDK

Ačkoli se jednotlivé inhibitory CDK často podstatně liší v chemické struktuře, sdílí většina těchto látek několik společných vlastností: 1. jedná se o látky s nízkou molekulovou hmotností (< 600 Da), 2. jsou to planární hydrofobní heterocykly, 3. kompetují s molekulami ATP o volné ATP-vazebné místo na molekule CDK a 4. na molekulu CDK se váží převážně pomocí hydrofobních vazeb nebo vodíkových můstků (Knockaert *et al.*, 2002).

Inhibiční profil jednotlivých sloučenin se liší. Podle jejich účinku se dělí do dvou skupin, pan-selektivní CDK inhibitory inhibující široké spektrum CDK a vysoce selektivní inhibitory, které preferenčně inhibují jen některé CDK (Shapiro, 2006; Malumbres *et al.*, 2007; Kryštof *et Uldrijan*, 2010).

2.2.2 Účinky inhibitorů CDK

Nejvýznamnějšími vlastnostmi, díky kterým se inhibitory CDK dostaly do centra zájmu jako látky potencionálně využitelné pro léčbu maligních onemocnění, jsou schopnost indukovat zablokování buněčného cyklu, indukce apoptózy, zablokování transkripce a schopnost aktivace proteinu p53. Tyto účinky se mezi jednotlivými inhibitory CDK výrazně liší v závislosti na jejich selektivitě a na buněčné linii, na kterou působí (Wesierska-Gadek *et al.*, 2009).

Zablokováním aktivity CDK podílejících se na regulaci buněčného cyklu (CDK1, CDK2, CDK4 a CDK6) dochází k defosforylaci jejich substrátů, zamezení průchodu buněčným cyklem a zablokování buněčné proliferace (Kryštof *et Uldrijan*, 2010).

Některé inhibitory CDK mohou účinně inhibovat transkripci. Funkce RNA-polymerázy II je regulována fosforylací CDK7 a CDK9. CDK9 se v komplexu s cyklinem T účastní fosforylace Ser2 C-terminální domény (CTD) RNA-polymerázy II, která podporuje elongační fázi transkripce. CDK7 v komplexu s cyklinem H fosforyluje Ser5 CTD. Tato fosforylace je nezbytná pro zahájení transkripce (Shapiro, 2006). Inhibice transkripce má největší dopad na proteiny s krátkým poločasem rozpadu. Do této skupiny patří například proteiny s antiapoptotickou funkcí Bcl-2 a Mcl-1 a jejich absence v buňkách může indukovat apoptózu (Blagosklonny, 2004).

Další významnou vlastností inhibitorů CDK je schopnost indukovat akumulaci a aktivaci proteinu p53 (David-Pfeuty, 1999; Ljungman *et Paulsen*, 2001; Kryštof *et al.*, 2005). Nádorový supresor p53 se účastní kontroly genetického materiálu buňky a v případě jeho poškození brání vzniku nekontrolovatelné buněčné proliferace aktivací apoptotické dráhy, navozením senescence nebo zástavou buněčného cyklu. Inaktivace proteinu p53 je společným znakem velkého množství různých typů maligních onemocnění (Malumbres *et Carnero*, 2003). Aktivace proteinu p53 může být docíleno pomocí inhibice transkripce, která způsobí snížení hladiny proteinů s krátkým poločasem rozpadu, mezi které patří mimo jiné protein MDM-2. Za normálních podmínek je mezi proteiny p53 a MDM-2 udržována zpětnovazebná regulační smyčka. Protein p53 transkripčně aktivuje MDM-2, který vykazuje

ubiquitin-ligázovou aktivitu a podílí se na degradaci p53. V případě zablokování transkripce pak dochází k výraznému snížení hladiny MDM-2, která má za následek akumulaci p53 (Uldrijan *et al.*, 2002; Blagosklonny, 2004). Dalším mechanismem indukujícím akumulaci p53 je inhibice CDK1 a CDK2, která brání fosforylaci p53 na Ser315. Díky tomu dochází k tetramerizaci p53, zábránění nukleárního exportu a tím k jeho akumulaci v jádře (David-Pfeuty, 1999; Ljungman *et Paulsen*, 2001). Aktivací proteinu p53 v nádorových buňkách může být docíleno spuštění programované buněčné smrti (Shapiro, 2006).

2.3 Vývoj inhibitorů CDK

2.3.1 Purinové CDK inhibitory

Po objevu vlastností přírodních rostlinných hormonů cytokininů jako inhibitorů CDK (Havlíček *et al.*, 1997; Vermeulen *et al.*, 2002) se výzkum zaměřil na hledání derivátů těchto přírodních látek a substituované purinové sloučeniny se staly prvními CDK-selektivními inhibitory, které kompetují s molekulou ATP o vazebné místo na molekule CDK (Fisher *et al.*, 2003). Prvním objeveným CDK inhibitorem byl dimethylaminopurin. Hodnota IC_{50} pro inhibici CDK1 byla 120 μM a specifita byla velmi nízká. O něco účinnější a specifitější se pak byl isopentenyladenin (CDK1: $IC_{50} = 55 \mu\text{M}$) (Senderowicz *et Sausville*, 2000).

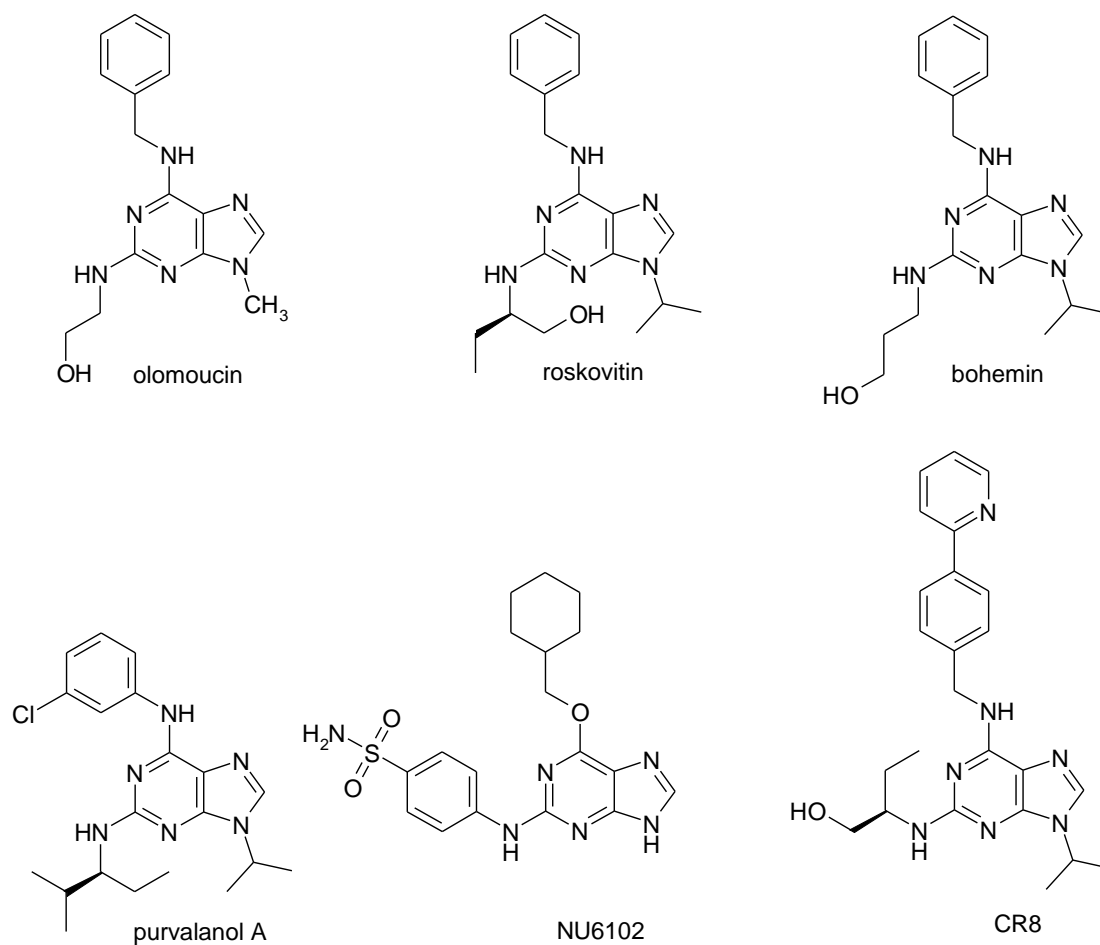
Později se ukázalo, že silný inhibiční efekt na CDK mají hlavně C2-, C6-, N9-substituované puriny. Jednou z prvních látek patřících do skupiny trisubstituovaných purinů byl olomoucín (6-(benzylamino)-2-[(2-hydroxyethyl)amino]-9-methyl-purin) (Obr. 1), který v mikromolárních koncentracích inhibuje CDK1, CDK2 a CDK5 a některé další proteinkinázy a také inhibuje buněčnou proliferaci a indukuje apoptózu nádorových buněk. Po objevení olomoucínu výzkum pokračoval v hledání modifikací této sloučeniny, které by zlepšily její vlastnosti. Podařilo se tak získat účinnější a selektivnější analoga roskovitin, bohemín, olomoucín II a purvalanolu A a B (Obr. 1) (Havlíček *et al.* 1997; Vermuelen *et al.*, 2002; Fischer *et al.*, 2003; Kryštof *et al.*, 2005).

S objevem těchto látek však vývoj purinových inhibitorů CDK neustal a modifikacemi substituentů na purinovém skeletu jsou hledány a vytvářeny stále nové sloučeniny.

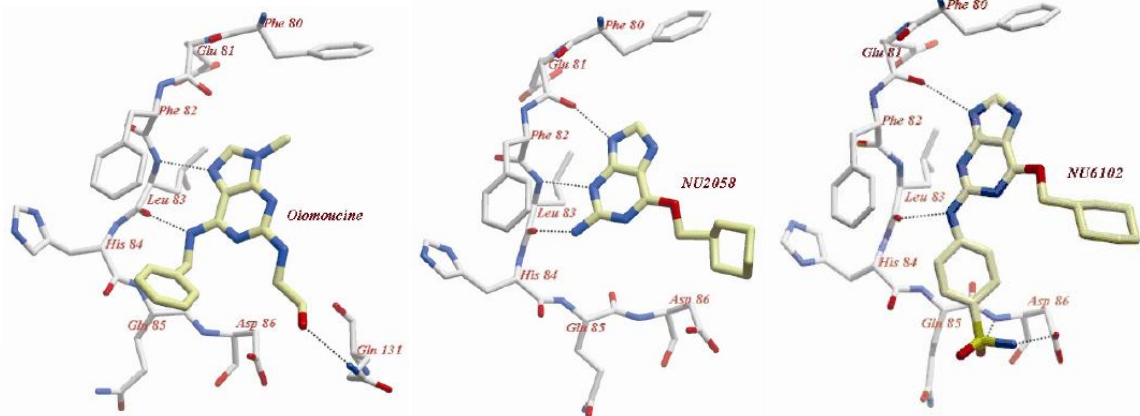
Látka s označením CR8 lišící se od roskovitinu biarylovým substituentem v pozici N6 (Obr. 1) vykazuje podobně vysokou účinnost inhibice CDK1, CDK2, CDK3, CDK5, CDK7 a CDK9 (hodnoty IC_{50} jsou 2x – 4x nižší než u roskovitinu), ale došlo u ní k velmi výraznému zlepšení proapoptických vlastností. Tyto protinádorové účinky byly potvrzeny u řady

buněčných linií a bylo prokázáno, že látka CR8 indukuje programovanou buněčnou smrt v koncentracích až 50x nižších než roskovitin (Bettayeb *et al.*, 2008b).

Modifikací látky NU2058 (O⁶-cyklohexylmethylguanin), která vykazuje poměrně výraznou selektivitu, avšak účinky v inhibici CDK1 (IC₅₀ = 5 μM) a CDK2 (IC₅₀ = 12 μM) jsou poměrně nízké, byla vytvořena látka s označením NU6102 (Obr. 1) dosahující výrazně lepších inhibičních vlastností (CDK1: IC₅₀ = 9 nM, CDK2: IC₅₀ = 6 nM) se zachováním selektivity výchozí látky, a zároveň u ní došlo ke zlepšení antiproliferačních vlastností (Davies *et al.*, 2002). Zlepšení biologických vlastností je zřejmě způsobeno odlišným mechanismem vazby látky NU6102 do ATP-vazebného místa oproti výchozí látce NU2058. Zatímco látka NU2058 interaguje pomocí 3 vodíkových vazeb s Glu81 a Leu83 CDK2, vazba látky NU6102 do ATP-vazebného místa CDK2 je zprostředkována 4 vodíkovými vazbami s Glu81, Leu83 a Asp86 (Babu *et al.*, 2007). Obě látky mají odlišnou orientaci v ATP-vazebném místě CDK2 než např. purinové inhibitory olomoucín nebo roskovitin (Babu *et al.*, 2007; Bettayeb *et al.*, 2008a) (Obr. 2).



Obr. 1: Chemická struktura některých purinových inhibitorů CDK.



Obr. 2: Vazba olomoucinu a látek NU2058 a NU6102 do ATP-vazebného místa CDK2 (převzato z Babu *et al.*, 2007).

Chemické sloučeniny na bázi purinů však nevykazují pouze CDK inhibiční vlastnosti, ale jsou například inhibitory celé řady dalších enzymů (např. fosfodiesterázy, MAP kinázy, sulfotransférázy), u některých látek byla prokázána schopnost inhibovat tvorbu mitotického vřeténka a řada dalších a nové možnosti využití purinových sloučenin se stále objevují (Legraverend *et Grierson*, 2006).

2.3.2 Roskovitin

Zřejmě nejlépe prostudovaným zástupcem purinových inhibitorů CDK je roskovitin (6-(benzylamino)-2-(*R*)-[[1-hydroxymethyl]propyl]amino]-9-isopropylpurin) (Obr. 1) (Havlíček *et al.*, 1997). Již v submikromolárních koncentracích funguje jako účinný inhibitor CDK1, CDK2, CDK5, CDK7 a CDK9 (hodnoty IC_{50} viz Tab. II) (Bettayeb *et al.*, 2008) a má výrazné antiproliferační účinky, které byly ověřeny na většině nádorových buněčných linií (průměrná hodnota $IC_{50} = 17 \mu\text{M}$) (Meijer *et al.*, 2006).

Roskovitin výrazně ovlivňuje buněčný cyklus. V závislosti na buněčné linii, použité koncentraci a délce působení může docházet k bloku v G0, G1, S nebo G2/M fázi nebo kombinaci těchto fází (Meijer *et al.*, 2006; Wesierska-Gadek *et Kryštof*, 2009; Wesierska-Gadek *et al.*, 2009). Spolu se změnami buněčného cyklu byla sledována hladina cyklínů. Pomocí analýzy western blotting bylo zjištěno, že působením roskovitinu dochází k redukci hladiny cyklínu D1, A a B1 (Whittaker *et al.*, 2004). Při studiu změn v regulaci buněčného cyklu bylo také prokázáno, že roskovitin inhibuje fosforylaci proteinu Rb. Inhibice fosforylace proteinu Rb brání jeho inaktivaci a rozpadu komplexu Rb-E2F, čímž je znemožněna transkripce genů nezbytných pro replikaci DNA (Whittaker *et al.*, 2004).

Zablokování replikace bylo prokázáno pomocí inkorporace 5-bromo-2'-deoxyuridinu (BrdU) do struktury DNA u buněk po ovlivnění roskovitinem (Whittaker *et al.*, 2004).

Díky inhibičním vlastnostem roskovitinu dochází jeho působením k inhibici fosforylace RNA-polymerázy II a tím ke snížení transkripce. Zablokování transkripce však není úplné a hlavní dopad má na proteiny s krátkým poločasem rozpadu. Do této skupiny patří například proteiny s antiapoptotickou funkcí (Bcl-2, Mcl-1, survivin). Roskovitin je rychle odbouráván na řadu metabolitů, způsobuje tedy pouze přechodné zablokování transkripce, které zasáhne proteiny s krátkým poločasem rozpadu, jejichž expresí se vyznačují rakovinné buňky a dochází u nich k indukci apoptózy, zatímco u normálních buněk dochází pouze k přechodnému zastavení průchodu buněčným cyklem (Meijer *et al.*, 2006). Roskovitin také indukuje aktivaci proteinu p53 a jeho akumulaci v jádře (David-Pfeuty, 1999). Zvýšení hladiny proteinu p53 je způsobeno inhibicí transkripce a jím způsobeným snížením hladiny proteinu MDM-2. V souvislosti se zvýšenou transkripční aktivitou p53 je často pozorováno zvýšení hladiny proteinu p21, který je jedním z přírodních inhibitorů CDK, což potvrzuje transkripční aktivitu p53 (Wesierska-Gadek *et al.*, 2009). Stanovení transkripční aktivity p53 po ovlivnění roskovitinem bylo provedeno u buněčné linie Arn8 exprimující β -galaktozidázu pod kontrolou p53-responzivního promotoru. β -galaktozidázový reportérový test prokázal, že se zvyšující se koncentrací roskovitinu dochází k nárůstu transkripční aktivity p53 a maximální aktivity je dosaženo při působení koncentrací v rozsahu 30 – 80 μ M (Kryštof *et al.*, 2005).

Díky vytvoření krystalové struktury roskovitinu v komplexu s CDK2 je znám způsob jeho vazby do cílového místa CDK2. Roskovitin se váže do ATP-vazebného místa CDK2, kde dochází k interakci Leu83 s roskovitinem pomocí 2 vodíkových můstků a celou strukturu stabilizuje řada hydrofobních a van der Waalsových interakcí. Stejný způsob vazby byl zjištěn i u dalších purinových inhibitorů CDK, zatímco orientace purinového skeletu molekuly ATP v ATP-vazebném místě CDK2 je odlišná (De Azevedo *et al.*, 1997; Meijer *et al.*, 2003).

Kromě CDK inhibičních vlastností byl u roskovitinu testován i vliv na další buněčné cíle. Z kinázových inhibičních testů vyplynulo, že roskovitin je inhibitorem Erk1 a Erk2, zapojených v mitogenem aktivované proteinkinázové (MAPK) dráze ($IC_{50} = 34 \mu$ M a 14μ M) (Meijer *et al.*, 1997), avšak v rozporu s těmito hodnotami jsou výsledky zjištěné u buněčných linií HT29 a KM12 odvozených od rakoviny tlustého střeva, u kterých došlo po ovlivnění roskovitinem naopak k aktivaci Erk1 a Erk2, což bylo potvrzeno detekcí fosforylace Elk-1

a exprese c-Fos (Whittaker *et al.*, 2004). Dalším odhaleným buněčným cílem roskovitinu jsou kaseinkináza 1 (CK1) nebo pyridoxalkináza (Meijer *et al.*, 2006).

Roskovitin byl jedním z prvních inhibitorů CDK, který vstoupil do klinického testování. Nyní se nachází v II. fázi klinického testování jako terapeutikum pro léčbu mnohočetného myelomu a v kombinaci s gemcitabinem/cisplatinou jako látka účinná proti nemalobuněčnému karcinomu plic (Legraverend *et Grierson*, 2006).

2.3.3 Purinové bioisostery

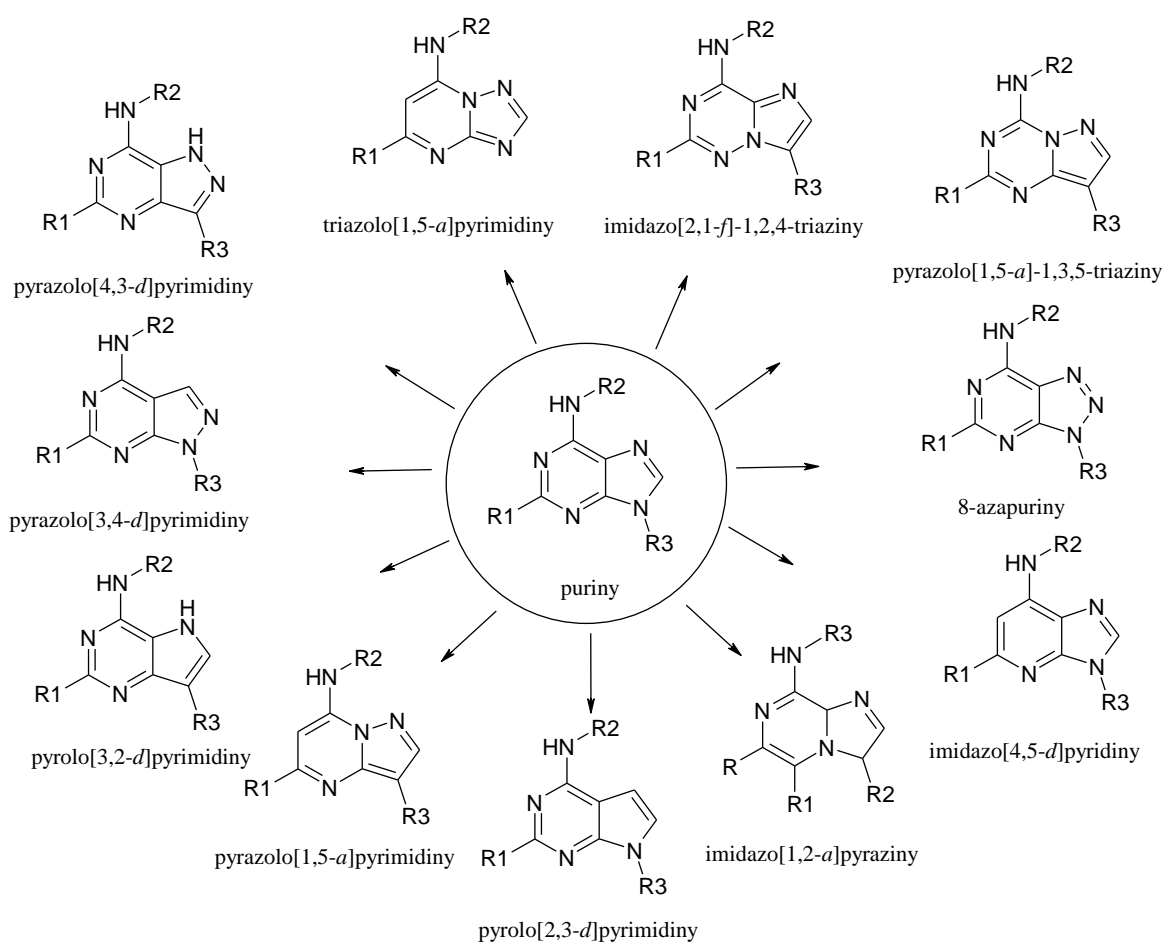
Jedním ze způsobů pro vyhledávání nových inhibitorů CDK v posledních letech je tzv. bioisosterická strategie, založená na cílené modifikaci vybrané výchozí látky s dobře prostudovanou chemickou strukturou a mechanismem působení. Bioisostery jsou strukturně podobné sloučeniny, které vznikají záměnami funkčních skupin nebo změnami v rozložení atomů. Odlišnosti v prostorovém uspořádání mají vliv na fyzikální a chemické vlastnosti látek (rozpuštěnost, reaktivita, hydrofobicita,...) a tyto modifikace biologicky aktivní výchozí látky umožňují dosažení lepší metabolické stability, snížení nežádoucích účinků, optimalizace biologických vlastností nebo zlepšení farmakologické aktivity (Hampl *et Paleček*, 2007; Lima *et Barreiro*, 2005; Popowycz *et al.*, 2009).

Cílem modifikací může být například zvýšení selektivity inhibitoru snížením inhibice některých dalších proteinkináz. Pyridoxalkináza (EC 2.7.1.35) katalyzuje fosforylaci forem vitamínu B6 za vzniku pyridoxal-5'-fosfátu, který je intracelulární aktivní formou vitamínu B6 a kofaktorem celé řady důležitých enzymů. Inhibice pyridoxalkinázy některými inhibitory CDK (např. roskovitin) tak může být důsledkem některých vedlejších účinků. Takového zlepšení biologických vlastností bylo dosaženo například u imidazo[4,5-*d*]pyridinů. (Tang *et al.*, 2005; WO 2009/034411 A1).

Snížení inhibice Erk2 a pyridoxalkinázy také může výrazně zlepšit účinnost CDK inhibitorů. Pokles jejich afinity k těmto kinázám způsobí zvýšení koncentrace těchto látek, které se v buňce nachází volně a tak mohou interagovat s CDK a rovněž mohou dosahovat proapoptotických nebo antiproliferačních účinků již v nižších koncentracích (Bettayeb *et al.*, 2008a).

Purinové bioisostery se syntetizují pomocí náročných několikastupňových postupů přes řadu meziproductů. Prozatím se podařilo vytvořit 11 odlišných chemických tříd: pyrolo[3,2-*d*]pyrimidiny (Čapek *et al.*, 2003), pyrolo[2,3-*d*]pyrimidiny, imidazo[1,2-*a*]pyraziny (WO 2004/026877 A1), imidazo[4,5-*d*]pyrimidiny (WO 2009/034411 A1),

pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidiny (WO 2008/151304 A1; Ali *et al.*, 2009), pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidiny (WO 03/082872 A1), pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidiny (Kim *et al.*, 2003), pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triaziny (Bettayeb *et al.*, 2008a), imidazo[2,1-*f*]-1,2,4-triaziny (Popowycz *et al.*, 2009), triazolo[1,5-*a*]pyrimidiny (WO 2004/108136 A1) a 8-azapuriny (Havlíček *et al.*, 2005) (Obr. 3). U většiny je zachována pozice jednotlivých substituentů a změny v heterocyklické kostře jsou minimální, avšak u některých látek dochází již k výraznějšímu odklonění od struktury trisubstituovaných purinů. Imidazo[1,2-*a*]pyraziny jsou tetrasubstituované látky, u 8-azapurinů se v heterocyklickém skeletu nachází již 5 atomů dusíku.



Obr. 3: Strukturní motivy známých purinových bioisosterů.

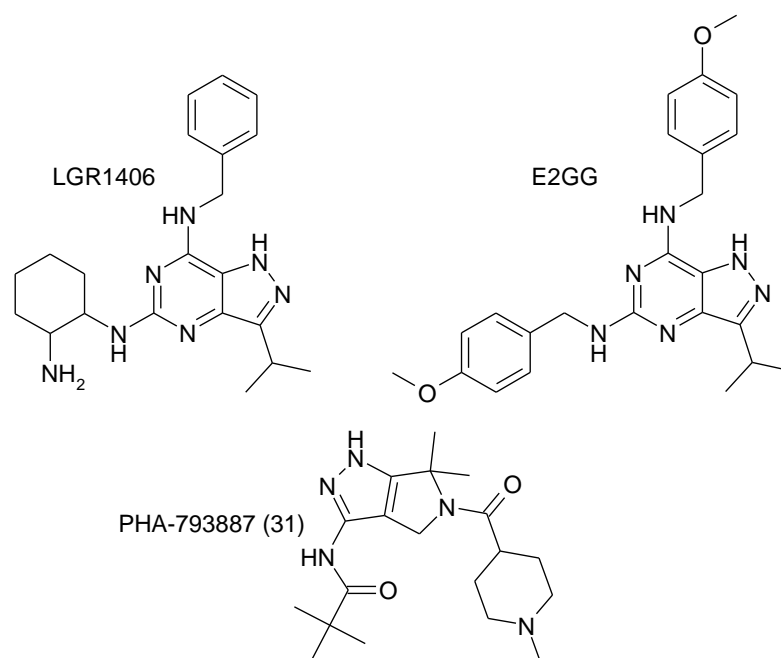
Umístění atomů dusíku ve skeletu bioisosterických sloučenin mění povahu těchto heterocyklických struktur a má velký vliv na chemické vlastnosti a biologickou účinnost těchto látek (Dwyer *et al.*, 2007).

Přesun atomu dusíku z pozice 9 purinového skeletu do pozice 5 v případě pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinů způsobil zvýšení inhibiční aktivity CDK2 (Bettayeb *et al.*, 2008a), zatímco vnesení pátého dusíku do základní kostry 8-azapurinů způsobilo snížení inhibice CDK2 (Havlíček *et al.*, 2005).

Zajímavých biologických vlastností bylo dosaženo u látky BS-181 patřící mezi pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidiny. Jedná se o vysoce specifický a velmi účinný inhibitor CDK7 ($IC_{50} = 21$ nM), další CDK inhibuje s výrazně nižší účinností. Látka byla navržena pomocí metod počítačového modelování na základě struktury CDK7. BS-181 inhibuje buněčnou proliferaci, fosforylaci substrátů CDK7 (protein Rb, CTD RNA-polymerázy II) a indukuje apoptózu (Ali *et al.*, 2009).

Skupina pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidinů zahrnuje řadu sloučenin lišících se typem substituentů v pozicích R1, R2 a R3 (Obr. 3). U těchto látek byla testována účinnost inhibice CDK2 a také účinnost inhibice buněčného dělení. Výsledky však prokázaly, že dobré CDK inhibiční vlastnosti nekorelují s inhibicí buněčného dělení a naopak (Kim *et al.*, 2003).

Ze skupiny pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinů byly testovány biologické účinky 3,7-disubstituovaných sloučenin. Z porovnání s purinovými analogy bylo zjištěno, že tyto látky dosahují vysoké inhibice CDK1 (Moravcová *et al.*, 2003). Z trisubstituovaných pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinů byl studován vliv látky LGR1406 (Obr. 4) na proliferaci buněk hladkého svalstva po stimulaci PDGF (platelet-derived growth factor) (Sroka *et al.*, 2009). Abnormální proliferace těchto buněk přispívá k restenóze. Ze srovnání s účinky roskovitinu vyplynulo, že látka LGR1406 účinně inhibuje syntézu DNA a vykazuje silné antiproliferační účinky. U buněk hladkého svalstva dochází po ovlivnění LGR1406 (5 μ M) kablokování buněčného cyklu ve fázi G1. LGR1406 rovněž vykazuje oproti roskovitinu vyšší účinnost v inhibici CDK1, CDK2 a CDK4 (Sroka *et al.*, 2009). Dalším zajímavým zástupcem pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinů je látka označovaná jako E2GG (Obr. 4). Jedná se o analog myoseverinu, což je 2,6,9-trisubstituovaný purin, který brání polymerizaci tubulinu, tím znemožňuje správné sestavení mitotického vřeténka a navozuje u buněk zablokování buněčného cyklu a následnou apoptózu. E2GG vykazuje s o něco nižší účinností stejné vlastnosti jako myoseverin a navíc u ní byla odhalena i průměrná CDK inhibiční aktivita (CDK1: $IC_{50} = 4,1$ μ M, CDK2: $IC_{50} = 3,7$ μ M, CDK7: $IC_{50} = 7,2$ μ M, CDK9: $IC_{50} = 50,3$ μ M). Odlišné biologické vlastnosti jsou zřejmě způsobeny přesunem atomu dusíku v heterocyklické kostře sloučeniny E2GG oproti myoseverinu (Kryštof *et al.*, 2006).



Obr. 4: Chemická struktura látek LGR1406, E2GG a PHA-793887.

Další skupinu inhibitorů CDK tvoří látky, jejichž struktura je tvořena 6-substituovaným pyrolo[3,4-*c*]pyrazolem. Nejedná se sice o purinové bioisostery, avšak vazba do ATP-vazebného místa CDK2 vykazuje určitou podobnost s purinovými CDK inhibitory. Mezi skupinou nasynthetizovaných sloučenin vykazovala nejlepší vlastnosti látka PHA-793887 nesoucí i označení 31 (Obr. 4). Látka PHA-793887 se do ATP-vazebného místa CDK2 váže pomocí tří vodíkových vazeb. Jedná se o velmi účinný inhibitor CDK a vykazuje velmi dobré antiproliferační účinky u řady nádorových buněčných linií. Pro tyto vlastnosti byla vybrána pro klinické testování jako terapeutikum pro léčbu pacientů se solidními tumory (Brasca *et al.*, 2010).

2.3.4 Roskovitinové bioisostery

Vzhledem k dobře známým biologickým a chemickým vlastnostem roskovitinu je při vytvoření nových strukturních motivů purinových bioisosterů snaha nasynthetizovat roskovitinový derivát, u kterého je zachována poloha a typ roskovitinových substituentů a strukturálních změn je dosaženo pouze modifikacemi v rámci chemické kostry. V současné době jsou známy biologické vlastnosti šesti roskovitinových bioisosterů (Obr. 5).

Látka N-&-N1 (7a) patřící do skupiny pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazinů se oproti roskovitinu vyznačuje výrazně účinnější inhibicí CDK1, CDK2, CDK5 a CDK9 a také CK1 a GSK-3 α/β a zároveň došlo ke snížení inhibice pyridoxalkinázy a Erk2. Inhibitor N-&-N1 je schopný indukovat apoptózu v koncentracích několikanásobně nižších než roskovitin (Bettayeb *et al.*, 2008a) a rovněž dosahuje mnohonásobně vyšších účinků v inhibici buněčné proliferace (Popowycz *et al.*, 2009). Oproti tomu látka N-&-N2 (13) patřící do skupiny imidazo[2,1-*f*]-1,2,4-triazinů, která je látce N-&-N1 (7a) velmi strukturně podobná (přesun atomu dusíku z pozice 5 do pozice 4), nevykazuje zlepšení biologických vlastností a účinnost inhibice studovaných proteinkináz je srovnatelná s roskovitinem (Bettayeb *et al.*, 2008a; Popowycz *et al.*, 2009).

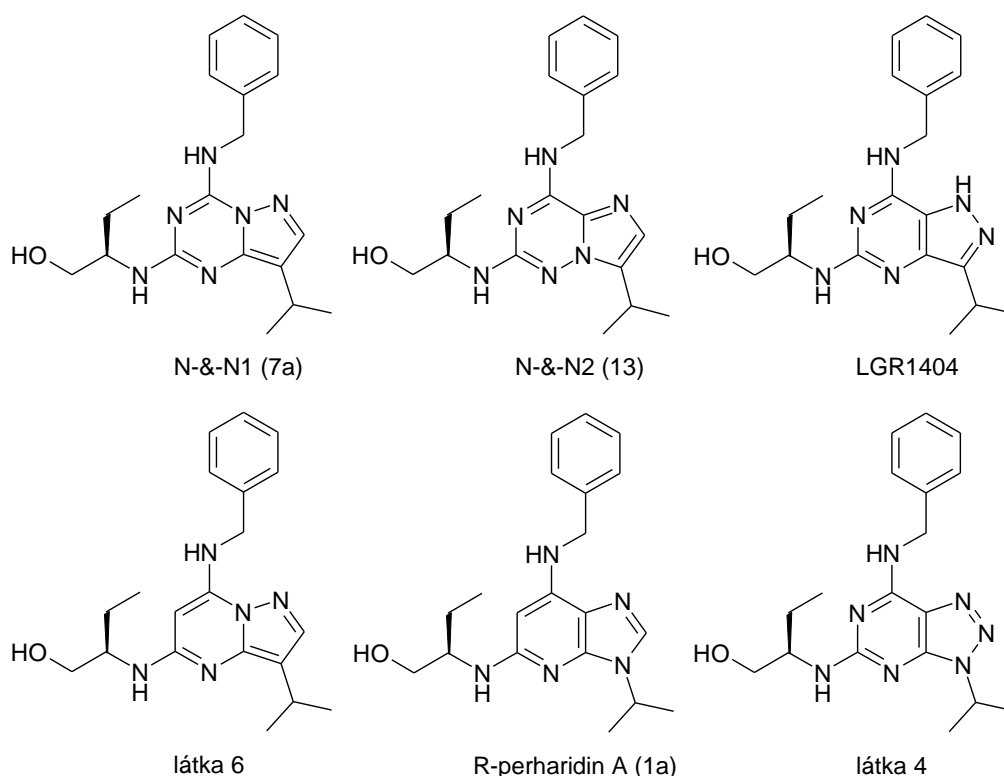
Látka LGR1404 je roskovitinovým bioisosterem patřícím do skupiny pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinů. Vykazuje stejné biologické vlastnosti jako roskovitin, avšak s mnohem vyšší účinností (Jorda *et al.*, nepublikovaná data).

Pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidinový bioisoster roskovitinu s označením 6 vykazuje výrazné zvýšení inhibice CDK2 ($IC_{50} = 70$ nM) (WO 2008/151304). Dále jsou známy roskovitinové bioisostery patřící do skupiny imidazo[4,5-*a*]pyrimidinů (látka označovaná 1a nebo *R*-perharidin A) a 8-azapurinů (látka s označením 4). U těchto látek nedošlo ke zlepšení CDK inhibičních vlastností. Hodnoty IC_{50} jsou srovnatelné resp. vyšší než u roskovitinu (Havlíček *et al.*, 2005; WO 2009/034411 A1). CDK inhibiční profil jednotlivých roskovitinových bioisosterů shrnuje Tab. II.

Tab. II: Účinnost inhibice CDK vybranými roskovitinovými bioisostery (podle Havlíček et al., 2005; Bettayeb et al, 2008a; Popowycz et al., 2009; Jorda et al., nepublikovaná data; WO 03/082872 A1; WO 2008/151304 A1; WO 2009/034411 A1).

	CDK/cyklin (vazebný partner)					
	1/B	2/A	2/E	5/p25	7/H	9/T
Roskovitin						
purin	0,33	0,22	0,15	0,27	0,8	0,23
N-&-N1, 13						
pyrazolo[1,5- <i>a</i>]-1,3,5-triazin	0,073	0,04	0,026	0,07	0,05	0,043
N-&-N2, 7a						
imidazo[2,1- <i>f</i>]-1,2,4-triazin	0,4	0,22	0,16	0,32	0,6	0,2
LGR1404						
pyrazolo[4,3- <i>d</i>]pyrimidin	0,04	-	0,04	-	-	-
R-perharidin, 1a						
imidazo[4,5- <i>a</i>]pyrimidin	0,35	0,3	0,18	0,2	0,9	0,48
látka 6						
pyrazolo[1,5- <i>a</i>]pyrimidin	-	> 1	-	-	0,07	0,1
látka 4						
8-azapurin	-	4,1	-	-	-	-

Číselné údaje v tabulce vyjadřují hodnoty IC_{50} pro dané CDK. Údaje jsou uvedeny v μM .



Obr. 5: Chemická struktura roskovitinových bioisosterů.

Do dnešního dne byla vyvinuta celá řada chemických látek, které plní funkci inhibitorů CDK. Tyto látky jsou strukturně velmi rozmanité a mohou být rozděleny do řady chemických tříd (Fischer *et al.*, 2003).

2.4 Inhibitory CDK v klinických fázích testování

V současné době se nachází několik inhibitorů CDK v různých fázích klinického testování jako možná terapeutika proti různým typům rakoviny. Kromě již zmíněného roskovitinu se jedná např. o flavopiridol, R547, SNS-032, PD-0332991, AT7519, ZK 3044709 a další (Malumbres *et al.*, 2007; Kryštof *et Uldrijan*, 2010), následující část diplomové práce stručně charakterizuje některé z nich.

Flavopiridol (Alvocidib, HMR1275) (Obr. 6) byl prvním inhibitorem CDK, u kterého bylo zahájeno klinické testování. Tato flavonoidní látka patří do skupiny pan-selektivních CDK inhibitorů, inhibuje CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, CDK7 a CDK9. U nádorových buněk vystavených působení flavopiridolu dochází ke změnám v buněčném cyklu. U většiny nádorových buněk dochází k zablokování buněčného cyklu na přechodu mezi fázemi G1 a S, ale u velkého množství buněk dochází k navození apoptózy nebo k mitotickému bloku

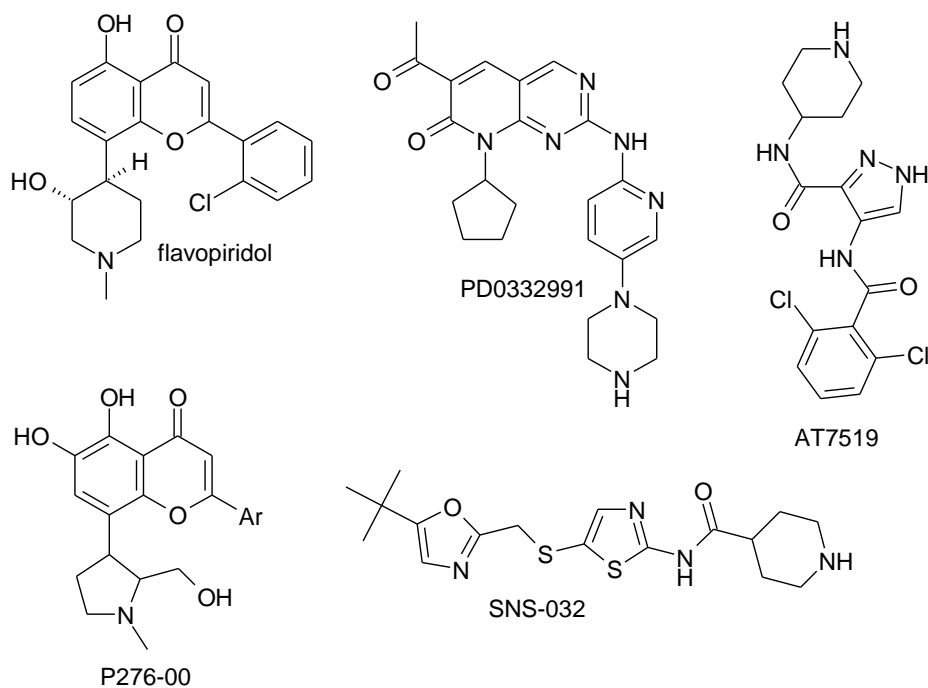
(Kryštof *et al.*, 2010; McInnes, 2008). V klinických testech se zkoumají účinky flavopiridolu u pacientů s chronickou lymfatickou leukémií (McInnes, 2008).

Do druhé fáze klinického testování se také dostal analog flavopiridolu, látka s označením P276-00 (Obr. 6), u které se testují terapeutické účinky u pacientů s mnohočetným myelomem a s nádory hlavy a krku (Wesierska-Gadek *et al.*, 2009; Kryštof *et al.*, 2010). Účinně inhibuje CDK1, CDK4 a CDK9 (hodnoty $IC_{50} < 100$ nM) a vykazuje silné antiproliferační účinky (Wesierska-Gadek *et al.*, 2009).

PD0332991 (Obr. 6) je vysoce specifický a účinný inhibitor cyklin-dependentních kináz. Inhibuje CDK4 a CDK6 již v koncentracích několika nanomolů. U Rb-pozitivních nádorových buněk má silné antiproliferační účinky a způsobuje zablokování buněčného cyklu v G1 fázi kvůli redukcí fosfoskupiny na proteinu Rb (Fry *et al.*, 2004; McInnes, 2008). Chemická struktura odpovídá pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7-onu. Látka se nachází v I. fázi testování jako terapie v léčbě lymfomu z plášťových buněk (mantle cell lymphoma), non-Hodgkinova lymfomu a mnohočetného myelomu (McInnes, 2008).

AT7519 (Obr. 6) je pan-selektivní CDK inhibitor. Účinně inhibuje CDK1, CDK2, CDK4, CDK5, CDK6 a CDK9 a také GSK3- β . Vyznačuje se silnou inhibicí buněčného růstu řady nádorových buněčných linií. Látka se nachází v klinických fázích testování u pacientů s metastazujícími solidními tumory nebo non-Hodgkinovým lymfomem (Malumbres *et al.*, 2007; Wesierska-Gadek *et al.*, 2009).

Látka SNS-032 (Obr. 6), označovaná také jako BMS-387032, je inhibitorem na bázi aminothiazolu (McInnes, 2008). Tato sloučenina se účastní inhibice buněčného cyklu a transkripce. Inhibuje široké spektrum kináz, převážně CDK2, CDK7 a CDK9, ale také CDK1, CDK4 a GSK3 β (Malumbres *et al.*, 2007; McInnes, 2008; Malumbres *et al.*, 2009). Inhibitor SNS-032 se nachází v I. fázi klinického testování jako možný preparát pro léčbu solidních tumorů a β -lymfoidních malignit (Dickson *et al.*, 2009; Malumbres *et al.*, 2009).

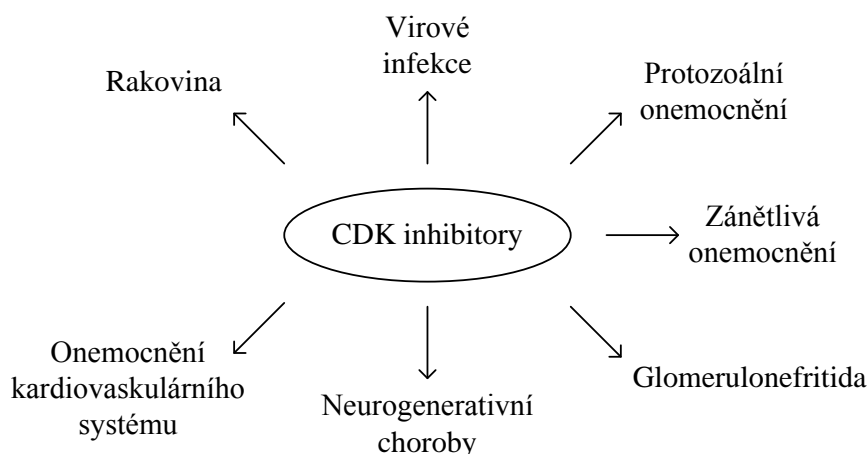


Obr. 6: Vybrané inhibitory CDK v klinickém testování.

Kromě testování protinádorových účinků samotných CDK inhibitorů se často přistupuje ke kombinování těchto sloučenin s jinými protinádorovými terapeutiky, čímž může být docíleno zlepšení terapeutického potenciálu látek, snížení toxicity nebo snížení rizika vzniku rezistence (Wesierska-Gadek *et al.*, 2009). Do klinického testování se dostala například kombinace flavopiridolu s mitoxantronem a cytarabinem, která dosáhla slibných výsledků u pacientů s akutní myeloidní leukémií (Dickson *et Schwartz*, 2009). Kromě kombinací s klasickými chemoterapeutiky se testují rovněž účinky kombinací CDK inhibitorů například s inhibitory MAPK dráhy (CI-1040), které brání přenosu intracelulárních signálů, nebo s inhibitory histodeacetyláz, které brání dekonenzaci chromatinu a zahájení genové exprese (Wesierska-Gadek *et al.*, 2009).

2.5 Moderní možnosti využití inhibitorů CDK

V poslední době se ukazuje, že inhibitory CDK by mohly najít uplatnění v léčbě celé řady dalších onemocnění, nejen u rakoviny. Předpokládá se možnost jejich využití například pro léčbu virových infekcí, při léčbě nemocí vyvolávaných jednobuněčnými parazity, při onemocněních nervového a kardiovaskulárního systému a řadě dalších (Knockaert *et al.*, 2002; Galons *et al.*, 2010).



Obr. 7: Možnosti potenciálního využití CDK inhibitorů (podle Knockaert *et al.*, 2002; Galons *et al.*, 2010, upraveno).

Virová replikace je závislá na aparátu hostitelské buňky a často je synchronizována s jejím buněčným cyklem. Některé viry využívají buněčné CDK a některé jsou dokonce schopny exprimovat vlastní cykliny a tak ovlivňovat buněčný cyklus hostitelské buňky. Po tomto zjištění se začalo uvažovat nad možností využití inhibitorů CDK pro zastavení virové replikace (Knockaert *et al.*, 2002; Fischer *et al.*, 2003). Nevýhodou antivirotik zaměřených na virové proteiny je časté vytvoření rezistence a velmi úzké spektrum účinku, zatímco látky, které by zasáhly buněčné proteiny nezbytné pro virovou replikaci, by mohly být účinné pro široké spektrum virových infekcí. U některých inhibitorů CDK byly prokázány antivirové účinky *in vitro* (Schang, 2003). Purinové inhibitory CDK roskovitin, olomoucín a purvalanol inhibují replikaci HSV (herpes simplex virus), jeho genovou transkripci a brání reaktivaci HSV z latentní formy, což je spojeno s expresí CDK2 a jadernou translokací CDK4 (Schang, 2002; Fischer, 2003). Podobných výsledků bylo dosaženo i v případě HIV-1 (human immunodeficiency virus type 1). Bylo prokázáno, že roskovitin inhibuje HIV-1

v infikovaných buňkách (T-lymfocytech, monocytech a jednojaderných buňkách periferní krve) a spouští u nich program apoptózy, čímž dochází k prudkému snížení virového titru (Agbottah *et al.*, 2005). Purinové CDK inhibitory rovněž prokázaly antivirotické účinky v případě lidského papilomaviru, cytomegaloviru nebo viru varicella-zoster (Knockaert *et al.*, 2002; Schang, 2002).

Jednobuněční parazité, mezi které patří například rody *Trypanosoma*, *Leishmania* nebo *Plasmodium*, jsou původci celé řady celosvětově rozšířených onemocnění. Bylo prokázáno, že tyto organismy mají geny kódující kinázy podobné lidským CDK, tzv. CRK (Cdc2-related kinase). Lidské CDK a parazitální CRK sdílí vysoké procento homologie. Rozdíly mezi CDK a CRK způsobují strukturální odlišnosti, ze kterých by mohla plynout rozdílná afinita inhibitorů. Inhibitory CRK, které by neovlivňovaly lidské CDK, by byly dobrým terapeutickým cílem. Ačkoli bylo prokázáno, že některé inhibitory CDK (olomoucín, roskovitin) inhibují CRK3 u rodů *Leishmania* a *Trypanosoma*, předpokládá se, že mezi sloučeninami, u kterých nebyla prokázána inhibiční aktivita proti lidským CDK, by se mohly najít nějaké CRK-specifické inhibitory (Knockaert *et al.*, 2002; Hammarton *et al.*, 2003).

Příkladem onemocnění kardiovaskulárního systému je hypertrofie srdce, která je spojena s větší velikostí diferencovaných srdečních myocytů, která může vést k poruchám srdeční činnosti a srdečnímu selhání. Růst myocytů srdečního svalu je spojen s intenzivní transkripcí a translací, což je důsledkem deregulace CDK9, která se účastní fosforylace CTD RNA-polymerázy II a stimuluje elongační fázi transkripce. Inhibitory CDK9 by tak mohly být vhodným terapeutickým cílem pro léčbu hypertrofie srdce (Kryštof *et al.*, 2009). Některá další onemocnění kardiovaskulárního systému jako je ateroskleróza nebo restenóza jsou způsobena abnormální proliferací buněk hladké svaloviny, která je důsledkem deregulace buněčného cyklu. Je prokázáno, že inhibitory CDK flavopiridol a olomoucín inhibují proliferaci buněk vaskulární hladké svaloviny (Knockaert *et al.*, 2002), stejně jako pyrazolopyrimidin LGR1406 (Sroka *et al.*, 2009).

Dalším typem onemocnění, která jsou spojena s deregulací aktivity CDK a u kterých by tedy mohly najít uplatnění inhibitory CDK, jsou neurogenerativní choroby (Alzheimerova choroba, amyotrofní laterální skleróza). Pro správný vývoj neuronů je nezbytná bazální aktivita CDK5, která je aktivována proteiny p35 a p39. V některých případech však dochází ke štěpení p35 a p39 kalcipainy na p25 a p29, které způsobují hyperaktivaci CDK5. Tato deregulace CDK5 v neuronech spouští apoptózu (Knockaert *et al.*, 2002).

Glomerulonefritidy tvoří skupinu zánětlivých onemocnění ledvin. Pro některé typy glomerulonefritid (např. IgA nefropatie) je charakteristická abnormální proliferace

mezangiálních buněk a zvýšená produkce matrix, která vede k narušení jejich správné funkce. Bylo prokázáno, že CDK inhibitor roskovitin tlumí proliferaci mezangiálních buněk, redukuje tvorbu buněčné matrix, a tím dochází ke zlepšení funkce ledvin (Pippin *et al.*, 1997; Clough, 2002; Knockaert *et al.*, 2002).

Terapeutické uplatnění zřejmě najdou inhibitory CDK i v případě léčby zánětů a chronických a autoimunitních zánětlivých onemocnění. Primárně je zánět obranným imunitním mechanismem organismu vůči infekci různými patogeny, avšak může dojít k jeho přechodu do chronické fáze, která narušuje i zdravé tkáně. Inhibitor CDK roskovitin se ukázal jako potenciální protizánětlivá sloučenina, protože podporuje apoptózu hlavních efektorových buněk, neutrofilů, *in vitro*, což je nezbytné pro ukončení zánětlivé reakce (Leitch *et al.*, 2009).

3 CÍL PRÁCE

Cílem experimentální části diplomové práce bylo ověření biologických účinků vybraných pyrazolopyrimidinových inhibitorů CDK na buněčnou nádorovou linii *in vitro* a ověření inhibiční aktivity testovaných inhibitorů vůči CDK.

4 MATERIÁL

4.1 Přístrojové vybavení

Při zpracovávání experimentální části diplomové práce byly využity následující přístroje: flowbox s vertikálním prouděním vzduchu TC 48 (Gelaire), CO₂ inkubátor (Sanyo), centrifuga BR4i (Jouan), ultrazvukový homogenizátor Sonopuls HD2200 (Bandelin), spektrofotometr Helios β (UNICAM), aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad), blotovací aparatura Mini Trans-Blot Cell (BioRad), vyvolávací automat XR 24 PRO (Dürr Dental AG), průtokový cytometr Cell Lab Quanta™ SC – MPL (Beckman Coulter), termostat na mikrotitrační destičky Thermomixer Comfort (Eppendorf), Image Reader BAS-1800 (Fujifilm), fluorescenční reader pro mikrotitrační destičky Fluoroskan Ascent (Thermo Labsystems), scintilační počítač Beckman LS6500 (Beckman) a fluorescenční mikroskop Olympus BX50 (Olympus).

4.2 Použité chemikálie

Při experimentech byly použity následující chemikálie: Mowiol 4-88 od firmy Calbiochem; KH₂PO₄, Na₂B₄O₇·10H₂O od firmy Chemapol; Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetální sérum od firmy Invitrogen; kyselina chlorovodíková, glycerol, chlorid draselný, laurylsíran sodný (SDS), trichloroctová kyselina (TCA) od firmy Lach-Ner; ³H uridin a ¹⁴C thymidin od společnosti M.G.P.; [γ -³³P]ATP, akrylamid, glycin, piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonová kyselina) (PIPES), Tween 20, tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) od firmy MP Biomedicals; scintilační koktejl ULTIMA GOLD™ od firmy Packard Biosciences; ethanol, kyselina fosforečná, methanol, chlorid sodný, Na₂HPO₄·12H₂O od firmy Penta; 2-merkptoethanol od firmy Serva; 2-glycerolfosfát, 4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina (HEPES), 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU), acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylkumarin (Ac-DEVD-AMC), acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyd (Ac-DEVD-CHO), aprotinin, peroxodisíran amonný, bromfenolová modř, hovězí sérový albumin (BSA), 4',6-diamidino-2-fenylindol dihydrochlorid (DAPI), dimethylsulfoxid (DMSO), dithiothreitol (DTT), ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), ethylenglykoltetraoctová kyselina (EGTA), etoposid, Histon III-S, hydroxid draselný, leupeptin, N,N'-methylenbisakrylamid, fluorid sodný, nocodazol, Nonidet P-40, penicilin/streptomycin, fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF), propidium jodid, ribonukleáza A, tetramethylethylendiamin, Triton X-100, trypsin od firmy Sigma Aldrich.

4.3 Použité roztoky

V experimentální části diplomové práce byly použity následující roztoky: PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄·12 H₂O, 2 mM KH₂PO₄ (pH = 7,4 – 7,5); TBS: 137 mM NaCl, 20 mM TRIS (pH=6,8); 2x kinázový pufr pro kinázový inhibiční test: 100 mM Hepes (pH = 7,4), 20 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 20 mM 2-glycerolfosfát, 2 mM NaF (pH = 7,4); 2x reakční pufr pro kinázový inhibiční test: 2x kinázový pufr, 30 μM ATP, [γ -³³P]ATP; RIPA pufr: 20 mM TRIS pH 7,4, 100 mM NaCl, 2 mM EGTA, 5 mM EDTA, 2 mM NaF, 0,2 % Nonidet P-40 (pH = 7,4), před použitím přidán: 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 μg/ml leupeptin a 10 μg/ml aprotinin; 5x vzorkovací pufr: 0,3 M TRIS pH = 6,8, 10 % SDS, 50 % glycerol, 0,05 % bromfenolová modř, 5 % 2-merkaptoethanol; Elektroforetický pufr: 25 mM TRIS, 192 mM glycin, 0,1% SDS; Blotovací pufr: 25 mM TRIS, 192 mM glycin; Blokovací roztoky: 5% nízkotučné sušené mléko v PBS s 0,1% Tween 20 a 5% BSA v TBS s 0,1% Tween 20; Reakční pufr pro fluorimetrické stanovení aktivity kaspázy 3: 25 mM PIPES/KOH pH = 7,3, 2 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, před použitím přidán: 5mM DTT; Promývací roztoky pro cytometrické techniky: 1% BSA v PBS, 1% BSA v PBS s 0,1% Tween 20, 0,5% BSA v PBS a 2 M HCl s 0,5% Triton X-100; montovací médium Mowiol: 100 mM TRIS pH = 8,5, 25% glycerol, 9 % Mowiol 4-88.

4.4 Použité protilátky

V experimentální části diplomové práce byly použity myší monoklonální protilátky rozlišující proteiny Bcl-2 (klon 100, ředění 1:250), cyklin B1 (ředění 1:50), cyklin E (ředění 1:500), MDM-2 (klon SMP14, ředění 1:250) a PARP-1 (klon F-2, ředění 1:500) a králičí polyklonální protilátka rozlišující protein Mcl-1 (klon S-19, ředění 1:500) od firmy Santa Cruz Biotechnology, myší monoklonální protilátka rozlišující protein Rb (klon 4H1, ředění 1:1000) a králičí polyklonální protilátky rozlišující proteiny fosfo-Rb Ser780 (ředění 1:1000), fosfo-Rb Ser807/811 (ředění 1:250), fosfo-Rb Ser 795 (ředění 1:100), p53 (ředění 1:100) a PUMA (ředění 1:250) od firmy Cell Signaling, myší monoklonální protilátky rozlišující proteiny cyklin A1 (ředění 1:10), p21 (klon 118, ředění 1:500), p53 (klon DO-1, ředění 1:100) a PCNA (klon PC-10, ředění 1:1000) od Dr. B. Vojtěška z Masarykova onkologického ústavu v Brně, myší monoklonální protilátka rozlišující tubulin (klon DM1A, ředění 1:500) a králičí polyklonální protilátka rozlišující protein fosfo-Rb Ser 612 (ředění 1:1000) od firmy Sigma Aldrich, králičí polyklonální protilátka rozlišující protein kaspáza 3 (ředění 1:500) od firmy

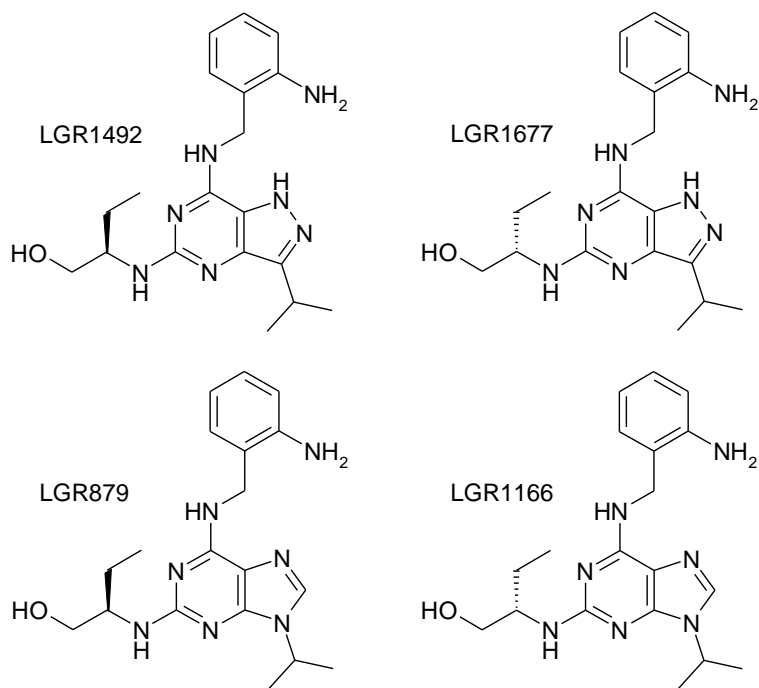
Dako Cytomation a králičí polyklonální protilátka rozlišující protein fosfo-histon H3 Ser10 (ředění 1:200) od firmy Millipore.

Při western blottingu byly primární protilátky vizualizovány pomocí sekundárních protilátek značených křenovou peroxidázou RAM/Px (ředění 1:1000) a SWAR/Px (ředění 1:1000) od firmy Sigma Aldrich. Při cytometrických technikách byly použity primární protilátky konjugované s fluorescenční značkou anti-cyklin A2-FITC (ředění 1:10) od firmy Beckman Coulter/Immunotech a anti-BrdU-FITC (ředění 1:20) od firmy Roche a fluorescenčně značené sekundární protilátky Goat-anti-mouse-FITC (ředění 1:50) od firmy Jackson Laboratories a Goat-anti-rabbit-Alexa Fluor 488 (ředění 1:1000) od firmy Invitrogen. Pro imunocytochemii byla využita fluorescenční sekundární protilátka Goat-anti-rabbit-Texas Red od firmy Jackson Laboratories.

4.5 Použité inhibitory CDK

V experimentální části diplomové práce byly testovány biologické účinky dvou vybraných trisubstituovaných pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinů z kolekce Laboratoře růstových regulátorů, Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého a Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v.v.i.. Všechny inhibitory byly připraveny doc. Ing. Liborem Havlíčkem, CSc. Jedná se o *R*- a *S*- optické izomery s označením LGR1492 a LGR1677 (7-[(2-aminobenzyl)amino]-5-(*R,S*)-[1-hydroxymethyl]propylamino]-3-isopropylpyrazolo[4,3-*d*]pyrimidiny) (Obr. 8). Pro ověření některých vlastností látek LGR1492 a LGR1677 byly pro srovnání testovány i jejich purinové analogy, látky LGR879 a LGR1166 (6-[(2-aminobenzyl)amino]-2-(*R,S*)-[1-hydroxymethyl]propylamino]-9-isopropylpuriny) (Obr. 8).

Inhibitory CDK byly připraveny jako 100 mM roztoky v DMSO a pro experimenty byly podle potřeby ředěny v DMSO nebo v kultivačním médiu.



Obr. 8: Chemická struktura testovaných látek.

4.6 Buněčná linie

Pro experimenty byla zvolena adherentní buněčná linie HCT-116 (The CORE Cell Center) odvozená od lidského kolorektálního karcinomu. Jedná se o buněčnou linii bez mutace v genech pro nádorové supresory p53 a Rb (Gayet *et al.*, 2001; Ikediobi *et al.*, 2006).

Buněčná linie byla kultivována v kultivačním médiu DMEM doplněném o 10% fetální bovinní sérum, penicilin (0,1 mg/ml), streptomycin (0,1 mg/ml) a L-glutamin (0,3 mg/ml) a kultivace probíhala v atmosféře 5% CO₂ při teplotě 37 °C.

5 METODIKA

5.1 Kinázový inhibiční test

Kinázový inhibiční test byl prováděn v mikrotitrační destičce s kulatým dnem. Testované látky LGR1492 a LGR1677 byly ředěny v destilované vodě, látky LGR879 a LGR1166 v 5mM HCl a postupným vyředováním byla připravena koncentrační řada s ředícím faktorem 5x. Do nové mikrotitrační destičky byly přeneseny 2 μ l testované látky o příslušné koncentraci a smíchány s koktejlem obsahujícím 1 μ l histonu (10 mg/ml), 1 μ l enzymu CDK2/cyklin E a 1 μ l destilované vody. Reakce byla nastartována přidáním 5 μ l 2x reakčního pufru a mikrotitrační destička byla přenesena do termostatu, kde byla inkubována po dobu 30 minut při teplotě 30 °C a neustálého třepání na 300 rpm. Po inkubaci byla reakce zastavena přidáním 5 μ l 5% kyseliny fosforečné, mikrotitrační destička byla promíchána a 5 μ l z každé jamky bylo přeneseno na fosfocelulózový papír P-81 (Whatman). Po 5 minutách byl fosfocelulózový papír 3x 5 minut promýván 5% kyselinou fosforečnou, opláchnut 96% ethanolem a ponechán na vzduchu uschnout. Přes noc byl fosfocelulózový papír exponován s citlivou deskou v kazetě a druhý den byl proveden sken pomocí Image Readeru BAS-1800 a vyhodnocení závislosti fosforylace na koncentraci testovaných látek.

Hodnoty IC_{50} udávající inhibiční účinnost jednotlivých testovaných látek byly stanoveny za použití počítačového programu GraphPad Prism (verze 5.0).

5.2 Kultivace, sklizení a lyzace buněk

Při experimentech byly buňky linie HCT-116 ponechány 36 hodin adherovat ke dnu kultivační nádoby, poté jim bylo vyměněno kultivační médium za médium obsahující testovanou látku o dané koncentraci (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M), ve kterém byly buňky inkubovány po dobu 24 hodin. V případě kontrolních buněk bylo do média přidáno pouze odpovídající množství DMSO. Koncentrace DMSO v kultivačním médiu nepřesáhla 0,1 %.

Buňky kultivované pro analýzu metodou western blotting a metodou fluorimetrického stanovení aktivity kaspázy 3 byly mechanicky seškrábány ze dna kultivačních misek, centrifugovány po dobu 10 minut při 1000 g a teplotě 4 °C a 2x promyty roztokem PBS. Buněčné pelety byly uskladněny v – 80 °C nebo zamraženy v tekutém dusíku. Poté byly buňky lyzovány v lyzačním pufru RIPA po dobu 25 minut na ledu a sonikovány pomocí ultrazvukového homogenizátoru. Následně byly vzorky centrifugovány po dobu 25 minut při

14000 g a teplotě 4 °C a metodou podle Bradfordové (Bradford, 1976) byla změřena koncentrace proteinů v lyzátu. K lyzátům určeným pro SDS-PAGE a western blotting byl přidán vzorkovací pufr a poté byly denaturovány 5 minut při teplotě 95 °C.

Buňky kultivované za účelem cytometrické analýzy byly sklizeny trypsinizací. Kultivační médium bylo přeneseno do zkumavek, buňky byly opláchnuty roztokem EGTA, který byl opět sebrán a přidán do zkumavek. Do kultivačních misek byl nepipetován trypsin a buňky byly inkubovány 10 minut při 37 °C, aby došlo k jejich dokonalému odlepení ode dna. Trypsin byl deaktivován přidáním kultivačního média DMEM a celý obsah misky byl opět přidán do zkumek. Vzorky byly centrifugovány 10 min při 1000 g a 4 °C. Poté byly buňky 2x promyty 1% roztokem BSA v PBS a zafixovány vychlazeným 70% ethanolem (pro analýzu buněčného cyklu a inkorporace BrdU) nebo promyty 0,5% roztokem BSA v PBS a fixovány a permeabilizovány vychlazeným 90% methanolem (pro detekci cyklinu B1 a A2 a fosforylovaného histonu H3). Minimální doba fixace byla 30 minut na ledu.

5.3 SDS-PAGE a western blotting

Diskontinuální elektroforéza probíhala v 5% zaostřovacím gelu v kombinaci s 10%, 12,5% nebo 15% dělicím gelem (podle molekulové hmotnosti detekovaných proteinů). Separace proteinů probíhala při napětí 90 V po dobu asi 30 minut, po vstupu proteinů do dělicího gelu bylo napětí zvýšeno na 150 V. Po elektroforetické separaci byly proteiny z gelu přenášeny na nitrocelulózovou membránu (BioRad) metodou western blottingu při proudu 270 mA za stálého chlazení ledem po dobu 2 hodin. Poté byly membrány blokovány 1 hodinu při pokojové teplotě v 5% sušeném mléku v PBS s 0,1% Tween 20 nebo 5% BSA v TBS s 0,1% Tween 20. Imunodetekce proteinů byla provedena pomocí specifických primárních protilátek a sekundárních protilátek značených křenovou peroxidázou. Inkubace s primární protilátkou probíhala přes noc při teplotě 4 °C, inkubace se sekundární protilátkou probíhala 1 hodinu při pokojové teplotě. Po inkubaci s protilátkami byly membrány vždy promyty v PBS/TBS a PBS/TBS s 0,1% Tween 20. Vizualizace byla provedena za použití chemiluminiscenčního kitu ECL (Amersham Pharmacia).

5.4 Fluorimetrické stanovení aktivity kaspázy 3 a 7

Tato metoda je založena na proteolytickém štěpení peptidového substrátu (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylkumarin) kaspázami 3 a 7. Při rozštěpení substrátu dochází

k uvolnění fluorescenční značky AMC (7-amido-4-methylkumarin), která po ozáření světlem o vlnové délce 346 nm emituje záření o vlnové délce 442 nm.

Buněčné lyzáty byly napipetovány do mikrotitrační destičky (množství proteinů asi 15 µg na jamku) a k lyzátům bylo přidáno 100 µl reakčního pufru se 100 µM substrátem Ac-DEVD-AMC. Jako negativní kontrola byly použity buněčné lyzáty inkubované ve 100 µl reakčního pufru se 100 µM substrátem a přidaným 100 µM inhibitorem kaspázy 3 a 7 (Ac-DEVD-CHO). Vzorky byly inkubovány 3 hodiny při pokojové teplotě a poté byla změřena míra fluorescence při 346/442 nm (ex/em) pomocí fluorescenčního readeru pro mikrotitrační destičky Fluoroskan Ascent od firmy Labsystems.

5.5 Cytometrické techniky

5.5.1 Analýza buněčného cyklu

Buňky zafixované 70% ethanolem byly centrifugovány 10 min při 1000 g a 4 °C a promyty 1% BSA v PBS s 0,1% Tween 20. Poté byly buňky resuspendovány v PBS obsahujícím RNázu (200 µg/ml) a propidium jodid (10 µg/ml) a po půlhodinové inkubaci ve tmě při pokojové teplotě byly analyzovány průtokovou cytometrií relativní změny obsahu DNA.

5.5.2 Detekce cyklínů B1 a A2 a fosforylovaného histonu H3

Buňky v 90% methanolu byly centrifugovány 10 min při 1000 g a 4 °C a poté promyty 0,5% BSA v PBS s 0,1% Tween 20.

Pro detekci cyklínu A2 byl buněčný pelet resuspendován ve 100 µl 0,5% BSA v PBS a k buněčné suspenzi bylo přidáno 10 µl protilátky anti-cyklín A2-FITC. Inkubace s protilátkou probíhala 1 hodinu při pokojové teplotě ve tmě.

Při detekci cyklínu B a fosforylovaného histonu H3 po promytí následovala inkubace buněk s primární protilátkou rozlišující protein cyklín B1 resp. fosforylovaný histon H3 1 hodinu při pokojové teplotě. Buňky byly promyty 0,5% BSA v PBS a poté byly inkubovány s fluorescenčně značenou sekundární protilátkou 1 hodinu při pokojové teplotě ve tmě.

Následně byly buňky promyty 0,5% BSA v PBS a nakonec resuspendovány v PBS obsahujícím RNázu (200 µg/ml) a propidium jodid (10 µg/ml). Po půlhodinové inkubaci ve tmě při pokojové teplotě byly analyzovány na průtokovém cytometru.

5.5.3 Inkorporace 5-bromo-2'-deoxyuridinu

Hodinu před ukončením inkubace s testovanou látkou byly buňky naznačeny 10 μM 5-bromo-2'-deoxyuridinem a poté sklizeny a zafixovány (viz kapitola 5.2). Buňky zafixované 70% ethanolem byly centrifugovány 10 min při 1000 g a 4 °C a poté promyty 1% BSA v PBS s 0,1% Tween 20. Buňky byly 30 minut inkubovány s 2 M HCl s 0,5% tritonem X-100 a následně promyty 0,1M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (pH = 8,5) a 1% BSA v PBS s 0,5% Tween 20. Buňky byly inkubovány s protilátkou anti-BrdU-FITC po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě ve tmě a poté promyty 1% BSA v PBS s 0,5% Tween 20. Buněčný pelet byl resuspendován v PBS obsahujícím RNázu (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a propidium jodid (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a po půlhodinové inkubaci při pokojové teplotě ve tmě byly buňky analyzovány na průtokovém cytometru.

5.6 Izolace radioaktivně značené DNA, RNA a mRNA

Buňky linie HCT-116 adherovaly 36 hodin v médiu obsahujícím ^{14}C značený thymidin (62,5 Bq/ml), aby došlo k radioaktivnímu naznačení DNA. Po 36 hodinách bylo médium odsáto a na 24 hodin nahrazeno čistým médiem DMEM s látkou LGR1492 o daných koncentracích. Půl hodiny před koncem inkubace byl do média přidán ^3H značený uridin (0,75 MBq/ml) pro radioaktivní naznačení RNA. Naznačené buňky byly rozděleny na dva podíly, jeden pro izolaci mRNA a druhý pro izolaci celkové DNA a RNA. mRNA byla z buněk vyizolována pomocí kitu Oligotex[®] Direct mRNA Mini Kit od firmy Qiagen (kat.č. 72022). Buňky pro izolaci celkové DNA a RNA byly lyzovány v 1% SDS po dobu 30 minut při pokojové teplotě, následně inkubovány 5 minut při 95 °C a poté byla ke vzorkům přidána 10% trichloroctová kyselina (TCA). Celkový objem byl nanesen na filtr (RTA Spin Filter, Invitex), zcentrifugován a promyt 5% TCA a destilovanou vodou. Celková DNA a RNA byla z filtru vyeluována 1M NaOH (70 °C). Vyizolovaná mRNA a celková DNA a RNA byla přenesena do scintilačního koktejlu a pomocí scintilačního počítače Beckman LS6500 byl změřen radioaktivní signál. Jako kontrola byla proměřena i míra radioaktivity elučních pufrů.

5.7 Imunocytochemie

Buňky byly napěstovány na krycím sklíčku a následně ovlivněny testovanou látkou. Poté byly buňky rostoucí na krycím sklíčku 2x promyty PBS a fixovány vychlazenou směsí acetonu a methanolu (1:1) po dobu alespoň 15 minut v -20 °C. Po odsátí fixační směsi byla sklíčka vysušena a uložena do -20 °C. Pro další práci byly buňky rehydratovány promytím v PBS

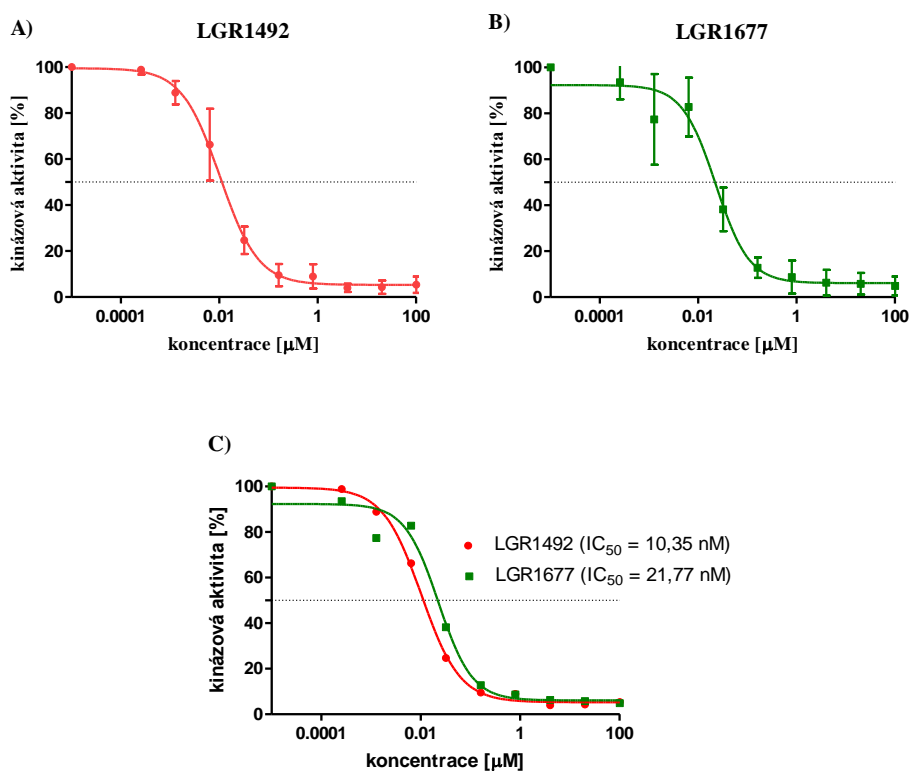
a vyblokovány v kompletním médiu DMEM. Následně byly buňky inkubovány 1 hodinu s králičí polyklonální protilátkou rozlišující protein p53 a poté promyty PBS a PBS s 0,1% Tween 20. Buňky byly inkubovány s fluorescenčně značenou sekundární protilátkou (Goat-anti-rabbit-Texas Red) 1 hodinu ve tmě a opět promyty PBS a PBS s 0,1% Tween 20. Nakonec byla buněčná jádra dobarvena DAPI (10 µg/ml), krycí sklíčka s buňkami promyta destilovanou vodou a přilepena pomocí montovacího média Mowiol na podložní sklo. Preparáty byly pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX50.

6 VÝSLEDKY

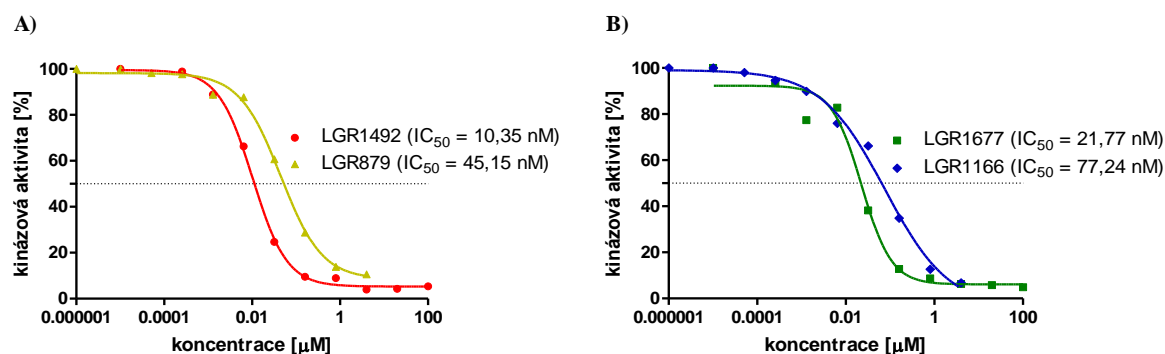
6.1 Stanovení inhibiční aktivity vybraných pyrazolopyrimidinů

Pro vybrané trisubstituované pyrazolopyrimidinové inhibitory LGR1492 a LGR1677 byly enzymologicky stanoveny hodnoty IC_{50} pro inhibici komplexu CDK2/cyklin E (Obr. 9). Hodnota IC_{50} udává koncentraci inhibitoru, která způsobí 50% pokles aktivity studovaného enzymu. Hodnoty byly srovnány s purinovými analogy vybraných látek (LGR879 a LGR1166) (Obr. 10).

Experiment prokázal, že obě pyrazolopyrimidinové sloučeniny LGR1492 a LGR1677 jsou velmi účinnými inhibitory CDK2. Nejvyšší inhibiční aktivity byla naměřena u *R*-izomeru LGR1492, jehož hodnota IC_{50} je asi 10 nM. Hodnota IC_{50} pro *S*-izomer LGR1677 je asi 22 nM. Purinové analogy vybraných látek mají inhibiční aktivitu zhruba 4x nižší.



Obr. 9: Závislost inhibice CDK2 na koncentraci látek LGR1492 (A) a LGR1677 (B) a srovnání inhibiční aktivity látek LGR1492 a LGR1677 (C).



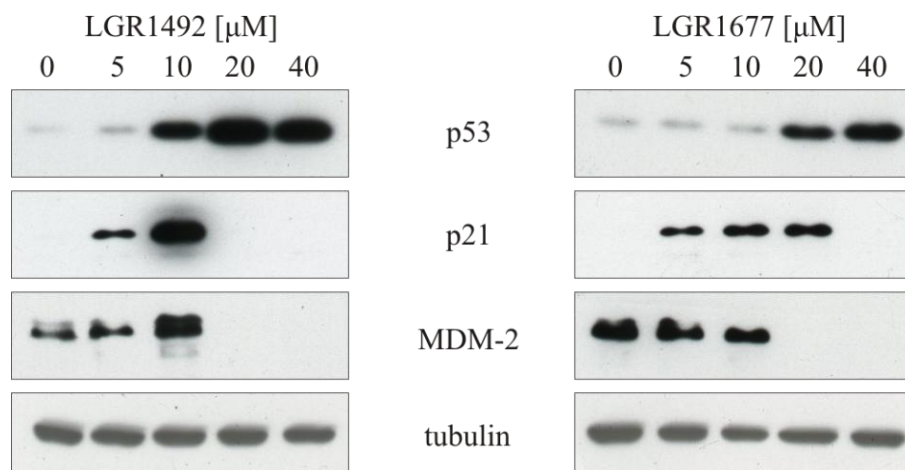
Obr. 10: Srovnání inhibiční aktivity A) látek LGR1492 a LGR879 a B) látek LGR1677 a LGR1166.

6.2 Aktivace nádorového supresoru p53

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.2.2, aktivace proteinu p53 je společnou vlastností celé řady inhibitorů CDK. Vzhledem k nezastupitelné roli tohoto nádorového supresoru v kontrolních a regulačních mechanismech buňky, je právě schopnost aktivace p53 jednou z vlastností, která je u nových inhibitorů CDK ověřována. Pro studium aktivace proteinu p53 byla sledována exprese proteinu v ovlivněných buňkách metodou western blottingu a imunofluorescenční detekce.

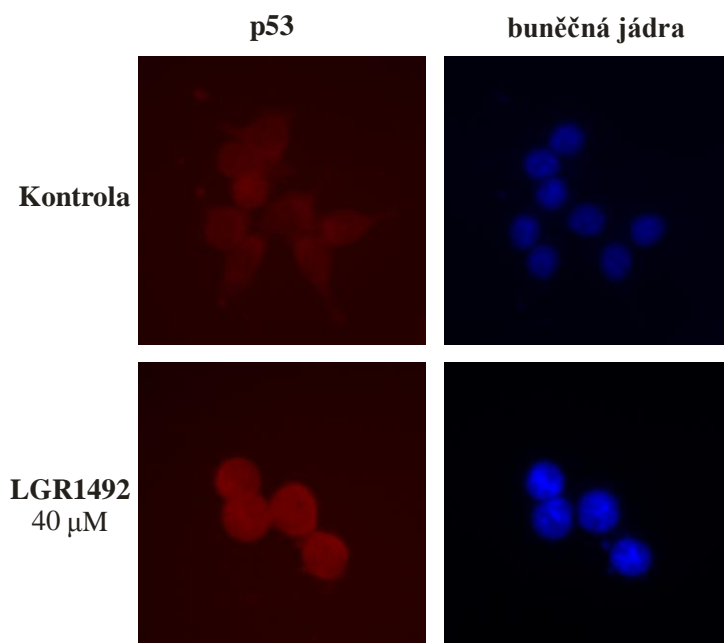
Spolu s hladinou proteinu p53 byla pomocí western blottingu sledována i hladina negativního regulátoru p53, proteinu MDM-2 (Uldrijan *et al.*, 2002) a také přirozeného inhibitoru CDK patřícího do rodiny Cip/Kip, proteinu p21, jehož hladina je regulována p53 (Denicourt *et Dowdy*, 2004).

Hladina proteinu p53 se v buňkách ovlivněných látkou LGR1492 výrazně zvyšovala se vzrůstající koncentrací látky, zatímco účinek látky LGR1677 byl nižší a nárůst hladiny proteinu p53 se objevil až v koncentraci 20 a 40 μM (Obr. 11). Protein p21 byl detekovatelný pouze v buňkách ovlivněných látkou LGR1492 o koncentraci 5 a 10 μM a v buňkách ovlivněných látkou LGR1677 o koncentraci 5 – 20 μM . Hladina proteinu MDM-2 nebyla při ovlivnění buněk nejvyššími koncentracemi testovaných látek detekována (Obr. 11).



Obr. 11: Hladina proteinů p53, p21 a MDM-2 v buňkách HCT-116 po ovlivnění látkou LGR1492 a LGR1677. Jako kontrola rovnoměrného nanesení vzorků byla provedena detekce tubulinu.

Pomocí imunofluorescenční detekce proteinu p53 byla sledována jeho lokalizace a míra exprese v kontrolních buňkách a v buňkách po ovlivnění látkou LGR1492 o koncentraci 40 μM . Zatímco v kontrolních buňkách byl fluorescenční signál p53 slabý a rozptýlený i v cytoplasmě, v buňkách ovlivněných látkou LGR1492 došlo k výraznému nárůstu intenzity fluorescenčního signálu a k jeho akumulaci v buněčném jádře (Obr. 12).



Obr. 12: Imunofluorescenční detekce proteinu p53 v buněčné linii HCT-116. Srovnání kontrolních buněk a buněk po ovlivnění látkou LGR1492. Buněčná jádra byla barvena DAPI. Zvětšení 600x.

6.3 Aktivace apoptózy

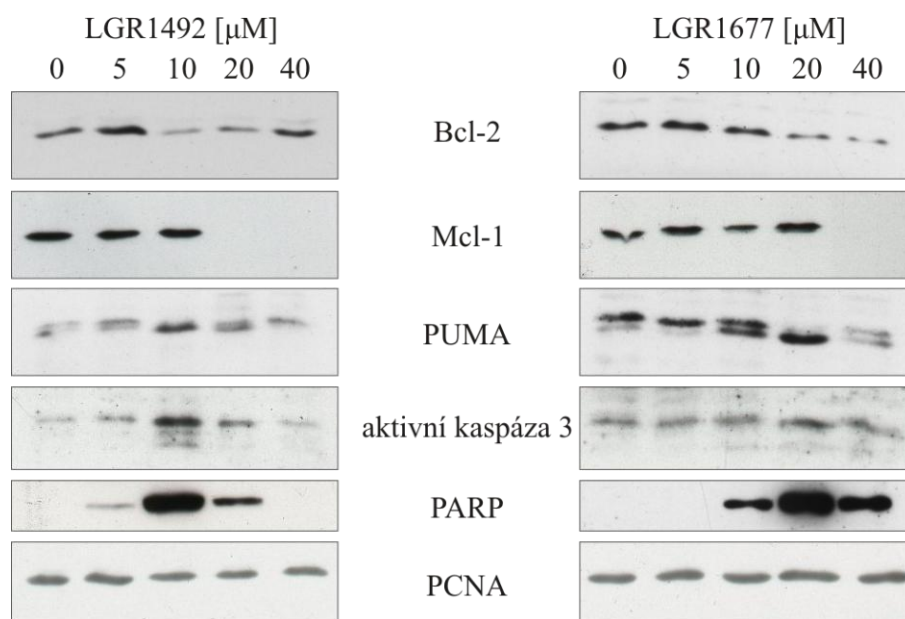
Pro stanovení proapoptotických účinků testovaných látek LGR1492 a LGR1677 byly využity metody sledování exprese vybraných proteinů s proapoptotickou a antiapoptotickou funkcí pomocí western blottingu a fluorimetrické stanovení aktivity kaspáz 3 a 7.

V prvním experimentu byla sledována hladina antiapoptotických proteinů Bcl-2 a Mcl-1 a hladina proapoptotického proteinu PUMA. U buněk ovlivněných látkou LGR1492 odpovídala nejvyšší hladina proapoptotického proteinu PUMA koncentraci 10 μM , zatímco hladina antiapoptotického proteinu Bcl-2 byla v této koncentraci nejnižší. Protein Mcl-1 byl detekovatelný pouze v kontrolních buňkách a buňkách ovlivněných nejnižšími koncentracemi látky LGR1492 (5 a 10 μM). U buněk ovlivněných látkou LGR1677 byla nejvyšší hladina proteinu PUMA detekována při koncentraci 20 μM . U proteinů Bcl-2 a Mcl-1 došlo k poklesu exprese v závislosti na zvyšující se koncentraci látky (Obr. 13).

Dalším bodem při stanovování proapoptotických účinků testovaných látek byla detekce aktivního fragmentu kaspázy 3. V neapoptotických buňkách se kaspáza 3 vyskytuje ve formě neaktivního proenzymu, v apoptotických buňkách dochází k jejímu proteolytickému štěpení aktivačními kaspázami za vzniku aktivního 17kDa fragmentu (Cohen, 1997). V buňkách ovlivněných látkou LGR1492 byla nejvyšší hladina aktivního fragmentu kaspázy 3 detekována v koncentracích 10 a 20 μM , v buňkách ovlivněných látkou LGR1677 byla o něco významnější hladina aktivního fragmentu detekována v koncentraci 20 μM (Obr. 13).

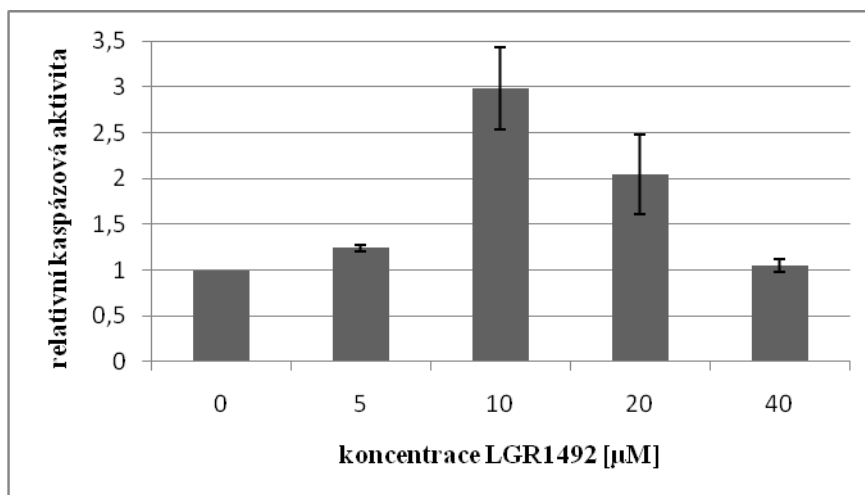
Substrátem aktivní kaspázy 3 je protein PARP (Poly(ADP-ribose)polymerase). Tento protein se účastní procesů oprav DNA. Během apoptózy je celkový 113 kDa PARP štěpen kaspázou 3 na dva inaktivní fragmenty o velikostech 89 kDa a 24 kDa (Soldani *et Scovassi*, 2002). Právě 89 kDa fragment je dalším významným apoptotickým markerem. Fragment proteinu PARP byl detekován v buňkách ovlivněných látkou LGR1492 v koncentracích 5 – 20 μM a nejvyšší hladina tohoto fragmentu byla detekována v koncentraci 10 μM . V buňkách ovlivněných látkou LGR1677 byla nejvýznamnější hladina tohoto fragmentu detekována při koncentraci 20 μM a v menší míře také v koncentraci 40 μM (Obr. 13).

Výsledek detekce štěpného fragmentu proteinu PARP a aktivní kaspázy 3 v buňkách ovlivněných látkami LGR1492 a LGR1677 koreloval s výsledky detekce proteinu PUMA a Bcl-2.

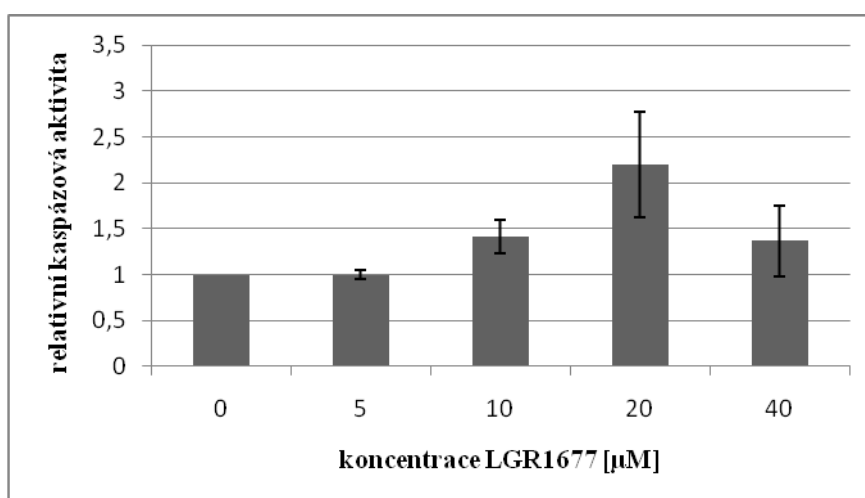


Obr. 13: Analýza aktivace apoptózy pomocí western blottingu. Hladina proteinů Bcl-2, Mcl-1, PUMA, aktivní kaspázy 3 a štěpného fragmentu proteinu PARP v buňkách HCT-116 po ovlivnění látkami LGR1492 a LGR1677. Pro ověření stejné koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích byla provedena detekce PCNA.

Apoptotické účinky látek LGR1492 a LGR1677 byly ověřeny použitím metody fluorimetrického stanovení aktivity kaspázy 3 a 7. Tato metoda potvrdila výsledek western blottingu. Nejvyšší relativní kaspázová aktivita pro látku LGR1492 byla naměřena v koncentraci 10 μM (Obr. 14), zatímco u látky LGR 1677 byla nejúčinnější koncentrace 20 μM (Obr. 15). Absolutní hodnoty fluorescence získané měřením na Fluoroskanu Ascent byly normalizovány podle signálu kontrolního vzorku a převedeny na hodnoty relativní.



Obr. 14: Relativní aktivita kaspázy 3 a 7 v buněčné linii HCT-116 po 24 hodinové kultivaci s látkou LGR1492 v koncentracích 0, 5, 10, 20 a 40 μM. Hladina fluorescence byla měřena po 3 hodinách inkubace.



Obr. 15: Relativní aktivita kaspázy 3 a 7 v buněčné linii HCT-116 po 24 hodinové kultivaci s látkou LGR1677 v koncentracích 0, 5, 10, 20 a 40 μM. Hladina fluorescence byla měřena po 3 hodinách inkubace.

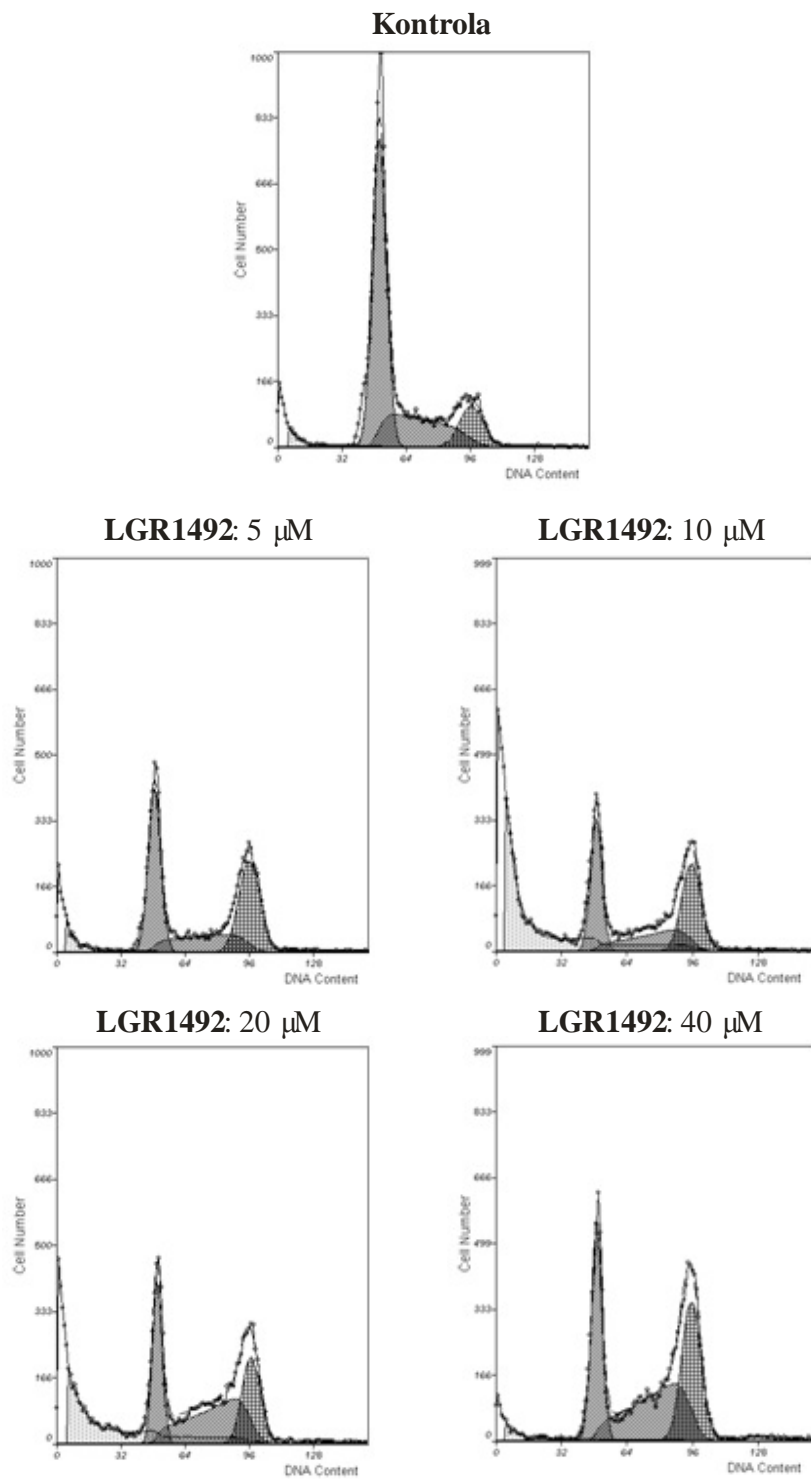
Po zhodnocení vlivu látek LGR1492 a LGR1677 na aktivaci nádorového supresoru p53 a jejich proapoptotických vlastností bylo zjištěno, že vyšší účinnosti dosahuje látka LGR1492, a proto další experimenty byly provedeny pouze s touto látkou.

6.4 Změny v regulaci buněčného cyklu

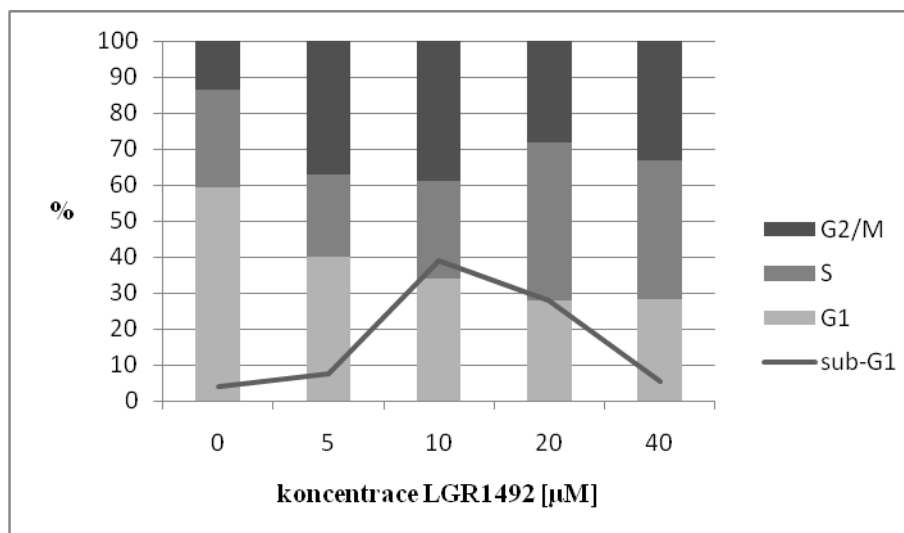
6.4.1 Analýza buněčného cyklu

Buňky linie HCT-116 byly ovlivněny vzestupnými koncentracemi látky LGR1492 na dobu 24 hodin a pomocí průtokové cytometrie u nich byly sledovány změny v buněčném cyklu. Analýza buněčného cyklu byla provedena pomocí barvení ethanolem fixovaných buněk propidium jodidem. Propidium jodid je fluorescenční barvivo, které interkaluje do struktury dvoušroubovice DNA a po ozáření světlem o vlnové délce 488 nm dochází k emisi záření (>560 nm), které je zachycováno detektorem průtokového cytometru. Pomocí jednoparametrové analýzy fluorescenčního signálu propidium jodidu se stanoví obsah DNA v buňce a tím fáze buněčného cyklu, ve které se buňka právě nachází.

Data získaná z měření na průtokovém cytometru byla analyzována pomocí počítačového programu Multicycle AV for Windows (Phoenix Flow Systems). Byly vytvořeny histogramy zastoupení jednotlivých fází buněčného cyklu (Obr. 16) a stanoveny změny v jejich procentuálním zastoupení v závislosti na koncentraci látky LGR1492 (Obr. 17). Z histogramů analýzy buněčného cyklu vyplývá, že u buněk ovlivněných látkou LGR1492 dochází k výraznému poklesu množství buněk v G1 fázi a k nárůstu počtu buněk v pozdní S fázi a fázích G2 a M. V případě buněk ovlivněných látkou LGR1492 o koncentraci 10 μM a 20 μM došlo k prudkému nárůstu sub-G1 populace, která odpovídá apoptotickým buňkám.



Obr. 16: Analýza zastoupení jednotlivých fází buněčného cyklu pomocí programu Multicycle AV for Windows (verze 3.00).



Obr. 17: Procentuální zastoupení jednotlivých fází buněčného cyklu v buňkách HCT-116 po ovlivnění látkou LGR1492. Data získána analýzou pomocí programu Multicycle AV for Windows (verze 3.00).

6.4.2 Detekce cyklínů B1 a A2 a fosforylovaného histonu H3

Pro přesnější stanovení změn v buněčném cyklu u linie HCT-116 ovlivněné látkou LGR1492, byla sledována hladina regulátorů buněčného cyklu cyklínu B1 a cyklínu A2 a jako mitotický marker byl vybrán fosforylovaný histon H3.

Pro detekci cyklínu B1, cyklínu A2 a fosforylace histonu H3 byla využita dvouparametrová analýza umožňující sledování závislosti exprese studovaného proteinu na fázi buněčného cyklu. Cyklíny B1 a A2 a fosforylovaný histon H3 byly detekovány pomocí fluorescenčně značených protilátek (signál FL1) a obsah DNA byl sledován za pomoci fluorescenčního signálu propidium jodidu (signál FL3).

Cyklín B je regulační podjednotkou CDK1 a komplex CDK1/cyklín B je nezbytný pro řádný průchod mezi fázemi G2 a M (Shapiro, 2006). Exprese cyklínu B je zahájena na začátku G2 fáze a svého vrcholu dosahuje na přechodu mezi fázemi G2 a M (Morgan, 2007). Cyklín A v komplexech s CDK1 a CDK2 je nezbytný pro řádný průchod S fází (Shapiro, 2006). Exprese cyklínu A je zahájena v průběhu G1 fáze a maximální hladina se v buňce nachází ve fázích S a G2. Poté je cyklín A v buňce degradován (Morgan, 2007).

Fosforylace Ser-10 N-terminálního řetězce histonu H3 je jedním z markerů probíhající mitózy v buňkách. Je asociována s kondenzací a segregací chromozomů během mitózy. Fosforylace histonu H3 je zahájena během profáze a nejvyšší hladina fosforylace může být

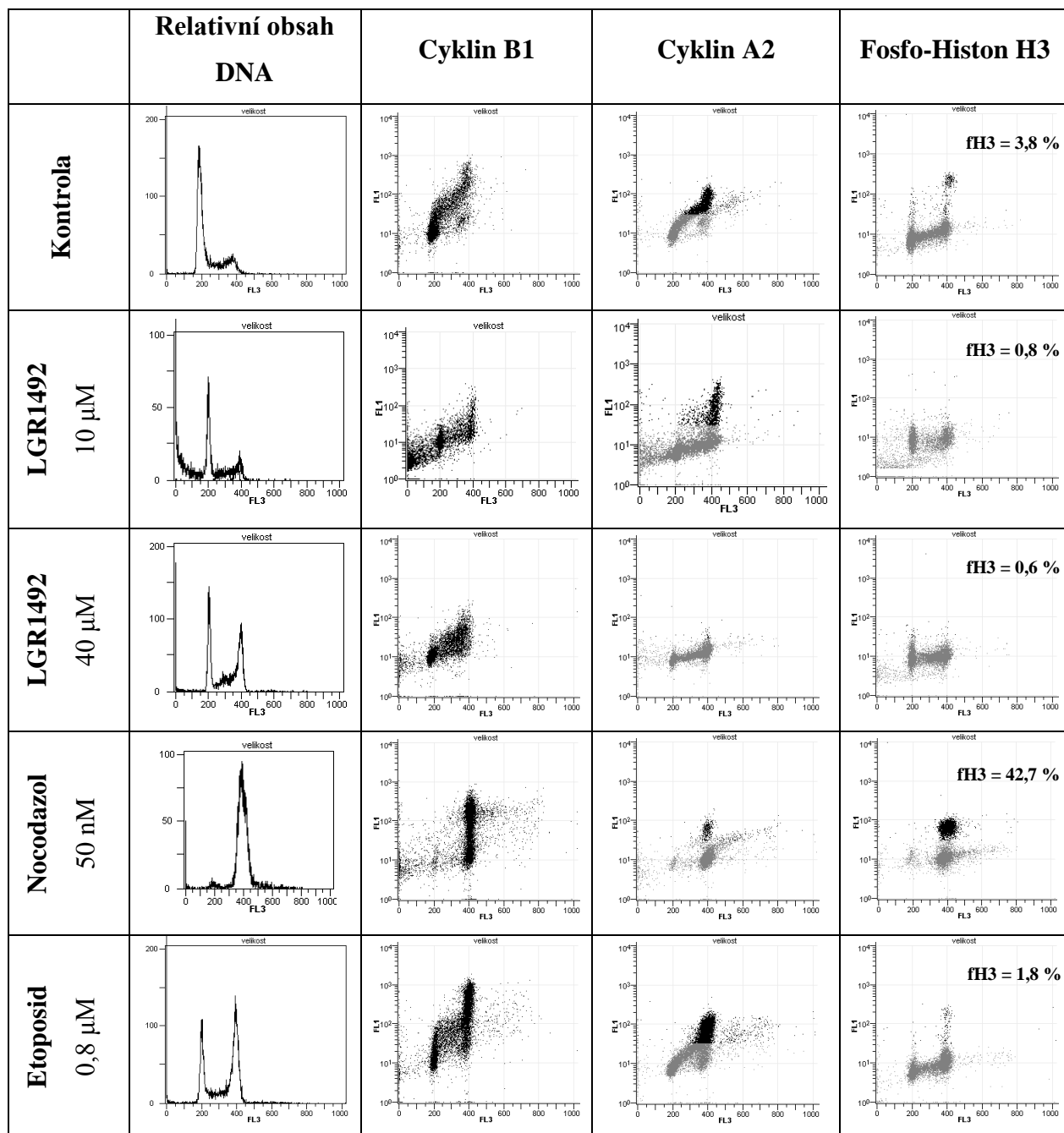
pozorována během metafáze. Poté dochází k postupné defosforylaci, která je dokončena v průběhu telofáze (Nowak *et Corces*, 2004).

Pro srovnání účinku látky LGR1492 byly použity buňky ovlivněné etoposidem a nocodazolem, což jsou látky s dobře známými účinky na buněčný cyklus. Etoposid patří mezi inhibitory topoisomerasy II. Způsobuje poškození DNA, zabraňuje chromatidové separaci a mitotické segregaci (Clarke *et al.*, 1993). Tím dochází k zablokování buněčného cyklu v G2 fázi a k zabránění zahájení mitózy (Bradford *et al.*, 2008). Buňky ovlivněné etoposidem byly zvoleny jako pozitivní kontrola pro detekci cyklinu B a cyklinu A. Nocodazol patří do skupiny tzv. mikrotubulárních jedů. Váže se na β -tubulin, tím brání polymerizaci mikrotubulů a v buňkách tedy nemůže dojít ke správnému sestavení mitotického vřeténka. Díky těmto vlastnostem se nocodazol hojně využívá pro synchronizaci buněk *in vitro*. Buňky ovlivněné nocodazolem jsou zablokovány v G2/M fázi buněčného cyklu (Blajeski *et al.*, 2002), a pro tuto vlastnost byly zvoleny jako pozitivní kontrola pro detekci cyklinu B a fosforylace histonu H3 na Ser10.

U buněk ovlivněných etoposidem a nocodazolem byla detekována výrazná buněčná populace odpovídající buňkám exprimujícím cyklin B1, zatímco cyklin A2 byl ve větší míře detekován pouze u buněk ovlivněných etoposidem. U buněk ovlivněných nocodazolem byla populace buněk exprimujících cyklin A2 velmi malá. Nocodazol způsobuje u buněk zablokování buněčného cyklu ve fázích G2 a M, kdy je hladina cyklinu B v buňkách nejvyšší, zatímco cyklin A je již postupně degradován. Naproti tomu etoposid blokuje buňky již ve fázi G2 a tudíž je v nich možné detekovat jak cyklin B1, tak cyklin A2.

U buněk ovlivněných látkou LGR1492 o koncentraci 10 μ M byla detekována populace odpovídající buňkám exprimujícím cyklin A2, zatímco buňky exprimující cyklin B1 detekovány nebyly. U koncentrace 40 μ M již nebyl detekován cyklin B1 ani cyklin A2 (Obr. 18).

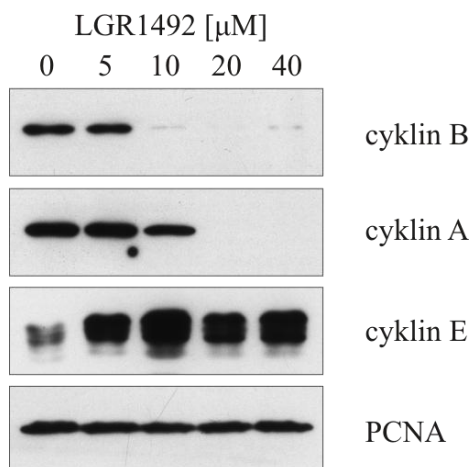
Nejvyšší hladina fosforylace histonu H3 na Ser10 byla podle předpokladu zjištěna v buňkách ovlivněných nocodazolem, který způsobuje zablokování buněčného cyklu ve fázi G2/M. Podíl buněk s fosforylací histonu H3 na Ser10 byl více než 40 %. Naproti tomu v buňkách ovlivněných etoposidem, stejně jako v buňkách ovlivněných látkou LGR1492 jak v koncentraci 10 μ M tak 40 μ M nebyla fosforylace histonu H3 detekována (Obr. 18).



Obr. 18: Účinek látky LGR1492, etoposidu a nocodazolu na buněčný cyklus linie HCT-116. Cytometrická detekce cyklinu B1, cyklinu A2 a fosforylovaného histonu H3. FL3 odpovídá signálu propidium jodidu, FL1 odpovídá signálu fluorescenční značky konjugované s protilátkou (FITC, Alexa 488), fH3 udává procentuální zastoupení buněk pozitivních na fosforylaci histonu H3 na Ser10.

Pro ověření správnosti detekce cyklinu B1 a cyklinu A2 v buňkách ovlivněných látkou LGR1492 pomocí průtokové cytometrie, byla provedena analýza western blotting (Obr. 19). Detekce cyklinu B a A korelovala s výsledky z průtokové cytometrie. V buňkách ovlivněných

látkou LGR1492 o koncentraci 10 μM byl detekován cyklin A, zatímco cyklin B detekován nebyl. V buňkách ovlivněných látkou LGR1492 o koncentraci 40 μM nebyl detekován cyklin B ani cyklin A. Pro doplnění byla provedena ještě detekce cyklinu E. V buňkách ovlivněných látkou LGR1492 došlo k výraznému zvýšení hladiny cyklinu E oproti kontrole, což zřejmě souvisí s inhibicí komplexu CDK2/cyklin E, který se účastní fosforylace cyklinu E, která je nezbytná pro jeho následnou degradaci (Morgan, 2007).



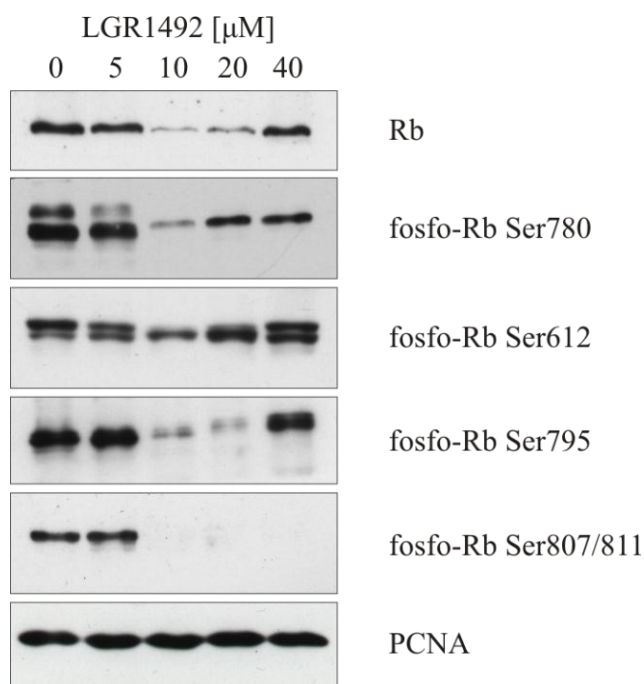
Obr. 19: Hladina cyklinu B, A a E v buňkách HCT-116 po ovlivnění látkou LGR1492. Pro ověření stejné koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích byla provedena detekce PCNA.

6.4.3 Změny ve fosforylaci proteinu Rb

Retinoblastomový protein (Rb) hraje klíčovou úlohu v regulaci buněčného cyklu. Interaguje s transkripčním faktorem E2F, tím brání transkripci S-fázových genů a tedy přechodu z fáze G1 do fáze S. CDK4 a CDK6 v komplexu s cyklinem D zprostředkovávají první vlnu fosforylace proteinu Rb, která umožňuje průchod G1 fází. Komplex Rb-E2F uvolňuje transkripční represi, dochází k degradaci proteinů Cip/Kip a je zahájena aktivace komplexu CDK2/cyklin E (Shapiro, 2006). V další vlně dochází k fosforylaci proteinu Rb komplexem CDK2/cyklin E, která narušuje komplex Rb-E2F, aktivuje transkripční faktor E2F a dochází k zahájení transkripce S-fázových genů (Shapiro, 2006). Pro inaktivaci proteinu Rb je nezbytná fosforylace nejméně dvěma odlišnými komplexy CDK/cyklin (Schmitz *et al.*, 2006).

Fosforylace proteinu Rb byla sledována pomocí králičích polyklonálních protilátek specifických pro fosforylační místa na proteinu Rb. Pokles fosforylace proteinu Rb na Ser780, Ser612 a Ser795 koreluje s poklesem hladiny celkového proteinu Rb, ke snížení fosforylace dochází pouze na Ser807/811 (Obr. 20). Látko LGR1492 nezpůsobuje výrazné změny ve fosforylaci Rb, protože jejím působením nedochází k ovlivnění přechodu mezi fázemi

G1/S buněčného cyklu. Odlišná fosforylace na Ser807/811 oproti Ser780, Ser612 a Ser795 je způsobena CDK inhibičními vlastnostmi látky LGR1492.

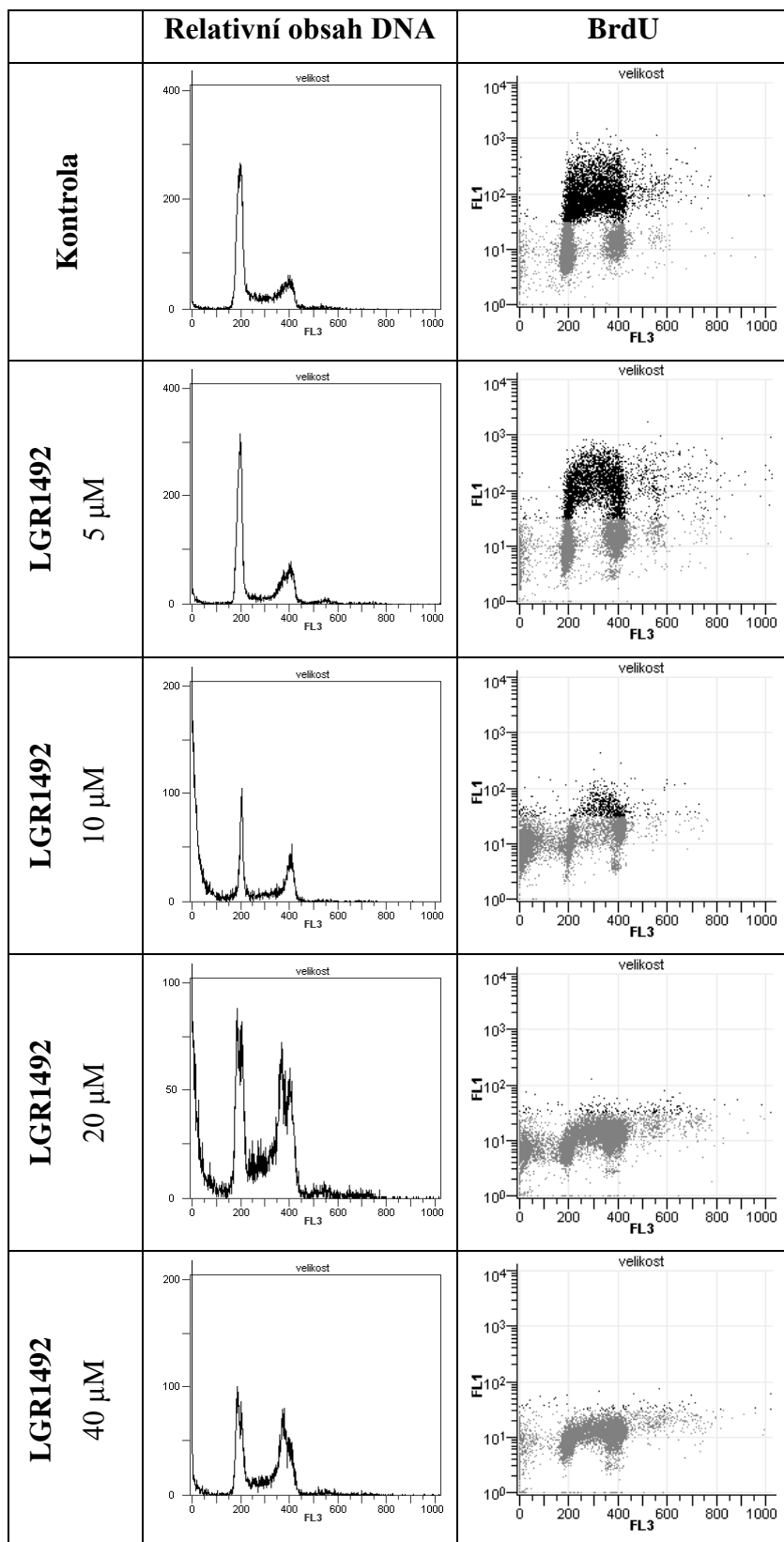


Obr. 20: Hladina proteinu Rb, fosforylovaného proteinu Rb na Ser780, Ser612, Ser795 a Ser807/811 v buňkách HCT-116 ovlivněných látkou LGR1492. Pro ověření stejné koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích byla provedena detekce PCNA.

6.5 Regulace replikace a globální transkripce

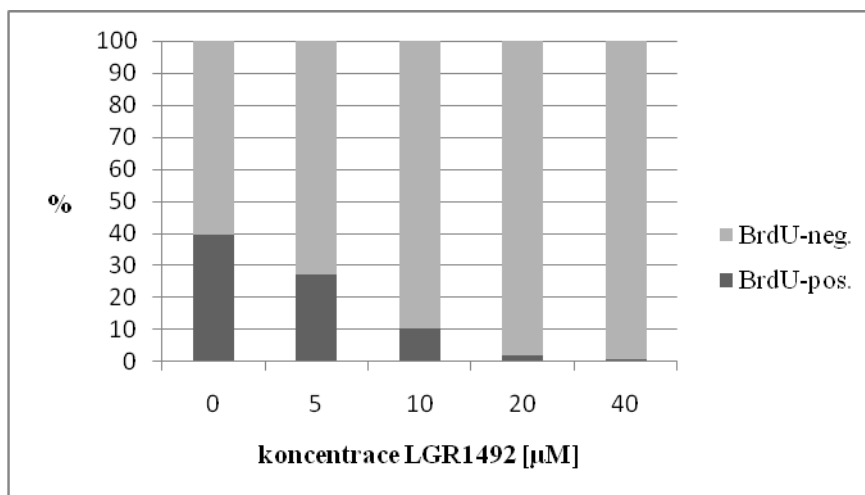
Pro stanovení vlivu látky LGR1492 na replikaci DNA, byla měřena inkorporace 5-bromo-2'-deoxyuridinu (BrdU). BrdU se inkorporuje do DNA dělících se buněk během S fáze buněčného cyklu, a proto je velmi často využívaným markerem syntézy DNA.

Experiment prokázal, že zvyšující se koncentrace látky LGR1492 způsobuje rapidní pokles aktivně se replikujících buněk (Obr. 21). Zatímco v kontrolních buňkách je podíl aktivně se replikujících buněk skoro 40 %, při působení látky LGR1492 o koncentraci 10 μ M je těchto buněk již pouze 10 % a při koncentraci 40 μ M necelé 1 % (Obr. 22).



Obr. 21: Změny v replikaci u buněk HCT-116 po ovlivnění látkou LGR1492.

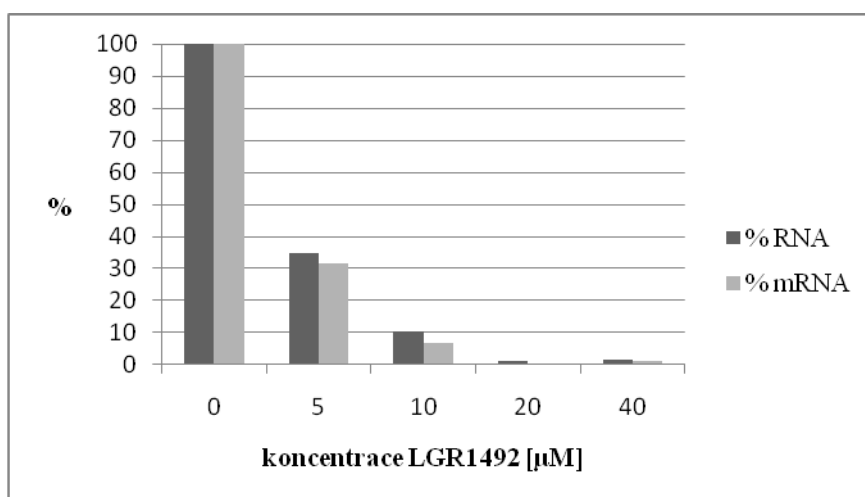
FL3 odpovídá signálu propidium jodidu, FL1 odpovídá signálu fluoresceinisothiokyanátu, který byl použit jako fluorescenční značka konjugovaná s protilátkou anti-BrdU.



Obr. 22: Úroveň replikace v buňkách HCT-116 po ovlivnění LGR1492 po dobu 24 hodin. Označení BrdU-pos. odpovídá aktivně se replikujícím buňkám s inkorporovaným 5-bromo-2'-deoxyuridinem, BrdU-neg. zahrnuje buňky bez inkorporovaného BrdU.

Pro studium transkripce byla využita metoda izolace radioaktivně naznačené mRNA, RNA a DNA a následného měření radioaktivního signálu pomocí scintilačního počítače.

Po 24 hodinové inkubaci s látkou LGR1492 došlo u buněčné linie HCT-116 k prudkému poklesu transkripce. Zatímco látka LGR1492 o koncentraci 5 μM způsobila snížení syntézy mRNA a celkové RNA na zhruba 30 % oproti kontrole, koncentrace 20 μM a 40 μM již způsobily úplné zablokování transkripce (Obr. 23).



Obr. 23: Úroveň transkripce v buňkách HCT-116 po ovlivnění LGR1492 po dobu 24 hodin. Kvůli finanční náročnosti (vysoká cena radioaktivně značených nukleosidů), nebylo provedeno opakování tohoto experimentu. Klesající trendy však naznačují správnost měření.

7 DISKUZE

Cílem praktické části diplomové práce bylo popsání některých účinků vybraných pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinových inhibitorů CDK na buněčné linii HCT-116 odvozené od kolorektálního karcinomu. Linie HCT-116 byla vybrána, protože se jedná o linii, která je často používaná pro *in vitro* testování CDK inhibitorů a nenesí mutaci v genech pro nádorové supresory p53 a Rb, což usnadňuje pochopení buněčného působení inhibitorů CDK (Gayet *et al.*, 2001; Ikediobi *et al.*, 2006).

Se zvyšující se koncentrací látek LGR1492 a LGR1677 dochází v buňkách HCT-116 k výraznému zvýšení hladiny proteinu p53 a k jeho translokaci do jádra. Absence proteinů p21 a MDM-2 při působení nejvyšších koncentrací testovaných látek je způsobena zablokováním transkripce. Zatímco při působení látky LGR1492 dochází k výraznému zvýšení hladiny proteinu p53 již v koncentraci 10 μ M, u blízkého příbuzného inhibitoru roskovitinu dochází ke zvýšené expresi p53 u řady buněčných linií až od koncentrace 20 μ M (Bettayeb *et al.*, 2008a; Kryštof *et al.*, 2005; Paprskářová *et al.*, 2009).

V souvislosti s aktivací proteinu p53 byly sledovány proapoptotické vlastnosti látek LGR1492 a LGR1677, protože p53 v odpovědi na nevratné poškození DNA různými mechanismy může zahájit transkripci proapoptotických genů a vyvolat buněčnou smrt (Haupt *et al.*, 2003). Pomocí různých metod byla sledována hladina proteinů s proapoptotickou (PUMA) a antiapoptotickou (Bcl-2, Mcl-1) funkcí, hladina kaspázy 3, jako jednoho z hlavních efektorů apoptotické kaskády, a proteinu PARP, který je substrátem kaspázy 3. Výsledky experimentů prokázaly, že nejsilnější proapoptotický účinek má látka LGR1492 v koncentraci 10 μ M, podobného účinku dosahuje i látka LGR1677, ale potřebná koncentrace je 20 μ M. Ve vyšších koncentracích dochází patrně k jiným způsobům buněčné smrti (mechanismy nezávislé na kaspázové kaskádě nebo nezávislé na p53) (Bröker *et al.*, 2005).

Dalším bodem při stanovování biologických a biochemických účinků vybraných pyrazolopyrimidinů, bylo určení jejich vlivu na buněčný cyklus buněčné linie HCT-116. Z analýzy buněčného cyklu bylo zjištěno, že látka LGR1492 způsobuje pokles počtu buněk v G1 fázi a nárůst množství buněk nacházejících se ve fázích S, G2 a M, avšak z této analýzy nebylo možné blíže určit podstatu změn v buněčném cyklu. U buněk ovlivněných látkou LGR1492 o koncentraci 10 μ M a 20 μ M došlo k nárůstu populace sub-G1, což je zřejmě důsledkem proapoptotických vlastností látky LGR1492, které byly určeny pomocí western blottingu a fluorimetrického stanovení aktivity kaspázy 3 a 7.

Pro bližší určení změn v deregulaci buněčného cyklu buněčné linie HCT-116 po ovlivnění látkou LGR1492 byla provedena detekce fosforylovaného histonu H3, cyklinu B1 a cyklinu A2. Pro srovnání byly buňky linie HCT-116 ovlivněny etoposidem a nocodazolem, což jsou látky, jejichž účinky na buněčný cyklus a na sledované regulátory buněčného cyklu jsou dobře známé (Bradford *et al.*, 2008). Etoposid působí jako inhibitor topoisomerázy II, který brání chromatidové separaci a mitotické segraci a tím blokuje buněčný cyklus v G2 fázi (Clarke *et al.*, 1993), nocodazol brání správnému sestavení mitotického vřeténka a blokuje buněčný cyklus v G2/M fázi (Blajeski *et al.*, 2002). Fosforylace histonu H3 na Ser10 byla vybrána jako marker mitotického bloku (Nowak *et Corces*, 2004). V buňkách ovlivněných látkou LGR1492 nebyla fosforylace histonu H3 detekována. Z toho vyplývá, že látka LGR1492 nezpůsobuje zablokování buněčného cyklu v M fázi.

V buňkách ovlivněných látkou LGR1492 o koncentraci 10 μM a 40 μM nebyl deteková cyklin B1, jehož syntéza v buňkách se začíná zvyšovat na začátku G2 fáze a nejvyšší hladiny dosahuje v metafázi (Morgan, 2007). Tento výsledek potvrdila i analýza western blotting. Z absence cyklinu B vyplývá, že u buněk linie HCT-116 zřejmě po ovlivnění látkou LGR1492 nedochází k zablokování buněčného cyklu ve fázi G2.

Z cytometrické detekce cyklinu A2 bylo zjištěno, že oproti kontrole dochází v buňkách ovlivněných látkou LGR1492 o koncentraci 10 μM k poklesu počtu buněk exprimujících cyklin A2, zatímco v buňkách ovlivněných látkou LGR1492 o koncentraci 40 μM již cyklin A2 detekován není. S tímto výsledkem korelují i výstupy z analýzy pomocí western blottingu. Syntéza cyklinu A je regulována komplexem CDK2/cyklin E a je v buňkách zahájena na začátku G1 fáze buněčného cyklu, svého maxima dosahuje ve fázích S a G2 a během mitózy postupně dochází k jeho degradaci (Morgan, 2007). Exprese cyklinu A je nezbytná pro zahájení a průběh replikace DNA (Wang *et al.*, 2009). Pokles hladiny cyklinu A v buňkách linie HCT-116 po ovlivnění látkou LGR1492 je zřejmě způsoben postupným snižováním kinázové aktivity komplexu CDK2/cyklin E se zvyšující se koncentrací testované látky, protože látka LGR1492 je vysoce účinným inhibitorem CDK2. Z analýzy úrovně replikace DNA za pomoci inkorporace 5-bromo-2'-deoxyuridinu bylo zjištěno, že látka LGR1492 se zvyšující se koncentrací způsobuje zablokování aktivní replikace buněk HCT-116. V buňkách ovlivněných testovanou látkou o koncentraci 10 μM je podíl aktivně se replikujících buněk asi 10,5 %, zatímco v koncentraci 40 μM je podíl těchto buněk pouze 0,9 %. Tyto výsledky tedy korelují se sníženou expresí cyklinu A při použití nejvyšší koncentrace látky LGR1492 a vyplývá z nich, že látka LGR1492 zřejmě díky inhibici CDK2 způsobuje postupné snížení aktivní replikace a zablokování buněčného cyklu

v S fázi. Zjištěná akumulace cyklinu E v buňkách po ovlivnění látkou LGR1492 pomocí western blottingu je způsobená rovněž inhibicí aktivity komplexu CDK2/cyklin E, která je nezbytná pro fosforylaci a následnou degradaci cyklinu E na začátku S fáze (Morgan, 2007).

Kromě zablokování replikace způsobuje látka LGR1492 se zvyšující se koncentrací u linie HCT-116 také prudký pokles transkripce. Při ovlivnění buněk látkou LGR1492 o koncentraci 5 μM na dobu 24 hodin dochází ke snížení syntézy celkové RNA i mRNA na zhruba 30 % oproti kontrole, nejvyšší koncentrace testované látky (20 μM a 40 μM) potom způsobují úplné zablokování transkripce. Zajímavé je, že pan-selektivní inhibitor CDK roskovitin, který inhibuje transkripční CDK7 i CDK9, způsobuje po 2 hodinách u stejné buněčné linie při použití koncentrace 50 μM pokles syntézy mRNA na asi 25 % oproti kontrole a ani při použití vyšších koncentrací nedochází k úplné inhibici transkripce (Ljungman *et* Paulsen, 2001). Úplné zablokování transkripce při působení látky LGR1492 je tedy možná způsobeno dlouhým časovým intervalem inkubace s testovanou látkou. Zablokování globální transkripce také vysvětluje pokles hladiny některých proteinů, jako např. MDM-2 a p21.

Bližší studium biologických účinků na linii HCT-116 bylo provedeno pouze s látkou LGR1492, u látky LGR1677 se předpokládají stejné vlastnosti, avšak s nižší účinností.

Za pomoci kinázového inhibičního testu bylo zjištěno, že jak látka LGR1492, tak látka LGR1677 jsou velmi účinnými inhibitory komplexu CDK2/cyklin E. Jejich hodnoty IC_{50} jsou 10 nM u látky LGR1492 a 22 nM u látky LGR1677, tzn., že oproti roskovitinu došlo u látky LGR1492 k patnáctinásobnému zvýšení inhibiční aktivity (roskovitin CDK2/E: IC_{50} = 150 nM) (Bettayeb *et al.*, 2008a). Vyšší účinnost inhibice CDK pyrazolopyrimidinových inhibitorů oproti jejich purinovým analogům je patrně způsobena strukturální změnou v kostře studovaných sloučenin. Posun atomu dusíku má patrně vliv na vaznost pyrazolopyrimidinů do ATP-vazebného místa CDK.

Látka LGR1492 se vyznačuje podobným antikinázovým profilem jako roskovitin, avšak dosahuje vyšší účinnosti jak v inhibici CDK, tak v aktivaci proteinu p53 nebo v inhibici transkripce, avšak zatím se nepodařilo přesněji určit mechanismus aktivace apoptotické dráhy a mechanismus buněčné smrti při působení nejvyšších koncentrací testovaných látek. Proto se do budoucna počítá i s dalšími studii s látkami LGR1492 a LGR1677, zejména se zaměřením na vysvětlení typů a mechanismů buněčné smrti, případně i/reverzibility jejich působení.

8 ZÁVĚR

Díky několika nezávislým metodám byly určeny některé biologické účinky dvou nových pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinových inhibitorů CDK na buněčnou linii HCT-116 odvozenou od kolorektálního karcinomu. Jednalo se o *R*-izomer s označením LGR1492 a *S*-izomer s označením LGR1677.

Z výsledků vyplývá, že látka LGR1492 inhibuje aktivitu cyklin-dependentních kináz zapojených jak v regulaci buněčného cyklu, tak i v transkripci. Kinázovým inhibičním testem bylo prokázáno, že obě látky jsou vysoce účinnými inhibitory komplexu CDK2/cyklin E. Hodnota IC_{50} pro látku LGR1492 dosahuje 10 nM a pro látku LGR1677 je 22 nM.

U buněk linie HCT-116 došlo po ovlivnění látkou LGR1492 k zablokování buněčného cyklu v S fázi a se zvyšující se koncentrací testované látky docházelo k postupnému zablokování replikace i transkripce. Látka LGR1492 způsobuje prudké zvýšení hladiny nádorového supresoru p53 a jeho akumulaci v jádře. Ze studia aktivace apoptotické dráhy dvěma nezávislými metodami vyplynulo, že látka LGR1492 nejúčinněji spouští apoptózu v koncentraci 10 μ M, při vyšších koncentracích patrně dochází k jinému typu buněčné smrti.

I když bližší studium účinků bylo provedeno pouze s látkou LGR1492 a u látky LGR1677 byly sledovány pouze inhibiční vlastnosti vůči komplexu CDK2/cyklin E, účinnost aktivace p53 a proapoptotické vlastnosti, tak z těchto výsledků vyplývá, že látka LGR1677 zřejmě dosahuje stejných biologických vlastností jako LGR1492, avšak její účinnost je nižší.

9 POUŽITÁ LITERATURA

- Agbottah, E., de La Fuente, C., Nekhai, S., Barnett, A., Gianella-Borradori, A., Pumfery, A., Kashanchi, F. (2005): Antiviral activity of CYC202 in HIV-1-infected cells. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 3029 – 3042.
- Ali, S., Heathcote, D.A., Kroll, S.H.B., Jogalekar, A.S., Scheiper, B., Patel, H., Brackow, J., Siwicka, A., Futcher, M.J., Periyasamy, M., Tolhurst, R.S., Kanneganti, S.K., Snyder, J.P., Liotta, D.C., Aboagye, E.O., Barret, A.G.M., Coombes, R.Ch. (2009): The development of a selective cyclin-dependent kinase inhibitor that shows antitumor activity. *Cancer Research* 69: 6208 – 6215.
- Babu, P.A., Narasu, M.L., Srinivas, K. (2007): Pyridines, pyridazines and guanines as CDK2 inhibitors: a review. *Archive for Organic Chemistry ARKIVOC* 2007: 247 – 265.
- Bettayeb, K., Sallam, H., Ferandin, Y., Popowycz, F., Fournet, G., Hassan, M., Echalié, A., Bernard, P., Endicott, J., Joseph, B., Meijer, L. (2008a): N-&-N, a new class of cell death-inducing kinase inhibitors derived from the purine roscovitine. *Molecular Cancer Therapeutics* 7: 2713 – 2724.
- Bettayeb, K., Oumata, N., Echalié, A., Ferandin, Y., Endicott, J.A., Galons, H., Meijer, L. (2008b): CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Oncogene* 27: 5797 – 5807.
- Blagosklonny, M.V. (2004): Flavopiridol, an inhibitor of transcription: Implications, problems and solutions. *Cell Cycle* 3: 1537 – 1542.
- Blajeski, A.L., Phan, V.A., Kittke, T.J., Kaufmann, S.H. (2002): G1 and G2 cell-cycle arrest following microtubule depolymerization in human breast cancer cells. *The Journal of Clinical Investigation* 110: 91 – 99.
- Bradford, J.A., Clarke, S.T., Hill, D., Chen, X.T. (2008): Characterization of DNA content, cyclin B1 and phosphorylated histone H3 with direct S-phase using EdU incorporation in multiparameter testing of cell lines with cell cycle blocking agents. Invitrogen, poster.

- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of mikrogram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248 – 254.
- Brasca, M.G., Albanese, C., Alzani, R., Amici, R., Avanzi, N., Ballinari, D., Bischoff, J., Borghi, D., Casale, E., Croci, V., Fiorentini, F., Isacchi, A., Mercurio, C., Nesi, M., Orsini, P., Pastori, W., Pesenti, E., Pevarello, P., Roussel, P., Varasi, M., Volpi, D., Vulpetti, A., Ciomei, M. (2010): Optimization of 6,6-dimethyl pyrrolo[3,4-*c*]pyrazoles: Identification of PHA-793887, a potent CDK inhibitor suitable for intravenous dosing. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18: 1844 – 1853.
- Bröker, L.E., Kruyt, F.A.E., Giaccone, G. (2005): Cell death independent of caspases: a review. *Clinical Cancer Research* 11: 3155 – 3162.
- Carnero, A. (2002): Targeting the cell cycle for cancer therapy. *British journal of cancer* 87: 129 – 133.
- Clarke, D.J., Johnson, R.T., Downes, C.S. (1993): Topoisomerase II inhibition prevents anaphase chromatid segregation in mammalian cells independently of the generation of DNA strand breaks. *Journal of Cell Science* 105: 563 – 569.
- Clough, J. (2002): CDK inhibitor shows promise for inflammatory kidney disease. *Drug Discovery Today* 7: 789 – 790.
- Cohen, G.M. (1997): Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal* 326: 1 – 16.
- Čapek, P., Otmar, M., Masojídková, M., Votruba, I., Holý, A. (2003): A facile synthesis of 9-deaza analogue of olomoucine. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 68: 779 – 791.
- David-Pfeuty, T. (1999): Potent inhibitors of cyclin-dependent kinase 2 induce nuclear accumulation of wild-type p53 and nucleolar fragmentation in human untransformed and tumor-derived cells. *Oncogene* 18: 7409 – 7422.

- Davies, T.G., Bentley, J., Arris, Ch.E., Boyle, F.T., Curtin, N.J., Endicott, J.A., Gibson, A.E., Golding, B.T., Griffin, R.J., Hardcastle, I.R., Jewsbury, P., Johnson, L.N., Mesguishe, V., Newell, D.R., Noble, M.E.M., Tucker, J.A., Wang, L., Whitfield, H.J. (2002): Structure-based design of a potent purine-based cyclin-dependent kinase inhibitor. *Nature Structural Biology* 9: 745 – 749.
- De Azevedo, W.F. Jr., Mueller-Dieckmann, H.J. Schulze-Gahmen, U., Worland, P.J., Sausville, E., Kim, S.H. (1996): Structural basis for specificity and potency of a flavonoid inhibitor of human CDK2, a cell cycle kinase. *Proceedings of the National Academy of Science* 93: 2735 – 2740.
- De Azevedo, W.F., Leclerc, S., Meijer, L., Havlíček, L., Strnad, M., Kim, S.H. (1997): Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: Crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *European Journal of Biochemistry* 243: 518 – 526.
- Denicourt, C., Dowdy, S.F. (2004): Cip/Kip proteins: more than just CDKs inhibitors. *Genes & Development* 18: 851 – 855.
- Dickson, M.A., Schwartz, G.K. (2009): Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy. *Current Oncology* 16: 36 – 43.
- Dwyer, M.P., Paruch, K., Alvarez, C., Doll, R.J., Keertikar, K., Duca, J., Fischmann, T.O., Hruza, A., Madison, V., Lees, E., Parry, D., Seghezzi, W., Sgambellone, N., Shanahan, F., Wiswell, D., Guzi, T.J. (2007): Versatile templates for the development of novel kinase inhibitors: Discovery of novel CDK inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 17: 6216 – 6219.
- Fischer, P.M., Endicott, J., Meijer, L. (2003): Cyclin-dependent kinase inhibitors. *Progress in Cell Cycle Research* 5: 235 – 248.
- Fry, D.W., Harvey, P.J., Keller, P.R., Elliott, W.L., Meade, M., Trachet, E., Albassam, M., Zheng, X., Leopold, W.R., Pryer, N.K., Toogood, P.L. (2004): Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics* 3: 1427 – 1437.
- Galons, H., Oumata, N., Meijer, L. (2010): Cyclin-dependent kinase inhibitors: a survey of recent patent literature. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 20: 377 – 404.

- Gayet, J., Zhou, X.P., Rolland, S., Hoang, J.M., Cottu, P., Hamelin, R. (2001): Extensive characterization of genetic alterations in series of human colorectal cancer cell lines. *Oncogene* 20: 5025 – 5032.
- Hammarton, T.C., Mottram, J.C., Doerig, Ch. (2003): The cell cycle of parasitic protozoa: potential for chemotherapeutic exploitation. *Progress in Cell Cycle Research* 5: 91 – 101.
- Hampl, F., Paleček, J. (2007): *Farmakochemie*, s. 38 – 57, VŠCHT Praha.
- Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z., Haupt, Y (2003): Apoptosis – p53 network. *Journal of Cell Science* 16: 4077 – 4085.
- Havlíček, L., Hanuš, J., Veselý, J., Leclerc, S., Meijer, L., Shaw, G., Strnad, M. (1997): Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: Synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* 40: 408 – 412.
- Havlíček, L., Fuksova, K., Kryštof, V., Orsag, M., Vojtesek, B., Strnad, M. (2005): 8-azapurines as new inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13: 5399 – 5407.
- Ikediodi, O.N., Davies, H., Bignell, G., Edkins, S., Stevens, C., O'Meara, S., Santarius, T., Avis, T., Barthorpe, S., Brackenbury, L., Buck, G., Butler, A., Clements, J., Cole, J., Dicks, E., Forbes, S., Gray, K., Halliday, K., Harrison, R., Hills, K., Hinton, J., Kosmidou, V., Lugg, R., Menzies, A., Mironenko, T., Parker, A., Perry, J., Raine, K., Richardson, D., Shepherd, R., Small, A., Smith, R., Solomon, H., Stephens, P., Teague, J., Tofts, C., Varian, J., Webb, T., West, S., Widaa, A., Yates, A., Reinhold, W., Weinstein, J.N., Stratton, M.R., Futreal, P.A., Wooster, R. (2006): Mutation analysis of 24 known cancer genes in the NCI-60 cell line set. *Molecular Cancer Therapeutics* 5: 2606 – 2612.
- Kasten, M., Giordano, A. (2001): Cdk10, a Cdc2-related kinase, associates with the Ets2 transcription factor and modulates its transactivation activity. *Oncogene* 20: 1832 – 1838.

- Kim, D.Ch., Lee, Y.R., Yang, B.S., Shin, K.J., Kim, D.J., Chung, B.Y., Yoo, K.H. (2003): Synthesis and biological evaluations of pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidines as cyclin-dependent kinase 2 inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 38: 525 – 532.
- Knockaert M., Greengard P., Meijer L. (2002): Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends in Pharmacological Sciences* 23: 417 – 425.
- Kryštof, V., McNae, I.W., Walkinshaw, M.D., Fischer, P.M., Müller, P., Vojtesek, B., Orsag, M., Havlíček, L., Strnad, M. (2005): Antiproliferative activity of olomoucine II, a novel 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cellular and Molecular Life Science* 62: 1763 – 1771.
- Kryštof, V., Moravcová, D., Paprskářová, M., Barbier, P., Peyrot, V., Hlobilková, A., Havlíček, L., Strnad, M. (2006): Synthesis and biological activity of 8-azapurine and pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine analogues of myoseverin. *European Journal of Medicinal Chemistry* 41: 1405 – 1411.
- Kryštof, V., Chamrád, I., Jorda, R., Kohoutek, J. (2009): Pharmacological targeting of CDK9 in cardiac hypertrophy. *Medicinal Research Reviews*. V tisku, doi: 10.1002/med.20172.
- Kryštof, V., Uldrijan, S. (2010): Cyclin-dependent kinase inhibitors as anticancer drugs. *Current Drug Targets* 11: 291 – 302.
- Legraverend, M., Grierson, D.S. (2006): The purines: Potent and versatile small molecule inhibitors and modulators of key biological targets. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14: 3987 – 4006.
- Leitch, A.E., Haslett, G., Rossi, A.G. (2009): Cyclin-dependent kinase inhibitor drugs as potential novel anti-inflammatory and pro-resolution agents. *British Journal of Pharmacology* 158: 1004 – 1016.
- Lima, L.M., Barreiro, E.J. (2005): Bioisosterism: A useful strategy for molecular modification and drug design. *Current Medicinal Chemistry* 12: 23 – 49.
- Ljungman, M., Paulsen, M.T. (2001): The cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine inhibits RNA synthesis and triggers nuclear accumulation of p53 that is unmodified at Ser15 and Lys382. *Molecular Pharmacology* 60: 785 – 789.

- Loyer, P., Trembley, J.H., Grenet, J.A., Busson, A., Corlu, A., Zhao, W., Kocak, M., Kidd, V.J., Lahti, J.M. (2008): Characterization of cyclin L1 and L2 interactions with CDK11 and splicing factors: influence of cyclin L isoforms on splice site selection. *Journal of Biological Chemistry* 283: 7721 – 7732.
- Malumbres, M., Carnero, A. (2003): Cell cycle deregulation: a common motif in cancer. *Progress in Cell Cycle Research* 5: 5 – 18.
- Malumbres, M., Pevarello, P., Barbacid, M., Bischoff, J.R. (2007): CDK inhibitors in cancer therapy: what is next? *Trends in Pharmacological Sciences* 29: 16 – 21.
- Malumbres, M., Barbacid, M. (2009): Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer* 9: 153 – 166.
- McInnes, C. (2008): Progress in the evaluation of CDK inhibitors as anti-tumor agents. *Drug Discovery Today* 13: 875 – 881.
- Meijer, L., Bettayeb, K., Galons, H. (2006): R-roscovitine (CYC202, Seliciclib). *Monographs on enzyme inhibitors, volume 2. CDK inhibitors and their potential as anti-tumor agent.* CRC Press, Taylor & Francis. Kapitola 9: 187 – 226.
- Meijer, L., Borgne, A., Mulner, O., Chong, J.P.J., Blow, J.J., Inagaki, N., Inagaki, M., Delcros, J.G., Moulinoux, J.P. (1997): Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *European Journal of Biochemistry* 243: 527 – 536.
- Meijer, L., Raymond, E. (2003): Roscovitine and other purines as kinase inhibitors. From starfish oocytes to clinical trials. *Accounts of Chemical Research* 36: 417 – 425.
- Moravcová, D., Kryštof, V., Havlíček, L., Moravec, J., Lenobel, R., Strnad, M. (2003): Pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidines as new generation of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13: 2989 – 2992.
- Morgan, D.O. (2007): *The cell cycle: Principles of control.* Oxford University Press.
- Nowak, S.J., Corces, V.G. (2004): Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends in Genetics* 20: 214 – 220.

- Paprskářová, M., Kryštof, V., Jorda, R., Džubák, P., Hajdúch, M., Wesierska-Gadek, J., Strnad, M. (2009): Functional p53 in cells contributes to the anticancer effect of the cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine. *Journal of Cellular Biochemistry* 107: 428 – 437.
- Popowycz, F., Fourmet, 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. (2009): Pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazine as a purine bioisostere: access to potent cyclin-dependent kinase inhibitor (R)-roscovitine analogue. *Journal of Medicinal Chemistry* 52: 655 – 663.
- Pippin, J.W., Qu, Q., Meijer, L., Shankland, S.J. (1997): Direct in vivo inhibition of the nuclear cell cycle cascade in experimental mesangial proliferative glomerulonephritis with roscovitine, a novel cyclin-dependent kinase antagonist. *The Journal of Clinical Investigation* 100: 2512 – 2520.
- Senderowicz, A.M., Sausville, E.A. (2000): Preclinical and clinical development of cyclin-dependent kinase modulators. *Journal of the National Cancer Institute* 92: 376 – 387.
- Shapiro, G.I. (2006): Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *Journal of Clinical Oncology* 24: 1770 – 1783.
- Schang, L.M. (2002): Cyclin-dependent kinases as cellular targets for antiviral drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50: 779 – 792.
- Schang, L.M. (2003): The cell cycle, cyclin-dependent kinases, and viral infections: new horizons and unexpected connections. *Progress in Cell Cycle Research* 5: 103 – 124.
- Schmitz, N.M.R., Hirt, A., Aebi, M., Leibundgut, K. (2006): Limited redundancy in phosphorylation of retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin-dependent kinases in acute lymphoblastic leukemia. *The American Journal of Pathology* 169: 1074 – 1079.
- Soldani, C., Scovassi, A.I. (2002): Poly(ADP-ribose)polymerase-1 cleavage during apoptosis: An update. *Apoptosis* 7: 321 – 328.

- Sroka, I.M., Heiss, E.H., Havlíček, L., Totzke, F., Aristei, Y., Pechan, P., Kubbutat, M.H.G., Strnad, M., Dirsch, V.M. (2009): A novel roscovitine derivative potently induces G1-phase arrest in PDGF-BB-activated vascular smooth muscle cells. *Molecular Pharmacology* 77: 255 – 261.
- Tang, L., Li, M.H., Cao, P., Wang, F., Chang, W.R., Nach, S., Reinhardt, J., Ferandin, Y., Galons, H., Wan, Y., Gray, N., Meijer, L., Jiang, T., Liang, D.C. (2005): Crystal structure of pyridoxal kinase in complex with roscovitine and derivatives. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 31220 – 31229.
- Trova, M.P., Barnes, K.D., Barford, C., Benanti, T., Bielaska, M., Burry, L., Lehman, J.M., Murphy, Ch., O'Grady, H., Peace, D., Salamone, S., Smith, J., Snider, P., Toporowski, J., Tregay, S., Wilson, A., Wyle, M., Zheng, X., Friedrich, T.D. (2009): Biaryl purine derivatives as potent antiproliferative agents: Inhibitors of cyclin dependent kinases. Part I. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19: 6608 – 6612.
- Uldrijan, S., Kotala, V., Vojtěšek, B. (2002): Regulace stability a aktivity nádorového supresoru p53. *Chemické listy* 96: 145 – 149.
- Vermeulen, K., Strnad, M., Kryštof, V., Havlíček, L., Van der Aa, A., Nijs, G., Rodrigus, I., Stockman, B., van Onckelen, H., Van Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N. (2002): Antiproliferative effect of plant cytokinin analogues with an inhibitory activity on cyclin-dependent kinases. *Oncogene* 16: 299 – 305.
- Wang, X., Song, Y., Ren, J., Qu, X. (2009): Knocking-Down cyclin A2 by si RNA suppresses apoptosis and switches differentiation pathways in K562 cells upon administration with doxorubicin. *PLoS ONE* 4: 1 – 10.
- Wesierska-Gadek, J., Chamrád, I., Kryštof, V. (2009): Novel potent pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors: a review of the patent literature. *Future Medicinal Chemistry* 1: 1561 – 1581.
- Wesierska-Gadek, J., Kryštof, V. (2009): Selective CDK inhibitors discriminating between cell cycle and transcriptional kinases: Future reality or utopia? *Annals of the New York Academy of Science* 1171: 228 – 241.

Whittaker, S.R., Walton, M.I., Garret, M.D., Workman, P. (2004): The cyclin-dependent kinase inhibitor CYC202 (R-Roscovitine) inhibits retinoblastoma protein phosphorylation, cause loss of cyclin D1, and activates the mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Research* 64: 262 – 272.

Patenty

WO 03/082872 A1: Moravcová, D., Havlíček, L., Kryštof, V., Lenobel, R., Strnad, M.: Novel pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidines, processes for their preparation and methods for therapy.

WO 2004/026877 A1: Paruch, K., Guzi, T., Dwyer, M.O., Doll, R.J., Girijavallabhan, V.M., Mallams, A.K.: Imidazopyrazines as cyclin dependent kinase inhibitors.

WO 2004/108136 A1: Bower, J.F., Cansfield, A., Jordan, A., Parratt, M., Walmsley, L.: Triazolo[1,5-*A*]pyrimidines and their use in medicine.

WO 2008/151304 A1: Jogalekar, A.S., Snyder, J.P., Liotta, D.C., Barrett, A.G., Coombes, R., Ali, S., Siwicka, A., Brackow, J., Scheiper, B.: Selective inhibitors for cyclin-dependent kinases.

WO 2009/034411 A1: Meijer, L., Bettayeb, K., Galons, H., Demange, L., Oumata. N.: Perharidines as CDK inhibitors.

10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ac-DEVD-AMC	Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylcoumarin
Ac-DEVD-CHO	Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyde
ATP	Adenosine triphosphate
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
BSA	Bovine serum albumin
c-Fos	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
CAK	CDK-activating kinase
CDK	Cyclin-dependent kinase
CK1	Casein kinase 1
Cip/Kip	CDK interacting protein/ kinase inhibitory protein
CRK	Cdc2-related kinase
CTD	C-terminal domain
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	Ethylenglycoltetraacetic acid
Erk	Extracellular-signal-regulated kinase
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GSK3- β	Glycogen synthase kinase 3 β
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
HIV-1	Human immunodeficiency virus type 1
HSV	Herpes simplex virus
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Mcl-1	Myeloid-cell leukemia 1
MDM-2	Murine double minute-2
mRNA	Messenger ribonucleic acid
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase

PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PIPES	Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
Rb	Retinoblastoma protein
RNA	Ribonucleic acid
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	Sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TBS	Tris-buffered saline
TCA	Trichloroacetic acid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
VSMC	Vascular smooth muscle cells