

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2015

Bc. Zuzana Skrášková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Léčba maligního melanomu inhibitory
proteinkinas**

Diplomová práce

Bc. Zuzana Skrášková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

Vedoucí práce: Mgr. Ladislava Vymětalová

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Ladislavy Vymětalové a že jsem v seznamu literatury uvedla všechny zdroje, jež byly při zpracování diplomové práce použity.

V Olomouci, dne 23.4. 2015

.....
Zuzana Skrášková

Souhrn

Cyklin-dependentní kinasy (CDK) jsou enzymy nezbytné pro regulaci buněčného cyklu, na funkci těchto kinas je ovšem závislá celá řada dalších buněčných procesů, například transkripce. U mnoha typů nádorů, včetně melanomu, dochází k deregulaci CDK, a tím i k nekontrolovatelnému dělení buněk. Melanom je navíc jedním z nejvíce progresivních typů nádorů, a protože je rezistentní na léčbu konvenční chemoterapií, nabízí se inhibice CDK jako efektivnější způsob léčby.

V této práci byly sledovány účinky čtyř pyrazolopyrimidinových inhibitorů CDK na buněčnou linii G361 odvozenou od melanomu. Vhodnými molekulárně-biologickými a biochemickými metodami, jako je imunoblotting nebo testy aktivity kaspas, bylo zjištěno, že všechny testované látky vykazují inhibiční vlastnosti vůči transkripčním CDK a jsou schopné indukovat apoptosu melanomových buněk. Tyto znaky účinku inhibitorů byly sledovány jak v závislosti na koncentraci, tak i na čase. Ve srovnání s jinými nízkomolekulárními inhibitory, jako je například roskovitin, jsou tyto látky účinné v nižších koncentracích.

Summary

Cyclin-dependent kinases (CDKs) are enzymes necessary for the cell cycle regulation. However, many other cellular processes are CDK dependent, including mRNA transcription. In many types of tumours, including melanoma, these kinases are deregulated and support unlimited cell division. Melanoma is one of the most progressive types of cancer and due to its resistance to conventional chemotherapy, novel therapeutic approaches are being developed. Amongst others, inhibition of CDKs could be a better treatment possibility.

In this study, the effects of four new pyrazolopyrimidine CDK inhibitors have been examined on melanoma cell line G361. Immunoblotting analysis and caspase assays showed potent inhibition of transcriptional CDKs and subsequent apoptosis of melanoma cells. These markers have been analyzed both in a concentration and a time dependent manner. Compared to other CDK inhibitor, roscovitine, these studied pyrazolopyrimidines evinced higher efficiency.

Poděkování

Ráda bych na tomto místě v první řadě poděkovala Mgr. Ladislavě Vymětalové za vedení diplomové práce. Dále pak děkuji doc. RNDr. Vladimíru Kryštofovi, Ph.D. za možnost vypracovat experimentální část práce v jeho laboratoři. Díky patří také Mgr. Radku Jordovi, Ph.D. za trefné a věcné připomínky a především děkuji personálu laboratoře, jmenovitě Janě Hudcové, Olze Hustákové a Dítě Parobkové, za ochotu a poskytnuté cenné praktické rady. Největší poděkování však patří mým rodičům, kteří mi umožnili absolvovat magisterské studium a děkuji svému příteli za nesmírnou psychickou podporu.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	AKTUÁLNÍ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1	Maligní melanom	11
2.1.1	Molekulární podstata vzniku melanomu	12
2.1.2	Možnosti léčby melanomu	17
2.2	CDK a jejich regulace	20
2.2.1	Funkce CDK	22
2.2.2	Nízkomolekulární inhibitory CDK pro cílenou terapii	25
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
3.1	Cíl práce	30
4	MATERIÁL A METODIKA	31
4.1	Přístroje a laboratorní vybavení	31
4.2	Použité chemikálie	31
4.3	Použité roztoky	32
4.4	Použité protilátky	32
4.5	Použitá buněčná linie	33
4.6	Studované inhibitory CDK	33
4.7	Kultivace buněk a jejich ovlivnění	34
4.8	Test cytotoxicity	34
4.9	Sklízení buněk a příprava lyzátu	34
4.10	SDS-PAGE, western blotting	35
4.11	Fluorimetrické stanovení aktivity kaspasy 3 a 7	36
5	VÝSLEDKY	37
5.1	Stanovení cytotoxicity	37
5.2	Měření aktivity kaspasy 3 a 7	38

5.3	Sledování vybraných proteinů souvisejících s inhibicí CDK v závislosti na koncentraci.....	39
5.4	Sledování vybraných proteinů souvisejících s inhibicí CDK v závislosti na čase	42
6	DISKUSE.....	45
7	ZÁVĚR.....	48
8	LITERATURA.....	49
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	58

1 ÚVOD

Maligní melanom je smrtelná forma nádorového onemocnění kůže. Jedná se o jednu z nejvíce progresivních forem rakoviny, jejíž léčba je navíc obtížná. Největší komplikací je vznik metastáz, které se v pozdějších fázích nemoci šíří do vzdálených orgánů a s tím souvisí i způsob léčby. V tomto případě se jedná o klasickou systémovou chemoterapii, vůči které se ale v případě melanomu po krátké době vyvíjí rezistence.

Díky rezistenci a vzrůstající incidenci tohoto onemocnění byla věnována pozornost faktorům, které ovlivňují jeho vznik a také mechanismům a genetickým alteracím, jež mají na rozvoj melanomu největší vliv. Dosud bylo popsáno několik signálních drah, jejichž defekty vedou k deregulaci buněčného cyklu melanocytů. Jedná se o dráhy závislé na růstových faktorech, jejichž konstitutivní aktivace vede k nekontrolovatelnému dělení buněk a ke vzniku melanomu. Součástí těchto signálních drah je celá řada enzymů, proteinkinas, které mohou být mutovány a na které je nová experimentální léčba cílená. Inhibitory proteinkinas tedy mohou regulovat zvýšenou aktivitu daných signálních drah a zastavit buněčné dělení nádorových buněk. Mezi účinné inhibitory proteinkinas s protinádorovým efektem patří například vemurafenib či sorafenib.

Kromě proteinkinas, které jsou součástí výše zmíněných signálních drah, je možné cílit terapii i na cyklin-dependentní kinasy (CDK). Jedná se o enzymy, které regulují buněčný cyklus a v důsledku poškození jejich regulačních mechanismů získávají mnohé buňky neomezený replikační potenciál a stávají se z nich buňky nádorové. Je známo několik typů CDK, které se podílí buď na regulaci buněčného cyklu, nebo transkripce. Po jejich ovlivnění specifickými inhibitory je možné pozorovat zastavení buněčného cyklu nádorových buněk v určité fázi, nebo spuštění programované buněčné smrti. Z inhibitorů CDK jsou známy například abemaciclib, dinaciclib nebo palbociclib. Všechny tyto inhibitory je možné při léčbě nádorových onemocnění použít buď samostatně, nebo v kombinaci s jiným inhibitorem, čímž se snižuje riziko vzniku možné rezistence ke konkrétnímu inhibitoru.

Ačkoli incidence melanomu stále vzrůstá, díky novým poznatkům a odhalení funkcí mutovaných proteinů v nádorových buňkách nedochází ke stejnému nárůstu mortality. Ta v posledních několika letech stagnuje a výhled do budoucna je pro pacienty s maligním melanomem díky neustálému vývoji nových specifických inhibitorů

proteinkinas stále optimističtější. Příspěť malým dílem k charakterizaci účinků nových inhibitorů CDK v buněčné linii lidského melanomu je také cílem této práce.

2 AKTUÁLNÍ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Maligní melanom

Melanomy jsou nádorová onemocnění, která vznikají maligní transformací pigmentových buněk kůže, melanocytů. Zatímco *in situ* a lokálně invazivní melanom je možné odstranit chirurgicky, metastazující onemocnění je obtížné léčit, což se odráží na vysoké mortalitě pacientů s tímto typem nádoru. Strategie pro kontrolu onemocnění je založena především na prevenci a včasné detekci. Aby to ale bylo možné, je nezbytné porozumět základní epidemiologii melanomu. Navíc melanom může vznikat v důsledku různých mechanismů a jejich charakterizace je velice důležitá pro rozvoj a využití racionálních přístupů v jeho léčbě.

Melanom je nádorové onemocnění, jehož incidence (poměr nově vzniklých případů k počtu osob ve sledované populaci za dané časové období) je závislá na geografických podmínkách. Tento fakt zůstává přesvědčivým důkazem, že role environmentálního prostředí při vzniku onemocnění není zanedbatelná. Závislost výskytu melanomu na zeměpisné šířce byla pozorována již ve druhé polovině dvacátého století (Lancaster, 1955; Lancaster *et* Nelson, 1957). V průběhu posledních desetiletí byl zaznamenán celosvětový nárůst incidence melanomu a to o 4 - 6 % ročně. Podle mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer; IARC) má nejvyšší incidenci melanomu Austrálie, a sice 39 nových případů na 100 000 obyvatel/rok, v těsném závěsu se drží Nový Zéland s incidencí 34:100 000/rok. V USA je pak incidence oproti Novému Zélandu poloviční, 17:100 000/rok, co se týká států střední Evropy, pohybuje se incidence mezi 4 - 10:100 000/rok. Nebělošské populace Afriky, Asie a Střední či Jižní Ameriky vykazují konzistentní incidenci 3:100 000/rok. Výskyt melanomu je tedy častější u jedinců světlé pleti než u jedinců s vyšší pigmentací kůže, liší se také v závislosti na věku a pohlaví. Stejný trend jako ve vzrůstající incidenci melanomu se projevuje i v případě mortality, avšak ne tak výrazně. Například v USA mezi lety 1950 – 1990 došlo k pětinasobnému zvýšení incidence melanomu, jeho mortalita však vzrostla pouze dvakrát. Podobná pozorování byla potvrzena i v případech států severní a západní Evropy (Whiteman *et* Green, 2011).

Závažnost onemocnění lze v průběhu rozvoje melanomu klinicky klasifikovat do čtyř fází, které se označují římskými číslicemi od I do IV, přičemž stadium IV je nejzávažnější. Pro stanovení fáze melanomu, ve které se nachází, se přihlíží k několika faktorům. Jedná se zejména o plochu melanomu, jeho hloubku, mitotický index

melanomových buněk a ulceraci. Na základě určení tohoto stupně je pak dále pacientovi stanovena vhodná léčba, může se jednat o chirurgické odstranění melanomu spolu s okolní tkání, radioterapii, chemoterapii, imunoterapii, či cílenou terapii. Fáze I melanomu se vyznačuje nejlepší prognózou, v jejím případě totiž nehrozí riziko vzniku metastáz a pro léčbu je dostačující chirurgický zákrok. V případě fáze II je léčba sice stejná, ale je nutné provést zároveň i biopsii lymfatických uzlin, což je místo prvního výskytu metastáz. Ve fázi III se spolu s místem primárního výskytu melanomu chirurgicky odstraňují i zasažené regionální lymfatické uzliny, navíc je pacientům nasazena imunoterapie interferonem α . Nakonec fáze IV se projevuje výskytem metastáz na mnoha místech organismu, nejčastěji se jedná o lymfatické uzliny, plíce, či mozek. Pacienti nejprve podstupují léčbu chemoterapeutiky, konkrétně se používá cytostatikum dakarbazin. Protože se však melanom vyznačuje vysokým stupněm rezistence ke konvenční chemoterapii, přistupuje se v této fázi i k experimentální léčbě (Dickson *et Gershenwald*, 2011). Ta je možná díky porozumění signálním drahám a jejich deregulacím, které se velkou mírou podílí na neomezeném replikačním potenciálu buněk, jejich schopnosti dělit se bez přítomnosti růstových faktorů a odolávat chemoterapeutickým činidlům. V současné době je tato cílená léčba směřována na proteiny související s regulací buněčného cyklu, především na CDK, nebo na proteiny účastnící se přenosu růstových signálů.

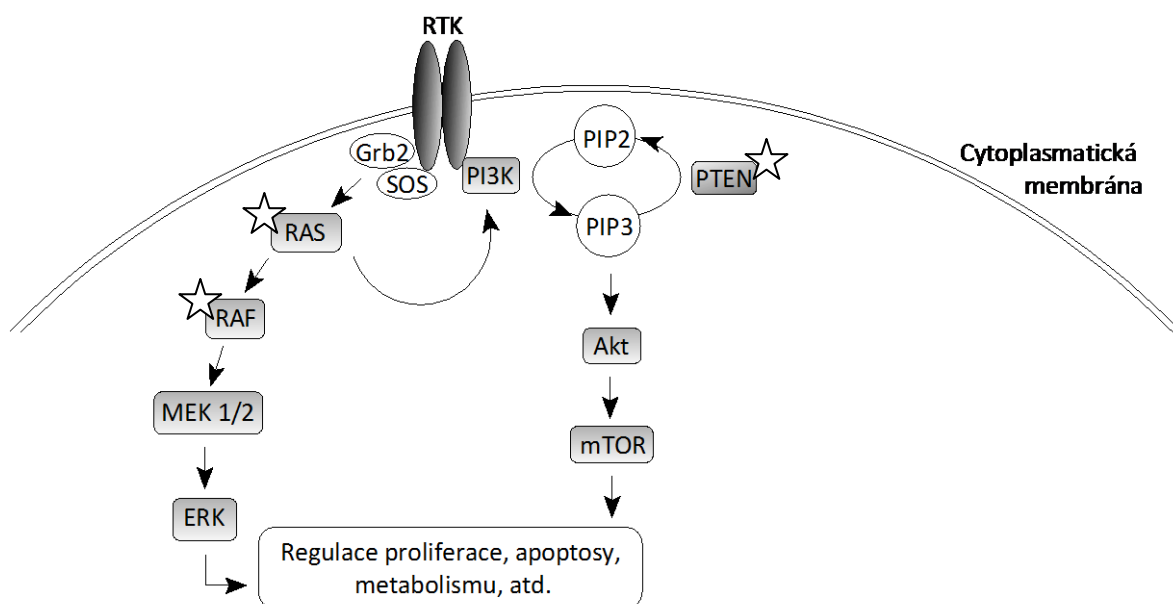
2.1.1 Molekulární podstata vzniku melanomu

Melanom je heterogenní onemocnění, které vykazuje přítomnost různých genetických alterací (Thomas *et al.*, 2007). Významným rizikovým faktorem pro rozvoj melanomu je vystavení UV záření (Hodis *et al.*, 2012), na druhou stranu jeho efekt nemá na rozvoj melanomu přímý vliv. Nejčastější nukleotidová záměna v genu *B-RAF* (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B) melanomových buněk je transverze thyminu za adenin (T/A), což není typická mutace vyvolaná tímto zářením. Je ale možné, že k této záměně dochází až v důsledku replikace DNA již poškozené UV zářením (Thomas *et al.*, 2006).

Mutace genu *BRAF* u melanomu je velice častá, vyskytuje se přibližně v 50 % případů. Většina těchto mutací je pouhá substituce valinu glutamovou kyselinou v kodonu 600, mutace se označuje jako V600E a vede k téměř pětisetnásobnému zvýšení kinasové

aktivity B-RAF (Wan *et al.*, 2004). Důsledkem vysoké aktivity B-RAF^{V600E} je konstitutivní signalizace MEK-ERK1/2 (mitogen-activated protein kinase kinase; extracellular signal-regulated kinase) a následná nepřírozeně silná regulace buněčných procesů v G₁ fázi buněčného cyklu primárních lidských melanocytů (Bhatt *et al.*, 2005). Kromě toho, tato mutace způsobuje také necitlivost melanomových buněk k negativním zpětnovazebným regulačním mechanismům (Ascierto *et al.*, 2012a).

Obecně tato signální dráha začíná tyrosin-kinasovým receptorem (RTK), například jím může být receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR), fibroblastový růstový faktor (FGFR) nebo hepatocytární růstový faktor (HGFR). Za normálních okolností jsou všechny tyto receptory aktivovány extracelulárními ligandy. Vazbou ligandu dochází k dimerizaci receptoru, spouští se tyrosin-kinasová aktivita cytoplasmatické domény receptoru, což vede k fosforylaci jeho tyrosinových reziduí. Důsledkem těchto změn je asociace adaptorových proteinů Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) a guanin nukleotidového výměnného faktoru SOS (son of sevenless) na receptor, aktivuje se SOS a dochází k vazbě GTP (guanosin trifosfát) na G-protein Ras (rat sarcoma). Aktivní Ras dále spouští činnost serin/threoninové kinasy RAF (v případě melanocytů B-RAF), která fosforyluje, a tím aktivuje MEK1 a MEK2 serin/threoninové kinasy. Nakonec MEK aktivuje ERK1 a ERK2, ty jsou translokovány do jádra, kde se podílí na regulaci transkripčních faktorů Elk-1 (ETS domain-containing protein Elk-1), Fos (FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog) a Jun (Jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog), které spolu tvoří transkripční faktor AP-1 (activator protein 1) a Myc (myelocytomatosis oncogene). Jakmile je transkripční faktor Elk-1 fosforylován, dochází k jeho zvýšené transkripční aktivitě. V případě transkripčních faktorů Fos a Jun je fosforylace stabilizující, což znamená, že nadále nedochází k jejich degradaci, ale započne transkripce příslušných genů, které řídí buněčné procesy jako je diferenciace, senescence, apoptosa, angiogenese nebo proliferace (Kerkhoff *et Rapp*, 1998; Morton *et al.*, 2003; Roskoski, 2012). Schematické znázornění této MAPkinasové dráhy je uvedeno na obrázku 1.



Obrázek 1: Schematické znázornění MAPkinasové signální dráhy. Po aktivaci tyrosin-kinasového receptoru (RTK) dochází k asociaci adaptorových proteinů Grb2 a SOS, které umožňují aktivaci Ras, ten posléze indukuje kinasovou aktivitu RAF. Signalizace fosforylační kaskadou vede až k aktivaci transkripčních faktorů, které regulují příslušnou buněčnou odpověď. V obrázku jsou hvězdičkou vyznačena místa s nejčastější mutací u melanomu. Protein N-RAS je mutován v 10 - 20 % případů, kinasa B-RAF ve 40 - 50 %. Fosfatasa PTEN je u melanomu mutována ve 20 - 40 % případů (Podle Solus *et* Kraft, 2013).

Signální dráha PI3K/AKT/mTOR je další dráhou, k jejíž deregulaci u melanomu dochází. Stejně jako v předchozím případě je k aktivaci RTK nutná vazba růstového faktoru. Následuje dimerizace (aktivace) receptoru a fosforylace kinasy následující v dané dráze. V tomto případě je takovým proteinem kinasa PI3K (phosphatidylinositide 3-kinase), která přeměňuje fosfatidylinositol (4,5)-bisfosfát (PIP-2) na fosfatidylinositol (3,4,5)-trisfosfát (PIP-3). Jsou známy tři třídy PI3K, jmenovitě I, II a III (Vanhaesebroeck *et al.*, 2010), přičemž třída IA má největší onkogenní potenciál. Kinasy PI3K třídy IA jsou heterodimery složené z katalytické podjednotky známé jako PIK3CA a regulační podjednotky. Právě podjednotka PIK3CA je v případě mutace onkogenní, aktivuje totiž PI3K/AKT signální dráhu (Kang *et al.*, 2005). Důležitá je také role PTEN (phosphatase and tensin homolog), který defosforyluje PIP-3 na PIP-2, a má tak opačný efekt oproti PI3K. Inaktivace nebo hypoaktivace PTEN vede k nadměrné aktivaci signální dráhy (Stemke-Hale *et al.*, 2008). K inaktivaci PTEN může docházet v důsledku somatických mutací, delecí, methylace promotoru nebo ztráty heterozygoty (Ogita *et* Lorusso, 2011).

Následující v signální dráze je kinasa AKT, známá také jako proteinkinasa B (PKB). Aktivována je fosforylací v pozici Thr308 fosfoinositid-dependentní kinasou 1 (PDK-1) a v pozici Ser473 mTOR komplexem 2 (mTORC2). Pro úplnou aktivaci jsou nutné obě fosforylace (Sarbasov *et al.*, 2005). Funkce AKT spočívá v aktivaci nebo inhibici několika dalších proteinů, například BAD (Bcl-2-associated agonist of cell death) a komplexu mTOR 1 (mTORC1). Prostřednictvím těchto proteinů jsou regulovány procesy, jako je buněčný růst, proliferace, angiogeneze nebo buněčná migrace (Manning *et al.*, 2007).

Nejfrekventovanější příčiny změn této dráhy zahrnují mutace či nadměrný počet kopií genů *PIK3CA* nebo jiných isoform PI3K, dále hraje roli ztráta exprese supresoru dráhy – PTEN, či hyperaktivace RTK (Isakoff *et al.*, 2005). Nejčastější mutace *PIK3CA* jsou substituce E542K, E545K nebo H1047R. Všechny tyto mutace jsou samy o sobě onkogenní, mohou totiž indukovat vznik nádoru bez jakékoliv jiné molekulární aberace (Ligresti *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2008). Současně však ve 45 % případů dochází k delecí *PTEN* a amplifikaci *AKT*, což vede k nadměrné expresi isoformy AKT3 (Stahl *et al.*, 2004). Studie genetických alterací primárního melanomu ukazují, že nádory s mutací B-RAF se vyznačují nízkým počtem kopií *PTEN*, což znamená, že podnětem nádorového bujení je aktivace obou signálních drah PI3K/AKT a také MAPkinasové signální dráhy (Russo *et al.*, 2009).

Znalost deregulací v MAPK a PI3K signálních drahách u různých typů nádorů včetně melanomu vedla k vývoji specifických inhibitorů konkrétních komponent těchto drah. Následující kapitola bude věnována právě vybraným inhibitorům různých proteinkinás.

Svou roli při rozvoji melanomu hrají i inhibitory apoptotických proteinů (IAP). Ty se v lidském organismu vyskytují v několika variantách, jedná se například o buněčné inhibitory cIAP1 a cIAP2, IAP vázaný na chromosom X (XIAP), survivin nebo melanomový ML-IAP (Salvesen *et al.*, 2002). V případě melanomů často dochází ke zvýšení exprese IAP, což přispívá k rozvoji onemocnění a rezistenci na terapii.

Jediným členem proteinové rodiny IAP, který přímo inhibuje katalytickou aktivitu kaspasy 3, 7 a 9, je XIAP (Eckelman *et al.*, 2006). Zatímco inhibici kaspasy 3 a 7 způsobuje prostřednictvím interakce s jejich aktivovanou formou, kaspasa 9 je inhibována vazbou XIAP na N-koncovou oblast, což brání homodimerizaci kaspasy 9, a tím její

následné aktivaci (Shiozaki *et al.*, 2003; Srinivasula *et al.*, 2001). Vysoká hladina XIAP a zároveň nízká hladina jeho antagonisty XAF1 (XIAP-associated factor 1) koreluje u melanomu s jeho progresivitou (Hiscutt *et al.*, 2010; Ng *et al.*, 2004). Ostatní IAP neinhibují kaspasy přímo, mají ale na nich nezávislé funkce, které přispívají k přežívání buněk a inhibici apoptosy. Například cIAP proteiny jsou příznačné svou C-koncovou RING (really interesting new gene) doménou s E3 ubiquitin ligasovou aktivitou. Zprostředkují tak ubiquitinilaci mnohých proteinů včetně těch, které se podílí na regulaci jiných proteinů nutných pro přežití buněk, například NF- κ B (Bertrand *et al.*, 2008; Mahoney *et al.*, 2008). Dalším IAP je i survivin, jehož exprese je závislá na fázi buněčného cyklu, přičemž jeho hladina je nejvyšší v průběhu mitosy, protože právě v ní zastává funkci regulátoru formace mitotického vřeténka - chrání buňky před tzv. mitotickou katastrofou, tedy kontroluje dynamiku mikrotubulů (Castedo *et al.*, 2004; Lamers *et al.*, 2011; Li *et al.*, 1998). Survivin interaguje s XIAP, posiluje tím inhibici kaspas (Dohi *et al.*, 2004). V porovnání s normálními melanocyty je u metastatického melanomu pozorována zvýšená exprese survivinu, což může být zapříčiněno zvýšenou rychlostí proliferace a nebo jeho nadměrnou expresí (Florell *et al.*, 2005; Grossman *et al.*, 1999). ML-IAP pak inhibuje aktivitu kaspasy 9 (Kasof *et Gomez*, 2001), může ale nepřímou přispívat i k inhibici kaspasy 3 a 7 a to díky ovlivnění XIAP (Vucic *et al.*, 2005). Inhibitory apoptotických proteinů jsou důležité pro přežití a rozvoj melanomu, protože jejich exprese je regulována stejnými drahami, které jsou pro melanomové buňky zásadní. Například onkogen MITF (Microphthalmia-associated transcription factor) je kritickým regulátorem ML-IAP (Dynek *et al.*, 2008), transkripce *cIAP-2* a také *XIAP* je regulovaná PI3K/AKT signalizací (Hu *et al.*, 2004). Dále bylo zjištěno, že XIAP, cIAP1/2 a taky ML-IAP snižují migraci a invazivitu melanomových buněk (Dogan *et al.*, 2008; Oberoi-Khanuja *et al.*, 2012), což nasvědčuje faktu, že k jejich expresi dochází až v pozdější fázi rozvoje melanomu, pravděpodobně až poté, co již byly vytvořeny metastázy. Naopak survivin zesiluje migraci melanomových buněk aktivací AKT (Mckenzie *et al.*, 2010), což potvrzuje hypotézu, že zvýšená exprese survivinu by mohla být jednou z prvních událostí ve vývoji melanomu. Inhibitory apoptotických proteinů mohou být také regulovány aktivačními mutacemi B-RAF. Inhibice signalizace MEK/ERK totiž vede ke snížení exprese XIAP a zároveň zvýšení exprese jeho inhibitoru XAF1 (Yu *et al.*, 2007), při

konstitutivní aktivaci B-RAF u melanomu je efekt opačný – dochází ke zvýšené expresi XIAP a zároveň nízké expresi jeho inhibitoru.

2.1.2 Možnosti léčby melanomu

Do skupiny inhibitorů MAPK/MEK/ERK se řadí například sorafenib, původně vyvinutý jako inhibitor serin/threoninové kinasy RAF. V malém počtu případů a pouze u některých typů nádorů s mutací genu *B-RAF* (G469E, D594G) byl skutečně účinný, ale v případech pacientů nesoucích nejčastější mutaci *B-RAF*^{V600E} v melanomových buňkách tomu tak nebylo (Ascierto *et al.*, 2012b; Chakraborty *et al.*, 2013). Sorafenib je tedy inhibitorem tyrosin-kinasových receptorů (RTK) na počátku zmíněné signální kaskády. Jedná se ale také o účinný inhibitor několika kinas, cílený především na RTK spojené s angiogenezí VEGFR-2, VEGFR-3 (vascular endothelial growth factor receptor) (Wilhelm *et al.*, 2008). Studie s tímto inhibitorem prokázaly, že inhibuje proliferaci nádorových buněk a angiogenezi zprostředkovanou endoteliálními buňkami (Wilhelm *et al.*, 2004). Sorafenib může být podáván v kombinaci s jinými inhibitory, například při léčbě agresivnějších forem melanomu se využívá kombinace s inhibitory MEK. Mohou být cílené také na VEGFR a jiné membránové receptory, k jejichž expresi dochází v nádorových buňkách, zatímco inhibitory MEK blokuji kaskádu, která je konstitutivně aktivní právě díky mutaci B-RAF (McCubrey *et al.*, 2012).

Vemurafenib byl schválený v roce 2011 pro léčbu metastatického melanomu s mutací B-RAF^{V600E} v USA, následně i v Evropě (Viola *et al.*, 2013). Jedná se o účinný, orálně podávaný lék, který inhibuje kinasovou doménu nejčastěji mutovaného proteinu B-RAF. Vemurafenib snižuje buněčnou proliferaci (Tsai *et al.*, 2008; Jang *et al.*, 2013), nemá ale protinádorový efekt na buňky bez mutace B-RAF (*B-RAF*^{WT}) (Chapman *et al.*, 2011; Joseph *et al.*, 2010). Farmakodynamickou analýzou bylo zjištěno, že účinky vemurafenibu na nádor jsou charakterizovány dobou expozice, která koresponduje s úrovní fosforylace MEK a ERK. Regrese melanomu korelovala s více než 90% inhibicí fosforylace ERK (Bollag *et al.*, 2010). V klinických testech pak byly účinky vemurafenibu potvrzeny - ve fázi I a II klinického testování byl pozorován protinádorový účinek u více než 50 % pacientů. Ve fázi III klinických studií byl účinek vemurafenibu srovnáván s alkylačním činidlem používaným pro konvenční chemoterapii – dakarbazinem. Celkové

přežití u pacientů léčených vemurafenibem dosahovalo 84 %, proti druhé skupině pacientů s 64 % (Chapman *et al.*, 2011). Navzdory slibným výsledkům klinických testů je použití vemurafenibu v klinické praxi omezené.

Díky molekulárním alteracím v signálních drahách melanomu dochází velice rychle ke vzniku rezistence (Corcoran *et al.*, 2011). Léková rezistence je častým problémem spojeným s použitím chemoterapeutik. K hodnocení rezistence je nezbytné porozumět adaptabilitě nádorových buněk a četným mechanismům, které k ní vedou. Mechanismy rezistence pak mohou být rozděleny do dvou skupin, a sice závislé na MAPK dráze a nezávislé (Villanueva *et al.*, 2010; McCubrey *et al.*, 2011). Mechanismus rezistence závislý na MAPK dráze spočívá v reaktivaci ERK, amplifikaci *B-RAF* nebo změně proteinu B-RAF alternativním sestřihem, což vede ke zvýšené kinasové aktivitě (Shao *et al.*, 2010). Navíc k rezistenci přispívají i sekundární mutace v MAPK dráze, nejčastěji *N-RAS* a MEK, které způsobují necitlivost buněk k inhibitoru (Emery *et al.*, 2009). Aby byla rezistence překonána, sledují se nyní v klinických studiích účinky kombinované terapie vemurafenibu, například s imunomodulačními činidly nebo inhibitory MEK (Trunzer *et al.*, 2013).

Další skupinou proteinkinas, na které může být cílená inhibice, jsou isoformy kinasy PI3K (Branca *et al.*, 2012). Pokročilé studie vedly k vývoji inhibitorů, které jsou selektivně cílené pouze na katalytické místo těchto kinas (Ogita *et al.*, 2011). Nové, specifické inhibitory isoformy PI3Ka, vykazují vysokou účinnost na buněčných liniích nesoucích mutaci *PIK3CA*, se vzrůstajícím počtem kopií tohoto genu navíc stoupá senzitivita buněk k inhibitoru. Na druhou stranu mutace B-RAF a PTEN způsobují rezistenci (Branca *et al.*, 2012). Inhibitory PI3K jsou například GSK2126458 a BEZ235. Tyto inhibitory byly hodnoceny *in vitro*, při jejich použití jako monoterapie nebyla prokázána žádná buněčná odpověď, avšak v kombinaci s inhibitory MEK vykazovaly zesílenou inhibici buněčného růstu (Britten, 2013). Nízká účinnost samotných inhibitorů PI3K je dána interakcí paralelních signálních drah PI3K/AKT/mTOR a RAS/RAF/MEK/ERK, navíc rezistence k terapii je zesílena nadměrnou expresí nebo přílišnou aktivací PDGFR- β (platelet derived growth factor receptor) či IGF1R (insulin-like growth factor 1 receptor) (McCubrey *et al.*, 2012). Rezistenci lze tedy překonat, stejně jako v případě vemurafenibu, kombinovanou inhibicí obou signálních drah

(Villanueva *et al.*, 2010). V neposlední řadě jsou pro cílenou terapii využívány i inhibitory CDK, jimž bude věnována samostatná kapitola.

Kromě terapie cílené na proteinkinasy je možné i využití imunoterapie. Ta je založena na zvýšení schopnosti imunitního systému eliminovat nádorové buňky a dosáhnout tak chemoterapeutického účinku (Mansh, 2011). Melanomové léze často obsahují infiltrativní T-buňky specifické k antigenům melanocytů asociovaných s nádorem, jedná se například o MART1 (melanoma antigen recognized by T-cells 1), gp100 (glycoprotein 100) a tyrosinasi (Tjin *et al.*, 2011) a právě díky takovým antigenům je imunoterapie možná. Metodou k eliminaci melanomových buněk je zvýšení přirozené funkce těchto cytotoxických T-lymfocytů (CTL) (Levings *et al.*, 2001). Antigen 4 asociovaný s CTL (CTLA-4; cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4) je molekula typu imunoglobulinu, nacházející se primárně na CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytech. Antigen CTLA-4 je důležitý pro regulaci drah pro aktivaci T-buněk a také brání autoimunitním reakcím (Melero *et al.*, 2007). Rekombinantní lidskou monoklonální protilátkou, která se váže na CTLA-4, je ipilimumab. Po vazbě na CTLA-4 dochází k zablokování interakce s jeho substráty CD80 a CD86. Toto imunoterapeutikum posiluje protinádorovou odpověď T-buněk, avšak vede k jejich nekontrolovatelné proliferaci, což může mít za následek vznik autoimunitních reakcí (Hodi *et al.*, 2010; Robert *et Ghiringhelli*, 2009). Kromě monoterapie je ipilimumab vhodný i k terapii kombinované. Například kombinace vemurafenibu s imunoterapií by mohla umožnit překonání mechanismů rezistence. Imunoterapie má totiž nízkou rychlost odezvy, ale za to dlouhý účinek, naproti tomu inhibitory B-RAF mají vysokou počáteční rychlost odezvy, ale zřídka je odezva dlouhodobá (Lipson *et Drake*, 2011; Ascierto *et al.*, 2012b). Ipilimumab navíc účinkuje nepřímo aktivací imunitního systému, a tak je jeho účinnost zřejmá jak u pacientů s mutací BRAF^{V600E} v melanomových buňkách i bez ní (Shahabi *et al.*, 2012).

V současné době je vyvíjena celá řada protinádorově účinných látek cílených proti různým onkogenům. Jednou z těchto skupin jsou i inhibitory cyklin-dependentních kinas, z nichž některé vykazují nadějnou protinádorovou aktivitu proti melanomu. V dalších kapitolách proto bude popsána funkce těchto enzymů a vlastnosti jejich inhibitorů.

2.2 CDK a jejich regulace

Cyklin-dependentní kinasy (CDK) jsou serin/threoninové kinasy, jejichž katalytická aktivita je regulována interakcemi s cykliny a přirozenými inhibitory CDK (CKI). Cykliny jsou pozitivními regulačními podjednotkami CDK, kontrolují jejich kinasovou aktivitu a substrátovou specifitu. Naopak inhibitory CDK mohou zcela zastavit buněčný cyklus v případě podmínek nepříznivých pro buněčné dělení (Lim *at* Kaldis, 2013).

Ze strukturního hlediska jsou CDK, podobně jako ostatní kinasy, tvořeny dvěma laloky. Aminokoncový lalok je složený z β -skládaných listů, obsahuje inhibiční element bohatý na glycin (G-loop, G-smyčka) a jediný α -helix, označovaný jako C-helix, který obsahuje sekvenci typu PSTAIRE, nutnou pro vazbu příslušného cyklinu. Sekvence PSTAIRE je typická pro CDK2, u ostatních kinas je nepatrně odlišná. C-koncový lalok se vyznačuje α -helikálním uspořádáním a obsahuje aktivační segment (T-smyčka) včetně fosforylačně senzitivní aminokyseliny. Pokud se CDK nachází v monomerní formě, tedy bez cyklinu, je katalytické místo uzavřeno právě T-smyčkou, která brání enzymatické aktivitě samotné CDK. Aktivní místo je uloženo mezi laloky. (De Bondt *et al.*, 1993; Jeffrey *et al.*, 1995).

Substrátová specifita CDK je řízená prolinem s preferencí sekvence S/T-P-X-K/R. K tomuto upřednostnění dochází v důsledku přítomnosti hydrofobní kapsy v blízkosti katalytického místa, kde se nachází prolin (pozice +1). Ne všechny CDK ale vyžadují přítomnost bazické aminokyseliny v pozici +3, jedná se například o transkripční CDK, pro které nemusí být sekvence S/T-P-X přesná. CDK7 nebo CDK9 mohou fosforylovat příslušná rezidua i za nepřítomnosti prolinu v pozici +1 (Echalier *et al.*, 2010).

Jak již bylo zmíněno výše, regulačními podjednotkami CDK jsou cykliny. Společně s CDK vytváří heterodimerický komplex, který má pod kontrolou průběh buněčného cyklu a přechod jeho kontrolními body prostřednictvím fosforylace cílového substrátu. Do kontroly buněčného cyklu jsou zapojeny cyklin A, cyklin B, cyklin D₁, D₂, D₃ a cyklin E. V průběhu buněčného cyklu dochází ke kolísání hladin všech cyklinů, tyto oscilace vedou k aktivaci určité CDK (Zhu *et al.*, 2003). Hladina cyklinů může být modifikována hormony a růstovými faktory (pozitivně) nebo aktivací specifických proteolytických mechanismů (negativně). Deregulace cyklinů v transformovaných buňkách pak přispívá k oslabení kontrolních bodů, snížení citlivosti na mitogenní stimulaci a celkové podpoře buněčné proliferace.

Při vazbě cyklinu na CDK dochází k silným hydrofobním interakcím. Asociace cyklinu s C-helixem podněcuje rotaci v ose tohoto úseku, přičemž se generují nové interakce v aktivním ATP-vazebném místě. Dále pak cykliny směřují C-lalok aktivačního segmentu CDK ven z katalytického místa, zpřístupní se fosforylačně senzitivní aminokyselina a může být fosforylována pomocí CAK (CDK-activating kinase). Fosforylovaná aminokyselina pak působí jako stabilizující struktura aktivovaného heterodimeru (Echalier *et al.*, 2010; Russo *et al.*, 1996a). Míra interakce je u různých CDK a cyklinů odlišná, například CDK2 a cyklin A interagují na svých N- i C-lalocích, zatímco kontakt CDK4 s cyklinem D je limitován pouze na N-lalok a na rozdíl od CDK2, ATP-vazebné místo CDK4 zůstává i po vazbě cyklinu nepřístupné svým substrátům (Day *et al.*, 2009; Takaki *et al.*, 2009). Některé CDK, jako třeba CDK5, nevyžadují pro svou aktivitu fosforylaci v aktivačním místě (Echalier *et al.*, 2010).

Oblast bohatá na glycin (G-smyčka) v N-koncovém laloku je přídatná regulační oblast CDK, zejména proto, že obsahuje aminokyselinová rezidua threoninu a tyrosinu v pozicích 14 respektive 15, jejichž fosforylace inhibuje kinasovou aktivitu. Fosforylace Thr14 a nebo Tyr15 kinasami Myt1 (myelin transcription factor 1) a Wee1 (Wee1-like protein kinase) inhibuje mnohé členy CDK rodiny a brání tak průběhu buněčného cyklu. Děje se tomu například při odpovědi na poškození DNA. Pro opětovnou aktivaci CDK a normální průběh buněčného cyklu je nutná eliminace těchto fosfátů fosfatasami z proteinové rodiny Cdc25 (cell division cycle 25) (Boutros *et al.*, 2007). Inhibiční fosforylace Thr14 nebo Tyr15 nevede k výrazným strukturálním změnám CDK, ale snižuje afinitu CDK k jejím substrátům. Aminokyselinové zbytky Thr14 a Tyr15 se nenachází u CDK7, tato kinasa je zřejmě konstitutivně aktivní (Echalier *et al.*, 2010).

Negativní regulace buněčného cyklu je dále zprostředkována dvěma hlavními rodinami proteinů, konkrétně se jedná o inhibitory CDK4 – nádorové supresory INK4 a proteiny rodiny CIP/KIP (CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein) – p21CIP1, p27KIP1 a p57KIP2. Skládání a funkce komplexů CDK4/cyklin D a CDK6/cyklin D jsou negativně regulovány proteiny rodiny INK4, která zahrnuje produkt genu *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A). Díky alternativnímu sestřihu a přítomnosti dvou promotorů v lokusu *CDKN2A* dochází k expresi dvou odlišných transkriptů (Mao *et al.*, 1995; Stone *et al.*, 1995). První z nich vzniká transkripcí exonu E1_α a produktem je p16INK4A, který inhibuje CDK4/6, druhým produktem je p14ARF, inhibující MDM2

(murine double minute 2) proteiny a vznikající z exonu E1 β (Pomerantz *et al.*, 1998; Quelle *et al.*, 1995). Regulace a kontrola interakcí mezi p16 a komplexy CDK4/6/cyklin D je kritická pro normální buněčný růst, což dokazuje také fakt, že jedním z nejčastěji amplifikovaných genů u nádorových buněk je *CDK4*, naopak nejvyšší frekvenci delece vykazuje právě *p16INK4A* (Beroukhim *et al.*, 2010). Proteiny INK4 interagují s CDK ve formě monomerů. Inhibice se děje narušením styčné plochy mezi cyklinem a ATP-vazebnou kapsou, což brání aktivaci CDK4 cykliny typu D nebo CAK (Jeffrey *et al.*, 2000). Proteiny z rodiny inhibitorů CIP/KIP umožňují regulaci až po formaci heterodimeru cyklin/CDK (Russo *et al.*, 1996b).

2.2.1 Funkce CDK

Normální buněčný růst je regulován dynamickou souhrou signálů, které kontrolují buněčný metabolismus, proliferaci, diferenciaci a buněčnou smrt. Důležitou roli v buněčném cyklu mají jeho tři kontrolní body v G₁, G₂ a M fázi. Kontrolní body zajišťují přesnou buněčnou proliferaci a replikaci DNA. Ztráta kontroly v těchto bodech pak vede k neřízené proliferaci, genomické nestabilitě a onkogenezi (Malumbers *et Barbacid*, 2001). V klasickém případě je buněčný cyklus kontrolován třemi interfázními CDK (CDK2, CDK4, CDK6), mitotickou CDK1 a cykliny čtyř tříd - A, B, D a E, (Malumbers *et Barbacid*, 2009). K rozhodnutí, zda buňka vstoupí do buněčného cyklu, dochází v G₀ fázi. Zásadní v této fázi je interakce mezi komplexem CDK3/cyklin C a členy retinoblastomové proteinové rodiny (RB1-RB3). Tento komplex fosforyluje RB proteiny v pozici Ser807/811 a fosforylace těchto míst je nezbytná pro efektivní uvolnění buněk z G₀ fáze (Ren *et Rollins*, 2004). V časně G₁ fázi pak dochází k expresi cyklinů typu D, což vede k aktivaci CDK4 a CDK6. Komplexy CDK4/cyklin D a CDK6/cyklin D započnou iniciační fosforylaci RB proteinů. V důsledku této fosforylace dochází k uvolnění transkripčních faktorů E2F, které umožňují transkripci genů nutných pro přechod kontrolním bodem (Pardee, 1989). Až do tohoto okamžiku je buněčný cyklus reverzibilní a závislý na mitogenní signalizaci. V pozdní G₁ fázi fosforyluje komplex CDK2/cyklin E RB1-RB3 na dalších místech, což umožňuje transkripčním faktorům E2F indukovat expresi genů potřebných pro replikaci DNA, tedy zahájení S fáze. Přechod do S fáze je označován jako restriční bod a zásadní roli hraje zejména u nádorových buněk, které jsou schopné projít

tímto bodem nezávisle na příjmu mitogenního signálu. Následně jsou proteiny RB udržovány ve fosforylovaném stavu komplexem CDK2/cyklin A a mitotické CDK1, která je aktivována cykliny A a B a zajišťuje tak pokračování cyklu (Santamaría *et al.*, 2007). V tabulce I je uveden přehled vybraných CDK spolu s jejich vazebnými partnery a funkcí.

Tabulka I: Přehled cyklin-dependentních kinas, jejich vazebných partnerů a funkcí (Podle Peyressatre *et al.*, 2015).

CDK	Cyklin	Funkce
CDK1	B	Mitosa
CDK2	A	S fáze
	E	G ₁ /S fáze
CDK3	C	G ₀ /G ₁ fáze
CDK4	D	G ₁ fáze
CDK5	p35/p39	Neuronální funkce
CDK6	D	G ₁ fáze
CDK7	H	Aktivace CDK, transkripce
CDK8	C	Transkripce
CDK9	T	Transkripce
CDK11	L	Regulace sestříhu
CDK12	K	Oprava DNA
	L	Regulace sestříhu
CDK13	K	Transkripce
	L	Regulace sestříhu

Kromě buněčného dělení se CDK účastní také regulace transkripce, konkrétně se jedná o CDK7, CDK8, CDK9, CDK12 a CDK13 (Bartkowiak *et Greenleaf*, 2011). Transkripční CDK fosforylují C-koncovou doménu (CTD) RNA polymerasy II (RNAPII), čímž regulují jednotlivé fáze transkripce od její iniciace, přes elongaci až po terminaci (Fuda *et al.*, 2009). CDK a jejich odpovídající partneři společně vytváří specifické transkripční komplexy. Například CDK7/cyklin H/Mat1 je součástí obecného

transkripčního faktoru TFIID. Tento transkripční faktor se účastní iniciace transkripce, konkrétně se jedná o fosforylaci Ser5 C-koncové domény RNAPII navázané na promotoru. CDK7 je také schopná fosforylovat a tím aktivovat jiné CDK, má tedy funkci jako CDK-aktivační kinasa (CAK) (Liu *et al.*, 2000). Dalším komplexem je CDK8/cyklin C, který je součástí mediátorového komplexu, regulujícího transkripci závislou na RNAPII, a nakonec komplex CDK9/cyklin T, představující aktivní formu pozitivního transkripčního elongačního faktoru P-TEFb. Obě nedávno objevené kinasy CDK12 a CDK13 tvoří komplex s cyklinem K a podílí se na regulaci sestřihu pre-mRNA (Bösken *et al.*, 2014). Transkripční CDK fosforylují serinová rezidua v heptapeptidové repetici 1-Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser-7 velké podjednotky RNA polymerasy II. Počet repetice se liší v závislosti na typu organismu a to v rozmezí od 26 repetice u kvasinek až po 52 repetice u savců (Bösken *et al.*, 2014). Ze sedmi aminokyselin repetice CTD mohou být fosforylovány všechny tři seriny – Ser2, Ser5, Ser7, threonin – Thr4 a také tyrosin – Tyr1 (Heidemann *et al.*, 2013; Egloff *et al.*, 2012). C-koncová doména RNAPII je esenciální pro buněčnou viabilitu, její částečné poškození nebo místně specifická mutace vedou k určitým růstovým defektům buněk a narušení procesu zpracování mRNA (Bösken *et al.*, 2014). V současné době se má za to, že CTD funguje jako základní prvek pro koordinaci a vazbu proteinů účastnících se různých fází transkripce a zároveň propojuje transkripci s ostatními jadernými procesy, jako je maturace mRNA nebo modifikace chromatinu. (Heidemann *et al.*, 2013; Egloff *et al.*, 2012).

Další cyklin-dependentní kinasa, CDK5, je mezi členy CDK výjimečná ze dvou důvodů. Za prvé svou funkcí, která je omezena pouze na nervový systém, za druhé svou aktivací, která není závislá na cyklinech, ačkoli jejich vazba na CDK5 je možná. K aktivaci dochází po vazbě proteinů p35 a p39. Tyto proteiny jsou od cyklinů strukturně velmi odlišné a k jejich expresi dochází pouze v nervové tkáni. Aktivita CDK5 je kritická pro přesnou formaci a funkci mozku. Vzhledem k její fyziologické funkci je zřejmé, že se CDK5 podílí i na vzniku neurodegenerativních poruch. Pokud dojde ke štěpení p35, aktivátoru CDK5, na aktivnější fragment p25 a ke vzniku komplexu p25/CDK5, dochází k aberantní fosforylaci proteinu tau a neurofilament, které jsou oba zahrnuty v procesu patogeneze neurodegenerativních onemocnění (Kesavapany *et al.*, 2004).

2.2.2 Nízkomolekulární inhibitory CDK pro cílenou terapii

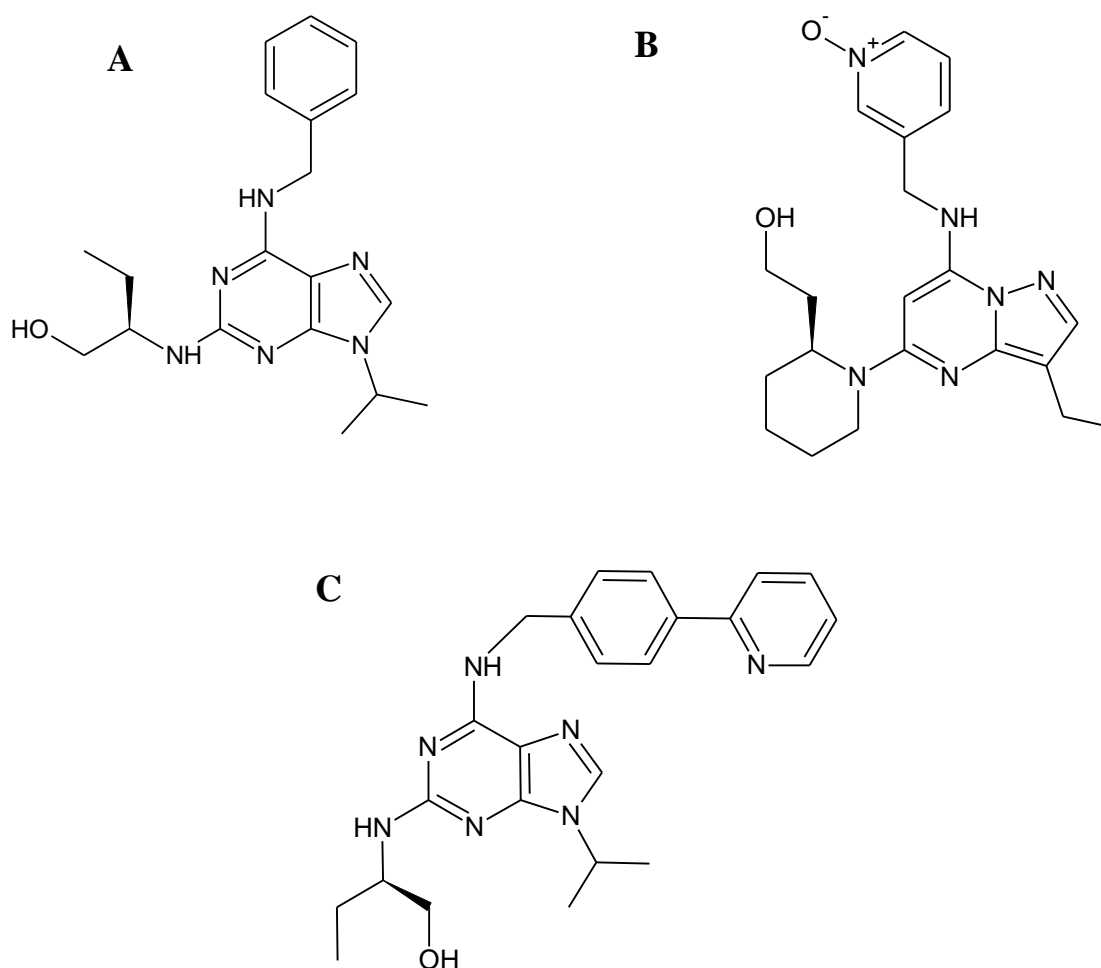
V průběhu minulých dvaceti let byla vyvinuta spousta inhibitorů CDK jako potenciálních nádorových terapeutik. Tyto CDK inhibitory byly testovány na mnoha buněčných typech nádorů. CDK inhibitory první generace jsou relativně nespecifické, patří mezi ně například flavopiridol, olomoucín nebo roskovitin. Na základě struktur inhibitorů první generace dochází k neustálému vývoji dalších inhibitorů CDK, tzv. inhibitorů CDK druhé generace, přičemž cílem je vždy vytvořit inhibitor s vyšší účinností (Asghar *et al.*, 2015).

Vzhledem k zásadní roli, kterou mají CDK v kontrole buněčného cyklu a tumorigeneze, je cílená terapie na interfázni, mitotické i transkripční CDK u melanomu intenzivně zkoumána. Například CDK2 hraje důležitou roli během buněčné interfáze a v případě melanomu je její role zásadní. Expze tohoto proteinu je u melanomu kontrolována melanocytárním transkripčním faktorem MITF (Du *et al.*, 2004). Vysoká expze CDK2 byla pozorována jak v případě metastatického melanomu, tak i u melanomu *in situ* (Abdullah *et al.*, 2011). Zatímco tato kinasa je u většiny buněčných typů postradatelná pro přechod z G₁ do S fáze, u melanomu je tomu naopak - RNA interference CDK2 vede k inhibici proliferace *in vitro*. Podobně jako je tomu u inhibice CDK4, umlčení CDK2 inhibuje buněčný růst, ale nedochází ke spuštění apoptosy (Du *et al.*, 2004). Vzhledem k efektům selektivních inhibitorů CDK4 a CDK2 na viabilitu melanomu není překvapující, že současné potlačení funkcí těchto dvou kinas vede k inhibici buněčného růstu a to jak *in vitro*, tak *in vivo*. Současná inhibice CDK2 a neinterfázni CDK, například CDK1, 5, 7 nebo 9, pak indukuje zastavení buněčného cyklu a také apoptosu melanomových buněk (Jalili *et al.*, 2012).

Roskovitin (Seliciclib) je CDK inhibitor, který kompetuje o ATP vazebné místo v molekule kinasy. Z chemického hlediska je roskovitin derivátem purinu, konkrétně se jedná o 2-(1-ethyl-2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-isopropylpurin (obrázek 2). Byl objeven při testování série C2, N6, N9-substituovaných adeninů a vykazuje jak vysokou účinnost, tak selektivitu vůči komplexům CDK2/cyclin E, CDK7/cyclin H/Mat1 a CDK9/cyclin T (Meijer *et al.*, 1997). Roskovitin indukuje apoptosu v nádorových buněčných liniích, redukuje růst nádorů v myších xenograftech a stal se jedním z prvních klinicky testovaných CDK inhibitorů. Bylo prokázáno, že při použití roskovitinu na buněčném modelu mnohočetného myelomu dochází k rychlému zablokování fosforylace CTD RNAPII, inhibici transkripce a poklesu jak proteinové, tak mRNA hladiny

antiapoptotického faktoru Mcl-1 (myeloid-cell Leukemia 1), což následně vede k indukci apoptosy. U mnohočetného myelomu byla navíc dokázána důležitost proteinu Mcl-1 pomocí siRNA (short interfering RNA), kdy samotná RNA interference byla k indukci apoptosy dostačující. (MacCallum *et al.*, 2005).

Na základě identifikace roskovitinu se začaly hledat látky odvozené od purinů, které by mohly mít stejnou nebo vyšší účinnost a specifitu. K syntéze nových inhibitorů se využívá několika přístupů. V případě roskovitinu se jedná o modifikace jeho substituentů, nebo o přeskupení atomů dusíku v molekule purinu. Oba přístupy vedly k vytvoření velkého množství inhibitorů odvozených od roskovitinu a také nových inhibitorů, jejichž základem jsou různé typy heterocyklických molekul. Jedná se například o pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidiny, imidazo[2,1-*f*]-1,2,4-triaziny, imidazo[4,5-*d*]pyridiny nebo pyrolo[3,2-*d*]pyrimidiny (Jorda *et al.*, 2011).



Obrázek 2: Strukturální vzorce (A) roskovitinu, (B) dinaciclibu, (C) CR8

Inhibitor CDK 2R-[[9-(1-methylethyl)-6-[[[4-(2-pyridinyl)fenyl]methyl]amino]-9H-purin-2-yl]amino]-1-butanol s označením CR8 byl připraven optimalizací substituentu roskovitinu v poloze N6, kde se v tomto případě nachází biaryl, strukturní vzorec je uveden na obrázku 2. Z více než sta testovaných kinas vykazuje CR8 nejvyšší selektivitu vůči CDK1, 2, 3, 5, 7 a CDK9, navíc oproti roskovitinu byla sloučenina CR8 2 - 4× více účinná (Bettayeb *et al.*, 2008).

V nedávné době některé vysoce selektivní nízkomolekulární inhibitory CDK vstoupily do klinických testů, jedná se především o palbociclib, abemaciclib a ribociclib (Dickson, 2014). Tyto molekuly jsou selektivní, účinné a aktivní při orálním podání pacientům. Jedná se o kompetitivní inhibitory CDK4 a CDK6 a projevují se inhibicí fosforylace RB proteinů (Fry *et al.*, 2004; Rader *et al.*, 2013; Gelbert *et al.*, 2014). Všechny tři sloučeniny jsou aktuálně ve třetí fázi klinických testů pro ER-pozitivní/HER2-negativní metastatickou rakovinu prsu, tedy takovou, která je závislá na estrogenovém receptoru (ER) a v nádorových buňkách se nevyskytuje amplifikace genu *HER2* (human epidermal growth factor receptor 2). Všechny molekuly jsou také v raných klinických fázích pro léčbu mnohočetného myelomu, rakoviny tlustého střeva nebo právě melanomu (Schwartz *et al.*, 2011; Flaherty *et al.*, 2012; Leonard *et al.*, 2012). Ačkoli je sledování klinické účinnosti selektivních inhibitorů CDK4 a CDK6 u pacientů trpících melanomem teprve v počátcích, preklinická data odhalují, že inhibice CDK4 a CDK6 bude efektivní u melanomů s mutací *B-RAF*^{V600E} a taky s mutací *N-RAS* (Kwong *et al.*, 2012; Shapiro *et al.*, 2013; Yadav *et al.*, 2014). Preklinické studie na transgenních myších modelech prokazují, že kombinace inhibitorů CDK4/6 a inhibitoru MEK1/2 vede k synergické účinnosti v *N-RAS* mutovaných melanomových buňkách (Kwong *et al.*, 2012). Abemaciclib indukuje zastavení buněčného cyklu a následně inhibuje růst myších xenograftů s mutací *B-RAF*^{V600E}. V kombinaci s vemurafenibem pak abemaciclib vede k aditivní inhibici nádorového růstu (Yadav *et al.*, 2014). Léčba melanomu kombinovanou terapií inhibitorů B-RAF a CDK tudíž může být lepší možností než použití jednotlivých samostatných inhibitorů.

Nejzajímavějším inhibitorem z hlediska testování na melanomových nádorových liniích je dinaciclib (obrázek 2). Ovlivnění panelu melanomových buněk dinaciclibem vede ke koncentračně-závislé inhibici jejich růstu, která je asociovaná s rychlým zastavením buněčného cyklu v G₂/M fázi a indukci apoptosy. Po ovlivnění xenograftů

lidského melanomu v myších dinaciclibem došlo k ústupu nádoru, přičemž tento účinek je způsoben snížením úrovně fosforylace RB proteinů a expresí Bcl-2. Dinaciclib také indukuje expresi p53 a současně snižuje expresi antiapoptotických proteinů Mcl-1 a XIAP. Pro objasnění aktivace p53 při dinaciclibem indukované buněčné smrti byly použity melanomové buněčné linie s umlčenou expresí p53 pomocí shRNA (small hairpin RNA). Díky nim bylo dokázáno, že při nulové hladině proteinu p53 v buňkách a po ovlivnění těchto buněk dinaciclibem je indukce apoptosy kompletně zastavena. Dinaciclib tedy indukuje apoptosu v panelu melanomových nádorových linií mechanismem, který je závislý na proteinu p53 (Desai *et al.*, 2013).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Cíl práce

Cílem práce byla charakterizace účinků nových nízkomolekulárních inhibitorů CDK s pyrazolopyrimidinovým skeletem, které byly nedávno připraveny v Laboratoři růstových regulátorů, v buněčném modelu maligního melanomu. Dílčí cíle byly stanoveny následovně:

- stanovení cytotoxicity v buněčné linii G361
- sledování změn hladin proteinů regulovaných CDK v buňkách po ovlivnění látkami
- vliv testovaných inhibitorů na indukci apoptosy.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Přístroje a laboratorní vybavení

V průběhu provedení experimentální části byly použity následující přístroje a laboratorní vybavení: CO₂ inkubátor (Sanyo), flowbox s vertikálním prouděním vzduchu TC 48 (Gelaire), centrifuga BR4i (Jouan), mikroskop Nikon TMS (Nikon), vodní lázeň, ultrazvukový homogenizátor Sonoplus HD2200 (Bandelin), UV-VIS spektrofotometr UV-1800 (Shimadzu), aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad), blotovací aparatura Mini Trans-Blot Cell (BioRad), chemiluminiscenční kamera LAS4000 (FujiFilm), fluorescenční reader pro mikrotitrační destičky Fluoroskan Ascent (Thermo LabSystems).

4.2 Použité chemikálie

V průběhu experimentální části byly použity následující chemikálie: calcein AM, ethyldiamintetraoctová kyselina (EDTA), ethylenglykoltetraoctová kyselina (EGTA), trypsin, penicilin, streptomycin, L-glutamin, dimethylsulfoxid (DMSO), inhibitory proteas leupeptin a aprotinin, dithiothreitol (DTT), fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), fluorid sodný, N,N'-metylenbisakrylamid, tetramethylethyldiamin (TEMED), peroxidisíran amonný, hydroxid draselný, Nonidet P-40, Triton X-100, bromfenolová modř, acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylkumarin (Ac-DEVD-AMC) od firmy Sigma Aldrich; kultivační médium Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetální telecí sérum, hovězí sérový albumin (BSA) od firmy Invitrogen; akrylamid, Tween 20, tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) a glycin od firmy MP Biomedicals; chemiluminiscenční substráty luminol a peroxid (ECL kit) od firmy Thermo Scientific; 2-merkptoethanol a Ponceau S od firmy Serva; chlorid sodný, piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonová kyselina) (PIPES), chlorid draselný a dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného od firmy Penta; dodecylsíran sodný (SDS) a glycerol od firmy Lach-Ner; dihydrogenfosforečnan draselný od firmy Chemapol.

4.3 Použité roztoky

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄ (pH = 7,4 – 7,5);

TBS: 137 mM NaCl, 20 mM TRIS (pH = 6,8);

RIPA pufr: 20 mM TRIS (pH = 7,4), 100 mM NaCl₂, 2 mM EGTA, 5 mM EGTA, 2 mM NaF, 0,2% Nonidet P-40, těsně před použitím byl přidán: 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin;

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

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

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

Blotovací pufr: 25 mM TRIS, 192 mM glycin;

Blokovací roztok: 3% BSA v TBS s 0,1% Tween 20;

Ponceau S: 0,2% v 1% kyselině octové;

Kaspasový reakční pufr: 25 mM PIPES/KOH (pH = 7,3), 2 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, před použitím přidán 5 mM DTT.

4.4 Použité protilátky

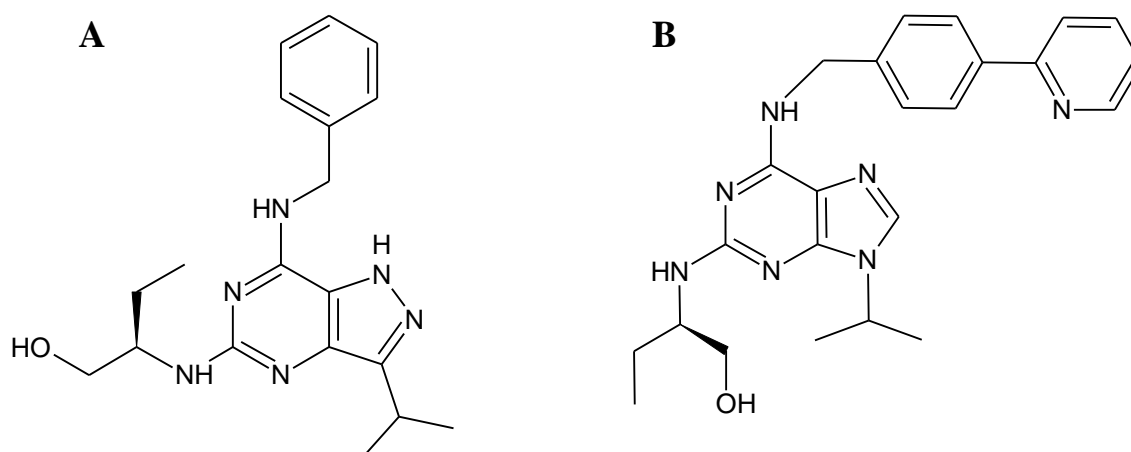
V experimentální části byly pro detekci proteinů použity specifické protilátky proti celkové RNAPII od firmy EMD Millipore (ředění 1:1000), RNAPII fosforylované na Ser2 a RNAPII fosforylované na Ser5 od firmy Bethyl Laboratories, Inc. (ředění 1:1000), Mcl-1 (klon S-19, ředění 1:250), PARP-1 (klon F-2, ředění 1:250) a β-aktin (ředění 1:5000) od firmy Santa Cruz Biotechnology, Inc. Protilátka proti proteinu p53 (klon DO-1, ředění 1:20) byla získána od Dr. B. Vojtěška z Masarykova onkologického ústavu v Brně. Použité sekundární protilátky značené křenovou peroxidasou byly od firmy Sigma Aldrich.

4.5 Použitá buněčná linie

Pro experimentální část byla použita adherentní buněčná linie G361 odvozená od lidského maligního melanomu. Kultivace probíhala v médiu DMEM s obsahem fetálního telecího séra (10 %), penicilinu (0,1 U/ml), streptomycinu (0,1 mg/ml) a L-glutaminu (0,3 mg/ml) v inkubátoru při teplotě 37 °C v 5% atmosféře CO₂.

4.6 Studované inhibitory CDK

Studované inhibitory CDK s pyrazolopyrimidinovým skeletem (označené kódy 2674, 3087, 3088 a 3175) byly připraveny doc. Ing. Liborem Havlíčkem, CSc. z Izotopové laboratoře Ústavu experimentální botaniky AV ČR. Struktury nejsou uvedeny z důvodu přípravy patentové ochrany. Jako pozitivní kontrola byly použity látky 1404 a 2204 připravené doc. Ing. Liborem Havlíčkem, CSc. již dříve (Jorda *et al.*, 2011; Oumata *et al.*, 2008), jejich struktury jsou uvedeny na obrázku 3. Všechny sloučeniny byly charakterizovány pomocí MS, NMR a elementární analýzy a jejich čistota byla vyšší než 95 %. Pro buněčné experimenty byly tyto inhibitory rozpuštěny v DMSO na koncentraci 100 mmol/l. Tyto zásobní roztoky byly uchovávány při teplotě 4 °C a ředěny těsně před použitím do kultivačního média tak, aby výsledná koncentrace DMSO nebyla vyšší než 0,1 %.



Obrázek 3: Strukturní vzorce kontrolních látek (A) 1404 (B) 2204

4.7 Kultivace buněk a jejich ovlivnění

Buněčná linie G361 byla kultivována v inkubátoru při teplotě 37 °C v atmosféře 5% CO₂, po dosažení přibližně 90% konfluence byly buňky vždy pasážovány.

V případě ovlivnění buněk byly tyto vysazeny na Petriho misky v počtu 1,5 milionu buněk, následovala 24 hodinová inkubace, aby došlo k adhezi buněk na dno kultivační nádoby. Následně bylo vyměněno médium, ve kterém byly naředěny testované látky na příslušnou koncentraci. Ovlivnění probíhalo po dobu 24 hodin za standardních kultivačních podmínek. Jako kontrola byly použity buňky, k nimž bylo přidáno odpovídající množství DMSO.

4.8 Test cytotoxicity

Pro zjištění cytotoxicity testovaných látek na danou buněčnou linii bylo využito barviva Calcein AM, které je akumulováno v živých buňkách a přeměněno intracelulárními esterasami na fluorescenční produkt. Intenzita fluorescence lineárně odpovídá počtu živých buněk v kultuře a dá se použít pro stanovení jejich počtu. Buňky byly vysazeny na 96-jamkovou desku a inkubovány 24 hodin, aby došlo k jejich adhezi ke dnu jamek. Buňky byly ovlivněny látkami v koncentracích od 10 μmol/l do 0,1 nmol/l po dobu 72 hodin. Po této době byl k buňkám přidán roztok Calceinu AM v PBS a opět proběhla hodinová inkubace. Fluorescence přeživších buněk byla měřena při vlnových délkách 485/538 nm (excitace/emise). Ze získaných hodnot byly pomocí softwaru ORIGIN vytvořeny křivky závislosti buněčné viability na dávce látky (tzv. „dose-response curve“), z nich pak byla odečtena hodnota IC₅₀, tedy poloviční maximální inhibiční koncentrace, při které dochází k inhibici růstu 50 % buněk. Jako blank bylo v experimentu použito čisté médium, kontrolou byly neovlivněné buňky.

4.9 Sklizení buněk a příprava lyzátu

Pro přípravu vzorků určených k testům na aktivitu kaspas 3, 7 a imunoblotting byly buňky uvolněny ze dna kultivační nádoby škrabkou a přeneseny do zkumavky. Následovala centrifugace při 1000 g po dobu 8 minut a při teplotě 4 °C. Supernatant byl odsát a buňky

byly 2× promyty PBS, přičemž byly současně přeneseny do 1,5ml mikrozkušavky a po odstranění supernatantu byly umístěny do hlubokomrazicího boxu s teplotou -80 °C.

Po rozmražení byl buněčný pelet resuspendován v odpovídajícím množství lyzačního pufru RIPA s přidávkem inhibitorů proteas. Lýze probíhala na ledu po dobu přibližně 20 minut za občasného promíchání, poté byly buňky lyzovány ultrazvukovým homogenizátorem (3 cykly, 15 vteřin, maximální výkon 40 %) a pro odstranění buněčných zbytků následovala centrifugace při 14000 g po dobu 20 minut a při teplotě 4 °C. Supernatant byl přenesen do nových mikrozkušavek a v buněčném lyzátu byla spektrofotometricky stanovena koncentrace proteinů metodou Bradfordové. Pro obě analýzy je nutné, aby všechny vzorky obsahovaly stejné množství proteinů. Proto v případě vzorků pro test aktivity kaspas 3 a 7 byly všechny lyzáty naředěny pufrům RIPA na koncentraci 3 µg/µl. Pro účely western blot analýzy pak byly lyzáty ředěny pufrům RIPA na shodnou hodnotu, tedy na koncentraci vzorku s nejnižší zjištěnou koncentrací proteinů. Po vyrovnání koncentrací bylo ke vzorkům přidáno odpovídající množství 5× SDS vzorkového pufru pro elektroforézu, vzorky byly denaturovány 5 minut při teplotě 95 °C a uskladněny v mrazáku při -20 °C.

4.10 SDS-PAGE, western blotting

Pro separaci proteinů byla použita gelová elektroforéza ve vertikálním uspořádání, separace probíhala za denaturujících podmínek v 10% polyakrylamidovém gelu. Při fokusaci proteinů v zaostřovacím gelu bylo použito napětí 80 V, po přechodu proteinů do gelu dělicího bylo napětí zvýšeno na 120 V.

Po dokončení separace byl gel s proteiny přenesen na blotovací aparaturu. Přenos proteinů na nitrocelulósovou membránu probíhal po dobu dvou a půl hodin za stálého chlazení ledem a při proudu 270 mA. Po ukončení přenosu proteinů byla membrána barvena Ponceau S 5 minut a následně opláchnuta destilovanou vodou. Díky nabarvení dochází ke zviditelnění proteinů na membráně a je tak možná vizuální kontrola rovnoměrného nanesení vzorků. Membrána byla zcela odbarvena v TBS a následně blokována v 3% roztoku BSA v TBS s Tweenem 20 jednu hodinu. Blokování je nutné, aby nedocházelo k nespecifickým vazbám protilátek na volnou membránu. Nakonec byly naneseny specifické primární protilátky pro vybrané proteiny a membrány byly

s protilátkou inkubovány přes noc při teplotě 4 °C ve vlhké komůrce. Následujícího dne byly membrány několikrát promyty TBS respektive TBS s Tweenem 20 a inkubovány s příslušnými sekundárními protilátkami značenými křenovou peroxidasou. Inkubace probíhala při laboratorní teplotě po dobu jedné hodiny a následně byly membrány opět promývány totožným pufrem. Primární i sekundární protilátky byly ředěny v 3% roztoku BSA. Po promytí byl na membránu nanesen roztok luminolu a peroxidu z kitu ECL v poměru 1:1 a pomocí CCD kamery LAS4000 bylo detekováno uvolněné světelné záření. Principem chemiluminiscenční reakce je přeměna substrátů (peroxid, luminol) křenovou peroxidasou na nestabilní produkt, který se stabilizuje vyzářením světelného kvanta. Množství daného proteinu je přímo úměrné množství peroxidasy a tím pádem uvolněnému světlu, což umožňuje relativní kvantifikaci proteinů.

4.11 Fluorimetrické stanovení aktivity kaspasy 3 a 7

Do 96-jamkové desky byl nadávkován buněčný lyzát o objemu 5 μ l s množstvím proteinů 15 μ g. K lyzátu bylo přidáno 100 μ l kaspasového pufru se substrátem Ac-DEVD-AMC, směs byla opatrně promíchána, aby nedošlo k napěnění a následovala inkubace při laboratorní teplotě ve tmě po dobu minimálně jedné hodiny. Fluorescence byla měřena po dvou hodinách inkubace a to při vlnových délkách 355/460 nm (excitace/emise). Jako kontrola byla měřena aktivita kaspas u neovlivněných buněk, od výsledných hodnot bylo odečteno pozadí neboli autolýza substrátu.

5 VÝSLEDKY

5.1 Stanovení cytotoxicity

U čtyř pyrazolopyrimidinových inhibitorů CDK s označením 2674, 3087, 3088 a 3175 byla nejprve pomocí calceinového testu stanovena cytotoxicita na buněčné linii G361, tedy byla určena hodnota IC_{50} . Hodnoty odečtené z křivek závislosti buněčné odpovědi na koncentraci látky jsou uvedeny v tabulce II v mikromolárních koncentracích. Pro ovlivnění byly použity koncentrace látek v rozmezí od 100 $\mu\text{mol/l}$ do 0,1 nmol/l , ředěny byly postupně vždy 10 \times od nejvyšší koncentrace po nejnižší. Samotné ovlivnění trvalo 72 hodin. Test cytotoxicity byl proveden ve třech opakováních, uvedené hodnoty jsou průměrem dílčích měření.

Tabulka II: Hodnoty IC_{50} pro čtyři testované inhibitory CDK. Doba ovlivnění byla 72 hodin, použité koncentrace 100 $\mu\text{mol/l}$ - 0,1 nmol/l .

Inhibitor	IC_{50} [$\mu\text{mol/l}$]
2674	0,23 \pm 0,02
3087	0,15 \pm 0,08
3088	3,05 \pm 0,05
3175	0,19 \pm 0,03

Ze získaných hodnot IC_{50} byly odvozeny koncentrace pro následující experimenty - pro test aktivity kaspasy 3, 7 a imunoblotting. Konkrétně se jednalo o násobky 0,5 \times IC_{50} , 1 \times IC_{50} a 5 \times IC_{50} . Číselné vyjádření koncentrací je uvedeno níže v tabulce III v mikromolárních koncentracích. Před použitím byly látky vždy postupně ředěny od nejvyšší koncentrace po nejnižší.

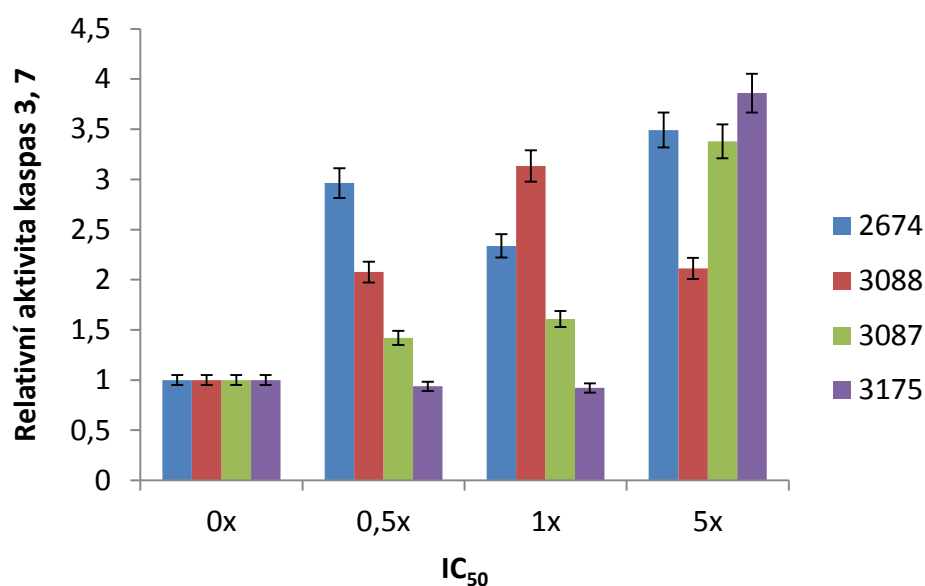
Tabulka III: Koncentrace testovaných látek, které byly použity pro test aktivity kaspasy 3, 7 a pro imunoblotting.

Inhibitor	0,5× IC₅₀ [μmol/l]	1× IC₅₀ [μmol/l]	5× IC₅₀ [μmol/l]
2674	0,115	0,23	1,15
3087	0,075	0,15	0,75
3088	1,525	3,05	15,25
3175	0,095	0,19	0,95

5.2 Měření aktivity kaspasy 3 a 7

V předchozím experimentu bylo zjištěno, že každá z testovaných látek 2674, 3087, 3088 a 3175 má na buněčnou linii G361 cytotoxický efekt. Je známo, že příbuzné inhibitory CDK se vyznačují svou schopností indukovat apoptosu (Gucký *et al.*, 2013; Jorda *et al.*, 2011; Zatloukal *et al.*, 2013). Pro relativní kvantifikaci proapoptotických účinků testovaných látek byl použit fluorimetrický test aktivity kaspas 3 a 7 v lyzátu buněk, které byly dříve ovlivněny testovanými látkami v koncentracích 0,5× IC₅₀, 1× IC₅₀ a 5× IC₅₀ po dobu 24 hodin. Všechny získané absolutní hodnoty fluorescence byly nejprve normalizovány dle kontrolního vzorku, posléze byly převedeny na relativní aktivitu kaspas.

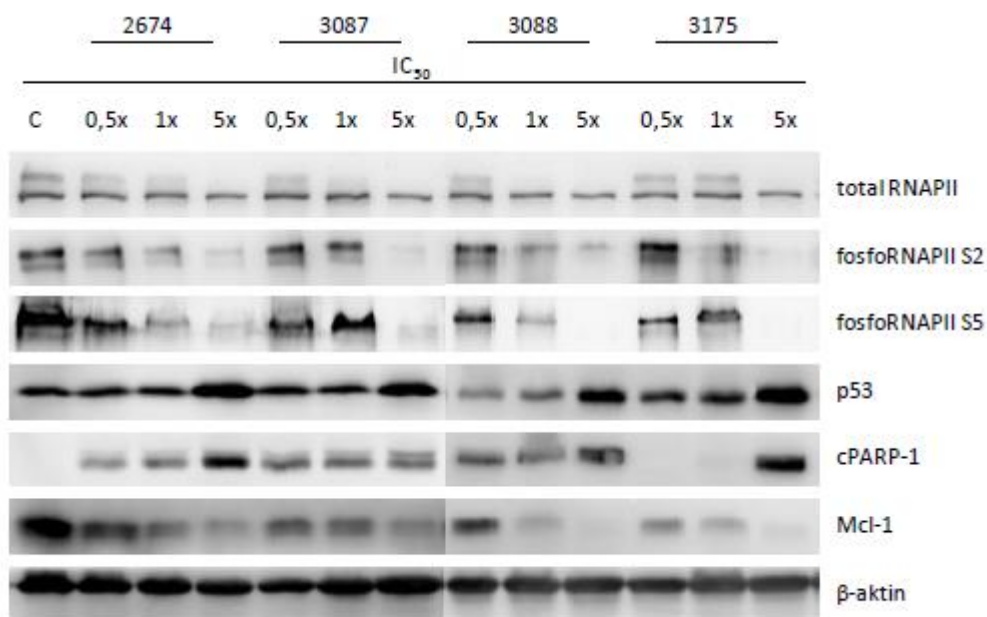
Ze získaných dat je patrné, že všechny čtyři látky jsou schopné indukovat apoptosu. U látek 2674, 3087 a 3088 dochází k mírnému zvýšení kaspasové aktivity v koncentracích nižších než IC₅₀, následně je zřejmý postupný nárůst aktivit až do nejvyšší koncentrace 5× IC₅₀. V případě látky 3088 však dochází k poklesu aktivity v nejvyšší koncentraci a to zřejmě v důsledku degradace proteinů vlivem použití vysoké koncentrace látky. Látka 3175 vykazuje proapoptotické účinky pouze v nejvyšší testované koncentraci, u nižších koncentrací nebyl pozorován nárůst kaspasové aktivity – ta se pohybovala na úrovni kontrolních buněk, jak je uvedeno na obrázku 4.



Obrázek 4: Relativní aktivita kaspas 3 a 7 v buněčné linii G361 po 24 hodinovém ovlivnění látkami 2674, 3087, 3088 a 3175 v koncentracích 0,5× IC₅₀, 1× IC₅₀ a 5× IC₅₀. Fluorescence byla měřena po 2 hodinách inkubace.

5.3 Sledování vybraných proteinů souvisejících s inhibicí CDK v závislosti na koncentraci

Pro ověření předpokládaného mechanismu účinku látek 2674, 3087, 3088 a 3175 byla využita metoda western blot, pomocí níž je možné sledovat nejen hladiny proteinů, ale také jejich postranlační modifikace související s aktivací nebo deaktivací. Vzhledem k předpokládanému mechanismu účinku byly sledovány hladiny RNAPII, což je významný substrát CDK7 a CDK9, a to jak celkové, tak fosforylované v místech Ser2 a Ser5. Na fosforylaci C-koncové domény velké podjednotky RNAPII se podílí několik typů transkripčních CDK (Bartkowiak *et al.*, 2011; Fuda *et al.*, 2009). Například komplex CDK7 s jejími partnery je součástí transkripčního faktoru TFIIF a podílí se na iniciaci transkripce, CDK9 je zodpovědná za fosforylaci v jiném místě CTD a umožňuje regulovat elongaci transkriptu. Pokud ale dojde k inhibici těchto transkripčních CDK, nemůže být RNAPII fosforylována a dochází k poklesu její hladiny v ovlivněných buňkách.



Obrázek 5: Stanovení hladin proteinů v buňkách G361 vystavených vlivu studovaných sloučenin. Buňky byly ovlivněny látkami 2674, 3087, 3088, 3175 v koncentracích $0,5 \times IC_{50}$, $1 \times IC_{50}$ a $5 \times IC_{50}$ po dobu 24 hodin. Proteiny byly detekovány i v kontrolních neovlivněných buňkách (C); jako kontrola rovnoměrné koncentrace proteinů ve vzorcích posloužila detekce β -aktinu.

Z obrázku 5 je zřejmé, že po 24 hodinovém ovlivnění buněčné linie G361 příslušnými koncentracemi látek 2674, 3087, 3088 a 3175 dochází k poklesu hladiny fosforylované RNAPII v místech Ser2 i Ser5. U látek 2674, 3088 a 3175 dochází ke zřetelnému snížení hladiny fosfoRNAPII Ser2 v koncentraci $1 \times IC_{50}$, u látky 3087 je tomu tak až v koncentraci nejvyšší. V případě fosforylované formy RNAPII v pozici Ser5 byla pozorována změna hladiny proteinů v koncentraci $1 \times IC_{50}$ u dvou látek a to 2674 a 3088, zbylé dvě látky vyvolaly změnu hladiny tohoto proteinu v koncentraci nejvyšší. Na základě tohoto pozorování se nabízí tvrzení, že všechny čtyři testované látky jsou možnými inhibitory transkripčních CDK.

Dalším proteinem detekovaným v tomto experimentu byl proapoptotický protein p53, který je za normálních okolností v buňkách ve velmi nízké koncentraci. Jak je patrné z obrázku 4, jeho hladina po ovlivnění látkami výrazně stoupá. Zřetelný je nárůst hladiny tohoto proteinu v buňkách vystavených vzrůstajícím koncentracím studovaných sloučenin.

Naproti tomu hladina proteinu Mcl-1, který se podílí na regulaci programované buněčné smrti, se po ovlivnění buněk G361 testovanými látkami výrazně snižuje.

V porovnání s kontrolními buňkami dochází k výraznému poklesu exprese v případě všech látek již v nejnižší koncentraci, tedy $0,5 \times IC_{50}$.

Posledním sledovaným proteinem byl fragment proteinu PARP-1. Poly(ADP-ribosa) polymerasa 1 je substrátem kaspas 3 a 7. Dochází-li tedy k aktivaci kaspas, je tento protein specificky štěpen na dva fragmenty o velikosti 113 a 89 kDa. Přítomnost fragmentu o velikosti 89 kDa (cPARP-1) je důkazem proapoptotických účinků testovaných látek. U kontrolních buněk k apoptose nedochází, proto v jejich případě nebyl štěpený PARP-1 detekován, jak ukazuje obrázek 5. Stejně tomu tak je i v případě dvou nejnižších koncentrací látky 3175, kdy ani po 24 hodinovém ovlivnění buněk G361 nedošlo ke štěpení PARP-1, pouze v koncentraci $5 \times IC_{50}$ je zřejmé strmé zvýšení hladiny štěpného produktu tohoto proteinu. Po ovlivnění buněk látkami 2674, 3087 a 3088 došlo k detekci cPARP-1 už v koncentracích nejnižších, přičemž rozdíl v hladině proteinu u různých koncentrací látek není výrazný.

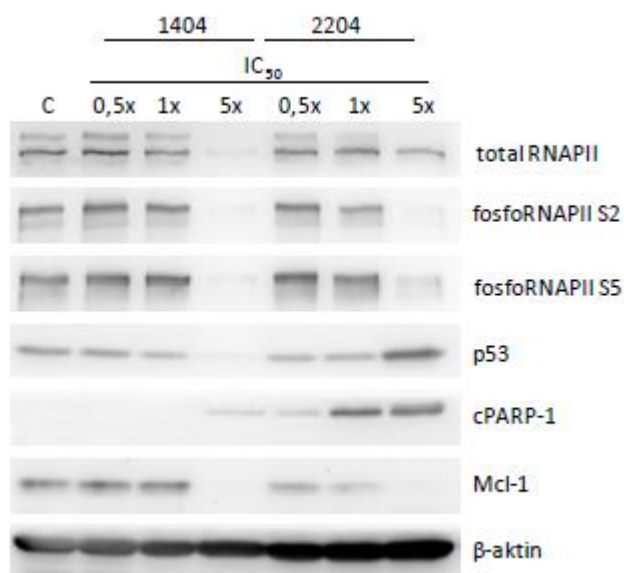
Kromě čtyř nových inhibitorů CDK byly v experimentu pro kontrolu použity i již charakterizované látky 1404 a 2204. Jejich koncentrace použité pro experiment byly opět $0,5 \times IC_{50}$, $1 \times IC_{50}$, $5 \times IC_{50}$. Hodnoty jsou číselně vyjádřeny v tabulce IV.

Tabulka IV: Koncentrace látek 1404 a 2204 použité pro 24 hodinové ovlivnění buněk a následné stanovení úrovně exprese vybraných proteinů.

Inhibitor	$0,5 \times IC_{50}$ [$\mu\text{mol/l}$]	$1 \times IC_{50}$ [$\mu\text{mol/l}$]	$5 \times IC_{50}$ [$\mu\text{mol/l}$]
1404	2,425	4,85	24,25
2204	0,25	0,5	2,5

V případě imunodetekce proteinů po ovlivnění buněk látkou 2204 byly pozorovány očekávané změny v hladinách vybraných proteinů, podobně jako tomu bylo v předchozích případech. Z obrázku 6 je zřejmé, že hladiny obou fosforylovaných forem RNAPII po ovlivnění buněk se vzrůstající koncentrací klesají, došlo tedy k zastavení transkripce. Naopak hladiny proteinů p53 a cPARP-1 vzrůstají, což svědčí ve prospěch indukce apoptosy. Hladina antiapoptotického faktoru Mcl-1 klesá, v nejvyšší koncentraci látky 2204 se jeho hladina jeví být téměř nulová. Naopak hladiny proteinů detekované po ovlivnění buněk látkou 1404 neodpovídají očekávání. Hladiny všech proteinů jsou

v koncentracích $0,5 \times IC_{50}$ a $1 \times IC_{50}$ shodné s kontrolními buňkami, v nejvyšší použité koncentraci látky 1404 nebyly detekovány žádné sledované proteiny. To je možné vysvětlit použitím příliš vysoké koncentrace látky 1404, kdy v buňkách došlo k úplné degradaci sledovaných proteinů.

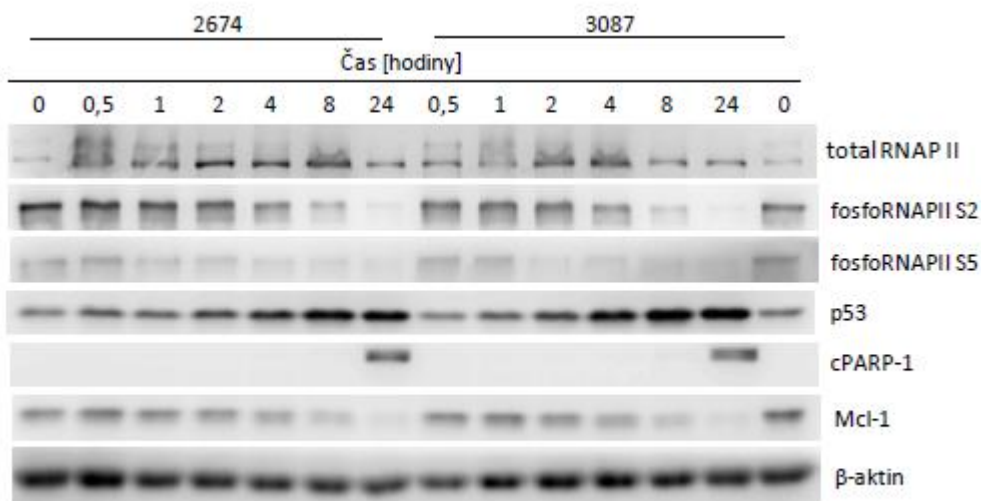


Obrázek 6: Stanovení hladin proteinů v buňkách G361 vystavených vlivu kontrolních sloučenin. Buňky byly ovlivněny látkami 1404 a 2204 v koncentracích $0,5 \times IC_{50}$, $1 \times IC_{50}$ a $5 \times IC_{50}$ po dobu 24 hodin. Proteiny byly detekovány i v kontrolních neovlivněných buňkách (C); jako kontrola rovnoměrné koncentrace proteinů ve vzorcích posloužila detekce β -aktinu.

5.4 Sledování vybraných proteinů souvisejících s inhibicí CDK v závislosti na čase

Expres vybraných proteinů byla sledována taktéž v závislosti na čase. Buňky byly ovlivněny látkami 2674, 3087, 3088, 3175 pouze v koncentraci $5 \times IC_{50}$. Kontrolní buňky byly sklizeny bez prodlevy (v čase 0), ostatní pak v časových intervalech 0,5; 1; 2; 4; 8 a 24 hodin od ovlivnění. Obrázek 7a zobrazuje relativní hladiny vybraných proteinů v závislosti na čase. Po ovlivnění látkami 2674 a 3087 dochází v buňkách k poklesu hladin obou fosforylovaných forem RNAPII. V případě látky 2674 dochází ke zřetelnému poklesu hladiny RNAPII fosforylované v místě Ser2 přibližně po 4 hodinách od ovlivnění, u látky 3087 je tomu tak až po osmi hodinách. Co se týká fosfoRNAPII Ser5, dochází po ovlivnění oběmi látkami ke změně proteinové hladiny dříve, již po dvou hodinách od ovlivnění lze

pozorovat pokles hladiny tohoto proteinu v buňkách. Hladina proapoptického proteinu p53 naopak s rostoucím časem vzrůstá, k počátečnímu nárůstu hladiny p53 dochází po 4 hodinách od ovlivnění, stejně tak je možné po čtyřhodinovém ovlivnění pozorovat pokles hladiny antiapoptického proteinu Mcl-1. Po ovlivnění jak látkou 2674, tak látkou 3087 dochází ke štěpení proteinu PARP-1 až po 24 hodinovém ovlivnění, po stejné době tedy pravděpodobně dochází k indukci apoptosy.

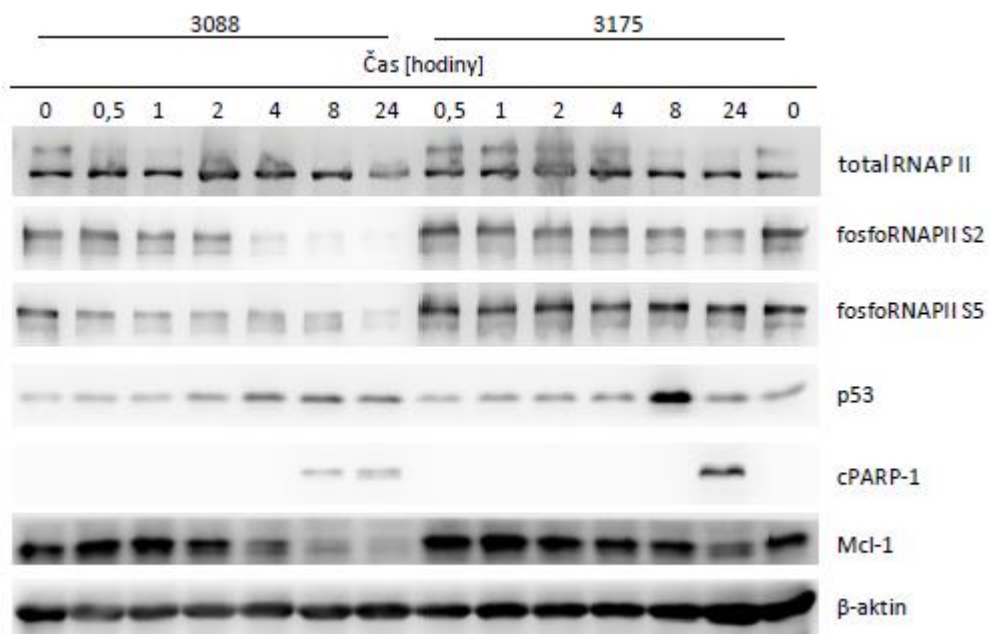


Obrázek 7a: Stanovení hladin proteinů v buňkách G361 vystavených vlivu studovaných sloučenin. Buňky byly ovlivněny látkami 2674 a 3087 v koncentraci $5 \times IC_{50}$ v časovém rozmezí od 0,5 do 24 hodin. Proteiny byly detekovány i v kontrolních neovlivněných buňkách (0); jako kontrola rovnoměrné koncentrace proteinů ve vzorcích posloužila detekce β -aktinu.

Obdobná závislost změn hladin proteinů na čase v buňkách linie G361 po 24 hodinovém ovlivnění byla pozorována taktéž u látek 3088 a 3175 v koncentraci $5 \times IC_{50}$, viz obrázek 7b. Po ovlivnění buněk látkou 3088, došlo k poklesu hladiny fosforylované formy RNAPII Ser2 po čtyřech hodinách od ovlivnění, u Ser5 fosforylované formy RNAPII je znatelný pokles až po 24 hodinách po ovlivnění buněk. Hladina proteinu p53 v buňkách vzrůstá opět po 4 hodinách od ovlivnění, po stejné době je možné pozorovat pokles hladiny antiapoptického faktoru Mcl-1. Štěpný fragment proteinu PARP-1 byl detekován po osmihodinovém ovlivnění látkou 3088.

V případě, kdy byly buňky ovlivněny 24 hodin látkou 3175, není možné pozorovat změny v hladině obou fosforylovaných forem RNA polymerasy II. Hladina těchto proteinů je v obou případech shodná s kontrolou. Po osmi hodinách od ovlivnění byl detekován

nárůst hladiny nádorového supresoru p53 a zároveň pokles hladiny antiapoptického proteinu Mcl-1. Ke štěpení PARP-1 došlo až po 24 hodinách od ovlivnění látkou 3175, v porovnání s buňkami ovlivněnými látkou 3088 tedy dochází k apoptose později.



Obrázek 7b: Stanovení hladin proteinů v buňkách G361 vystavených vlivu studovaných sloučenin. Buňky byly ovlivněny látkami 3088 a 3175 v koncentraci $5 \times IC_{50}$ v časovém rozmezí od 0,5 do 24 hodin. Proteiny byly detekovány i v kontrolních neovlivněných buňkách (0); jako kontrola rovnoměrné koncentrace proteinů ve vzorcích posloužila detekce β -aktinu.

6 DISKUSE

Na základě testů pro stanovení antiproliferační aktivity testovaných látek lze tvrdit, že všechny studované inhibitory 2674, 3087, 3088 i 3175 mají na buňky linie G361 cytotoxický účinek. Rozptyl hodnot IC_{50} je pro danou buněčnou linii od 0,15 $\mu\text{mol/l}$ do 3,05 $\mu\text{mol/l}$, přičemž nejvyšší antiproliferační aktivitu vykazuje látka 3087. Při srovnání s kontrolními látkami 1404 ($IC_{50} = 4,8 \mu\text{mol/l}$) a 2204 ($IC_{50} = 0,5 \mu\text{mol/l}$), jejichž cytotoxicita na buněčnou linii G361 byla testována již dříve (Gucký *et al.*, 2013; Jorda *et al.*, 2011) je zřejmé, že kromě inhibitoru 3088 mají tři ostatní na buněčnou linii stejný efekt při nižších koncentracích. Po ovlivnění buněk látkami bylo navíc možné pozorovat jejich morfologické změny, které zřejmě souvisí s apoptosou. Proto byla schopnost testovaných inhibitorů indukovat apoptosu prokázána fluorimetrickým testem aktivity kaspas 3 a 7 v lyzátu buněk po ovlivnění všemi čtyřmi inhibitory. K indukci apoptosy došlo u buněk po ovlivnění všemi látkami, avšak za použití různých koncentrací. U inhibitorů 2674, 3087 a 3088 byl pozorován nárůst aktivity kaspas 3 a 7 již v koncentraci nižší než je IC_{50} zjištěná pro tyto látky, v případě inhibitoru 3175 došlo ke strmému nárůstu aktivity až v koncentraci 0,95 $\mu\text{mol/l}$, tedy pětinašobku IC_{50} . Lze tedy usuzovat, že k aktivaci kaspas je v případě látky 3175 dostačující mnohem nižší koncentrace, která je pravděpodobně nižší než 0,95 $\mu\text{mol/l}$ a zároveň vyšší než 0,19 $\mu\text{mol/l}$ ($1 \times IC_{50}$). Na základě těchto výsledků je možné říct, že inhibitory 2674, 3087, 3088 i 3175 jsou schopny aktivovat vnitřní mitochondriální apoptotickou dráhu, jejíž součástí jsou právě kaspasy 3 a 7. Pro potvrzení byl v rámci imunoblottingu detekován štěpný fragment proteinu PARP-1 (cPARP-1), který je substrátem kaspasy 3 a je jí specificky štěpen na produkt o velikosti 89 kDa.

Kromě substrátu kaspas, proteinu PARP-1, byly metodou western blotting detekovány proteiny p53 a Mcl-1 související s apoptosou a také proteiny, které jsou substráty transkripčních CDK, především RNAPII. Imunodetekcí byla potvrzena schopnost látek indukovat apoptosu. Detekce cPARP-1 korelovala ve všech případech se zvýšenou aktivitou kaspas. Navíc ovlivněné buňky vykazovaly v závislosti na dávce snížení hladiny antiapoptotického faktoru Mcl-1 a také zvýšení hladiny proteinu p53, o němž je známo, že je aktivován a stabilizován inhibitory CDK (MacCallum *et al.*, 2005; Kotala *et al.*, 2001). Ostatními detekovanými proteiny byla celková RNA polymerasa II a její postranskripčně fosforylované formy v pozicích Ser2 a Ser5. Hladiny obou fosforylovaných forem RNAPII

v závislosti na koncentraci klesají. Pokles hladin fosforylovaných forem RNAPII může být způsobený přímou inhibicí CDK7 a CDK9, stejně jako je tomu v případě kontrolní látky 2204. V úvahu je ale nutné vzít také negativní zpětnovazebné mechanismy, kdy po ovlivnění buněk látkami může v jejich důsledku dojít ke snížení exprese CDK9 (Bettayeb *et al.*, 2008).

Inhibice konkrétních CDK studovanými inhibitory byla testována již dříve v Laboratoři růstových regulátorů, kdy byly stanoveny hodnoty IC_{50} mimo jiné pro inhibici komplexů CDK2/cyklin E, CDK7/cyklin H/MAT1 a CDK9/cyklin T1. Tyto hodnoty IC_{50} udávají koncentraci inhibitoru, při které dojde k 50% poklesu aktivity sledovaného enzymu. Z hlediska inhibice komplexu CDK2/cyklin E se jako nejúčinnější jeví inhibitor s označením 3087, jehož IC_{50} pro tento komplex je pouze 0,009 $\mu\text{mol/l}$. Inhibiční aktivity ostatních látek jsou 2 - 14 \times nižší, přičemž nejnižší aktivita byla zjištěna pro inhibitor 3088 a to 0,128 $\mu\text{mol/l}$. Kontrolní látky, 1404 a 2204, vykazují pro komplex CDK2/cyklin E shodnou inhibiční aktivitu 0,04 $\mu\text{mol/l}$ (Bettayeb *et al.*, 2008; Jorda *et al.*, 2011). To znamená, že všechny studované pyrazolopyrimidinové inhibitory kromě 3088 jsou v tomto ohledu účinnější. Na druhou stranu, inhibiční aktivita dinaclicibu byla pro komplex CDK2/cyklin E stanovena na 1 nmol/l (Abdullah *et al.*, 2011), tento inhibitor je tedy 10 \times účinnější než nejúčinnější studovaný inhibitor 3087. Komplex CDK2/cyklin E je v buňkách nezbytný pro fosforylaci RB proteinů a pro přechod buněk z G_1 fáze buněčného cyklu do S fáze. Při jeho inhibici tedy dochází k zastavení buněčného cyklu v G_1 fázi. Inhibiční aktivita testovaných látek byla sledována i v případě transkripčních CDK, konkrétně CDK7 a CDK9. Nejvyšší inhibiční aktivitu pro komplex CDK7/Cyklin H/MAT1 vykazoval inhibitor s nejhorším cytotoxickým účinkem a to 3088, IC_{50} pro tento komplex byl 0,8 $\mu\text{mol/l}$. Inhibiční aktivity zbylých tří látek 2674, 3087 a 3175 se pohybovaly v rozmezí 1 - 2,8 $\mu\text{mol/l}$. Všechny hodnoty IC_{50} byly ale vyšší než v případě kontrolní látky 1404, její IC_{50} pro komplex CDK7/Cyklin H/MAT1 je 0,16 $\mu\text{mol/l}$ (Jorda *et al.*, 2011), aktivita testovaného inhibitoru 3088 je tedy 5 \times nižší než u této kontrolní látky. Inhibiční aktivita kontrolní látky 2204 (Bettayeb *et al.*, 2008) je srovnatelná s látkami 2674, 3087 a 3175. Pro poslední komplex CDK9/Cyklin T1 se inhibiční aktivity inhibitorů pohybují v rozmezí od 0,07 $\mu\text{mol/l}$ pro 3087 do 0,25 $\mu\text{mol/l}$ pro inhibitor 3175. Účinnost inhibice tohoto komplexu je vysoká a srovnatelná s oběmi kontrolními látkami (Bettayeb *et*

al., 2008; Jorda *et al.*, 2011). Vyšší aktivitu v inhibici této transkripční CDK ale vykazuje dinaciclib a to pouze 4 nmol/l (Abdullah *et al.*, 2011).

Jak CDK7 tak CDK9 se v komplexu s příslušnými cykliny podílí na regulaci transkripce a to prostřednictvím fosforylace CTD RNAPII. Fosforylace této domény umožňují regulovat jednak iniciaci transkripce a posléze také její elongaci. Inhibice CDK7 a CDK9 tak vede k zastavení transkripce, čímž dochází ke snížení hladin proteinů s antiapoptotickým účinkem jako je třeba Mcl-1 a v buňkách dochází k indukci apoptosy (Bösken *et al.*, 2014). Kinasové inhibiční testy potvrzují předpokládaný mechanismus účinku, který byl stanoven na základě metody western blotting, a sice že čtyři testované inhibitory 2674, 3087, 3088 a 3175 jsou specifické inhibitory CDK, které se podílí na zastavení buněčného cyklu inhibicí CDK2 a jsou také schopné prostřednictvím inhibice transkripčních CDK indukovat apoptosu.

7 ZÁVĚR

Byly sledovány účinky čtyř nových pyrazolopyrimidinových inhibitorů CDK na nádorovou buněčnou linii G361 odvozenou od maligního melanomu. Pro tuto buněčnou linii jsou inhibitory cytotoxické, zjištěné hodnoty IC_{50} se pohybují v rozmezí od 0,15 do 3,05 $\mu\text{mol/l}$. Cytotoxicita je dána schopností inhibitorů indukovat apoptosu a to prostřednictvím aktivace vnitřní mitochondriální apoptotické dráhy. Její součástí jsou kaspasy 3 a 7, jejichž aktivita byla po ovlivnění buněk inhibitory několikanásobně zvýšená. Imunodetekcí byly sledovány změny v hladinách proteinů souvisejících s apoptosou a inhibicí CDK a na základě těchto změn byl navržen mechanismus účinku studovaných inhibitorů. Jelikož změny hladin těchto proteinů vykazují podobný trend, jako byl již pozorován v předchozích experimentech s inhibitory podobných struktur, bylo usouzeno, že všechny čtyři testované inhibitory s označením 2674, 3087, 3088, 3175 jsou stejně jako kontrolní látky 1404 a 2204 účinné a specifické inhibitory CDK, zejména pak CDK2 a transkripčních CDK7 a CDK9. V porovnání s inhibitory podobných struktur, od kterých jsou tyto nové sloučeniny odvozeny, vykazují účinek v několikanásobně nižších koncentracích a jsou tedy jejich účinnější variantou.

8 LITERATURA

- Abdullah, C., Wang, X., Becker, D. (2011): Expression analysis and molecular targeting of cyclin-dependent kinases in advanced melanoma. *Cell Cycle* 10: 977-988
- Ascierto, P. A., Kirkwood, J. M., Grob, J., Simeone, E., Grimaldi, A. M., Maio, M., Palmieri, G., Testori, A., Marincola, F. M., Mozzillo, N. (2012a): The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *Journal of Translational Medicine* 10: 85
- Ascierto, P. A., Simeone, E., Giannarelli, D., Grimaldi, A. M., Romano, A., Mozzillo, N. (2012b): Sequencing of BRAF inhibitors and ipilimumab in patients with metastatic melanoma: a possible algorithm for clinical use. *Journal of Translational Medicine* 10: 107
- Asghar, U., Witkiewicz, A. K., Turner, N. C., Knudsen, E. S. (2015): The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Neture Reviews Drug Discovery* 14(2): 130-46
- Bartkowiak, B., Greenleaf, A. L. (2011): Phosphorylation of RNAPII. *Transcription* 2: 115-119
- Beroukhim, R., Mermel, C. H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J. S., Dobson, J., Urashima, M., McHenry, K. T. *et al.* (2010): The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 463: 899-905
- Bertrand, M. J., Milutinovic, S., Dickson, K. M., Ho, W. C., Boudreault, A., Durkin, J., Gillard, J. W., Jaquith, J. B., Morris, S. J., Barker, P. A. (2008): cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ubiquitin ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Molecular Cell* 30: 689-700
- Bettayeb, K., Oumata, N., Echalié, A., Ferandin, Y., Endicott, J. A., Galons, H., Meijer, L. (2008): CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Oncogene* 27: 5797-5807
- Bhatt, K. V., Spofford, L. S., Aram, G., McMullen, M., Pumiglia, K., Aplin, A. E. (2005): Adhesion control of cyclin D1 and p27^{Kip1} levels is deregulated in melanoma cells through BRAF-MEK-ERK signaling. *Oncogene* 24: 3459-3471
- Bollag, G., Hirth, P., Tsai, J., Zhang, J., Ibrahim, P. N., Cho, H., Spevak, W., Zhang, C., Thang, Y., Habets, G., Burton, E. A., Wong, B., Tsang, G., *et al.* (2010): Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* 467: 596-599
- Bösken, Ch. A., Farnung, L., Hintermair, C., Merzel Schachter, M., Vogel-Bachmayr, K., Blazek, D., Anand, K., Fisher, R. P., Eick, D., Geyer, M. (2014): The structure and substrate specificity of human CDK12/Cyclin K. *Nature Communications* 5: 3505
- Boutros, R., Lobjois, V., Ducommun, B. (2007): CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets?. *Nature Review Cancer* 7: 495-507
- Brana, I., Siu, L. L. (2012): Clinical development of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors for cancer treatment. *BMC Medicine* 10: 161
- Britten, C. D. (2013): PI3K and MEK inhibitor combinations: examining the evidence in selected tumor types. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 71: 1395-1409
- Castedo, M., Perfettini, J. L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R., Kroemer, G. (2004): Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 23: 2825-2837
- Corcoran, R. B., Settleman, J., Engelma, J. A. (2011): Potential therapeutic strategies to overcome acquired resistance to BRAF or MEK inhibitors in BRAF mutant cancers. *Oncotarget* 2: 336-346

- Day, P. J., Cleasby, A., Tickle, I. J., O'Reilly, M., Coyle, J. E., Holding, F. P., McMenamin, R. L., Yon, J., Chopra, R., Lengauer, C., Jhoti, H. (2009): Crystal structure of human CDK4 in complex with D-type cyclin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 4166-4170
- De Bondt, H. L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H. D., Morgan, D. O., Kim, S. H. (1993): Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* 363: 595-602
- Desai, B. M., Villanueva, J., Nguyen, T. T., Lioni, M., Xiao, M., Kong, J., Krepler, C., Vultur, A., Flaherty, K. T., Nathanson, K. L., Smalley, K. S. M., Herlyn, M. (2013): The anti-melanoma activity of dinaciclib, a cyclin-dependent kinase inhibitor, is dependent on p53 signalling. *PloS ONE* 8: e59588
- Dickson, M. (2014): Molecular Pathways: CDK4 Inhibitors for Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research* 20(13): 3379-3383
- Dickson, P., Gershenwald, J. (2011): Staging and Prognosis of Cutaneous Melanoma. *Surgical Oncology Clinics of North America* 20(1): 1-17
- Dogan, T., Harms, G. S., Hekman, M., Karreman, C., Oberoi, T. K., Alnemri, E. S., Rapp, U. R., Rajalingam, K. (2008): X-linked and cellular IAPs modulate the stability of C-RAF kinase and cell motility. *Nature Cell Biology* 10: 1447-1455
- Dohi, T., Okada, K., Xia, F., Wilford, C. E., Samuel, T., Welsh, K., Marusawa, H., Zou, H., Armstrong, R., Matsuzawa, S., Salvesen, G. S., Reed, J. C., Altieri, D. C. (2004): An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 34087-34090
- Du, J., Widlund, H. R., Horstmann, M. A., Ramaswamy, S., Ross, K., Huber, W. E., Nishimura, E. K., Golub, T. R., Fisher, D. E. (2004): Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocytes-specific transcriptional regulation by MITF. *Cancer Cell* 6: 565-576
- Dynek, J. N., Chan, S. M., Liu, J., Zha, J., Fairbrother, W. J., Vucic, D. (2008): Microphthalmia-associated transcription factor is a critical transcriptional regulator of melanoma inhibitor of apoptosis in melanomas. *Cancer Research* 68: 3124-3132
- Eckelman, B. P., Salvese, G. S., Scott, F. L. (2006): Human inhibitor of apoptosis proteins: Why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep.* 7: 988-994
- Egloff, S., Dienstbier, M., Murphy, S. (2012): Updating the RNA polymerase CTD code: adding gene-specific layers. *Trends in Genetics* 28: 333-341
- Echalier, A., Endicott, J. A., Noble, M. E. (2010): Recent developments in cyclin-dependent kinase biochemical and structural studies. *Biochimica et Biophysica acta* 1804: 511-519
- Emery, C. M., Vijayendrana, K. G., Zipse, M. C., Sawyera, A. M., Niua, L., Kima, J. J., Hattona, C., Choprad, R., *et al.* (2009): MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 106: 20411-20416
- Flaherty, K., LoRusso, P., DeMichele, A., Abramson, V., Courtney, R., Randolph, S., Shaik, M., Wilner, K., O'Dwyer, P. and Schwartz, G. (2011): Phase I, Dose-Escalation Trial of the Oral Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor PD 0332991, Administered Using a 21-Day Schedule in Patients with Advanced Cancer. *Clinical Cancer Research* 18(2): 568-576
- Florell, S. R., Bowen, A. R., Hanks, A. N., Murphy, K. J., Grossman, D. (2005): Proliferation, apoptosis, and survivin expression in a spectrum of melanocytic nevi. *Journal of Cutaneous Pathology* 32: 45-49

- Fry, D. W., Harvey, P. J., Keller, P. R., Elliott, W. L., Meade, M., Trachet, E., *et al.* (2004): Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapy* 3: 1427-1438
- Fuda, N. J., Ardehali, M. B., Lis, J. T. (2009): Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription *in vivo*. *Nature* 461: 186-192
- Gelbert, L., Cai, S., Lin, X., Sanchez-Martinez, C., del Prado, M., Lallena, M., Torres, R., Ajamie, R., Wishart, G., Flack, R., Neubauer, B., Young, J., Chan, E., Iversen, P., Cronier, D., Kreklau, E. and de Dios, A. (2014): Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219: in-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine. *Investigational New Drugs* 32(5): 825-837
- Grossman, D., Mcniff, J. M., Li, F., Altieri, D. C. (1999): Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma. *Journal of Investigative Dermatology* 113: 1076-1081
- Gucký, T., Jorda, R., Zatloukal, M., Bazgier, V., Berka, K., Řezníčková, E., Béres, T., Strnad, M., Kryštof, V. (2013): a novel series of highly potent 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 56: 6234-6247
- Heidemann, M., Hintermair, C., Voß, K., Eick, D. (2013): Dynamic phosphorylation patterns of RNA polymerase II CTD during transcription. *Biochimica et Biophysica Acta* 1829: 55-62
- Hiscutt, E. L., Hill, D. S., Martin, S., Kerr, R., Harbottle, A., Birch-Machin, M., Redfern, C. P., Fulda, S., Armstrong, J. L., Lovat, P. E. (2010): Targeting X-linked inhibitor of apoptosis protein to increase the efficacy of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis for melanoma therapy. *Journal of Investigative Dermatology* 130: 2250-2258
- Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J. C., Akerley, W., *et al.* (2010): Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *New England Journal of Medicine* 363: 211-223
- Hodis, E., Watson, I. R., Kryukov, G. V., Arold, S. T., Imielinski, M., Theurilland, J. P., Nickerson, E., Auclair, D., Li, L., Place, C., Dicara, D. *et al.* (2012): a landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 150: 251-263
- Hu, P., Han, Z., Couvillon, A. D., Exton, J. H. (2004): Critical role of endogenous Akt/IAPs and MEK1/ERK pathways in counteracting endoplasmic reticulum stress-induced cell death. *Journal of Biological Chemistry* 279: 49420-49429
- Chakraborty, R., Wieland, C. N., Comfere, N. (2013): Molecular targeted therapies in metastatic melanoma. *Pharmacogenomics and Personalised Medicine* 6: 49-56
- Chapman, P. B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J. B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Tasciari, A., Maio, M., *et al.* (2011): Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *The New England Journal of Medicine* 364: 2507-2516
- Isakoff, S. J., Engelman, J. A., Irie, H. Y., Luo, J., Brachmann, S. M., Pearlman, R. V., Cantley, L. C., Brugge, J. S. (2005): Breast cancer-associated PIK3CA mutations are oncogenic in mammalian epithelial cells. *Cancer Research* 65: 10992-11000
- Jalili, A., Wagner, C., Pashenkov, M., Pathria, G., Mertz, K. D., Widlund, H. R., Lupien, M., Brunet, J.-P., Golub, T. R., Stingl, G., Fisher, D. E., Ramaswamy, S., Wagner,

- S. N. (2012): Dual suppression of the cyclin-dependent kinase inhibitors CDKN2C and CDKN1A in human melanoma. *Journal of the national cancer institute* 104: 1673-1679
- Jang, S., Atkins, M. B. (2013): Which drug, and when, for patients with BRAF-mutant melanoma? *The Lancet Oncology* 14: 60-69
- Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J., Pavletich, N. P. (1995): Mechanism of CDK activation revealed by the structure of cyclin A/CDK2 complex. *Nature* 376: 313-320
- Jeffrey, P. D., Tong, L., Pavletich, N. P. (2000): Structural basis of inhibition of CDK-cyclin complexes by INK4 inhibitors. *Genes development* 14: 3115-3125
- Jorda, R., Havlíček, L., McNae, I. W., Walkinshaw, M. D., Voller, J., Štunc, A., Navrátilová, J., Kuzma, M., Mistrík, M., Bártek, J., Strnad, M., Kryštof, V. (2011): Pyrazolo[4,3d]pyrimidine bioisostere of roscovitine: Evaluation of a novel selective inhibitor of cyclin-dependent kinases with antiproliferative activity. *Journal of Medicinal Chemistry* 54: 2980-2993
- Joseph, E. W., Pratilas, C. A., Poulikakos, P. I., Tadi, M., Wang, W., Taylor, B. S., Halilovic, E., Persaud Y., Xing, F., Viale, A., *et al.* (2010): The RAF inhibitor PLX4032 inhibits ERK signaling and tumor cell proliferation in a V600E BRAF-selective manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 107: 14903-14908
- Kang, S., Bader, A. G., Vogt, P. K. (2005): Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 102(3): 802-807
- Kasof, G. M., Gomes, B. C. (2001): Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *Journal of Biological Chemistry* 276: 3238-3246
- Kerkhoff, E., Rapp, U. R. (1998): Cell cycle targets of Ras/Raf signalling. *Oncogene* 17: 1457-1462
- Kesavapany, S., Li, B.-S., Amin, N., Zheng, Y.-L., Grant, P., Pant, H. C. (2004): Neuronal cyclin-dependent kinase 5: role in nervous system function and its specific inhibition by the Cdk5 inhibitory peptide. *Biochimica et biophysica acta* 1697: 143-153
- Kotala, V., Uldrijan, S., Horky, M., Trbusek, M., Strnad, M. and Vojtesek, B. (2001). Potent induction of wild-type p53-dependent transcription in tumour cells by a synthetic inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58(9): 1333-1339
- Lamers, F., Van Der Ploeg, I., Schild, L., Ebus, M. E., Koster, J., Hansen, B. R., Koch, T., Versteeg, R., Caron, H. N., Molenaar, J. J. (2011): Knockdown of survivin (BIRC5) causes apoptosis in neuroblastoma via mitotic catastrophe. *Endocrine-Related Cancer* 18: 657-668
- Leonard, J., LaCasce, A., Smith, M., Noy, A., Chirieac, L., Rodig, S., Yu, J., Vallabhajosula, S., Schoder, H., English, P., Neuberg, D., Martin, P., Millenson, M., Ely, S., Courtney, R., Shaik, N., Wilner, K., Randolph, S., Van den Abbeele, A., Chen-Kiang, S., Yap, J. and Shapiro, G. (2012): Selective CDK4/6 inhibition with tumor responses by PD0332991 in patients with mantle cell lymphoma. *Blood* 119(20): 4597-4607
- Levings, M. K., Sangregorio, R., Roncarolo, M. G. (2001): Human cd25(+) cd4(+) t regulator cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *Journal of Experimental medicine* 193: 1295-1302

- Li, F., Ambrosini, G., Chu, E. Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P. C., Altieri, D. C. (1998): Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 396: 580-584
- Ligresti, G., Militello, L., Steelman, L. S., Cavallaro, A., Basile, F., Nicoletti, F., Stivala, F., McCubrey, J. A., Libra, M. (2009): PIK3CA mutations in human solid tumors. Role in sensitivity to various therapeutic approaches. *Cell Cycle* 8: 1352-1358
- Lim, S., Kaldis, P. (2013): CDK, cyclins and CKIs: roles in cell cycle regulation. *Development* 140: 3079-3093
- Lipson, E. J., Drake, C. G. (2011): Ipilimumab: an anti-CTLA-4 antibody for metastatic melanoma. *Clinical Cancer Research* 17: 6958-6962
- Liu, J., Kipreos, E. T. (2000): Evolution of cyclin-dependent kinases (CDK) and CDK-activating kinases (CAKs): differential conservation of CAKs in yeast and metazoa. *Molecular biology and evolution* 17: 1061-1074
- MacCallum, D. E., Melville, J., Frame, S., Watt, K., Anderson, S., Gianella-Borradori, A., Lane, D. P., Green, S. R. (2005): Seliciclib (CYC202, R-Roscovitine) Induces Cell Death in Multiple Myeloma Cells by Inhibition of RNA Polymerase II-Dependent Transcription and Down-regulation of Mcl-1. *Cancer Research* 65: 5399-5407
- Mahoney, D. J., Cheung, H. H., Mrad, R. L., Planchette, S., Simard, C., Enwere, E., Arora, V., Mak, T. W., Lacasse, E. C., Waring, J., Korneluk, R. G. (2008): Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNF-alpha-mediated NF-kappa B activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105: 11778-11783
- Malumbres, M., Barbacid, M. (2001): To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature Review Cancer* 1: 222-231
- Malumbres, M., Barbacid, M. (2009): Cell cycle, CDK and cancer: a changing paradigm. *Nature Review Cancer* 9: 153-166
- Malumbres, M., Barbacid, M. (2005): Mammalian Cyclin-dependent kinases. *Trends in biochemical sciences* 30: 630-641
- Manning, B. D., Cantley, L. C. (2007): AKT/PKB signaling: Navigating downstream. *Cell* 129(7): 1261-1274
- Mansh, M. (2011): Ipilimumab and cancer immunotherapy: a new hope for advanced stage melanoma. *Yale Journal of Biology and Medicine* 84: 381-389
- Mao, L., Merlo, A., Bedi, G., Shapiro, G. I., Edwards, C. D., Rollins, B. J., Sidransky, D. (1995): a novel p16INK4A transcript. *Cancer Research* 55: 2995-2997
- McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Franklin, R. A., Montalto, G., Carvello, M., Libra, M., Candido, S., Malaponte, G., *et al.* (2012): Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascade inhibitors: how mutations can result in therapy resistance and how to overcome resistance. *Oncotarget* 3: 1068-1111
- McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Kempf, C. R., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Stivala, F., Malaponte, G., Nicoletti, F., Libra, M., *et al.* (2011): Therapeutic resistance resulting from mutations in Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR signaling pathways. *Journal of Cellular Physiology* 226: 2762-2781
- Mckenzie, J. A., Liu, T., Goodson, A. G., Grossman, D. (2010): Survivin enhances motility of melanoma cells by supporting Akt activation and $\alpha 5$ integrin upregulation. *Cancer Research* 70: 7927-7937
- 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
- Melero, I., Hervas-Stubbs, S., Glennie, M., Pardoll, D. M., Chen, L. (2007): Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy. *Nature Review Cancer* 7: 95-106
- Morton, S., Davis, R. J., McLaren, A., Cohen, P. (2003): A reinvestigation of the multisite phosphorylation of the transcription factor c-Jun. *The EMBO Journal*, 22(15): 3876-3886
- Ng, K C., Campos, E. I., Martinka, M., Li, G. (2004): XAF1 expression is significantly reduced in human melanoma. *Journal of Investigative Dermatology* 123: 1127-1134
- Oberoi-Khanuja, T. K., Karreman, C., Larisch, S., Rapp, U. R., Rajalingam, K. (2012): Role of melanoma inhibitor of apoptosis (ML-IAP) protein, a member of the baculoviral IAP repeat (BIR) domain family, in the regulation of C-RAF kinase and cell migration. *Journal of Biological Chemistry* 287: 28445-58455
- Ogita, S., Lorusso, P. (2011): Targeting phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt beyond rapalogs. *Targeted Oncology* 6: 103-117
- Oumata, N., Bettayeb, K., Ferandin, Y., Demange, L., Lopez-Giral, A., Goddard, M., Myrianthopoulos, V., Mikros, E., Flajolet, M., Greengard, P., Meijer, L. and Galons, H. (2008): Roscovitine-Derived, Dual-Specificity Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases and Casein Kinases 1. *Journal of Medicinal Chemistry* 51(17): 5229-5242.
- Pardee, A. B. (1989): G₁ events and regulation of cell proliferation. *Science* 246: 603-608
- Peyressatre, M., Prével, C., Pellerano, M., Morris, M. C. (2015): Targeting Cyclin-Dependent Kinases in Human Cancers: From Small Molecules to Peptide Inhibitors. *Cancers* 7: 179-237
- Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N. J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H. W., Cordon-Cardo, C., DePinho, R. A. (1998): The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2, and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92(6): 713-23
- Quelle, D. E., Zindy, F., Ashmun, R.A., Sherr, C. J. (1995): Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83: 993-1000
- Rader, J., Russell, M., Hart, L., Nakazawa, M., Belcastro, L., Martinez, D., Li, Y., Carpenter, E., Attiyeh, E., Diskin, S., Kim, S., Parasuraman, S., Caponigro, G., Schnepf, R., Wood, A., Pawel, B., Cole, K. and Maris, J. (2013): Dual CDK4/CDK6 Inhibition Induces Cell-Cycle Arrest and Senescence in Neuroblastoma. *Clinical Cancer Research* 19(22): 6173-6182
- Ren, S., Rollins, B. J. (2004): Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G₀ exit. *Cell* 117(2): 239-251
- Robert, C., Gharinghelli, F. (2009): What is the role of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma? *Oncologist* 14: 848-861
- Roskoski, R. (2012): ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research* 66(2): 105-143
- Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Patten, A. K., Massague, J., Pavletich, N. P. (1996b): Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-CDK2 complex. *Nature* 382: 325-331
- Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Pavletich, N. P. (1996a): Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nature Structural Biology* 3: 696-700

- Russo, A. A., Torrisi, E., Bevelacqua, Y., Perrotta, R., Libra, M., McCubrey, J. A., Spandidos, D. A., Stivala, F., Malaponte, G. (2009): Melanoma: molecular pathogenesis and emerging target therapies. *International Journal of Oncology* 34: 1481-1489
- Salvesen, G. S., Duckett, C. S. (2002): IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3: 401-410
- Santamaría, D., Barrière, C., Carqueira, A., Hunt, S., Tardy, C., Newton, K., Cáceres, J. F., Dubus, P., Malumbers, M., Barbacid, M. (2007): CDK1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* 448: 811-815
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., Sabatini, D. M. (2005): Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science* 307(5712): 1098-1101
- Shahabi, V., Whitney, G., Hamid, O., Schmidt, H., Chasalow, S. D., Alaparthi, S., Jackson, J. R. (2012): Assessment of association between BRAF-V600E mutation status in melanomas and clinical response to ipilimumab. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 61: 733-737
- Shao, Y., Aplin, A. E. (2010): Akt3-mediated resistance to apoptosis in B-RAF-targeted melanoma cells. *Cancer Research* 70: 6670-6681
- Shapiro, G., Rosen, L. S., Tolcher, A. W., Goldman, J. W., Gandhi, L., Papadopoulos, K. P., *et al.* (2013): a first-in-human phase I study of the CDK4/6 inhibitor, LY2835219, for patients with advanced cancer. *Journal of Clinical Oncology* 31
- Shiozaki, E. N., Chai, J., Rigotti, D. J., Riedl, S. J., Li, P., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Fairman, R., Shi, Y. (2003): Mechanisms of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Molecular Cell* 11: 519-527
- Schwartz, G. K., LoRusso, P. M., Dickson, M. A., Randolph, S. S., Shaik, M. N., Wilner, K. D., *et al.* (2011): Phase I study of PD0332991, a cyclin-dependent kinase inhibitor, administered in 3-weeks cycles (Schedule 2/1). *British Journal of Cancer* 104: 1862-1868
- Solus, J. F., Kraft, S. (2013): Ras, Raf and MAP Kinase in Melanoma. *Advances in Anatomic Pathology* 20: 217-226
- Srinivasula, S. M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R. A., Robbins, P. D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y., Alnemri, S. (2001): a conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 410: 112-116
- Stahl, J. M., Sharma, A., Cheung, M., Zimmerman, M., Cheng, J. Q., Bosenberg, M. W., Kester, M., Sandirasegarane, L., Robertson, G. P. (2004): Deregulated Akt3 Activity Promotes Development of Malignant Melanoma. *Cancer Research* 64: 7002-7010
- Stemke-Hale, K., Gonzalez-Angulo, A. M., Lluch, A., Neve, R. M., Kuo, W. L., Davies, M., Carey, M., Hu, Z., Guan, Y., *et al.* (2008): An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Research* 68(15): 6084-6091
- Stone, S., Jiang, P., Dayananth, P., Tavtigian, S. V., Katcher, H., Parry, D., Peters, G., Kamb, A. (1995): Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. *Cancer Research* 55: 2988-2994
- Takaki, T., Echalié, A., Brown, N. R., Hunt, T., Endicott, J. A., Noble, M. E. (2009): The structure of CDK4/cyclin D3 has implications for models of CDK activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 4171-4176

- Thomas, N. E., Berwick, M., Cordeiro-Stone, M. (2006): Could BRAF mutations in melanocytic lesions arise from DNA damage induced by ultraviolet radiation? *Journal of investigative dermatology* 126: 1693-1696
- Thomas, N. E., Edmiston, S. N., Alexander, A., Millikan, R. C., Groben, P. A., Hao, H., Tolbert, D., Berwick, M., Busam, K. *et al.* (2007): Number of nevi and early-life ambient UV exposure are associated with BRAF-mutant melanoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 16: 991-997
- Tjin, E. P., Konijnenberg, D., Krebbers, G., Mallo, H., Drijfhout, J. W., Franken, K. L., van der Horst, C. M., Bos, J. D. *et al.* (2011): T cell immune function in tumor, skin, and peripheral blood of advanced stage melanoma patients: implications for immunotherapy. *Clinical Cancer Research* 17: 5736-5747
- Trunzer, K., Pavlick, A. C., Schuchter, L., Gonzalez, R., McArthur, G. A., Hutson, T. E., Moschos, S. J., Flaherty, K. T., Kim, K. B., Weber, J. S., *et al.* (2013): Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 31: 1767-1774
- Tsai, J., Lee, J. T., Wang, W., Zhang, J., Cho, H., Mamo, S., Bremer, R., Gillette, S., Kong, J., Haass, N. K., Sproesser, K., Li, L., Smalley, K. S., Fong, D., *et al.* (2008): Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 105: 3041-3046
- Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M., Bilanges, B. (2010): The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signaling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11(5): 329-341
- Villanueva, J., Adina, V., Lee, J. T., Somasundaram, R., Fukunaga-Kalabis, M., Cipolla, A. K., Wubbenhorst, B., Xu, X., Gimotty, P. A., Kee, D., *et al.* (2010): Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by co-targeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell* 18: 683-695
- Viola, J. R., Rafael, D. F., Wagner, E., Besch, R., Hindawi, M. O. (2013): Gene therapy for advanced melanoma: selective targeting and therapeutic nucleic acids. *Journal of Drug Delivery* 2013: 837348
- Vucic, D., Franklin, M. C., Wallweber, H. J., Das, K., Eckelman, B. P., Shin, H., Elliott, L. O., Kadkhodayan, S., Deshayes, K., Salvesen, G. S., Fairbrother, W. J. (2005): Engineering ML-IAP to produce an extraordinary potent caspase 9 inhibitor: implications for Smac-dependent anti-apoptotic activity of ML-IAP. *Biochemical Journal* 385: 11-20
- Wan, P. T. C., Garnett, M. J., Roe, S. M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V. M., Jones, C. M., Marshall, Ch. J., Springer, C. J., Barford, D., Marais, R. (2004): Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF. *Cell* 116: 855-867
- Wilhelm, S. M., Adnane, L., Newell, P., Villanueva, A., Llovet, J. M., Lynch, M. (2008): Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Molecular Cancer Therapy* 7: 3129-3140
- Wilhelm, S. M., Carter, C., Tang, L., Wilkie, D., McNabola, A., Rong, H., Chen, C., Zhang, X., Vincent, P., McHugh, M., Cao, Y., *et al.* (2004): BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Research* 64: 7099-7109

- Yadav, V., Burke, T., Huber, L., Van Horn, R., Zhang, Y., Buchanan, S., Chan, E., Starling, J., Beckmann, R. and Peng, S. (2014): The CDK4/6 Inhibitor LY2835219 Overcomes Vemurafenib Resistance Resulting from MAPK Reactivation and Cyclin D1 Upregulation. *Molecular Cancer Therapeutics* 13(10): 2253-2263
- Yu, L. F., Wang, J., Zou, B., Lin, M. C. M., Wu, Y. L., Xia, H. X., Sun, Y. W., Gu, Q., *et al.* (2007): XAF1 mediates apoptosis through an extracellular signal-regulated kinase pathway in colon cancer. *Cancer* 109: 1996-2003
- Zatloukal, M., Jorda, R., Gucký, T., Řezníčková, E., Voller, J., Pospíšil, T., Malínková, V., Adamcová, H., Kryštof, V., Strnad, M. (2013): Synthesis and in vitro biological evaluation of 2,6,9-trisubstituted purines targeting multiple cyclin-dependent kinases. *European Journal of Medicinal Chemistry* 61: 61-72
- Zhao, L., Vogt, P. K. (2008): Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene* 27: 5486-5496
- Zhu, M. H., Ni, C. R., Zhu, Z., Li, F. M., Zhang, S. M. (2003): Immunohistochemical demonstration of cyclins A, B, D1, D3 and E in hepatocellular carcinomas using tissue microarrays. *Chinese Journal of Pathology* 32 (5): 440-3

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ac-DEVD-AMC	Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylcoumarin
AKT	viz PKB
AP-1	Activator protein 1
ARF	Alternate reading frame
ATP	Adenosine triphosphate
BAD	Bcl-2-associated agonist of cell death
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
B-RAF	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
BSA	Bovine serum albumin
CAK	CDK-activating kinase
CD4 ⁺	Cluster of differentiation 4
CD8 ⁺	Cluster of differentiation 8
CD80	Cluster of differentiation 80
CD86	Cluster of differentiation 86
Cdc25	Cell division cycle 25
CDK	Cyklin-dependent kinase
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
cIAP	Cell inhibitor of apoptotic proteins
CIP/KIP	CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein
CKI	Cyclin-dependent kinase inhibitor
cPARP-1	Cleaved PARP-1
CTD	C-terminal domain
CTL	Cytotoxic T-lymphocytes
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4
Cyc	Cyclin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	Epidermal growth factor receptor

EGTA	Ethyleneglycoltetraacetic acid
Elk-1	ETS domain-containing protein Elk-1
ER	Estrogene receptor
Erk	Extracellular signal-regulated kinase
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
Fos	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
gp100	Glycoprotein 100
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanosin triphosphate
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HGFR	Hepatocyte growth factor receptor
IAP	Inhibitor of apoptotic proteins
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
INK4	viz CDKN2A
Jun	Jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MART1	Melanoma antigen recognized by T-cells 1
Mat1	Menage a trois-1
Mcl-1	Myeloid-cell Leukemia 1
MDM2	Murine double minute 2
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MITF	Microphthalmia-associated transcription factor
ML-IAP	Melanoma inhibitor of apoptosis
mRNA	Messenger ribonucleic acid
mTOR	Mammalian target of rapamycin
mTORC	mTOR complex
Myc	Myelocytomatosis oncogene
Myt1	Myelin transcription factor 1
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
PARP-1	Poly(ADP-ribose) polymerase 1

PBS	Phosphate buffered saline
PDGFR	Platelet derived growth factor receptor
PDK-1	Phosphoinositide-dependent kinase 1
PI3K	Phosphatidylinositide 3-kinase
PIP-2	Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate
PIP-3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PIPES	Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic) acid
PKB	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethylsulphonyl fluoride
P-TEFb	Pozitive transcription elongation factor b
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RAS	Rat sarcoma
RB	Retinoblastoma protein
RING	Really interesting new gene
RIPA	Radioimmunoprecipitation buffer
RNA	Ribonucleic acid
RNAPII	RNA polymerase II
RTK	Receptor Tyrosin-kinase
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel elocetrophoresis
shRNA	Small hairpin RNA
siRNA	Short interfering RNA
SOS	Son of Sevenless
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TFIIH	Transcription factor IIH
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UV	Ultraviolet
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
Wee1	Wee1-like protein kinase
XAF1	XIAP-associated factor 1
XIAP	X-linked inhibitor of apoptotic proteins