

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## **Charakterizace účinku nových CDK4/6 inhibitorů na nádorových buněčných liniích**

### **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor: **Bc. Karolína Kozlanská**  
Studijní program: N0512A130009 Biochemie  
Studijní obor: Biochemie  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: **doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.**  
Rok: 2022

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne .....



## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce panu doc. RNDr. Vladimíru Kryštofovi, PhD. za odborné vedení a korekci teoretické části diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat všem kolegům a pracovníkům katedry experimentální biologie za projevenou vstřícnost a jmenovitě paní Janě Hudcové a panu Mgr. Miroslavu Peřinovi za veškerou pomoc v laboratoři. Práce byla podpořena projekty TAČR (TP01010037, Podpora procesu komercializace výsledků výzkumu a vývoje na Ústavu experimentální botaniky AV ČR v.v.i. od roku 2020), GAČR (21-06553S, Inhibice onkogenních kinas malým molekulami) a Přírodovědeckou fakultou Univerzity Palackého v Olomouci (IGA\_PrF\_2022\_007, Molekulární účinky inhibitorů enzymů).

## Bibliografická identifikace

Autor	Bc. Karolína Kozlanská
Název práce	Charakterizace účinku nových CDK4/6 inhibitorů na nádorových buněčných liniích
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022

### Abstrakt

Cyklin dependentní kinasa 4 (CDK4) patří do skupiny Ser/Thr proteinkinas esenciálních pro regulaci buněčného cyklu. Za fyziologických podmínek aktivní komplex CDK4/cyklin D reguluje progresi G1 fáze a různé deregulace genu pro CDK4 nebo souvisejících proteinů jsou spojovány s tumorigenezí. V současné době je CDK4 považována za slibný terapeutický cíl, dokonce již bylo schváleno několik ATP-kompetitivních inhibitorů pro léčbu metastatického karcinomu prsu v kombinaci s endokrinní terapií. Praktická část je věnována studiu účinku nových CDK4 inhibitorů a jejich vlivu na životaschopnost linií karcinomu prsu v kombinaci s endokrinní a anti-HER2 terapií. Pro vypracování praktické části byly použity metody: průtoková cytometrie, western blotting, CETSA,  $\beta$ -galaktosidasový test a stanovení cytotoxicity resazurinem. Testované inhibitory vykazovaly na buněčné úrovni zastavení buněčného cyklu v G1 fázi spojené s poklesem hladiny fosforylovaných forem proteinu RB a indukovaly navození senescentního fenotypu nádorových buněk, obdobně jako inhibitor palbociclib. V kombinačních experimentech látky vykazovaly spíše aditivní účinky s anti-HER2 a endokrinní terapií. Testované inhibitory prokázaly na buněčných liniích odlišný profil cytotoxicity, což jen vyzdvihuje význam charakterizace nesespecifických účinků látek, které mohou mít dále dopad na klinické úrovni. Práce poukazuje také na rizika vzniku lékové rezistence a shrnuje nástroje zamezení vzniku prostřednictvím kombinační terapie.

Klíčová slova	Buněčný cyklus, cyklin dependentní kinasa 4/6, inhibice, rezistence, karcinom prsu, kombinační terapie
Počet stran	83
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author	Bc. Karolína Kozlanská
Title	Characterization of the effect of novel CDK4/6 inhibitors on tumor cell lines
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
The year of presentation	2022

### Abstract

Cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) belongs to the group of Ser/Thr protein kinases essential for cell cycle regulation. Under physiological conditions, the active CDK4/cyclin D complex regulates G1 phase progression and various CDK4 gene deregulation or related proteins are associated with tumorigenesis. CDK4 is currently considered a promising therapeutic target, and several ATP-competitive inhibitors have even been approved for the treatment of metastatic breast cancer in combination with endocrine therapy. The practical part is devoted to the study of the effect of new CDK4 inhibitors and their effect on the viability of breast cancer lines in combination with endocrine and anti-HER2 therapy. The following methods were used to develop the practical part: flow cytometry, western blotting, CETSA,  $\beta$ -galactosidase assay and determination of cytotoxicity by resazurin. At the cellular level, the inhibitors tested showed G1 phase cell cycle arrest associated with decreased levels of phosphorylated forms of the RB protein and induced the induction of a senescent phenotype of tumor cells, similar to the palbociclib inhibitor. In combination experiments, the substances showed an additive effects with anti-HER2 and endocrine therapy. The tested inhibitors showed a different cytotoxicity profile on the cell lines, which only highlights the importance of characterizing the non-specific effects of the substances, which may further have an impact at the clinical level. The work also points out the risks of drug resistance and summarizes the tools to prevent the development through combination therapy.

Keywords	Cell cycle, cyclin-dependent kinase 4/6, inhibition, resistance, breast cancer, combination therapy
Number of pages	83
Number of appendices	0
Language	Czech

## OBSAH

1	ÚVOD .....	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	2
2.1	Karcinom prsu .....	2
2.2	Buněčný cyklus .....	5
2.2.1	Kontrolní body .....	5
2.2.2	Regulace buněčného cyklu .....	6
2.2.3	Cyklin-dependentní kinasy .....	6
2.2.4	Regulace aktivity CDK .....	8
2.2.5	Cyklin dependetní kinasa 4 .....	10
2.2.6	Cyklin D .....	12
2.2.7	Význam CDK4 v onkologii.....	12
2.3	Inhibitory CDK4.....	13
2.3.1	První generace ATP-kompetitivních inhibitorů .....	16
2.3.2	Druhá a třetí generace inhibitorů .....	17
2.3.2.1	Palbociclib .....	18
2.3.2.2	Ribociclib .....	20
2.3.2.3	Abemaciclib.....	21
2.3.2.4	Trilaciclib .....	23
2.3.3	Inhibitory v klinickém testování.....	23
2.3.3.1	Lerociclib.....	24
2.3.3.2	SHR-6390.....	25
2.3.4	Modulátory stability CDK.....	25
2.4	Rezistence k CDK4/6 inhibitorům .....	27
2.4.1	Možné přístupy k omezení vzniku rezistence .....	29
2.5	Nově syntetizované látky pro zpracování diplomové práce.....	30
3	PRAKTICKÁ ČÁST .....	32
3.1	Materiál .....	32
3.1.1	Chemikálie.....	32
3.1.2	Roztoky .....	33
3.1.3	Seznam použitých protilátek .....	34
3.1.4	Testované inhibitory .....	35
3.1.5	Buněčné kultury .....	35
3.1.6	Přístrojové vybavení .....	36
3.1.7	Programy .....	36
3.2	Metody.....	37

3.2.1	Práce s buněčnými kulturami .....	37
3.2.2	SDS-PAGE a western blotting s imunodetekcí .....	37
3.2.3	Termodenaturace proteinů.....	38
3.2.4	Analýza buněčného cyklu průtokovou cytometrií.....	40
3.2.5	Stanovení cytotoxicity resazurinem .....	41
3.2.6	Kvantifikace indukované senescence .....	41
4	VÝSLEDKY .....	43
4.1	Analýza buněčného cyklu .....	43
4.2	Testované látky indukují v liniích karcinomu prsu senescenci .....	45
4.3	Proteinová analýza po ovlivnění inhibitory CDK4/6 .....	49
4.4	Interakce MT-PPC14-4B s CDK4.....	51
4.5	Kombinační terapie s CDK4 inhibitory.....	54
4.5.1	Kombinační účinek inhibitoru HER2 a CDK4/6 .....	56
4.5.2	Kombinační účinek tamoxifenu s CDK4/6 inhibitory .....	57
4.5.3	Kombinační účinek fulvestrantu s CDK4/6 inhibitory .....	58
5	DISKUSE .....	59
6	ZÁVĚR.....	66
7	LITERATURA .....	67
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	81

## **Cíle práce**

### Teoretická část

Cílem teoretické části práce bylo seznámení s problematikou a vypracování literární rešerše na téma regulace buněčného cyklu a role cyklin-dependentních kinas, konkrétně CDK4/6 a jejich význam pro onkologický výzkum. Dále se zaměřit na problematiku inhibice CDK4/6 a charakterizaci selektivních CDK4/6 inhibitorů.

### Experimentální část

Cílem experimentální části bylo prostřednictvím biochemických a molekulárně biologických metod charakterizovat účinky testovaných látek na nádorových buněčných liniích. Součástí experimentální práce bylo také ověřit kombinační efekt testovaných látek s endokrinní a anti-HER2 terapií na nádorových liniích odvozených od karcinomu prsu.

# 1 ÚVOD

Eukaryotické buňky během své existence podléhají procesu zvaný buněčný cyklus. Cyklus sestává ze 4 fází: G1, S, G2 a M a je časově vymezen generační dobou. Celý proces začíná aktivací regulačních komplexů a je zakončen buněčným dělením, během něhož dochází ke vzniku dvou dceřiných buněk. Pokud hovoříme o již diferencovaných buňkách podléhající klasickou mitózu, jsou nově vzniklé buňky morfologicky stejné a obsahují totožný počet chromozomů (Schafer, 1998). Z důvodu zachování integrity původní DNA musí být celý proces přísně regulován. Tuto funkci v buňkách zajišťují z velké části cyklin-dependentní kinasy (CDK).

Deregulace v aktivitě CDK vedou k nekontrolované proliferaci a jedná se o jeden z významných patologických procesů v souvislosti s nádorovou transformací (Malumbres *et al.*, 2014; Yuan *et al.*, 2021). Během onkogeneze dochází u většiny typů nádorů velmi často k hyperaktivaci komplexu CDK4/cyklin D nebo nadměrné expresi cyklinu D, což má za následek snazší zahájení S fáze. Tato vlastnost se ukázala výhodnou pro protinádorovou terapii, neboť se nádorové buňky prostřednictvím hyperaktivace CDK4/cyklin D stávají citlivější vůči inhibici v porovnání s netransformovanou tkání.

Inhibice CDK4/6 je proto považována za slibnou strategii protinádorové terapie (Diehl *et al.*, 1997; Peyressatre *et al.*, 2015). Mezi chronologicky první vyvinuté látky s inhibiční aktivitou patří tzv. pan-CDK inhibitory se schopností inhibovat více kinas rodiny CDK. S ohledem na jejich nižší selektivitu, účinnost a nežádoucí toxicitu se jako léčiva ovšem neuplatnily. Středem zájmu se staly novější inhibitory s výrazně vyšší selektivitou vůči CDK4 (Yuan *et al.*, 2021). V současné době jsou pro léčbu nádorových onemocnění schváleny čtyři ATP-kompetitivní selektivní inhibitory CDK4/6: palbociclib, ribociclib, abemaciclib a trilaciclib. Častý problém jejich terapeutického použití je však *de novo* vznikající léková rezistence. Proto je nezbytné stále věnovat prostředky a úsilí pro vývoj nových léčiv rezistenci překonávajících (Adon *et al.*, 2021).

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Karcinom prsu

Karcinom prsu patří mezi solidní nádorová onemocnění s vysokou incidencí. Odhaduje se, že právě jedna z osmi žen je během svého života postižena karcinomem prsu (Buchler, 2017). Nádorová onemocnění prsu lze rozdělit na invazivní a neinvazivní. V případě neinvazivních nádorů se jedná často o adenomy a fibroadenomy, které nejsou ohrožující na životě. Nejčastější diagnózou v případě invazivních typů je tzv. invazivní non-special type (NST, dříve duktální typ), tvořící téměř 70 % všech nově diagnostikovaných případů. Lobulární invazivní karcinom prsu tvoří okolo 10-20 % případů. Speciální situací je pagetova choroba, při níž dochází k přeměně submamilárních mlékovodů na neinvazivní nebo invazivní typy (Watkins, 2019). Ačkoliv incidence karcinomu prsu obecně stoupá, mortalita má v posledních letech spíše klesající trend (Buchler, 2017). Vývoj onemocnění může být ovlivněn řadou rizikových faktorů, které lze dále rozdělit na modifikovatelné a nemodifikovatelné. Mezi nemodifikovatelné faktory se řadí okolnosti s nejvyšším relativním rizikem (Tab. 1). Modifikovatelné faktory naopak zahrnují rizika, jež mohou i nemusí mít vliv na vývoj onemocnění, jako časná menarche, životospráva či přítomnost jiných chronických onemocnění.

Pro řadu specifických typů karcinomu prsu existují vlastní rizikové faktory (Buchler, 2017). Významným indikátorem chování karcinomu je stav hormonálních receptorů (Tab. 2). Tumory pozitivní na estrogení a progesteronový receptor mají obecně lepší prognózu. Dalším prognostickým markerem je exprese tyrosin kinasového receptoru HER2, podílejícího se na regulaci růstu a diferenciaci epidermálních buněk. Obecně jsou HER2 negativní tumory spojovány s horší prognózou a metastázováním do lymfatických uzlin (Parise & Caggiano, 2017). Triple negativní karcinom prsu (TNBC) představuje zbylých 10-20 % diagnostikovaných nádorů a vyznačuje se velmi špatnou prognózou. Ta je spojená s komplikovanou léčbou v důsledku absence hormonálních receptorů pro estrogen, progesteron a HER2, které u jiných typů karcinomů, jejichž progresi je závislá na funkčnosti těchto receptorů, mohou sloužit jako terapeutický cíl. Obzvláště vysoké riziko existuje u nositelek genové mutace *Brca* (Watkins, 2019). Vyšší riziko vzniku onemocnění je zde také spojeno s geopolitickým původem a přítomností diabetu v premenopauzálním období. I přesto, že se jedná o nejvíce agresivní tumory, mohou mít v případě dosažení kompletní odpovědi na chemoterapii příznivější prognózu.



Na základě epidemiologických dat lze pozorovat, že existuje nesoulad mezi některými rizikovými faktory karcinomu prsu pozitivních na estrogení receptor a pozitivních na HER2. Ženy s HER2 pozitivním karcinomem jsou v průměru mladšího věku a současně zde existuje menší spojitost mezi vznikem onemocnění a hormonálními faktory. U žen s ER pozitivním karcinomem prsu je tomu naopak (Li *et al.*, 2017).

Po stanovení diagnózy na základě výsledků radiologického, genetického, endokrinologického a onkologického vyšetření, je klíčové začít co nejdříve s vhodnou léčbou. Jednou z nedílných součástí léčby je chirurgická terapie, případné provedení mastektomie a vyšetření axilárních uzlin (Zárubová, 2017). Doplňkovou léčbou po chirurgickém zákroku je adjuvantní radioterapie či chemoterapie, redukující riziko recidivy onemocnění v následujících 10 letech až o 15 % (Soumarová, 2017).

Neinvasivní léčba nádoru se následně odvíjí dle základních charakteristik nádorů a v posledních letech se vývoj zaměřuje spíše na konkrétní molekulární cíle. Jedná se především o anti-HER2 terapii a cílenou léčbu karcinomu prsu pozitivní na estrogení receptor prostřednictvím endokrinní terapie. Až 50-60 % karcinomů pozitivních na estrogení receptory reaguje kladně na hormonální terapii (Fínek, 2017). V současné době jsou využívány dvě skupiny látek: selektivní modulátory estrogeního receptoru (tamoxifen) a inhibitory aromatasy (letrozol, anastrozol, exemestan).

**Tabulka 1.** Hlavní nemodifikovatelné rizikové faktory karcinomu prsu (Medscape [4. 2. 2022]).

Riziko	Poznámka
Pohlaví	Ženy mají 100x vyšší riziko než muži
Věk	Riziko vzniku roste s věkem
Vrozené mutace	Mutace v genech <i>Brcal,2</i> , celoživotní riziko v případě Cowdenova syndromu (mutace PTEN), mutace CHEK2
Lobulární karcinom <i>in situ</i>	20-30% případů progreduje do invazivního karcinomu
Více přímých příbuzných s ca prsu	V případě 2 příbuzných prvního stupně je riziko až pětinasobné
Rodinná anamnéza ovariálního karcinomu	Pravděpodobně překryv s rizikem výskytu onkogenních mutací
Osobní anamnéza karcinomu prsu	Pravděpodobně překryv s rizikem výskytu onkogenních mutací
Atypická hyperplazie prsu	Výskyt ve 30 % případů po 25 letech sledování
Velmi vysoká prsní denzita (>50%)	Riziko se zvyšuje se stupněm denzity
Expozice ionizujícímu záření	Riziko se zvyšuje celoživotně od 10 let po expozici

**Tabulka 2.** Subtypy karcinomu prsu (ER = estrogenní receptor, PR = progesteronový receptor, HER2 = lidský epidermální receptor 2, + pozitivní, - negativní) (Watkins, 2019).

Subtyp	Imunohistochemie	Prognóza	Poznámka
Luminální A	ER <sup>+</sup> /PR <sup>+</sup> /HER2 <sup>-</sup>	Dobrá	Nejvíce rozšířený typ, nižší pravděpodobnost recidivy
Luminální B HER2 pozitivní	ER <sup>+</sup> /PR <sup>+</sup> /HER2 <sup>+</sup>	Slušná	Vyšší tendence recidivy
Bazální triple negativní	ER <sup>-</sup> /PR <sup>-</sup> /HER2 <sup>+</sup>	Špatná	Přístupnost anti-HER2 mAb (trastuzumab), u většiny se vyvine rezistence Nižší věk, agresivní typ nádoru s vysokou mírou recidivy

Konkrétně pro léčbu metastatických karcinomů prsu jsou používány antagonisté estrogenního receptoru (fulvestrant). Přetrvávajícím problémem je však *de novo* vznikající rezistence. V případě anti-HER2 terapie představuje největší přínos léčba prostřednictvím monoklonálních protilátek trastuzumabem či pertuzumabem, které mohou být použity současně i pro léčbu HER2 pozitivního karcinomu žaludku a nádoru slinných žláz (Sharma *et al.*, 2010; Fínek, 2017). Další možností jsou konjugáty protilátka-léčivo: ado-trastuzumab emtansin a fam-trastuzumab deruxtekan. Vysokou účinnost vykazují také specifické kinasové inhibitory HER2 jako například lapatinib, účinný reverzibilní inhibitor ATP-vazebného místa tyrosinkinasových domén HER2 a EGFR. V případě TNBC karcinomu prsu s pozitivní mutací *Brca* jsou možností léčby látky inhibující poly(ADP-ribosa)polymerasu (PARP): olaparib, veliparib (Sharma *et al.*, 2010; Watkins, 2019).

Pro léčbu časných stádií karcinomu prsu je stále upřednostňována aplikace neoadjuvantní chemoterapie za použití doxorubicinu nebo cytostatik ze skupiny taxanů. Pro léčbu metastazujícího karcinomu prsu byla dlouhou dobu strategií léčby systémová chemoterapie a hormonální terapie. Na rozdíl od časných stádií karcinomu prsu je i s dnes dostupnými terapeutiky metastazující karcinom považován za velmi obtížně léčitelný (Fisusi & Akala, 2019). Velký význam zde má koncept kombinované terapie, poskytující výhody jako šance na vyšší účinnost, snížení toxicity a omezení vzniku lékové rezistence. Díky tomu se kombinovaná léčba stala v klinické praxi již konvenčním postupem. Velkou zásluhu na tom nesou pokroky v oblastech organické syntézy, buněčné biologie a proteomiky. Za velmi úspěšnou je považována léčba kombinující endokrinní terapii s inhibitory cyklin-dependentní kinasy 4/6, což jsou látky inhibující progresi buněčného cyklu nádorových buněk (Deng *et al.*, 2018).

## 2.2 Buněčný cyklus

Buněčný cyklus je posloupnost komplexních procesů vedoucích od vzniku nové buňky buněčným dělením po její následující rozdělení na 2 dceřiné buňky, které obsahují identický počet chromozomů. Celý proces je kontrolován řadou regulačních proteinů, z nichž klíčovou funkci zastávají cyklin-dependentní kinasy (Malumbres *et al.*, 2014). Morfologicky lze cyklus rozdělit na interfázi a mitotickou fázi, která zahrnuje profázi, metafázi, anafázi a telofázi. Interfáze sestává z jedné syntetické a dvou „gap“ fází.

G1 a G2 fáze vytvářejí buňkám prostor pro přípravu na kritické procesy dělení buněk, a to replikaci DNA a mitózu (Schafer, 1998). V průběhu těchto fází buňka vnímá různé vnitřní i okolní signály, na základě nichž se rozhoduje, zda cyklus zahájí či v něm bude pokračovat. Během probíhající G1 fáze má buňka možnost růst, syntetizovat proteiny, opravovat poškození genomu a připravovat se na syntézu DNA (Morgan, 1997). Zatímco replikace a mitóza probíhají ve většině buněk stejně, vstup do G1 fáze a její průběh je závislý na buněčném typu a probíhá za odlišných podmínek pod vlivem různých signálů a vývojových programů. Vstup do G1 je podmíněn aktivací cyklin-dependentní kinasy 4.

V S fázi dochází k syntéze DNA a pro její zahájení je taktéž nutná regulace prostřednictvím CDK (Massagué, 2004). Po dokončení replikace v S fázi, vstupuje buňka do G2 fáze, která vytváří prostor pro přípravu buňky na mitózu. Buňka syntetizuje proteiny odpovědné za kondenzaci chromozomů, tvorbu mitotického aparátu a destrukci jaderného obalu. V G1 i G2 fázi se nachází dva kontrolní body zabraňující vstupu do další fáze, pokud nemá buňka dokončenou tu předešlou (Schafer, 1998). V případě přijetí antimitotických signálů nebo absence mitogenní signalizace, opouští buňka cyklus a vstupuje do klidového stádia G0 (Malumbres & Barbacid, 2001).

### 2.2.1 Kontrolní body

Kontrolní bod je strukturně-funkční systém buněčného cyklu, který posuzuje správnost dokončených procesů a schopnost buňky zahájit následující fázi. Buněčný cyklus je regulován biochemickými mechanismy tak, aby nadcházející události byly podřízené předešlému procesu, například musí být dokončena replikace před iniciací mitózy (Johnson & Walker, 1999). Současně je zastavení buněčného cyklu závislé na mnoha faktorech, například velikosti buňky, stavu nutrientů nebo defektech v molekule DNA.

V průběhu cyklu musí buňka pro dokončení překonat tři kontrolní body. První kontrolní bod se nachází v G1 fázi, pokud v tomto bodě nemá buňka dostatečné

podmínky pro průchod cyklem, přechází do klidové G0 fáze. V této fázi se nachází za fyziologických podmínek většina diferencovaných buněk, kdy některé podstoupí mitózu pouze párkrát během jednoho roku (Schafer, 1998). Kontrolní bod v G1 fázi je řízen proteinem p53, který funguje jako klíčová komponenta pro rozpoznání poškozených částí DNA. V reakci na zjištěné poškození indukuje expresi inhibičního proteinu p21, který zastavuje aktivitu cyklin-dependentní kinasy 2 odpovědné za progresi cyklu do S fáze (Johnson & Walker, 1999). V opačném případě dochází k aktivaci příslušné cyklin-dependentní kinasy, což vede k progresi cyklu a replikaci DNA.

Druhý kontrolní bod se nachází v G2 fázi a rozhoduje o vstupu buňky do mitózy. I zde zastávají důležitou funkci CDK, které jsou aktivovány fosforylací (Schafer, 1998). V případě zjištění poškození DNA zde dochází k zastavení buněčného cyklu. Poslední kontrolní bod se nachází na konci metafáze a zajišťuje revizi vazby všech chromozomů na kinetochorové mikrotubuly dělicího vřeténka. Tímto způsobem zajišťuje správný rozchod chromozomů v anafázi (Johnson & Walker, 1999).

### **2.2.2 Regulace buněčného cyklu**

Klíčovou funkci v regulaci cyklu zastávají cyklin-dependentní kinasy tvořící aktivní heterodimerní komplexy s cykliny. CDK jsou řazeny do enzymové skupiny transferas (EC 2.7.11.22). Jedná se o Ser/Thr proteinkinasy, jejichž aktivita je regulována několika způsoby; fosforylací, defosforylací, vazbou cyklinu a lokalizací komplexu CDK/cyklin v buňce (Malumbres & Barbacid, 2001). Cyklinové podjednotky regulují aktivitu komplexů CDK/cyklin prostřednictvím své periodické syntézy a destrukce během cyklu (Johnson & Walker, 1999).

### **2.2.3 Cyklin-dependentní kinasy**

V lidském genomu je kódováno 20 různých CDK, účastnících se celé řady důležitých buněčných procesů. Na základě evolučních studií lze cyklin-dependentní kinasy rozdělit do 8 podskupin (Liu & Kipreos, 2000). Samostatnou skupinu tvoří CDK2, zahrnující také CDK1 a CDK3. Druhou skupinu pak tvoří CDK4 a CDK6, které jsou strukturně i funkčně homologní. Nejpočetnější je CDK5 skupina, do níž patří CDK14, CDK15, CDK16, CDK17, CDK18 a CDK5 (Obr. 1). Tyto skupiny CDK s příslušnými cykliny fungují jako klíčové regulátory buněčného cyklu. Zbývající skupiny CDK20, CDK7,

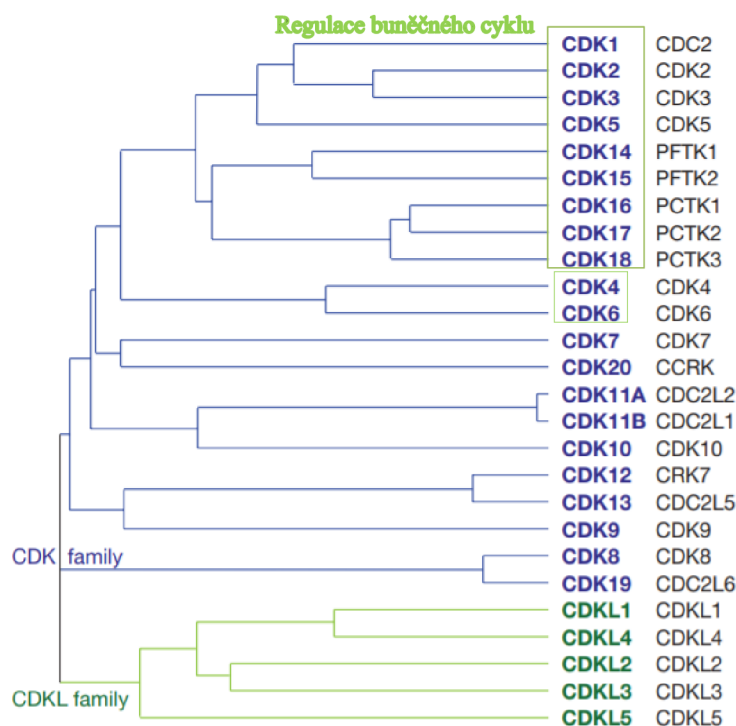
CDK8, CDK10 a CDK11 a skupina CDK9, do níž patří dále CDK12 a CDK13, se účastní regulace transkripce (Obr. 1). Mimo rodinu CDK byla identifikována také vzdálenější skupina proteinů označována jako CDK-like (CDKL), do níž patří proteiny CDKL1, CDKL2, CDKL3, CDKL4 a CDKL5 (Malumbres *et al.*, 2009).

Kromě regulace buněčného cyklu a transkripce CDK zastávají různé funkce v procesech diferenciaci, příjmu živin a apoptózy (Rickert *et al.*, 1996). Některé z těchto proteinkinás zastávají i více klíčových funkcí. Například CDK7 je podjednotkou transkripčního faktoru TFIIH, kde je zahrnuta v procesu iniciace transkripce fosforylací Ser5 rezidua C-terminální domény RNA polymerasy II a současně také aktivuje jiné CDK, působí tedy jako CDK aktivační kinasa (CAK) (Guo & Stiller, 2004).

CDK4, CDK6 a CDK2 řídí přechod buňky z G1 do S fáze. CDK4 a CDK6 koordinují procesy ranné G1 fáze, zatímco aktivita CDK2 je vyžadována pro ukončení G1 a zahájení S fáze. CDK4 a CDK6 vytváří aktivní komplexy s cykliny typu D (cyklin D1, D2, D3), které fosforylují podřízené substráty, jako protein RB (Johnson & Walker, 1999). Tyto dvě kinasy jsou strukturně i funkčně homologní, jejich rozdílnost a detailnější charakterizace byla popsána na experimentech *in vivo*. Zatímco funkce CDK4 je kritická pro vývoj pankreatických  $\beta$ -buněk a hypofýzy, CDK6 je esenciální pro hematopoézi (Malumbres & Barbacid, 2001). Další odlišnost obou kinás se objevuje v porovnání tvorby komplexů s chaperony za neaktivního stavu. V nepřítomnosti cyklinu typu D tvoří CDK4 a CDK6 komplex s HSP90 a cdc37. Obě kinasy se liší ve vazebné afinitě k chaperonům, která se následně odráží na ochotě interagovat s inhibičními proteiny a cyklinem D. Zatímco CDK6 se projevuje slabou afinitou, afinita CDK4 k chaperonům je vysoká a její vytěsnění z komplexu je méně snadné nežli v případě CDK6 (Nebenfuehr *et al.*, 2020).

CDK2 je aktivována cykliny typu E během přechodu G1/S a cykliny typu A v průběhu S fáze. Aktivní komplex CDK2/cyklin E se podílí na udržování proteinu RB v hyperfosforylovaném stavu a účastní se tak pozitivní zpětné vazby na aktivitu transkripčních faktorů E2F (Lehner & O'Farrel, 1989). Na přechodu mezi fázemi G1 a S dochází k expresi cyklinu A, jehož vysoká hladina přetrvává během S fáze. V pozdní S fázi cyklin A asociuje s CDK1, jejíž kinasová aktivita je nezbytná pro ukončení S fáze. Současně má funkci negativního zpětnovazebného regulátoru E2F (Walker & Maller, 1991; Hinds *et al.*, 1992).

V G2 fázi se nachází druhý kontrolní bod, který je aktivován poškozením DNA a brání buňkám před vstupem do mitózy. Je regulován především komplexy CDK1 s cykliny A,



**Obrázek 1.** Lidská rodina proteinů CDK a CDK-like (Převzato a upraveno z Malumbres *et al.*, 2009).

B1 a B2. Fosforylovanými substráty těchto komplexů jsou cytoskeletární proteiny, jaderné póry, proteiny jaderné laminy a histon H1. Pro ukončení mitózy je nutná degradace cyklinů typu A i B (King *et al.*, 1994).

## 2.2.4 Regulace aktivity CDK

Struktura kinas sestává ze dvou hlavních komponent: N-terminální oblasti bohaté na  $\beta$ -listy s jedním  $\alpha$ -helixem a C-terminální části, bohaté na  $\alpha$ -helixy, mezi nimiž leží aktivní místo. Součástí C-terminální oblasti je aktivační segment citlivý k fosforylaci. Jak již bylo zmíněno, k aktivaci kinas dochází po vazbě cyklinu na CDK (Pavletich, 1999). Cyklin interaguje s oběma laloky kinas a iniciuje strukturální změny. Obecně dochází k významným konformačním změnám v CDK, zatímco struktura cyklinu se téměř nemění. Interakce s C-koncovým helixem kinasy proti specifické šroubovici v cyklinu, vede k reorientaci helixu, rotaci v ose tohoto segmentu a indukci konformační změny v ATP-vazebné doméně. Posun aktivačního segmentu C-konce z katalytického místa zpřístupní threonin (např.: T161 u CDK1 nebo T160 u CDK2) pro fosforylaci prostřednictvím CAK (Echalier *et al.*, 2010). Fosforylace poté působí jako stabilizátor aktivní formy kinasového heterodimeru.

Oblast rozhraní CDK/cyklin je specifická pro každý typ kiny s cyklinem. Například CDK2/cyklin A se vzájemně dotýkají v N i C-koncových oblastech, oproti tomu interakce CDK4/cyklin D je omezena na N-koncovou oblast. Cyklin typu D navíc nevynucuje vznik aktivní konformace a dokonce i v jeho přítomnosti je ATP-vazebné místo CDK4 stále uzavřené a nedostupné substrátům (Day *et al.*, 2009; Malumbres, 2014). Některé kiny naopak nevyžadují pro aktivaci fosforylaci v aktivačním segmentu a mohou přijmout aktivní konformaci i na základě jiných interakcí (Echalier *et al.*, 2010). Například CDK5, která se podílí v post-mitotických neuronech na extenzi neuritů, tvorbě synapsí, diferenciaci nebo autofágií, je aktivována spíše specifickými aktivátory p35 a p25 než cykliny. Aktivace je indukována  $Ca^{2+}$  ionty a závislá na kalpainu (Peyressatre *et al.*, 2015).

Další regulační oblastí je G-smyčka na N-konci, bohatá na glycinová rezidua. Obsahuje Thr a Tyr, jejichž fosforylace kinasami Wee1 a Myt1 vede k deaktivaci proteinu, například při poškození DNA. Inhibiční fosforylace obecně nezpůsobí zásadní změny ve struktuře, ale inhibují aktivitu CDK prostřednictvím snížení afinity kiny k podřízeným substrátům. Následná defosforylace fosfatásou cdc25 indukuje opětovnou reaktivaci a progresi buněčného cyklu (Boutros, 2007). CDK regulující buněčný cyklus jsou negativně regulovány dalšími skupinami malých proteinů, např. INK4 a CIP/KIP (Jeffrey *et al.*, 2000). Inhibiční proteiny jsou v proliferujících buňkách exprimovány v nízkých téměř nedetekovatelných hladinách a zvýšení jejich exprese je obvykle známkou přítomnosti stimulů inhibujících cyklus.

Inhibiční proteiny INK4 specificky interagují s monomerní formou CDK4. Interakce vede ke znemožnění vytvoření vazby mezi CDK a cyklinem D a deformaci ATP-vazebné domény, čímž zabraňují aktivaci cyklinem a současně i CAK (Blain, 2008). Skupina INK4 zahrnuje proteiny p15, p16, p18 a p19. Významným regulátorem aktivity CDK4/6 je p16, jehož funkce je založená na regulaci proteinu RB (Malumbres, 2014). V RB deficientních buňkách, dochází ke zvýšení exprese p16 způsobené zpětnovazebnou smyčkou. Kdy je za fyziologických podmínek exprese p16 regulována vazbou proteinů skupiny polycomb na genový lokus p16. Dochází k následnému umlčení genu prostřednictvím methylace Lys27 histonu H3. Proces regulace zahrnuje také protein RB, který je součástí podjednotky komplexu histon lysinmethyltransferasy (Kotake *et al.*, 2015). Zvýšená exprese p16 však nemá žádný vliv na potlačení proliferace, protože proliferační aktivita buněk již není závislá na aktivaci komplexu CDK4/cyklin D (Lukas *et al.*, 1995 b).

Proteiny ze skupiny CIP/KIP interagují s podjednotkou CDK i cyklinu a jsou tedy schopné inhibovat komplex kinasy v heterodimerní formě, což poskytuje další úroveň regulace (Pavletich, 1999). Do této skupiny patří protein p21, jehož funkcí je mimo potvrzené interakce s komplexy CDK/cyklin také inhibovat syntézu DNA prostřednictvím interakce s PCNA, elongačním faktorem pro DNA polymerázu  $\delta$  (Li *et al.*, 1994 a). Exprese inhibičního proteinu p21 je závislá na p53. Buňky s deficientním p21 ztrácí schopnost regulovat svou proliferační aktivitu v reakci na poškození DNA. Další zástupci proteinů této skupiny jsou proteiny p27 a p57, zastávající totožnou inhibiční funkci jako p21. Narozdíl od p21, jehož exprese je prokázána ve všech buňkách, je exprese proteinů p27 a p57 spíše tkáňově specifická (Johnson & Walker, 1999).

### 2.2.5 Cyklin dependetní kinasa 4

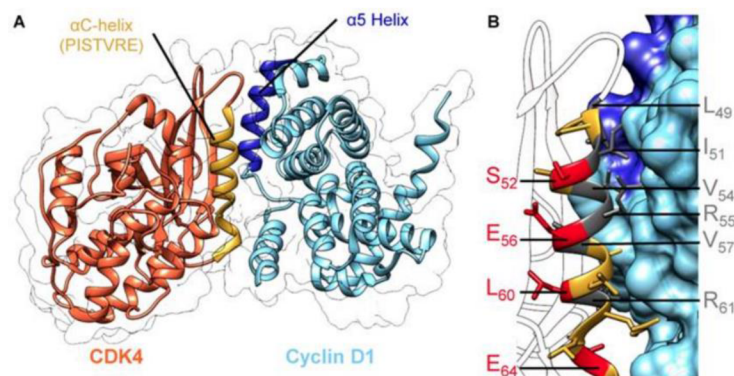
Gen pro CDK4 je uložen na chromozomu 12 (12q14.1). Tento gen podléhá konstitutivní expresi, lišící se svou intenzitou v různých tkáních. Nadměrná exprese byla zjištěna v reprodukčních orgánech, zejména v děloze (Genecards [2. 2. 2022]). Přepisem mRNA vzniká monomerní protein o délce 303 AMK zbytků. Kinasa CDK4 má typickou dvojlaločnatou strukturu, zahrnující 5 vláken  $\beta$ -listu a jeden  $\alpha$ -helix (PISTVRE) na N-konci (1-96 AMK) a převážně helikální C-konec (97-303 AMK). ATP-vazebná doména se nachází ve štěrbině mezi oběma doménami. Cyklin typu D interaguje s PISTVRE helixem (Obr. 2).

Jak již bylo zmíněno v předešlých kapitolách, CDK4 zastává klíčovou funkci v regulaci buněčného cyklu v ranné G1 fázi. Významným substrátem kinasy je protein RB, nacházející se v počátku G1 fáze v hypofosforylovaném stavu. Tehdy RB asociuje do komplexu s několika proteiny a to, transkripčními faktory typu E2F a s histondeacetylasami. Komplex RB/HDAC se váže na promotory genů a stabilizuje uzavřenou konformaci chromatinu (Day *et al.*, 2009). Aktivitou komplexu CDK4/cyklin D1 dochází fosforylaci Ser780 a Ser795 reziduí RB. Fosforylace vede k disociaci inhibičního komplexu a uvolněné faktory E2F mohou indukovat expresi cyklinu E (Nigg, 1993). Obdobnou biochemickou funkci, jako RB, plní v buňkách dva příbuzné proteiny: p107 a p130 (Baker & Reddy, 2012). Dalšími substráty CDK4 jsou proteiny SMAD3, cdt1, FOXM1 a PRTM5. V porovnání s ostatními proteiny CDK je počet substrátů CDK4 relativně nízký a současně několik z těchto proteinů jsou substráty i jiných CDK (Matsuura *et al.*, 2004).



Komplexní funkce CDK4 v mnohobuněčných organismech byly zkoumány prostřednictvím mutantních myších modelů. Protože je přechod buňky do další fáze cyklu závislý na sekvenční aktivaci jednotlivých CDK, bylo zpočátku předpokládáno, že ztráta aktivity CDK bude mít zásadní vliv na progresi buněčného cyklu, pokud nedojde ke kompenzaci účinku jinou kinasou. Tento případ byl sledován například na modelech CDK1 mutantů, kdy ztráta aktivity kinasy vedla k embryonální letalitě myši ve stadiu blastocysty (Diril *et al.*, 2012). Naopak CDK2, 4 nebo 6 deficientní myši zůstaly životaschopné a nebyl příliš ovlivněn probíhající buněčný cyklus, právě z důvodu funkčních kompenzačních mechanismů jiných CDK. Současně tyto studie nevylučují vliv jednotlivých CDK na vývoj onemocnění souvisejících s buněčným cyklem, protože CDK2 a CDK4 mutanti sice vykazovali obvyklou progresi buněčného cyklu přes S fázi, ale výsledkem byly linie s deficientní proliferací, vykazující vysokou hladinu fosforylovaného RB (Baker & Reddy, 2012). Mutace měly také významný dopad na úrovni komplexních organismů. Myší modely s deficientní CDK4/6 po určité době vývoje podléhaly rozsáhlé anémii. Na CDK4 defektních fenotypech byly pozorovány projevy podobné diabetu, snížení velikosti a počtu  $\beta$ -buněk Langerhansových ostrůvků, současně modely vykazovaly sterilitu a neurologické defekty.

Zvířecí modely navíc ukázaly souvislost mezi deficiencí CDK4 a progresí rakoviny mléčných žláz (Barrière *et al.*, 2007) Přibližně u 50 % testovaných CDK4 deficientních myši došlo k rozvoji adenokarcinomu mléčné žlázy, který dále progredoval v invazivní typy nádorů. Po následné charakterizaci byla v buňkách zjištěna nadměrná exprese cyklinu D1 (McIntosh *et al.*, 1995; Weinstat-Saslow *et al.*, 1995).



**Obrázek 2.** Krystalová struktura komplexu lidské CDK4 s cyklinem D1. A: celkový pohled; B: interakce mezi helixem PIVSTRE CDK4 a cyklinem D1, aminokyseliny zapojené do interakce jsou vyznačeny šedě, červeně jsou vyznačeny rezidua nahrazená substitucí alkenylovanými aminokyselinami (Převzato z: Bouclier *et al.*, 2020).

## 2.2.6 Cyklin D

Cyklin D je kódován genem *Ccnd1*, jehož umístění na chromozomu je 11q13.3. Gen obsahuje 5 exonů jejichž alternativním sestřihem vznikají různé varianty cyklinu D1, D2 nebo D3 o přibližné délce 295 AMK zbytků. Součástí genu jsou sekvence kódující funkční domény budoucího proteinu jako vazebná doména na protein RB a tzv. cyklin-box, což je CDK vazebná doména (Hosokawa & Arnold, 1998; Genecards [2. 2. 2022]). Exprese cyklinu D je obvykle indukována růstovými faktory, včetně IGF-I, kyselinou lysosofosfatidovou nebo může být iniciována po steroidní stimulaci androgeny (Fu *et al.*, 2003). Hormonální stimulace může být v určitých buněčných typech způsobena také gastrointersticinálními hormony (Albanese *et al.*, 1999).

Kromě interakce s kinasami CDK4/6 bylo zjištěno, že cyklin D je zprostředkovatelem jiných regulačních funkcí, nezávislých na vazbě CDK. Konkrétní varianta cyklinu D1 funguje jako integrátor extracelulárních signálů od ranné po střední G1 fázi. Účastní se regulace aktivity různých transkripčních faktorů a proteinů řídících acetylaci histonů a proteinů odpovědných za remodelaci chromatinu (Wang *et al.*, 2004). Vazbou na odpovídající HDAC reguluje buněčnou proliferaci a diferenciaci buněk, a to závisle i nezávisle na aktivitě CDK. Cyklin D1 se podílí na regulaci diferenciaci kosterních myeloblastů, klků epitelu tenkého střeva a adipocytů.

Po stimulaci buněk Il-6 asociuje cyklin D1 s aktivační doménou proteinu STAT3, což vede k jeho inaktivaci nezávisle na interakci s CDK. Tento proces má následně vliv na adhezi a mobilitu buněk (Bienvenu *et al.*, 2001). Právě regulace adheze a migrace buněk může mít zásadní vliv na tumorigenezi, což koreluje s faktem, že tumorigeneze spojená s brzkým vznikem metastáz je velmi často spojována právě s nadměrnou expresí cyklinu D1 v transformovaných buňkách (Lin *et al.*, 2000). Deregulovaná exprese je často stimulována onkogenními signály jako RAS, SRC nebo  $\beta$ -katenin (Fu *et al.*, 2004).

## 2.2.7 Význam CDK4 v onkologii

V množství preklinických a klinických studií bylo prokázáno, že vznik nádorového onemocnění je z velké části důsledkem poruch v regulaci buněčného cyklu, vedoucích k neomezené proliferaci a neschopnosti buněk podstoupit apoptózu (Baker & Reddy, 2012). Většina nádorových onemocnění vykazuje abnormality v dráze CDK4/cyklin D/INK4/RB. Zejména se jedná o hyperaktivní stav CDK4, k němuž dochází v důsledku nadměrné exprese pozitivních regulátorů (včetně cyklinů D) nebo inaktivace inhibitorů

skupiny INK4 a CIP/KIP. Mimo to byly popsány bodové mutace v genu pro CDK4 a jeho chromozomální translokace. Příkladem je mutace R24C, odpovědná za vznik rezistence k CDK inhibitorům. Tato mutace bývá často identifikována u melanomů, karcinomů plic a lymfomů z plášťových buněk (Deshpande *et al.*, 2005). Častý výskyt amplifikací nebo nadměrné exprese CDK4 byly detekovány u celé řady nádorů: gliomů, sarkomů, lymfomů, leukémií i rakovin prsu. Kombinace nadměrné exprese a amplifikace bývá často detekována u karcinomů děložního čípku, karcinomů prsu a lymfomů z plášťových buněk. V různých typech nádorových onemocnění byla doposud charakterizována celá řada jednobodových mutací v genu pro CDK4. Tyto mutace se objevují v různých variantách. Mezi mutace s nejvyšší četností bylo zařazeno 38 různých jednobodových mutací a 25 missense mutací v N-terminální doméně CDK4, konkrétně v reziduích 2, 9, 10, 23, 24, 31, 35 a 43.

Vůbec nejvíce často dochází k mutacím genu pro cyklin D. Nejčastěji detekovaným defektem je translokace t(11;14)(q13;q32) do blízkosti oblasti kódující těžký řetězec imunoglobulinu, což vede ke konstitutivní expresi proteinu v buňkách mnohočetného myelomu, B-lymfocytární leukémie a chronické lymfocytární leukémie (Peyressatre *et al.*, 2015). Další abnormality s častou incidencí jsou amplifikace a různé jednonukleotidové polymorfismy. Významným polymorfismem je A870G, způsobující chybný sestřih mezi exony 4 a 5. Důsledkem je translace pokračující do intronu 4 a exprese zkrácené verze proteinu, který je schopen tvořit aktivní komplex s CDK4, ale postrádá normální C-terminální konec, jehož fosforylace je klíčová pro jaderný transport a degradaci cyklinu proteazomální dráhou v cytoplazmě (Lin *et al.*, 2006). Jeho ztráta tak způsobuje akumulaci proteinu v jádře, což přispívá onkogenním vlastnostem. Polymorfismus A870G bývá často detekován v karcinomech prostaty a prsu. Amplifikace genu pro cyklin D jsou potom detekovány v různých typech nádorových onemocnění nejčastěji však hlavy a krku (Dickson *et al.*, 1995; Diehl *et al.*, 1997).

### 2.3 Inhibitory CDK4

Objasnění funkce CDK jako klíčových regulátorů buněčného cyklu přispělo k vývoji cílené léčby některých nádorových onemocnění. Za zvláště slibné terapeutické cíle jsou dnes považovány CDK4 a CDK6, a to právě z důvodu četného výskytu mutací a deregulací na úrovni exprese a aktivity těchto kinas u různých typů lidských malignit (Kryštof & Strnad, 2001). Změny na úrovni kontroly buněčného cyklu v G1 fázi vedou

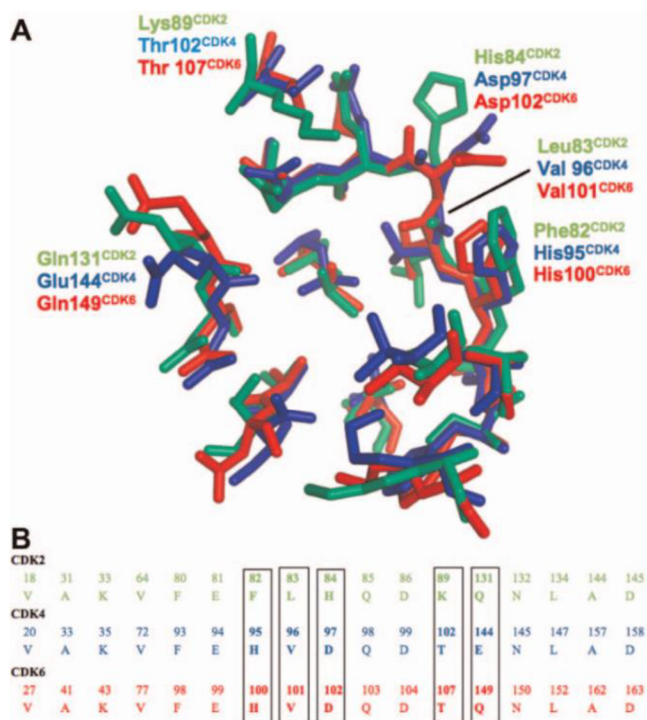
k zesílení onkogenních procesů v transformovaných buňkách, genomové nestabilitě a nekontrolované proliferaci (McInnes *et al.*, 2004). Současně celá řada nádorových buněk je i přes četné mutace závislá na aktivitě kinas CDK4 a CDK6 a jejich inhibice vede v transformovaných buňkách k zastavení progresu buněčného cyklu vedoucí k senescenci nebo programované buněčné smrti.

Poslední tři desetiletí bylo věnováno značné úsilí vývoji látek, inhibujících aktivitu CDK4 a CDK6. Nejprve byly za tímto účelem zkoumány a purifikovány přírodní látky vykazující inhibiční aktivitu. Mezi přírodní látky s prokázanou CDK4 inhibiční aktivitou patří alkaloid staurosporin, dále pak molekuly vykazující současně CDK1, CDK4 a CDK9 inhibiční aktivitu, flavon P276-00 a aminopyrimidinové indoly (merioliny) (Peyressatre *et al.*, 2015). Postupem času se spektrum CDK4 inhibitorů rozšířilo o nízkomolekulární syntetické inhibitory, inhibiční peptidy, různá peptidomika a bifunkční molekuly PROTAC (Adon *et al.*, 2021). Na základě mechanismu účinku lze tyto látky rozdělit na ATP-nekompetitivní, vážící se mimo aktivní místo a látky ATP-kompetitivní, mimikující svou vazbou ATP, substrátově kompetitivní látky, molekuly založené na protein-proteinové interakci a allosterické inhibitory.

ATP-kompetitivní CDK4 inhibitory se váží do aktivního místa proteinu a napodobují tak funkci přirozeného inhibičního proteinu p16, což vysvětluje zvýšenou citlivost buněk, které p16 neexprimují (Peyressatre *et al.*, 2015). Zpočátku setrval problém se selektivitou ATP-kompetitivních látek z důvodu vysoce konzervované aminokyselinové sekvence v ATP-vazebném místě kinas rodiny CDK (Obr. 3), proto mimo ATP-kompetitivních inhibitorů byly navrženy i jiné alternativní strategie inhibice (McInnes *et al.*, 2004). Jednou z nich je výše zmíněná nekompetitivní inhibice. Inhibitory působí nezávisle na vazbě p16 a není tedy u nich předpokládán účinek podobný CKI. Mezi tyto inhibitory patří 3-ATA: 3-aminothioakridon a deriváty chrysinu, allosterické regulátory aktivity kinas CDK2, CDK4 a 6 (Peyressatre *et al.*, 2015). Nekompetitivní inhibitory jsou obecně selektivnější kvůli vysoké rozdílnosti rozhraní různých CDK s cykliny.

Inspirace ve struktuře inhibičních proteinů vedla k návrhu peptidových sloučenin, konkurujících nebo narušujících specifického rozhraní CDK/cyklin. Na základě znalosti sekvence p16 interagující s CDK4 byly vytvořeny cyklické hexapeptidy odvozené od C-terminální domény s motivem PRGPRP (Kotake *et al.*, 2015). Peptidové inhibitory odvozené od p21 a p27 byly původně vytvořeny za účelem vazby na CDK2/cyklin rozhraní, avšak jejich inhibiční funkce byla prokázána také pro CDK4.

Společně s rozvíjejícími se metodami molekulárního modelování a novými poznatky z krystalografických analýz komplexů CDK/cyklin byla postupem času vyřešena otázka selektivity ATP-kompetitivních sloučenin (Kotake *et al.*, 2015). Na základě znalosti struktur CDK2, CDK4 a CDK6 byl vytvořen model ATP-vazebného místa těchto tří kinas. V komplexním modelu struktur bylo možné provést srovnání a z výsledných odlišností v odpovídajících pozicích pak identifikovat rezidua zodpovědná za selektivitu k CDK4/6 (Obr. 3). Přestože je většina AMK reziduí v ATP-vazebném místě převážně konzervativní, bylo popsáno pět konkrétních AMK shodných pro CDK4 a CDK6, ale odlišných od CDK2 (Shafiq *et al.*, 2012). Vývoj vysoce selektivních ATP-kompetitivních inhibitorů ukázal později velmi slibné účinky, proto již několik inhibitorů prošlo klinickým testováním a bylo schváleno pro léčbu nádorových onemocnění.

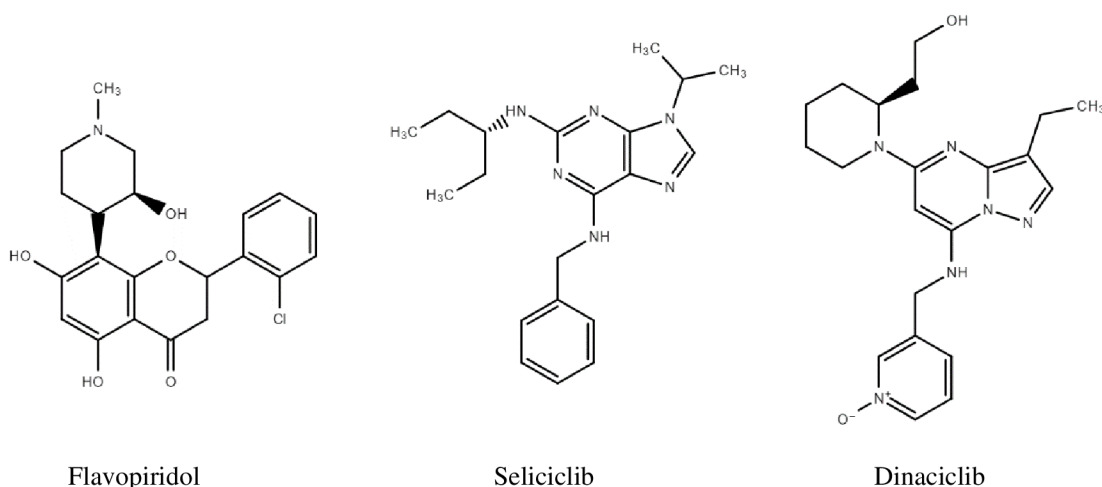


**Obrázek 3.** Srovnání AMK sekvence ATP-vazebného místa kinas CDK2, CDK4 a CDK6. A: strukturální motivy kinas CDK2 (zeleně), CDK4 (modře), CDK6 (červeně), B: odpovídající sekvence AMK vazebného místa, vyznačena jsou rozdílná rezidua odpovědná za selektivitu (Převzato od Shafiq *et al.*, 2012).

### 2.3.1 První generace ATP-kompetitivních inhibitorů

Inhibice CDK byla již od počátku považována za velmi perspektivní cestu léčby nádorových onemocnění. Mnohé z prvních látek však nebyly příliš selektivní, proto jsou označovány také jako pan-CDK inhibitory. Většina těchto látek selhala ve fázi klinického testování, z části pro nedostačující léčebný účinek, ale také z důvodu relativně vysoké toxicity pro netransformované buňky (Malumbres *et al.*, 2009). V současné době lze ATP-kompetitivní CDK inhibitory dle chronologie a specifity účinku rozdělit na inhibitory první, druhé a třetí generace.

Nejvíce zkoumanou látkou první generace inhibitorů byl semisyntetický analog rostlinného alkaloidu rohitukinu, flavopiridol (Yuan *et al.*, 2021). Inhibitor vykazoval inhibiční účinky na CDK1, 2, 4, 6, 7 i 9 a ačkoliv indukoval silnou inhibiční aktivitu v *in vitro* modelech, *in vivo* účinek byl podstatně nižší, než se zpočátku předpokládalo a s ohledem k vysoké hematotoxicitě byly klinické testy ukončeny. Dalším příkladem inhibitoru první generace je seliciclib (roscovitin), který vykazoval inhibiční účinek na CDK1, CDK2 a CDK5 (Whittaker *et al.*, 2004). Seliciclibu, na rozdíl od flavopiridolu, nebyla prokázána hematotoxicita a doposud probíhají dvě klinické studie pro léčbu Cushingovy choroby a pokročilých solidních tumorů (Obr. 4). S vývojem zkoumání těchto látek se souběžně měnil pohled na jejich účinek (Asghar *et al.*, 2015). Zpočátku se předpokládalo, že je seliciclib relativně selektivní inhibitor CDK1, 2 a 5. Následně získaná data však ukázala, že mimo zmíněné kinasy seliciclib inhibuje také CDK7 a CDK9.



**Obrázek 4.** Strukturální vzorce pan-CDK inhibitorů první generace: zleva flavopiridolu, seliciclibu a inhibitoru druhé generace: dinaciclibu.

### 2.3.2 Druhá a třetí generace inhibitorů

Nová generace inhibitorů byla vyvinuta s cílem zvýšit selektivitu a snížit nespecifické účinky látek. Mezi významné inhibitory této skupiny patří dinaciclíb, což je inhibitor CDK1, 2 a CDK5 vykazující slabou inhibiční aktivitu pro CDK4/6 a CDK9 (Parry *et al.*, 2010). Ve srovnání s flavopiridolem měl dinaciclíb výraznější inhibiční účinek na fosforylaci RB, replikaci DNA a navíc byl méně toxický pro netransformovanou tkáň. Dinaciclíb se nachází ve druhé fázi klinického testování pro léčbu akutní myeloidní leukémie a triple negativního karcinomu prsu v kombinaci s epirubicin hydrochloridem (Fry *et al.*, 2004). Již byla dokončena třetí fáze klinického testování v kombinaci s rituximabem pro léčbu chronické lymfocytární leukémie.

Ve srovnání s nespecifickými inhibitory nedochází při léčbě selektivními CDK4 inhibitory k inhibici CDK, regulujících cyklus nenádorových buněk. Prostřednictvím knock-out modelů bylo prokázáno, že CDK4/6 nejsou nezbytné pro vývoj zdravých fibroblastů, právě díky existenci kompenzačních mechanismů. Stejně tvrzení neplatí pro nádorové buňky, které jsou závislé na signalizaci RB. V důsledku ztráty p16, zvýšené exprese cyklinu D či hyperaktivace komplexu CDK4/6 s cyklinem D se stávají nádorové buňky citlivějšími vůči selektivní inhibici CDK4/6 (Yuan *et al.*, 2021). Proto se jedná o relativně bezpečnou a účinnou léčebnou strategii nádorových onemocnění, mající minimální vedlejší účinky na nenádorovou tkáň. Prostřednictvím chemického screeningu bylo zjištěno, že pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-onové deriváty s 2-aminopyridinovým postranním řetězcem v poloze C2 jsou vysoce selektivní pro inhibici CDK4/6. Následnou optimalizací struktury byl vytvořen inhibitor třetí generace, palbociclíb (Fry *et al.*, 2004). Inhibiční účinek byl předpokládán na všech liniích s přítomností funkčního proteinu RB, čímž byla současně prokázána biologická specifita účinku.

Paralelní úsilí ve vývoji nových selektivních sloučenin dalo vzniknout dalším dvěma, FDA schváleným inhibitorům, abemaciclíbu a ribociclíbu, jejichž struktura je založená na skeletu 7H-pyrrolo(2,3-d)pyrimidinu (Ribociclíb) a 6-(pyrimidin-4-yl)-1H-benzo[d]imidazolu (Abemaciclíb). Všechny tři látky mají podobný strukturní motiv (Obr. 5), zcela odlišný od původních pan-CDK inhibitorů (Obr. 4). I přesto, že v době vzniku palbociclíbu ještě nebyla přesně známa struktura CDK4/6, bylo předpokládáno, že látky se váží do ATP-vazebné kapsy (Asghar *et al.*, 2015). V průběhu klinických testů byl pozorován výrazný pokles závažných vedlejších účinků ve srovnání s pan-CDK inhibitory.



Nejvíce využívaným markerem pro hodnocení citlivosti nádorů vůči CDK4/6 inhibitorům je charakterizace dráhy CDK4/CDK6/RB/p16/INK4A (Yuan *et al.*, 2021). Funkční protein RB je nezbytný pro inhibiční aktivitu selektivních CDK4/6 inhibitorů a jeho ztráta či mutace vedoucí k funkčním změnám je přímým markerem rezistence k účinku látek. Ztráta RB vede v buňkách ke zvýšení exprese p16 inhibičního proteinu, jehož zvýšené hladiny jsou detekovány například u malignit způsobených lidskými papilomaviry, schopnými inaktivovat RB u karcinomů děložního hrdla (Carozzi *et al.*, 2008).

### 2.3.2.1 Palbociclib

Palbociclib (Obr. 5) patří do skupiny pyridopyrimidinů. Jedná se o reverzibilní nízkomolekulární inhibitor CDK4/6 třetí generace (VanderWel *et al.*, 2005; Guha, 2012). Palbociclib je silný a selektivní inhibitor CDK4 a komplexů CDK4/6 s cyklinem D1, přičemž jeho toxicita je velmi nízká. Palbociclib vykazuje poloviční inhibiční aktivitu na komplexu CDK4/cyklin D1 v hodnotě  $11 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$  (Tab. 3), hodnota  $\text{IC}_{50}$  pro komplex CDK4/cyklin D3 je rovna  $9 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Inhibitor vykazuje také silnou inhibiční a selektivní aktivitu na homologní CDK6 v komplexu s cyklinem D2 rovněž v nanomolárních hodnotách (Tripathy *et al.*, 2017). K selektivitě a účinnosti inhibitoru na CDK4 přispělo vnesení acetylové skupiny na C6 a 2-aminopyridinový řetězec do polohy C2. Vnesení methylové skupiny na C5 naopak způsobilo snížení selektivity palbociclibu vůči CDK1 a CDK2 (VanderWel *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2018 a).

Inhibice CDK4/6 palbociclibem snižuje fosforylaci Ser780, Ser795 a Ser807/811 reziduí proteinu RB, což vede k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi v buňkách s funkčním RB. Kromě poklesu fosforylace RB indukuje inhibice CDK4/6 pokles fosforylace i příbuzných proteinů p110, p107 a p130 (Roskoski, 2016). Vyjma proteinu RB se na regulaci buněčného cyklu podílí další substrát CDK4, transkripční faktor FOXM1, odpovědný mimo jiné za potlačení buněčného stárnutí. Akutní inhibice CDK4/6 indukuje senescenci spojenou se zvýšenou aktivitou  $\beta$ -galaktosidasy a aktivací drah p53/p21 a p16 (Anders *et al.*, 2011). Navíc bylo zjištěno, že inhibice palbociclibem má vliv na aktivaci proteazomu prostřednictvím snížené hladiny ECM29 (Miettinen *et al.*, 2018). Ačkoliv je palbociclib vysoce selektivní, v rámci proteomického profilování byla zjištěna interakce s lipidovými kinasami PIK3R4, PIK3CD, PIP5K2C a PIP4K2A/B/C,



kteře jsou součástí dráhy závislé na fosfatidylinositolu a účastní se tak aktivace signalizační kaskády proteinkinasy B (AKT) (Sumi *et al.*, 2015).

S funkcí palbociclibu interferuje inhibiční protein p27, jehož funkcí za normálních okolností je modulace aktivity CDK2/cyklin A, E. Mimo inhibiční funkce byla zjištěna allosterická regulace jaderného transportu CDK4/cyklin D. Protein vazbou na komplex CDK4/cyklin D indukuje konformační změny spojené s poklesem vazebné afinity palbociclibu k CDK4. Dochází k otočení Phe93 v řetězci  $\beta 5$  a Ala33 v  $\beta 3$  opačným směrem, proto je znemožněno vzniku vazby s methylem na C5 a acylem na C6 pyridopyrimidinového řetězce palbociclibu. *In vitro* studie ukázaly, že trimerní komplex CDK4/cyklin D/p27 vykazuje sníženou citlivost k inhibici (Guiley *et al.*, 2019).

Významné buněčné účinky palbociclib vykazuje při inhibici homologní CDK6 na indukci apoptózy nádorových buněk T-lymfocytární leukémie. Za běžných podmínek komplex CDK6/cyklin D3 fosforyluje dva klíčové enzymy glykolýzy 6-fosfofruktokinasy a pyruvátkinasy. Fosforylace má na enzymy inhibiční účinek a dochází ke zpomalení probíhající glykolýzy skrze přesměrování meziproductů do pentosafosfátového cyklu, což podporuje produkci redukováného NADPH a glutathionu, podílejících se na regulaci hladiny ROS. Inhibice komplexu CDK6/cyklin D3 palbociclibem snižuje fosforylaci enzymů a jejich zvýšená aktivita vede k vyčerpání NADH a glutathionu. V důsledku vysoké hladiny ROS nádorové buňky podstupují apoptózu (Wang *et al.*, 2017).

Palbociclib našel uplatnění v léčbě mnoha nádorových onemocnění od hematologických malignit až po pokročilé a metastatické solidní tumory. V průběhu preklinických studií bylo zjištěno, že slibně interaguje s jinými molekulárně cílenými činidly. Prozatím největší pokrok byl zaznamenán v léčbě lumnálního metastatického karcinomu prsu. Kombinace palbociclibu s endokrinní terapií u pacientek s metastatickým karcinomem prsu pozitivním na estrogenní nebo progesteronový receptor vykazovala vysokou synergii v *in vitro* i *in vivo* modelech. Inhibice CDK4/6 v kombinaci s inhibitorem aromatasy letrozolem statisticky významně prodloužila dobu do progresu onemocnění (Dange *et al.*, 2017). Na základě výsledků klinických studií byl palbociclib roku 2015 schválen FDA v kombinaci s letrozolem pro léčbu metastatického ER<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> karcinomu prsu (Bilgin *et al.*, 2017). Současně byl palbociclib shledán účinným pro kombinační terapii s fulvestrantem a v roce 2016 schválen FDA pro léčbu ER<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> pokročilého metastatického karcinomu prsu žen s progresí onemocnění po předchozí neúspěšné endokrinní terapii (Iwata *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018 b).

Palbociclib byl také testován v monoterapii RB pozitivních pokročilých solidních tumorů, kolorektálního karcinomu s mutací RAS, kožního melanomu a non-Hodkingových lymfomů. Výsledky studií ukázaly slibnou klinickou účinnost a omezenou toxicitu (Schwartz *et al.*, 2011; Teh *et al.*, 2016). Další úspěšnou aplikací palbociclibu představuje léčba mnohočetného myelomu v kombinaci s bortezomibem a dexamethasonem (Niesvizky *et al.*, 2015). V posledních letech se výzkum zaměřuje na testování účinku CDK4/6 inhibitorů u karcinom plic. V rámci *in vivo* studií na myších modelech bylo zjištěno, že kombinace inhibitorů EGFR s palbociclibem výrazně snižuje proliferaci, angiogenezi a současně indukuje apoptózu nádorových buněk v porovnání se samotnou léčbou gefitinibem (Liu *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017). V současné době je palbociclib ve fázi pre-klinického testování pro léčbu primárních glioblastomů s deregulovanou aktivitou kinas CDK4/6. Stávajícím problémem pro klinické využití je přestup přes hematoencefalickou bariéru (Liu *et al.*, 2017). *In vivo* bylo zjištěno, že je palbociclib substrátem P-glykoproteinu, který je odpovědný za eflux a omezení vstupu a distribuce látky do invazivních oblastí (Liu *et al.*, 2018 a).

### 2.3.2.2 Ribociclib

Dalším vysoce účinným, selektivním CDK4/6 inhibitorem je ribociclib (Obr. 5). Strukturně je ribociclib podobný palbociclibu: klíčové substituenty v poloze C2 a C7 zůstávají stejné, ale na rozdíl od palbociclibu je ribociclib tvořen pyrrolo[2,3-d]pyrimidinovým jádrem (Rader *et al.*, 2013). V rámci chemoproteomických studií inhibiční aktivity na buněčných liniích karcinomu plic bylo zjištěno, že ribociclib vykazuje vyšší selektivitu vůči CDK4/6 než palbociclib, dokonce i při vyšších koncentracích inhibitor interaguje s nižším počtem nesespecifických cílů, mezi nimiž byly identifikovány izoformy CAML2 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$  a kinas TTK, která je inhibována i palbociclibem (Sumi *et al.*, 2015; Hafner *et al.*, 2019). Hodnota IC<sub>50</sub> ribociclibu na komplexu CDK4/cyklin D1 je 10 nmol·l<sup>-1</sup> (Tab. 3), zatímco hodnoty na komplexy CDK1 a CDK2 se pohybují v koncentracích o tři řády vyšších. Na buněčných liniích byla pozorována další odlišnost účinku těchto dvou inhibitorů mající souvislost se získanou rezistencí. Zatímco v liniích rezistentních na palbociclib byla zjištěna vysoká hladina exprese cyklinu E, rezistence na ribociclib se projevila spíše nárůstem hladiny E2F (Doi *et al.*, 2017).

Ribociclib je vysoce účinný napříč různými typy nádorových onemocnění, významné výsledky vykazuje v kombinaci s endokrinní terapií. Klinická data ukazují, že léčebná kombinace s letrozolem výrazně zvýšila průměrnou dobu přežití a zastavila růst nádorů u pacientek s viscerálními metastázemi, proto byla v roce 2017 schválena FDA (Tripathy *et al.*, 2017). Pozitivní klinické výsledky ukázaly také kombinace s tamoxifenem a fulvestrantem a triple-kombinace ribociclib:letrozol:everolimus (inhibitor mTOR) nebo alpelisib (inhibitor PI3K) u dříve léčených pacientek s progredujícím ER pozitivním karcinomem prsu s mutací v dráze PI3K/AKT/mTOR (Juric *et al.*, 2016).

Nadějnou kombinací je použití ribociclibu s inhibitorem RAF (encorafenib) a MEK (binimetinib) pro léčbu melanomu s mutací RAF. Protoonkogenní kinasa RAF je významnou složkou dráhy mitogenem-aktivovaných proteinkinás podřízených RAS. K této kombinaci vedla motivace časté deregulace dráhy RAS vedoucí k nadměrné expresi cyklinu D. Klinické testy ukázaly, že kombinace ribociclibu s binimetinibem vedla k výrazné regresi nádoru ve srovnání s monoterapií MEK inhibitory. Léčba způsobila prodloužení průměrné délky přežití a potlačila vývoj rezistence u nádorových modelů (Tripathy *et al.*, 2017). Výrazně zvýšená exprese cyklinu D je také charakteristická pro neuroblastom. Často bývá tato deregulace způsobena onkogenní aktivací kinasy ALK, vedoucí až k osminásobně vyšší expresi cyklinu D v buňkách neuroblastomu oproti jiným typům malignit. Tato skutečnost činí buňky neuroblastomu zvláště citlivé k inhibici CDK4/6 ribociclibem, který způsobil regresi nádoru pacientů s neuroblastomem již v nanomolárních koncentracích (Molenaar *et al.*, 2008).

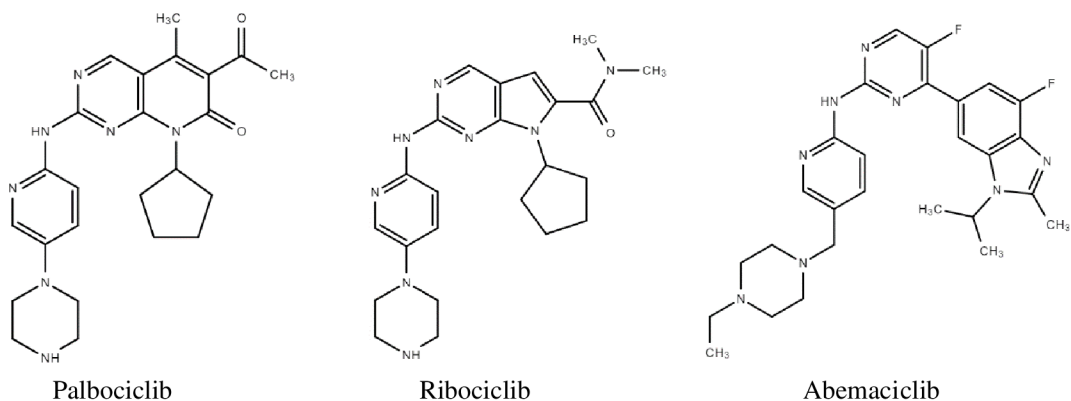
### 2.3.2.3 Abemaciclib

Ačkoliv je inhibiční mechanismus účinku abemaciclibu ve srovnání s palbociclibem a ribociclibem stejný, chemicky je tento inhibitor odlišný (Obr. 5). Jeho struktura je odvozena od 2-anilino-2,4-pyrimidinu, přičemž v poloze C2 pyrimidinu se nachází ((4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)pyridin-2-yllový řetězec a v poloze C5 atom fluoru. Druhý fluor se nachází na C4 benzimidazolu (O'Leary *et al.*, 2016). Abemaciclib vykazuje inhibiční účinky vůči CDK4 na nižší koncentrační úrovni než palbociclib a ribociclib (Tab. 3), ale současně je abemaciclib méně selektivní a v koncentracích nad  $0,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  interaguje s řadou dalších molekulárních cílů (kinasy PIM1, DYRK, HIPK, TTK), což má za následek zvýšenou cytotoxicitu a navození G2/M bloku (Hafner *et al.*, 2019). V roce 2017 byl abemaciclib schválen pro léčbu ER<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> metastatického

karcinomu prsu progredujícího po neúspěšné endokrinní terapii v kombinaci s fulvestrantem. V roce 2021 byl schválen pro léčbu ER<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> karcinomu prsu s vysokým rizikem recidivy v kombinaci s tamoxifenem nebo inhibítorem aromatasy.

Abemaciclib byl účinný v buňkách kolorektálního karcinomu a melanomu pozitivních na mutaci v RAS s vyvinutou rezistencí vůči vemurafenibu. Vysokou odezvu vykazují také linie nemalobuněčného karcinomu plic a glioblastomů (O'Leary *et al.*, 2016; Royce *et al.*, 2022). Existují studie poukazující na rozdíl mezi absorpcí abemaciclibu a palbociclibu přes hematoencefalickou bariéru. Abemaciclib je schopen narušením efluxního působení P-glykoproteinů senzibilizovat buňky vykazující nadměrnou expresi těchto přenašečů (Sanchez-Matinez *et al.*, 2011). Důsledkem je dobrá distribuce přes hematoencefalickou bariéru, což umožňuje inhibiční aktivitu vůči primárním nádorům CNS a mozgovým metastázám.

Abemaciclib vykazuje vyšší selektivní účinek k CDK4 než CDK6, navíc je u něj prokázána schopnost inhibice CDK9 (O'Leary *et al.*, 2016). Oproti palbociclibu a ribociclibu má abemaciclib mírnější vedlejší účinky z hlediska hematotoxicity, naproti tomu jeho specifickým vedlejším účinkem je gastrotoxita a zvýšená hladina aminotransferas, což může značit negativní vliv abemaciclibu na funkci jater (Gelbert *et al.*, 2014; Tadesse *et al.*, 2017).



**Obrázek 5.** Strukturální vzorce schválených CDK4/6 inhibitorů: zleva palbociclibu, ribociclibu a abemaciclibu.

**Tabulka 3.** Srovnání hodnot IC<sub>50</sub> selektivních inhibitorů CDK4/6 na enzymových komplexech CDK/cyklin (Tripathy *et al.*, 2017).

Hodnoty IC <sub>50</sub> (nmol·l <sup>-1</sup> )	Palbociclib	Ribociclib	Abemaciclib
CDK4/cyklin D1	11	10	2
CDK6/cyklin D1, 2, 3	16	39	10
CDK1/cyklin B	>10 000	>10 000	1627
CDK2/cyklin A, E	>10 000	>10 000	504
CDK5/p25	>10 000	>10 000	355
CDK9/cyklin T	Neuvedeno	Neuvedeno	57

#### 2.3.2.4 Trilaciclib

Trilaciclib (G1T28) je relativně nově schválený CDK4/6 inhibitor vykazující silnou antineoplastickou a chemoprotektivní aktivitu. Inhibitor byl popsán v roce 2016 a pro odvození struktury bylo základem pyrrolo[2,3-d]pyrimidinové jádro, obdobně jako tomu bylo u ribociclibu (Obr. 6). Ke schválení úřadem FDA došlo v únoru roku 2021 jako chemoprotektantu kostní dřeně před negativním účinkem chemoterapeutické léčby metastatického malobuněčného karcinomu plic (Powell & Prasad, 2021). Hematopoetické buňky jsou k účinku chemoterapie zvláště citlivé a v důsledku jejich poškození dochází k dlouhodobé myelosupresi, což činí organismus náchylný k infekcím a krvácení.

V současné době se trilaciclib nachází ve II. fázi klinického testování v kombinaci s gemcitabinem a karboplatinou pro léčbu triple negativního karcinomu prsu a ve III. fázi pro léčbu metastatického kolorektálního karcinomu (Ammazzalorso *et al.*, 2021). Ve III. fázi klinického testování je také zkoumán účinek trilaciclibu u metastatického karcinomu močového měchýře v průběhu léčby chemoterapií (Weiss *et al.*, 2019).

#### 2.3.3 Inhibitory v klinickém testování

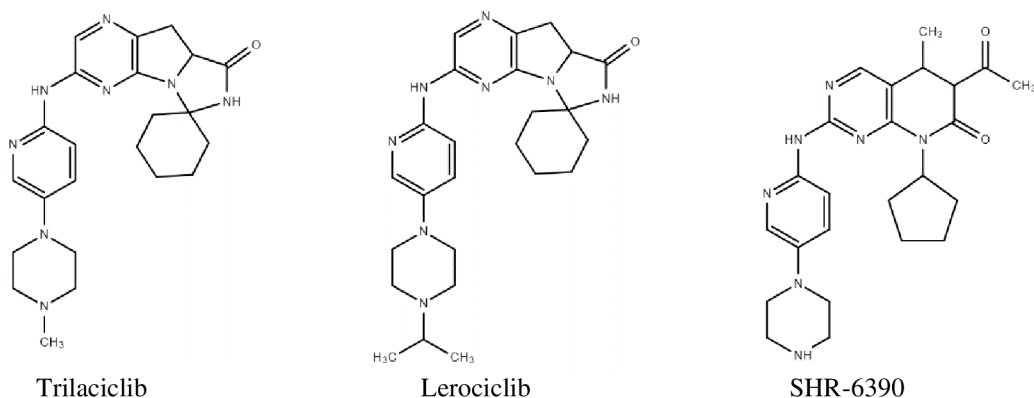
Vzhledem k vysoké efektivitě léčby CDK4/6 nízkomolekulárními inhibitory ve srovnání s minimem vedlejších účinků, je stále výzvou hledání nových ještě selektivnějších inhibitorů (Li *et al.*, 2014). Ačkoliv léčba schválenými inhibitory s sebou přináší mnoho výhod, většina látek stále vykazuje nespecifické interakce. V současné době jsou pro léčbu nádorových onemocnění schváleny čtyři ATP-kompetitivní selektivní inhibitory CDK4/6: palbociclib, ribociclib, abemaciclib a trilaciclib (Ammazzalorso

*et al.*, 2021). Ve fázi klinického testování se nachází řada dalších látek, které jsou buď selektivními inhibitory CDK4/6 nebo vykazují duální inhibiční účinky. Příkladem látek s duálním účinkem jsou inhibitory lerociclib, ON123300 a AMG925, u nichž byla mimo selektivity k CDK4/6 prokázána inhibiční aktivita na onkogenní kinasu FLT3. Mutace v této kinase vedou k vývoji maligního onemocnění akutní myeloidní leukémie (Zhang *et al.*, 2014; Bisi *et al.*, 2017).

### 2.3.3.1 Lerociclib

Lerociclib (G1T38) je vysoce selektivní CDK4/6 inhibitor, který byl vyvinut v roce 2017. Svou chemickou strukturou je téměř totožný s trilaciclibem (Obr. 6). Jedinou odlišností je koncový substituent na piperazinu, kde má trilaciclib navázán methyl a lerociclib má ve stejném místě navázán isopropyl (Bisi *et al.*, 2017). Tato změna vedla ke změně farmakokinetických vlastností a umožnění perorální aplikace látky, nikoliv však k narušení selektivity.

Lerociclib vykazoval v *in vitro* modelech inhibiční účinek na RB pozitivních nádorových liniích B-buněčné leukémie (MV4-11), ER<sup>+</sup> karcinomu prsu (MCF-7) a buněčných liniích lymfomů. Mimo specifickou inhibici CDK4/6 byl prokázán také inhibiční účinek na konkrétní mutace FLT3 [D835V a ITD] na liniích akutní myeloidní leukémie, nikoliv však na nemutovanou formu proteinu. *In vivo* studie ukázaly výrazný inhibiční efekt na růst HER2<sup>+</sup> myších xenograftů karcinomu prsu (Bisi *et al.*, 2017). V současné době se nachází ve II. fázi klinického testování pro léčbu ER<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> metastatického karcinomu prsu v kombinaci s fulvestrantem nebo letrozolem



**Obrázek 6.** Chemická struktura CDK4/6 inhibitorů: zleva trilaciclib 2021 schválen FDA, lerociclib a SHR-6390 ve fázi klinického testování.

(Ammazzalorso *et al.*, 2021). Paralelně probíhající klinická studie se zabývá prospěšností léčby nemalobuněčného karcinomu plic s EGFR mutací lerociclibem v kombinaci s osimertinibem (Tan *et al.*, 2019).

### 2.3.3.2 SHR-6390

SHR-6390 (dalciciclib) je CDK4/6 selektivní inhibitor strukturně podobný abemaciclibu (Obr. 6). Inhibitor prokázal vysoký inhibiční účinek na fosforylaci RB v *in vitro* modelech linií MCF-7/TR karcinomu prsu rezistentní k tamoxifenu a linii BT-474 rezistentní k trastuzumabu. V kombinační terapii vykazoval synergický účinek s fulvestrantem na buněčné linii MCF-7 a v rámci *in vivo* modelů prokázal účinnost na regresi xenoimplantovaného nádoru MCF-7 v kombinaci s inhibitorem aromatasy letrozolem (Long *et al.*, 2019). V současné době probíhá paralelně celá řada klinických studií dalciciclibu, ať už kombinaci s jinou látkou nebo samostatně jako monoterapeutika. Aktuálně se látka nachází ve II. fázi klinického testování pro léčbu pokročilých solidních tumorů, pro monoterapii také probíhají experimentální léčby melanomu. V kombinaci s dalšími inhibitory je dalciciclib testován pro léčbu ER<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> pokročilého karcinomu prsu v kombinaci s famitinibem, dále pro preoperační léčbu karcinomu prsu s anastrozolem a v kombinaci s pyrotinibem pro léčbu HER2<sup>+</sup> karcinomu žaludku (Ammazzalorso *et al.*, 2021).

### 2.3.4 Modulátory stability CDK

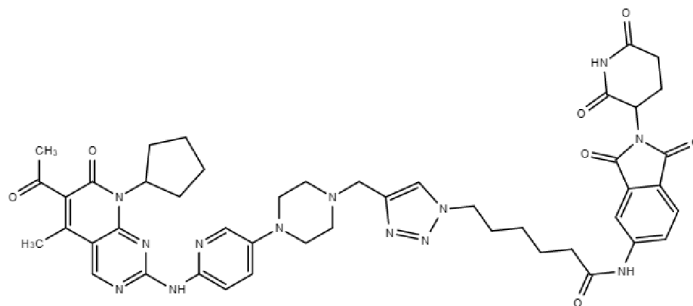
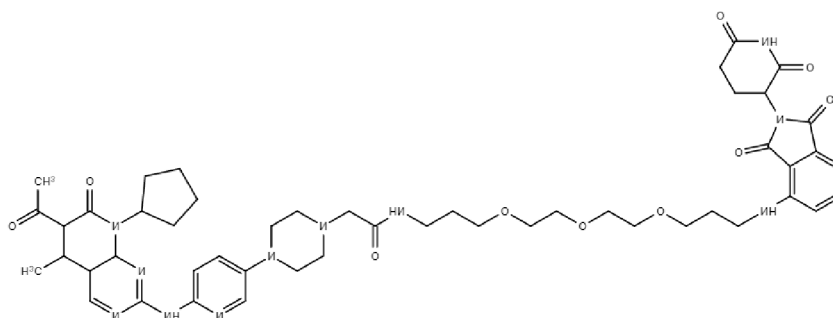
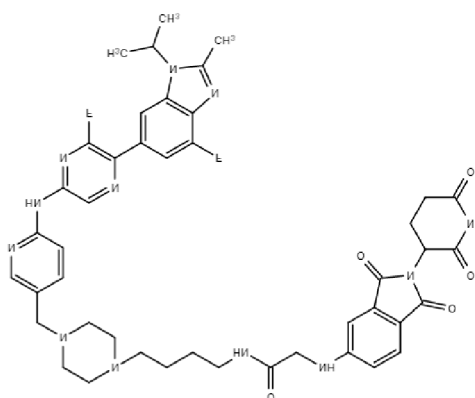
Ačkoliv nízkomolekulární selektivní inhibitory CDK4/6 vykazují vysokou účinnost, riziko vzniku získané rezistence vyvolává obavy ze snížení efektivity. Relativně novou strategií pro překonání některých omezení malých kompetitivních inhibitorů představují heterobifunkční molekuly PROTAC (proteolysis targeting chimera) zacílené na indukovanou proteolýzu (Konstantinidou *et al.*, 2019). Molekuly PROTAC obsahují ligand pro cílový protein CDK4 nebo CDK6 (obvykle kompetitivní inhibitor) a současně ligand pro E3 ligasu, které jsou vzájemně spojeny linkerem.

Narozdíl od běžných nízkomolekulárních inhibitorů, kde dochází pouze k reverzibilní inhibici, bifunkční molekuly PROTAC se jednak váží na cílový protein svou částí s inhibiční aktivitou, druhá část molekuly s ligandem se váže na E3 ligasu, čímž dojde k vytvoření ternárního komplexu kinasa:PROTAC:ligasa. Následuje ubikvitinace

a degradace cílového proteinu v proteazomu. Molekula PROTAC je následně uvolněna a celý proces se opakuje, funguje v podstatě jako katalyzátor. Pro vývoj PROTAC jsou nejvíce využívány ligandy E3 ligas von Hippel-Lindau (VHL), cereblona (CRBN) a MDM2 ve spojení s nízkomolekulárními selektivními inhibitory palbociclibem, ribociclibem a abemaciclibem (Ammazzalorso *et al.*, 2021). Struktura PROTAC zásadně ovlivňuje selektivitu, stabilitu a konformaci výsledného komplexu s CDK4 nebo CDK6. Zatímco použití ribociclibu se neprojevilo jako velmi efektivní, PROTAC molekuly obsahující palbociclib a abemaciclib vykazovaly specifickou CDK4/6 degradační aktivitu (Obr. 7). Doposud bylo vytvořeno množství chimérických molekul s pomalidomidem, ligandem pro CRBN, degradační účinnost však vykazovaly i molekuly nesoucí ligand pro VHL (Anderson *et al.*, 2020). Důležitou komponentou pro funkčnost molekuly je struktura linkeru. V několika studiích bylo paralelně zjištěno, že délka a rigidita linkeru má zásadní vliv na účinnost a vazebnou afinitu vytvořených molekul. Pro uchycení inhibitoru CDK4/6 je nejvhodnější variantou použití amidových, thiazolových či methylových skupin, které neovlivní aktivitu inhibitoru. Na druhé straně linkeru se nejvíce osvědčila aminoskupina jako kotvicí skupina pro ligand E3 ligasy, což dokazuje zásadní vliv flexibility v této části (Su *et al.*, 2019; Khan *et al.*, 2020).

U mnohých kombinací již byla potvrzena vysoká účinnost *in vitro* na nádorových liniích. Za zmínku stojí degradátor, jehož struktura je založena na palbociclibu a pomalidomidu propojenými linkerem obsahujícím thiazolový kruh (Obr. 7A). Molekula selektivně a účinně degraduje CDK4 a 6, což by mohlo být prospěšné také pro potlačení rezistence vzniklé v důsledku nadměrné exprese CDK6. Studie na nádorových liniích ukázaly, že látka degraduje CDK4 a 6 v linii triple-negativního karcinomu prsu MDA-MB-231 s účinností v jednotkách  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Zhao & Burgess, 2019). Další výzkumná skupina vytvořila sérii chimérických molekul palbociclibu s pomalidomidem, které se vzájemně lišily v délce flexibilního linkeru s atomy kyslíku (Obr. 7B). Molekuly s delším linkerem selektivně degradovaly CDK6 v buněčné linii karcinomu pankreatu MiaPaCa2 s degradační účinností  $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Rana *et al.*, 2019). Za zmínku také stojí série chimérických molekul palbociclibu, abemaciclibu, ribociclibu s pomalidomidem propojené alkylovým nebo PEG linkerem (Obr. 7C). Tyto konjugáty taktéž vykazovaly předpokládanou aktivitu k CDK4 a 6, ačkoliv molekuly obsahující abemaciclib vykazovaly nesespecifickou degradační aktivitu na CDK9 (Jiang *et al.*, 2019).



**A****B****C**

**Obrázek 7.** Konjugáty PROTAC vytvořené konjugací palbociclibu s pomalidomidem (7A, B) a abemaciclibu s pomalidomidem (7C).

## 2.4 Rezistence k CDK4/6 inhibitorům

Možnou komplikací léčby je nárůst rezistentních populací nádorových buněk, který byl pozorován ve vzorcích nádorové tkáně pacientů po dlouhodobé expozici inhibitorům CDK4/6. Tato rezistence může vzniknout celou řadou molekulárních mechanismů, podporujících přežití a proliferaci buněk. Na základě provedení genomických analýz vzorků progredující nádorové tkáně bylo možné identifikovat některé faktory odpovědné za vznik. U pacientek s ER<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> karcinomy prsu léčených kombinací hormonální terapie s inhibitory CDK4/6 byl detekován výrazný nárůst exprese CDK6 a cyklinu E1 často spojený s mutacemi v RB. Bylo zjištěno, že tato změna byla iniciována

prostřednictvím represe dráhy růstového faktoru TGF- $\beta$  v důsledku exprese specifické miRNA (Cornell *et al.*, 2019). Nárůst exprese cílového proteinu v buněčných populacích vedl ke snížení senzitivity k léčbě. Nadměrná exprese CDK4 naopak nebyla při vzniku rezistence pozorována. Jedním z možných vysvětlení může být rozdíl v citlivosti komplexů CDK6/cyklin D3 a CDK4/cyklin D1 k inhibitorům (Yang *et al.*, 2017). Navíc docházelo k utlumení exprese estrogenního a progesteronového receptoru, jejichž ztráta byla často detekována souběžně se zesílenou signalizací závislou na androgenním receptoru.

Zásadním a velmi účinným rezistenčním mechanismem buněk je *de novo* mutace genu pro RB nebo jeho úplná ztráta. Nejčastěji detekované mutace byly v exonech 8, 3, 19 a 22 po dlouhodobé léčbě palbociclibem. Dlouhodobá expozice ribociclibu vedla nejčastěji ke vzniku rezistenční mutace genu pro RB v exonu 19 (p.Met695fs\*26) (Condorelli *et al.*, 2018). Úplná ztráta RB jako primárního cíle kinas může být způsobena vlivem nadměrné exprese transkripčních faktorů E2F. Brzká adaptace na CDK4/6 inhibitory omezuje schopnost buněk vyvolat úplné a stabilní zablokování buněčného cyklu v G1. V souvislosti s transkripčními faktory E2F je také hladina exprese cyklinu E1 a E2, která přímo ovlivňuje citlivost buněk k CDK4/6 inhibitorům (Scaltriti *et al.*, 2011). V klinické praxi je navíc nadměrná exprese tohoto cyklinu spojována s horší prognózou napříč spektrem různých nádorových onemocnění.

Důležitým mechanismem získané rezistence je ztráta nádorových supresorů a zvýšená aktivace onkogenních drah. Velmi často dochází v rozvíjejícím se tumoru ke ztrátě nádorového supresoru PTEN (Adon *et al.*, 2021). Nepřítomnost PTEN vede k hyperaktivaci kinasy AKT, přímo odpovědné za stabilizaci komplexu CDK4/cyklin D a zvýšení aktivity CDK2. AKT fosforyluje Thr157 reziduum proteinu p27, což naruší jeho transport do jádra, kde se za běžných podmínek protein podílí na inhibici CDK2 (Costa *et al.*, 2020). Jeho zvýšená lokalizace v cytoplazmě tedy vede k hyperaktivaci CDK2, současně tvoří trikomplex s CDK4 a cyklinem D, který je odolný vůči CDK4 inhibitorům (kapitola 2.3.2.1). Zvýšená exprese PTEN naopak snižuje aktivitu AKTday a indukuje apoptózu nádorových buněk.

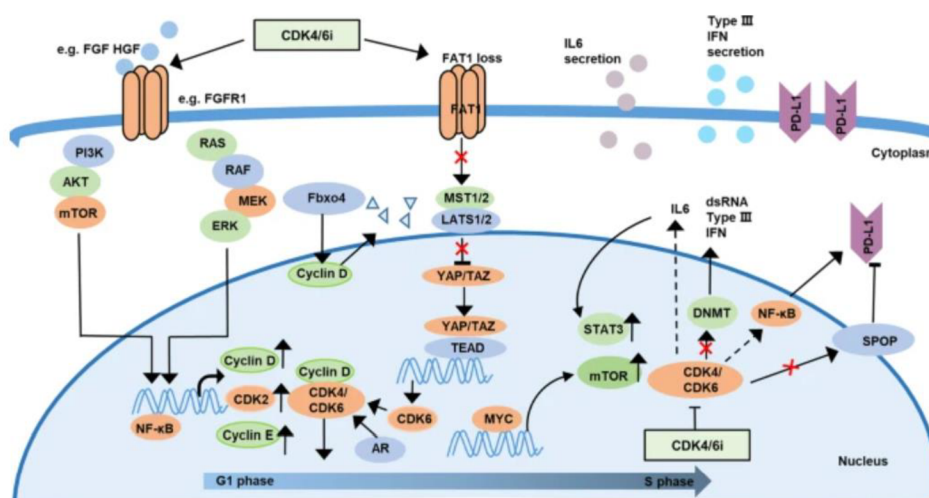
Řada studií ukázala, že rezistence může být způsobena mutací komponent signálních drah nesouvisejících s přímou regulací CDK4/RB (Obrien *et al.*, 2020). Příkladem je ztráta nádorového supresoru FAT1, vedoucí k inaktivaci dráhy Hippo (Obr. 8). Suprese Hippo ovlivňuje prostřednictvím faktorů YAP/TAZ expresi a lokalizaci CDK6 v jádře. Buněčné linie s potlačenou expresí FAT1 mají sníženou citlivost k inhibitorům CDK4

a vyžadují k zastavení proliferace výrazně vyšší koncentrace inhibitorů (Li *et al.*, 2018). Po dlouhodobé expozici ribociclibu byla u řady vzorků pozorována amplifikace FGFR1, která skrze aktivaci MAPK vede ke zvýšení exprese cyklinů typu D i E. Změny v mikroprostředí nádorů také často vedou ke zvýšené expresi Myc, řídící metabolismus glukosy a aminokyselin (Xu *et al.*, 2020). Zvýšená exprese vede k přeprogramování metabolismu a aktivaci mTOR.

Dosud byly diskutovány pouze případy vzniku *de novo* rezistence v důsledku dlouhodobé expozice inhibitorům. Celá řada nádorových linií však vykazuje tzv. přirozenou rezistenci, ačkoliv mají tyto linie přítomen funkční protein RB. Tato problematika byla studována na buněčných liniích triple negativního karcinomu prsu. U některých linií byla zjištěna například zvýšená lysozomální biogeneze vedoucí k sekvestraci CDK4/6, která pravděpodobně podporuje rezistenci (Fassl *et al.*, 2020).

### 2.4.1 Možné přístupy k omezení vzniku rezistence

Během mnohých preklinických i klinických studií bylo prokázáno, že velmi účinným nástrojem pro potlačení vzniku lékové rezistence je kombinování inhibice různých molekulárních drah, vykazující synergické účinky. Získaná rezistence po monoterapii CDK4/6 inhibitory je spojena se ztrátou závislosti cyklu na RB a aktivací dráhy PI3K/mTOR (Obrien *et al.*, 2020). Získanou rezistenci je možné potlačit podáním selektivního inhibitoru PI3K/mTOR. V dnešní době jsou již známé trojkombinační



**Obrázek 8.** Schéma mechanismů vzniku rezistence k CDK4/6 inhibitorům (Převzato z: Xu *et al.*, 2020).

terapie CDK4/6:ER:PI3K u ER<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> karcinomu prsu, schopné zabránit rozvoji rezistenčních mechanismů k endokrinní terapii i inhibitorům CDK4/6.

V liniích ER<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> karcinomu prsu také často dochází k deregulaci FGFR. Nádorové buňky podrobené dlouhodobé expozici CDK4/6 inhibitorům mají často receptor FGFR hyperaktivován, což může výrazně ovlivnit proliferaci a růst nádoru. V preklinických studiích jsou testovány trojkombinace látek inhibujících ER:CDK4/6:FGFR1 (Adon *et al.*, 2021). Dosavadní výsledky ukazují, že tato kombinace způsobila regresi nádoru a do budoucna s ní lze počítat jako se slibnou prevencí vzniku rezistence závislé na FGFR1.

Po dlouhodobé inhibici CDK4/6 může dojít ke kompenzaci nadměrnou expresí cyklinu D1 a tím k sekvestraci endogenních inhibitorů p21 a p27. Protein p21 fyziologicky inhibuje aktivitu CDK2 a v případě jeho inaktivace dochází k progresi cyklu řízené aktivitou komplexu CDK2/cyklin E. V případě vzniku rezistence způsobené aktivací c-MYC, vedoucí k hyperaktivaci komplexu CDK2/cyklin E, je možností léčby duální inhibice CDK2 a CDK4/6 (Adon *et al.*, 2021).

## 2.5 Nově syntetizované látky pro zpracování diplomové práce

Vývoji nových látek s inhibiční aktivitou vůči CDK se dlouhodobě věnují také na několika pracovištích Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci (např. Laboratoř růstových regulátorů, Katedra experimentální biologie, Katedra organické chemie). Mezi velmi aktivní a selektivní inhibitory CDK patří například 3,5,7-trisubstituované pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny vykazující účinnou inhibici CDK2, 7 a 9 (Jorda *et al.*, 2011; Jorda *et al.*, 2019) nebo imidazo[1,2-c]pyrimidinony, které jsou vysoce specifické k CDK2 (Jansa *et al.*, 2021). Publikované výsledky popisují nejen biochemickou účinnost a selektivitu vůči CDK a ostatním proteinkinám, ale také účinky látek na nádorových liniích.

V rámci aktuálně řešeného výzkumného projektu byla navržena a připravena série doposud nepopsaných heterocyklických derivátů, z nichž byly vybrány pro bližší charakterizaci účinku dvě kandidátní sloučeniny, MT-PPC14-4B a MT-PPC20-4B (Kryštof *et al.*, nepublikované výsledky). Obě látky vykazovaly specifickou inhibiční aktivitu na komplexu CDK4/cyklin D1, přičemž látka MT-PPC14-4B se jevila jako více selektivní (Tab. 4). Měření cytotoxicity na nádorových liniích ukázaly, že sloučeniny vykazují růstovou inhibiční aktivitu,

**Tabulka 4.** Cytotoxicita studovaných látek na buněčných liniích a inhibiční efekt na enzýmech.

Inhibitor	GI50 ( $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )			IC50 ( $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )	
	MV4-11	K562	MCF-7	CDK2/E	CDK4/D1
MT-PPC14-4B	4,31	17,05	18,74	4,58	0,082
MT-PPC20-4B	2,45	7,11	8,78	11,09	0,416
Palbociclib	1,14	2,28	3,2	9,11	0,014

zvláště citlivá vůči účinku obou látek byla linie MV4-11 odvozená od akutní myeloidní leukémie. Dle získaných výsledků na liniích vykazovala látka MT-PPC20-4B vyšší míru cytotoxicity ve srovnání s látkou MT-PPC14-4B (Tab. 4).

## 3 PRAKTICKÁ ČÁST

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Chemikálie

2-Merkaptoethanol 97% (Serva, Německo), 4',6-diamidin-2-fenylindol: DAPI (Thermo Fisher Scientific, USA), 7-hydroxy-3H-fenoxazin-3-on-10-oxid sodná sůl (Sigma-Aldrich, USA), akrylamid (VWR, USA), aprotinin (Sigma-Aldrich, USA), bovinní sérový albumin: BSA (VWR, USA), bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, Rakousko), Coomassie-brilliant blue (Sigma-Aldrich, USA), dekahydrát tetraboritanu sodného (Sigma-Aldrich, USA), dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema, ČR), dimethylsulfoxid: DMSO (PanReach AppliChem, Německo), dithiothreitol: DTT (Roche, Německo), dodecylsírán sodný: SDS (Lach-Ner, ČR), ECL substrát: peroxid vodíku a luminol (Thermo Fisher Scientific, USA), ethanol 96% (Lach-Ner, ČR), fenylmethylsulfonylfluorid: PMSF (Sigma-Aldrich, Čína), fetální bovinní sérum: FS (Biowest, Francie), fluorid sodný (Lach-Ner, ČR), formaldehyd (Penta, ČR), glutaraldehyd (Lach-Ner, ČR), glycerol (Lach-Ner, ČR), glycin (Sigma-Aldrich, USA), hexakynoželezitan draselný (Penta, ČR), hexakynoželezitan draselný (Penta, ČR), hydrogenfosforečnan sodný (Penta, ČR), hydroxid sodný (Penta, ČR), chlorid draselný (Lachema, ČR), chlorid hořečnatý (Lachema, ČR), chlorid sodný (Penta, ČR), kultivační médium RPMI 1640 (Biowest, Francie), kultivační médium DMEM (Sigma-Aldrich, USA), kyselina ethylendiamintetraoctová: EDTA (Sigma-Aldrich, Čína), kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová: EGTA (Sigma-Aldrich, USA), kyselina chlorovodíková 35% (Lach-Ner, ČR), kyselina trihydrogenfosforečná 85% (Penta, ČR), kyselina octová 99% (Lach-Ner, ČR), kyselina 2-hydroxypropan-1,2,3-trikarboxylová (Penta, ČR), L-glutamin (Sigma-Aldrich, USA), leupeptin (Sigma-Aldrich, USA), n-butanol (Lach-Ner, ČR), N',N',N',N'-tetramethylethylendiamin: TEMED (BioRad, USA), N',N'-metylenbisakrylamid (Sigma-Aldrich, Čína), nonidet: P 40 (Fluka, Švýcarsko), orthovanadičnan sodný (Sigma-Aldrich, USA), penicilin (Sigma-Aldrich, USA), peroxodisírán amonný (BioRad, USA), propidium jodid (Sigma-Aldrich, USA), proteinový detekční marker: Spectra Multicolor Broad PageRuler Prestained Protein Ladder 10-250 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA), Ponceau S (Serva, Německo), streptomycin (Sigma-Aldrich, USA), tris(hydroxymethyl)aminomethan: TRIS (Serva, Německo), triton-X-100 (Sigma-

Aldrich, USA), trypsin (Thermo Fisher Scientific, USA), tween-20: polyoxyethylensorbitanmonolaurát (Sigma–Aldrich, USA), X-gal (Thermo Fisher Scientific, USA).

### 3.1.2 Roztoky

- barvicí roztok pro  $\beta$ -gal esej:  $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  hexakvanoželeznatan draselný;  $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  hexakvanoželezitan draselný;  $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  chlorid hořečnatý;  $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  chlorid sodný;  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  X-gal v citrát-fosforečnanovém pufru (pH 6)
- blokovací pufr: 5% (w/v) BSA; 0,1% (v/v) Tween 20 v TBS
- blottovací pufr:  $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TRIS;  $192 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  glycin v  $\text{dH}_2\text{O}$
- Bradfordovo činidlo: 0,01% (w/v) Coomassie-Brilliant blue; 4,7% (v/v) ethanol; 8,5% (v/v) kyselina fosforečná v  $\text{dH}_2\text{O}$
- citrát-fosforečnanový pufr (40  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; pH 6):  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  kyselina 2-hydroxypropan-1,2,3-trikarboxylová;  $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  heptahydrát fosforečnanu sodného v  $\text{dH}_2\text{O}$
- DAPI barvicí roztok:  $0,1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  DAPI v PBS
- ECL roztok: 1:1 luminol a  $\text{H}_2\text{O}_2$
- elektroodový pufr:  $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TRIS;  $192 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  glycin; 0,1% (w/v) SDS v  $\text{dH}_2\text{O}$  (pH 8,3)
- fixační roztok: 0,2% (v/v) glutaraldehyd; 1,85% (v/v) formaldehyd v PBS
- kultivační médium DMEM s 10% FS: 10 g práškového média v 1 l sterilní  $\text{dH}_2\text{O}$ ; doplněno: 10% (v/v) FS; penicilin  $100 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; streptomycin  $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ;  $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  L-glutamin
- kultivační médium RPMI 1640 s 10% FS: 10 g práškového média v 1 l sterilní  $\text{dH}_2\text{O}$ ; doplněno: 10% (v/v) FS; penicilin  $100 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; streptomycin  $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ;  $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  L-glutamin
- lyzační pufr RIPA:  $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TRIS (pH 7,4);  $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl,  $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  EGTA;  $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  EDTA; 0,2% (v/v) nonidet P-40 (pH 7,4);  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  DTT;  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  PMSF;  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  vanadičnan sodný;  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaF;  $2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  leupeptin;  $0,5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  aprotinin v  $\text{dH}_2\text{O}$
- lyzační pufr W:  $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  HEPES;  $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  KCl;  $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ;  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  EDTA;  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  EGTA; 0,5% (v/v) nonidet P 40 (pH 7,4)  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  PMSF;  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  DTT;  $2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  leupeptin;  $0,5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  aprotinin;  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  vanadičnan sodný;  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaF v  $\text{dH}_2\text{O}$

- odbarvovací roztok: 0,1% (v/v) SDS v dH<sub>2</sub>O
- permeabilizační roztok: 0,2% (v/v) triton X-100 v PBS
- promývací fosfátový pufr PBS: 137 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl; 2,7 mmol·l<sup>-1</sup> KCl; 10 mmol·l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 mmol·l<sup>-1</sup> KHPO<sub>4</sub> (pH 7,4) v dH<sub>2</sub>O
- Ponceau S: 0,2% (w/v) Ponceau S; 1% (v/v) kyselina octová v dH<sub>2</sub>O
- resazurin: 0,0625 mg·ml<sup>-1</sup> sodné soli 7-hydroxy-3H-fenoxazin-3-on-10-oxidu v PBS
- SDS vzorkovací pufr: 0,3 mol·l<sup>-1</sup> TRIS (pH 6,8); 50% (v/v) glycerol; 10% (w/v) SDS; 5% (v/v) 2-merkptoethanol; 0,05% (w/v) bromfenolová modř v dH<sub>2</sub>O
- TBS: 137 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl; 20 mmol·l<sup>-1</sup> TRIS (pH 6,8) v dH<sub>2</sub>O; pH upraveno koncentrovanou HCl na hodnotu 7,6
- TBS-T 20: 137 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl; 20 mmol·l<sup>-1</sup> TRIS; 0,05% (v/v) Tween 20 v dH<sub>2</sub>O

### 3.1.3 Seznam použitých protilátek

Imunodetekce proteinů byla provedena s použitím primárních protilátek (Tab. 5) a sekundárních protilátek, konjugovaných s křenovou peroxidasou (Tab. 6). Ředící poměr byl u primárních protilátek 1:500, u sekundárních protilátek je tento poměr uveden v tabulce 5. Protilátky byly ředěny v blokovacím pufru.

**Tabulka 5.** Přehled použitých primárních protilátek (původ: R = králík, M = myš).

Protein	M <sub>r</sub> antigenu (kDa)	Protilátka	Typ (klon; zdroj)	Výrobce
Bcl-2	26	Anti-Bcl-2	M; mAb	Sigma-Aldrich
CDK2	34	Anti-CDK2	78B2; R; mAb	Cell signaling
CDK4	34	Anti-CDK4	DCS156; mAb	Cell signaling
CDK6	36	Anti-CDK6	D4S8S; R; mAb	Cell signaling
Cyklin A2	49	Anti-cyklin A2	BF683; M; mAb	Cell signaling
Erα	68	Anti-ERα	F10; M; mAb	Santa Cruz
HER2	185	Anti-HER2	D8F12; R	Cell signaling
HER3	185	Anti-HER3	D22C5; R	Cell signaling
Mcl-1	42-43	Anti-Mcl-1	D35A5; R; mAb	Cell signaling
PCNA	30	Anti-PCNA10	mAb; IgG2	Cell signaling
RB	110	Anti-total RB	4H1; M	Cell signaling
pRB Ser780	110	Anti-pRB S780	D59B7; R; IgG	Cell signaling
pRB Ser807/811	110	Anti-pRB S807/811	D20B12; R; IgG	Cell signaling
RNA polymerasa II	516	Anti-RNA pol.II	3E8; krysa	Millipore
fosfoRNA pol.II Ser5	516	Anti-pRNA pol.II S5	M	Millipore
p16	16	Anti-p16	D7C1M; R	Cell signaling
α-tubulin	55	Anti- α-tubulin	DM1A; IgG1	Sigma-Aldrich
β-aktin	56	Anti- β-aktin	C4; M; mAb	Santa Cruz



**Tabulka 6.** Přehled použitých sekundárních protilátek (Px = polyklonální).

Protilátka	Typ	Výrobce a původ	Ředící poměr
Swine anti-rabbit	swine anti-rabbit Ig; Px	Cell signaling	1:1000
Rat anti-mouse	rabbit anti-mouse Ig; Px	Cell signaling	1:1500
Goat anti-rat	Goat anti-rat Ig; Px	Merck	1:2000

### 3.1.4 Testované inhibitory

V diplomové práci byl zkoumán buněčný účinek a selektivita látek MT-PPC14-4B a MT-PPC20-4B (hodnoty inhibiční aktivity Tab. 4). Látky byly syntetizovány v roce 2019 doc. RNDr. Petrem Cankařem Ph.D. (Katedra organické chemie Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci). Zásobní roztoky látek byly uchovávány při 4 °C.

Pro srovnání účinku látek byl použit CDK4 inhibitor palbociclib (CAS 571190-30-2), jehož zásobní roztok byl uchován při -20 °C. Pro ověření kombinačního účinku testovaných látek na ER<sup>+</sup> karcinomu prsu byly použity fulvestrant (CAS 129453-61-8) a tamoxifen (CAS 10540-29-1). Kombinační účinek testovaných látek s anti-HER2 terapií byl stanovován za použití RTK inhibitoru lapatinibu (CAS 388082-78-8). Zásobní roztoky látek byly ředěny v DMSO před uskutečněním experimentu tak, aby výsledná koncentrace DMSO v médiu s živými buňkami nepřesáhla 0,1 % (v/v).

### 3.1.5 Buněčné kultury

Pro vypracování experimentální části byly použity modelové nádorové linie nesoucí odlišné genové mutace a fyziopatologické charakteristiky (Tab. 7).

**Tabulka 7.** Přehled použitých nádorových buněčných linií.

Název	Tkáňový původ	Charakteristika
AU565	Adenokarcinomu prsu SKBR3	HER2 <sup>+</sup> /ER <sup>-</sup> /AR <sup>-</sup>
BT474	Invazivní karcinomu prsu	HER2 <sup>+</sup> /AR <sup>+</sup> /ER <sup>-</sup>
BT549	Invazivní karcinomu prsu	Mutace PTEN/RB/p53
DU145	Metastazující karcinomu prostaty	Mutace RB/p53/STK1
MDA-MB-468	Adenokarcinomu prsu	HER2 <sup>-</sup> /AR <sup>-</sup> /ER <sup>-</sup> /RB <sup>-</sup>
MCF-7	Invazivní karcinomu prsu	ER <sup>+</sup> /HER2 <sup>-</sup> /p53 <sup>-</sup> /p16 <sup>-</sup>
MV4-11	Akutní myeloidní leukémie	Mutace FLT3-ITD/PIK3CA/p53
SKBR3	Adenokarcinomu prsu	ER <sup>-</sup> /HER2 <sup>+</sup> /AR <sup>+</sup>
T47D	Duktální karcinomu prsu	AR <sup>+</sup> /ER <sup>+</sup> /PR <sup>+</sup>

### 3.1.6 Přístrojové vybavení

- CCD chemiluminiscenční kamera LAS-4000 (FujiFilm, Japonsko)
- centrifuga BR4i (Jouan, USA)
- centrifuga 5702 (Eppendorf, Německo)
- CO<sub>2</sub> inkubátor (Sanyo, Japonsko)
- fluorescenční mikroskop IX 51 (Olympus, Japonsko)
- laminární box s vertikálním prouděním vzduchu (Alpina, Polsko)
- magnetická míchačka s ohřevem Arex 6 (Velp Scientifics, Itálie)
- mikrodestičkový fluorimetr Fluoroskan Ascent (Thermo Labsystem, USA)
- mikrodestičkový fluorimetr Tecan infinite 200 pro (Life Sciences, Rakousko)
- minicentrifuga 5702R (Eppendorf, Německo)
- odsávací pumpa FTA2i (Biosan, Lotyšsko)
- optický mikroskop TMS (Nikon, Japonsko)
- pipetor (BrandTech Scientific, USA)
- pH metr se skleněnou elektrodou (XS instruments, Itálie)
- průtokový cytometr BD FACS VERSE<sup>TM</sup> (Becton-Dickinson Company, USA)
- předvážky laboratorní (Kern, Německo)
- souprava pro vertikální elektroforézu: Mini Protean Tetra Cell (BioRad, USA)
- souprava pro western blotting: Mini Trans-Blot Module (BioRad, USA)
- spektrofotometr UV-1800 (Shimadzu, Japonsko)
- termocyklér MJ Mini (BioRad, USA)
- termostat blokový (Kleinfeld labortechnik, Německo)
- třepačka vířivá Vortex mixer (Velp Scientifics, Itálie)
- třepačka s kývavým pohybem MiniRocker MR-1 (Biosan, Lotyšsko)
- ultrazvuková vana (VWR, USA)
- vodní lázeň (GFL, Německo)
- zdroj pro elektroforézu a western blotting (E-C Apparatus Corporation, USA)

### 3.1.7 Programy

BD FACSuite<sup>TM</sup> Software (Becton-Dickinson Company, USA), Combenefit 2.02 (Slashdot Media, USA), DP Controller, ImageJ, ModFit LT 5.0 (Verity Software House, USA), Multi2.2 (Image reader Las-4000) (FujiFilm, Japonsko), Origin.

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Práce s buněčnými kulturami

Buněčné linie byly kultivovány v inkubátoru za stabilních podmínek 5% CO<sub>2</sub>, teploty 37 °C. Linie byly podle specifických požadavků na kultivační podmínky udržovány ve sterilním RPMI nebo DMEM médiu s 10% FS. Dle rychlosti růstu jednotlivých linií byly kultury pasážovány 2-3x týdně. U adherentních linií bylo provedeno před pasážováním uvolnění trypsinem s EDTA a následné rozsuspendování v čistém médiu. Pasážování a ovlivňování buněk bylo prováděno za sterilních podmínek v laminárním boxu.

Počet buněk použitých v experimentu byl vždy přizpůsoben typu experimentu, velikosti kultivační nádoby, typu buněk a jejich velikosti. U suspenzní linie MV4-11 byl počet buněk přepočítán na objem kultivačního média, buňky adherentních linií byly ředěny s ohledem k povrchu kultivační nádoby. Ovlivnění suspenzních buněk bylo provedeno přidáním připraveného roztoku látky přímo k buňkám. Adherentní linie byly ovlivněny následující den (po přisednutí na dno kultivační nádoby) tak, že bylo vyměněno kultivační médium za médium s předem naředěnou látkou. Po ovlivnění byly buňky dále inkubovány s látkou po dobu závislou na konkrétním experimentu.

### 3.2.2 SDS-PAGE a western blotting s imunodetekcí

Pro analýzu proteinů (western blot) byly buňky kultivovány na Petriho miskách (Ø 9,6 cm, kultivační povrch 60 cm<sup>2</sup>). Připravený roztok látky v DMSO byl naředěn do 10 ml kultivačního média. Po uplynutí inkubační doby byly buňky sklizeny do předem vychlazených zkumavek na ledu a centrifugovány 8 min, 1000 g, při 4 °C. Bylo provedeno 2x promytí v PBS a následně byly buňky uloženy do hluboko mrazícího boxu (-80 °C).

Zamražené pelety buněk byly vytaženy na led a ponechány volně rozmraznout. Následně byl k peletu přidán čerstvě připravený lyzační pufr s inhibitory proteas a fosfatas. Pelet byl inkubován na ledu s lyzačním pufrem po dobu 30 minut, během nichž byl 3x rozsuspendován. Po uplynutí stanovené doby byly buněčné lyzáty sonikovány v ultrazvukovým homogenizátorem (30 s, 3 cykly, 40% intenzita) a centrifugovány 30 min, 14 000 g, při 4 °C.

Po centrifugaci byl supernatant přenesen do nové mikrozkušavky za současného změření objemu. Následně byla stanovena celková koncentrace proteinů metodou dle Bradforda (Bradford, 1976) a srovnána koncentrace proteinů ve všech vzorcích, podle nejnižší naměřené hodnoty přidáním lyzačního pufru. K lyzátům byl napipetován vzorkovací pufr SDS (5x) a po promíchání byly vzorky zahřívány 5 minut při 95 °C, centrifugovány v minicentrifuze a uchovány při teplotě -20 °C.

Separace proteinů byla provedena diskontinuální SDS-PAGE. Elektroforéza probíhala za denaturujících podmínek v polyakrylamidovém gelu o tloušťce 1 mm, složeného z 5% zaostřovací části v kombinaci s 10%, 12,5% nebo 15% dělicí částí. Zpočátku probíhala separace proteinů při napětí 80 V a po vstupu vzorků do dělicího gelu bylo zvýšeno napětí na hodnotu 120 V. Separované proteiny byly po ukončení elektroforézy přeneseny z gelu na nitrocelulózovou membránu (velikost pórů 0,45 μm) metodou western blottingu. Přenos probíhal po dobu 3 hodin za stálého chlazení a konstantního proudu 270 mA. Přenesené proteiny byly obarveny v roztoku Ponceau S, následně byla membrána promyta v destilované vodě a vysušena.

Proteiny byly vyřezány z membrány podle markeru molekulových hmotností a nařezané proužky membrán byly odbarveny v TBS. Po odbarvení byly membrány hodinu blokovány v roztoku 5% BSA v TBS-T na třepačce. Zablokované membrány byly vysušeny na filtračním papíře a přeneseny do vlhké komůrky, převrstveny primární protilátkou. Inkubace s primární protilátkou probíhala přes noc v lednici při 4 °C. Následující den byly membrány promyty v TBS a TBS-T a inkubovány hodinu se sekundární protilátkou. Po ukončení inkubace byly membrány znovu promyty v TBS a TBS-T. Promyté membrány byly vysušeny na filtračním papíře a položeny na destičku, kde byly převrstveny chemiluminiscenčním substrátem ECL pro detekci proteinů. Membrány byly inkubovány s ECL roztokem po dobu 5 min a následně probíhala detekce chemiluminiscenčního signálu pomocí CCD kamery LAS4000.

### **3.2.3 Termodenaturace proteinů**

Metoda termodenaturace (CETSA) byla v průběhu zpracování diplomové práce optimalizována pro použití na adherentních liniích. Postup byl prováděn nejprve dle originálních protokolů, kdy byly buňky před sklizením a lyzací inkubovány po dobu 1 hodiny s vysokou koncentrací látky tak, aby se docílilo saturace cílových proteinů v buňce (Molina *et al.*, 2013; Jafari *et al.*, 2014; Huber *et al.*, 2015). Na základě

nepublikovaných výsledků bylo zjištěno, že inkubační doba je pro použité adherentní linie nedostatečná a musely být provedeny optimalizační změny. Aby se však předešlo aktivaci proteazomu, která následně může ovlivnit hladinu detekovaného proteinu v buňce, nebylo možné použít delší inkubační časy. Aktivace proteazomu s následnou degradací peptidových substrátů byla již dříve popsána v buněčných liniích karcinomu prsu MCF-7 a T47D po ovlivnění CDK4/6 inhibitory palbociclibem a ribociclibem, proto bylo cílem se jí touto změnou v postupu vyvarovat (Miettinen *et al.*, 2018). Teplotní denaturace byla tedy provedena v buněčném lyzátu za přítomnosti inhibitorů proteas a fosfatas ve stabilizujících podmínkách lyzačního pufru.

Pro analýzu termostability proteinů byly buňky kultivovány na Petriho miskách (Ø 9,6 cm, kultivační povrch 60 cm<sup>2</sup>). Z důvodu následné alikvotace buněčného lyzátu a náročnosti na množství, bylo vždy použito množství buněk alespoň ze 4 misek. Neovlivněné buňky byly sklizeny obdobně jako pro analýzu metodou western blotting popsanou v kapitole 3.2.2.

Následně byly buňky rozmarazeny na ledové tříšti. S ohledem na množství peletu bylo přidáno adekvátní množství lyzačního pufru obsahující inhibitory proteas a fosfatas, po provedení sonikace a centrifugace (30 min, 14 000g, při 4 °C) byl převeden supernatant do čisté mikrozkušavky. Po změření objemu byl rozdělen do několika mikrozkušavek, do kontroly bylo přidáno DMSO. K další části lyzátu byly přidány testované látky v takové koncentraci, aby došlo k navázání látky na všechny cílové proteiny nacházející se ve vzorku a současně nepřesáhla koncentrace DMSO ve vzorku 1%, z tohoto důvodu byly látky naředěny v lyzačním pufru. Po přidání látek byly lyzáty inkubovány 30 minut na ledu, během nichž byly několikrát rozsuspendovány.

Ještě před ukončením inkubace byly lyzáty znovu rozsuspendovány a rozděleny v jednotném objemu do PCR mikrozkušavek, čímž bylo docíleno shodné koncentrace proteinů ve všech vzorcích. PCR stripky byly vloženy do termocykléru, v němž byl předem nastaven požadovaný teplotní gradient (ten se pro různé proteiny lišil). Protokol termodenaturace proteinů sestával ze tří fází: předehřátí po dobu 1 min na teplotu 25 °C, následné denaturace v nastaveném teplotním gradientu po dobu 3 min a závěrečné chlazení po dobu 1 min na teplotu 20 °C. Během zahřívání došlo k denaturaci proteinů v závislosti na použité teplotě a současně přítomnosti látky, u níž byl předpoklad, že po vazbě do aktivního místa proteinu bude stabilizovat nativní konformaci. Po vychladnutí byly PCR vzorky centrifugovány 30 minut při 14 000g a 4 °C. Během centrifugace došlo k peletaci denaturovaných proteinů ze vzorků. Po stočení byl

supernatant s vysokou opatrností přenesen do nových mikrozkušavek. Po tomto kroku byl ke vzorkům přidán vzorkovací pufr SDS (5x) a následovalo zahřátí na termobloku při 95 °C po dobu 5 minut.

Obdobně jako u metody western blotting v kapitole 3.2.2 byly následně proteiny separovány SDS-PAGE, metodou western blot přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Teplotní stabilizace proteinů vlivem specifické vazby látky byla stanovena imunodetekcí s následnou kvantifikací intenzity imunofluorescence jednotlivých vzorků.

### **3.2.4 Analýza buněčného cyklu průtokovou cytometrií**

Pro analýzu buněčného cyklu byly buňky kultivovány na Petriho miskách (Ø 6 cm s kultivačním povrchem 22,1 cm<sup>2</sup>). Připravený roztok látky v DMSO byl naředěn do 5 ml kultivačního média. Po skončení inkubační doby byly buňky sklizeny (trypsinizace, centrifugace 8 min, 1000 g, 4 °C) do vychlazených zkumavek a jednou promyty v PBS. Po druhé centrifugaci byl odstraněn promývací pufr a buněčný pelet byl rozsuspendován ve 100 µl PBS. Buňky byly následně zafixovány v 1 ml vychlazeného 70% ethanolu, který byl za stálého promíchávání přidáván po kapkách. Vzorky byly před samotnou analýzou uskladněny při -20 °C.

Zafixované buňky byly promíchány na vortexu a po stočení (8 minut při 1000 g a 4 °C) byly převedeny do PBS. Po druhém stočení byly pelety rozsuspendovány v 50 µl 1% BSA v PBS s 0,1% Tweenem. Za stálého promíchávání byla po kapkách přidána 2 mol·l<sup>-1</sup> HCl s 0,5% Triton X. Buňky byly v roztoku inkubovány 30 minut za laboratorní teploty a následně centrifugovány a neutralizovány v roztoku Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O (pH 8,5). Vzorky byly znovu zcentrifugovány a pelety rozsuspendovány v PBS. Následovalo poslední stočení, po němž byl k buňkám přidán roztok filtrovaného PBS s propidium jodidem o koncentraci 0,1 µg·ml<sup>-1</sup>.

Takto připravené vzorky byly ponechány inkubovat 30 minut ve tmě za laboratorní teploty. Po uplynutí inkubační doby byla provedena analýza buněčného cyklu na průtokovém cytometru. Pro kvantifikaci zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu bylo v každém vzorku analyzováno minimálně 10 000 buněk. Po excitaci při  $\lambda = 535$  nm byla měřena emise fluorescence PI při  $\lambda = 617$  nm. Měřením bočního rozptylu bylo možné kvantifikovat případné populace apoptických buněk. Celková kvantifikace dat byla provedena v ModFit LT 5.0.

### 3.2.5 Stanovení cytotoxicity resazurinem

Buňky byly pro účely měření cytotoxicity kultivovány v 96-jamkových panelech. Množství buněk bylo opět přizpůsobeno kultivačnímu povrchu jamek, velikosti a typu buněk. K buňkám (80  $\mu$ l suspenze buněk na jamku) byly po 24 hodinách přidány adekvátně zředěné testované látky (20  $\mu$ l na jamku). První sloupec čistého média bez buněk sloužil jako blank, do druhého sloupce bylo k buňkám přidáno médium s DMSO (neovlivněná kontrola). Následně byly buňky ovlivňovány v sestupných koncentračních řadách látek, vždy v triplicátech. Po 72 hodinách bylo přidáno 20  $\mu$ l roztoku resazurinu v PBS. Po dalších 4 hodinách inkubace při 37 °C ve tmě byla měřena fluorescence na (excitace  $\lambda = 544$  nm/ emise  $\lambda = 590$  nm).

Pro posouzení kombinačního efektu dvou látek (**a**,**b**) byly buněčné linie kultivovány v 96-jamkových panelech (60  $\mu$ l na jamku). Po 24 hodinách byly přidány naředěné koncentrační řady látky **a** ve vertikálním směru a látky **b** v horizontálním směru tak, že koncentrace látky **a** rostla ve vertikálním směru a v prvním řádku byla koncentrace látky **a** rovna 0. Koncentrace látky **b** rostla v horizontálním směru a v prvním sloupci byla rovna 0. Diagonálně tedy v horním levém rohu se nacházela kontrola a v pravém dolním rohu mikrotitrační desky byla nejvyšší koncentrace obou látek **a** i **b**. Stanovení kombinačního efektu bylo provedeno obdobně jako u měření cytotoxicity, tedy vždy v triplicátech po inkubaci s resazurinem po 72 hodinách.

### 3.2.6 Kvantifikace indukované senescence

Uznávaným markerem buněčné senescence je zvýšená aktivita  $\beta$ -galaktosidasy. Detekce její buněčné aktivity byla provedena na základě modifikace originálního protokolu (Dimri, 1995). Buňky adherentní linie byly kultivovány v 6-jamkových panelech v množství 80-100 000 buněk na jamku tak, aby během 7denní inkubace nebylo dosaženo plné konfluency. Buňky byly před ovlivněním ponechány 24 hodin v inkubátoru. Následující den bylo buňkám čisté médium vyměněno za médium s naředěnou látkou či DMSO (kontrola). Ovlivněné buňky byly kultivovány po dobu 7 dní, během této doby jim bylo každý třetí den vyměněno médium za čerstvé (s látkou v případě ovlivněných, s DMSO v případě kontroly).

Po ukončení inkubace bylo médium odsáto a jamky byly promyty sterilním PBS s nízkou koncentrací hořčičných iontů. Následně bylo PBS odsáto a buňky byly inkubovány po dobu 5 minut při laboratorní teplotě s fixačním roztokem formaldehydu

a glutaraldehydu v PBS. Fixační roztok byl odebrán a buňky byly 2x promyty s PBS. Následně bylo PBS odsáto a k buňkám byl přidán čerstvě připravený barvicí roztok obsahující X-gal (pH 6). Poslední krok byl proveden za snížené intenzity osvětlení v laminárním boxu. Po přidání roztoku byly panely utěsněny parafilmem, aby nedošlo k expozici preparátu CO<sub>2</sub>, byly obaleny do hliníkové fólie a ponechány takto ve tmě po dobu 16 hodin v inkubátoru při 37 °C.

Po ukončení inkubace byl odsát z jamek barvicí roztok a po promytí s PBS byly buňky permeabilizovány v roztoku 0,2% triton-X 100 v PBS na kývačce po dobu 2 minut. Následně byl roztok odsát a jamky byly promyty 3x s PBS. K buňkám bylo přidáno 500 µl roztoku DAPI a byla provedena inkubace po dobu 20 minut na kývačce ve tmě. Po ukončení inkubace byly jamky promyty s PBS a preparát byl hodnocen kvalitativně pod světelným mikroskopem. Pro zjištění podílu senescentních buněk ve vzorcích byl v programu ImageJ kvantifikován počet buněk pozitivních na enzym β-galaktosidasu proti celkovému počtu buněčných jader buněk v zorném poli.



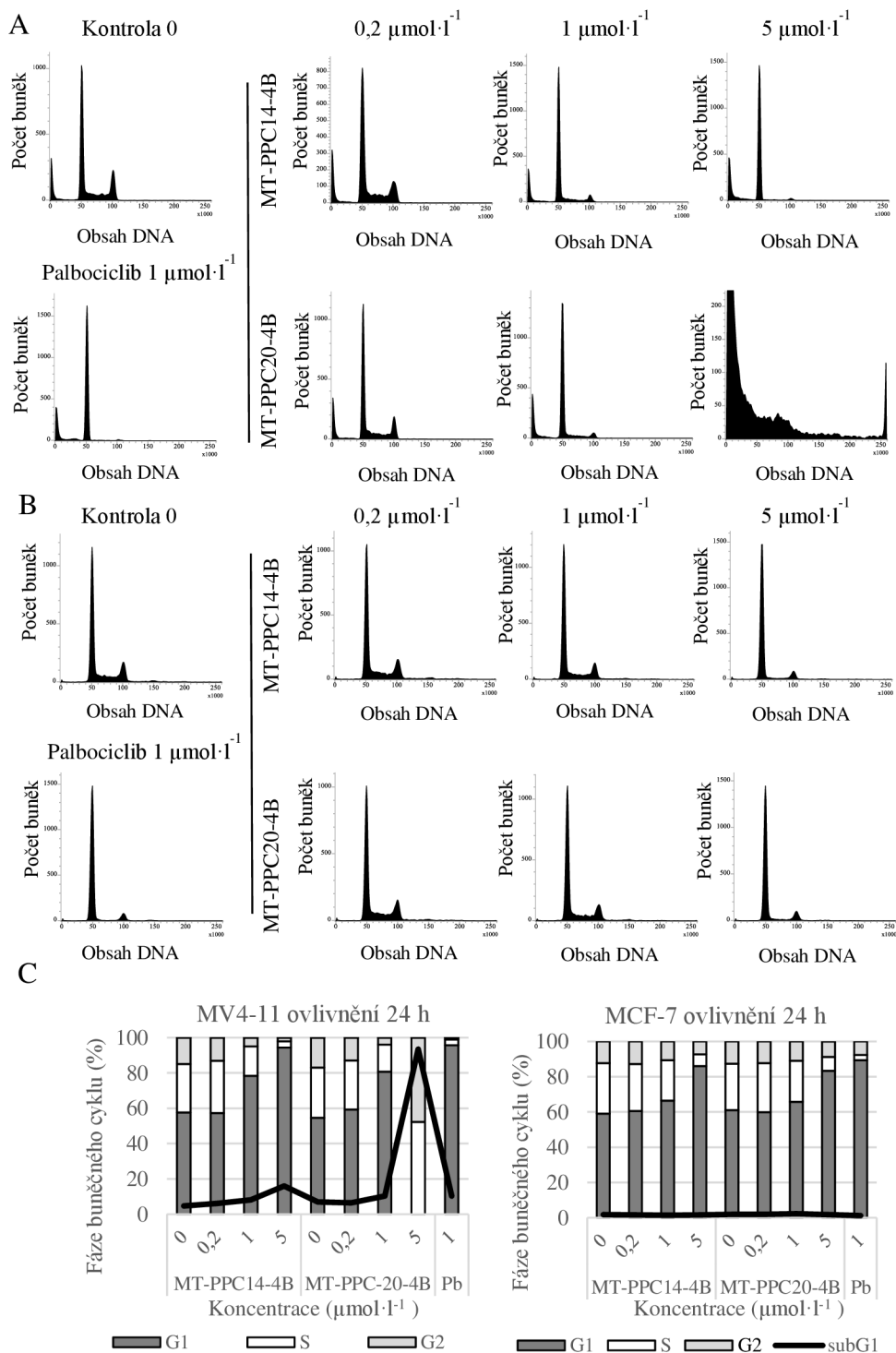
## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Analýza buněčného cyklu

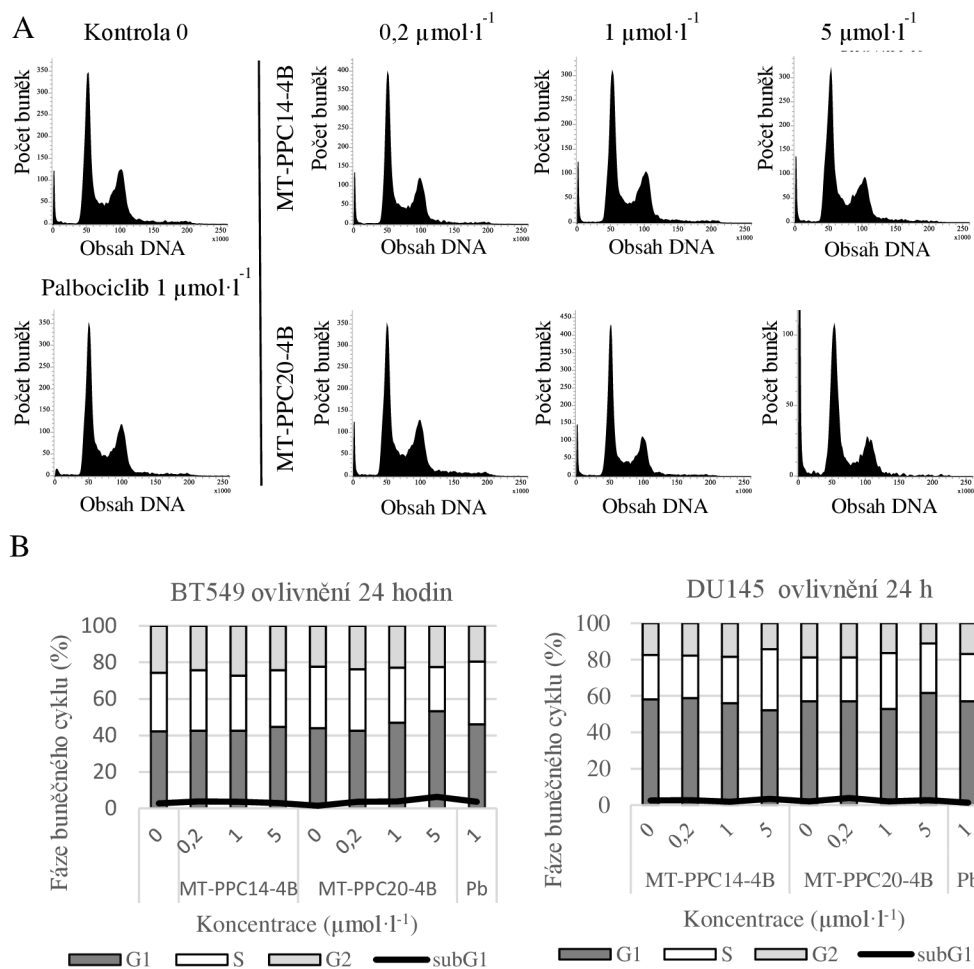
V rámci experimentální části diplomové práce bylo cílem charakterizovat účinky dvou nově syntetizovaných látek, které se po provedení kinasových testů jeví jako potencionálně selektivní inhibitory CDK4/6 (Tab. 4). Na základě znalostí o mechanismu působení CDK4/6 inhibitorů byly navrženy experimenty tak, aby bylo možné srovnat účinky testovaných látek s komerčně dostupným CDK4/6 selektivním inhibitorem palbociclibem a současně bylo možné potvrdit selektivitu inhibičního účinku obou testovaných látek MT-PPC14-4B a MT-PPC20-4B.

CDK4/6 inhibitory jsou charakteristické zastavením buněčného cyklu v G1 fázi, způsobeným zablokováním signalizační kaskády a fosforylace proteinu RB, přičemž takto reagují pouze buňky s funkčním RB (Elmi *et al.*, 2019). Pro tyto účely byla provedena analýza buněčného cyklu na liniích s funkčním RB. Jelikož jsou CDK4/6 inhibitory účinné v širokém spektru nádorových linií, pro demonstraci účinku byly vybrány právě dvě nádorové linie zcela odlišného charakteru. Analýza buněčného cyklu byla provedena na nádorové linii odvozené od AML MV4-11 a linii karcinomu prsu MCF-7. Buňky byly na dobu 24 hodin ovlivněny látkami MT-PPC14-4B a MT-PPC20-4B v koncentrační řadě 0,2, 1 a 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Účinek látek byl srovnáván s palbociclibem, který byl použit v koncentraci 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Látky při koncentraci 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  dosahovaly podobného účinku jak na linii AML (Obr. 9A), tak u linie MCF-7 (Obr. 9B). Látka MT-PPC20-4B byla na linii MV4-11 mnohem více cytotoxická než látka MT-PPC14-4B (Obr. 9A), což koresponduje s výsledky GI50 na buněčných liniích (Tab. 4). Současně lze na základě těchto výsledků potvrdit údaj IC50 na enzymovém komplexu CDK4/cyklin D. Látka MT-PPC14-4B vykazovala spíše cytostatický účinek, obdobně jako palbociclib.

Z výsledků na RB pozitivních liniích bylo patrné, že obě látky indukují silný G1 blok, pro potvrzení selektivity látek na CDK4/6 byla třeba provést analýzu cyklu RB negativních linií, které proliferují nezávisle na aktivaci komplexu CDK4/cyklin D1 a nebyl u nich tedy předpokládán žádný inhibiční efekt (Lukas *et al.*, 1995 a). Látky byly pro tyto účely testovány na liniích karcinomu prsu BT549 a metastatického karcinomu prostaty DU145. Ze získaných histogramů linie BT549 i kvantifikaci rozložení jednotlivých fází buněčného cyklu u obou linií bylo zřejmé, že látky nevykazují žádný účinek až do koncentrace 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Obr. 10).



**Obrazek 9.** Výsledky analýzy buněčného cyklu RB pozitivních nádorových linií. A: Histogramy analýzy cyklu linie MV4-11 po ovlivnění 24 hodin. B: Histogramy analýzy cyklu linie MCF-7 po 24 hodinách, testované látky MT-PPC14-4B a MT-PPC20-4B byly použity v koncentracích 0,2; 1 a 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Palbociclib (Pb) byl použit v koncentraci 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . C: Procentuální zastoupení buněk MV4-11 a MCF-7 ve fázích buněčného cyklu po 24 hodinách ovlivnění uvedenou koncentrační řadou látek.



**Obrázek 10.** Výsledky analýzy buněčného cyklu na RB negativních nádorových liniích karcinomu prsu BT549 a prostaty DU145. A: Histogramy analýzy cyklu linie BT549 po ovlivnění 24 hodin, testované látky MT-PPC14-4B a MT-PPC20-4B byly použity v koncentrační řadě 0,2; 1 a 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , palbociclib (Pb) byl použit v koncentraci  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . B: Procentuální zastoupení buněk BT549 a DU145 ve fázích buněčného cyklu po 24 hodinách ovlivnění uvedenou koncentrační řadou látek.

## 4.2 Testované látky indukují v liniích karcinomu prsu senescenci

Již dříve byl prokázán vliv CDK4/6 inhibitorů na navození senescentního stavu buněk karcinomu prsu a aktivaci dráhy p16/pRB. V důsledku zvýšené exprese CDK inhibičních proteinů má v tomto směru navození senescence negativní vliv na proliferaci nádorových buněk, které podléhají autofágii (Capparelli *et al.*, 2012; Valenzuela *et al.*, 2017).

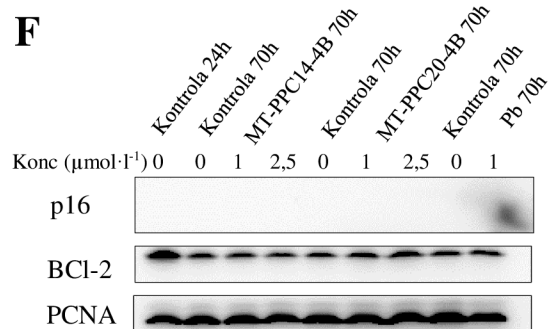
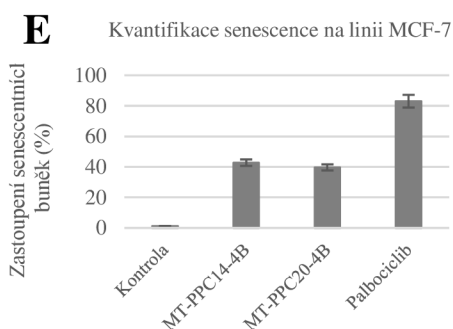
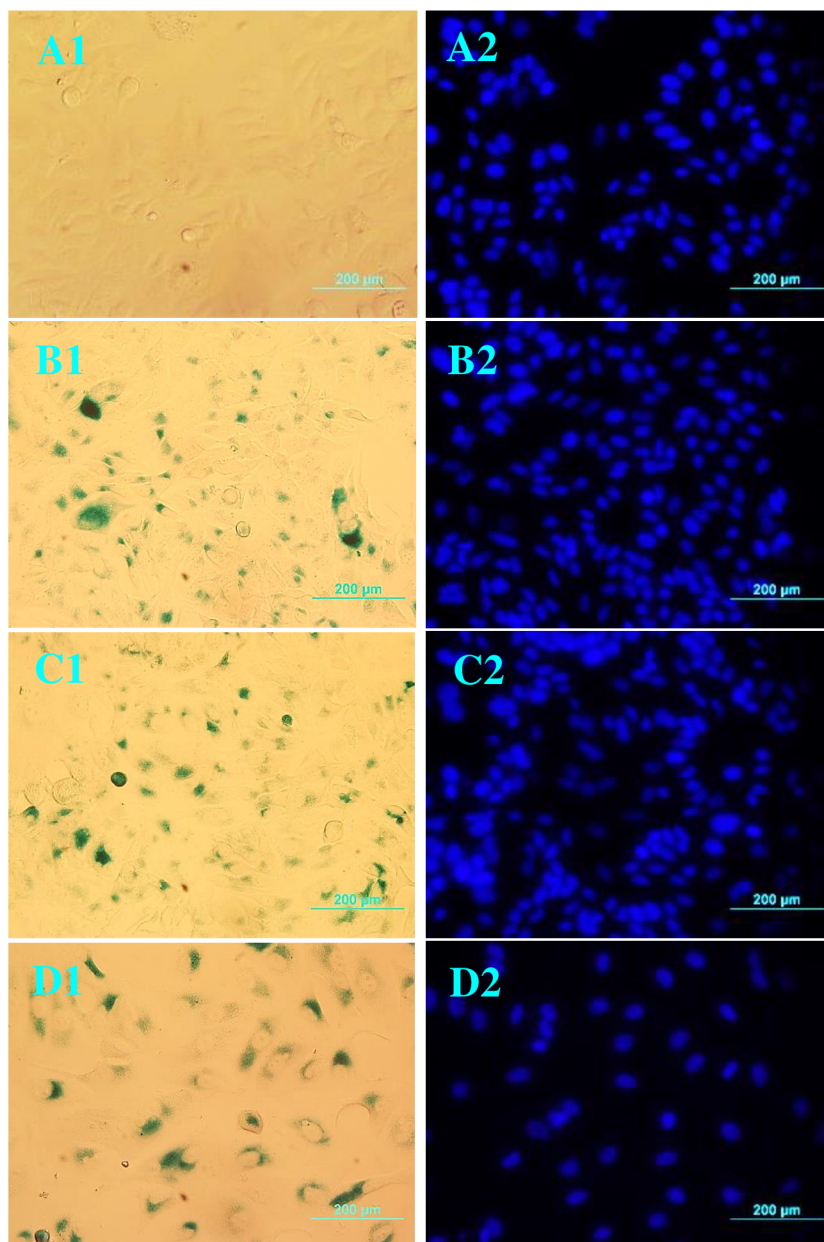
Mimo zvýšenou hladinu exprese p16 lze senescenci detekovat prostřednictvím dalších markerů. V experimentální části diplomové práce byly sledovány tři senescenční markery, a to změna morfologie ovlivněných buněk a jejich schopnost proliferovat, aktivita  $\beta$ -galaktosidasy, která je exprimována v senescentních buňkách, a výše zmíněná hladina exprese inhibičního proteinu p16. Z důvodu prováděné fixace byl výběr

nádorových linií omezen na adherentní. Pro experimenty byla tedy vybrána buněčná linie karcinomu prsu MCF-7 (Obr. 11), která byla použita také pro cytometrickou analýzu (Obr. 9B) a RB pozitivní linie karcinomu prsu SKBR3 (Obr. 12). Obě tyto linie byly dále použity pro sledování účinku kombinací látek.

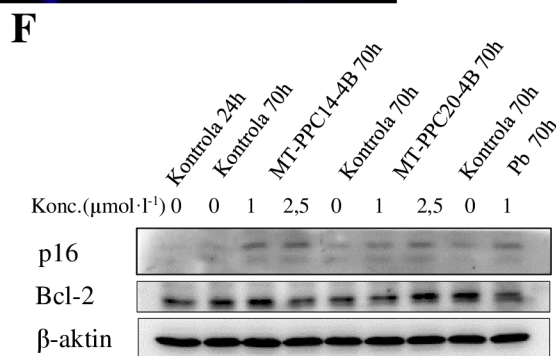
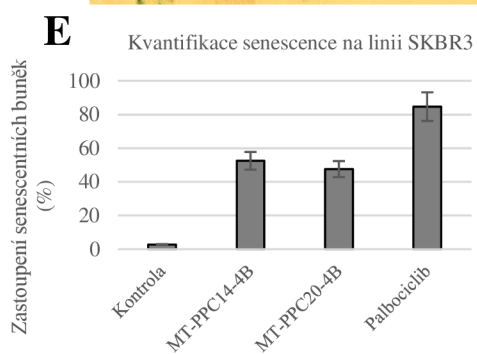
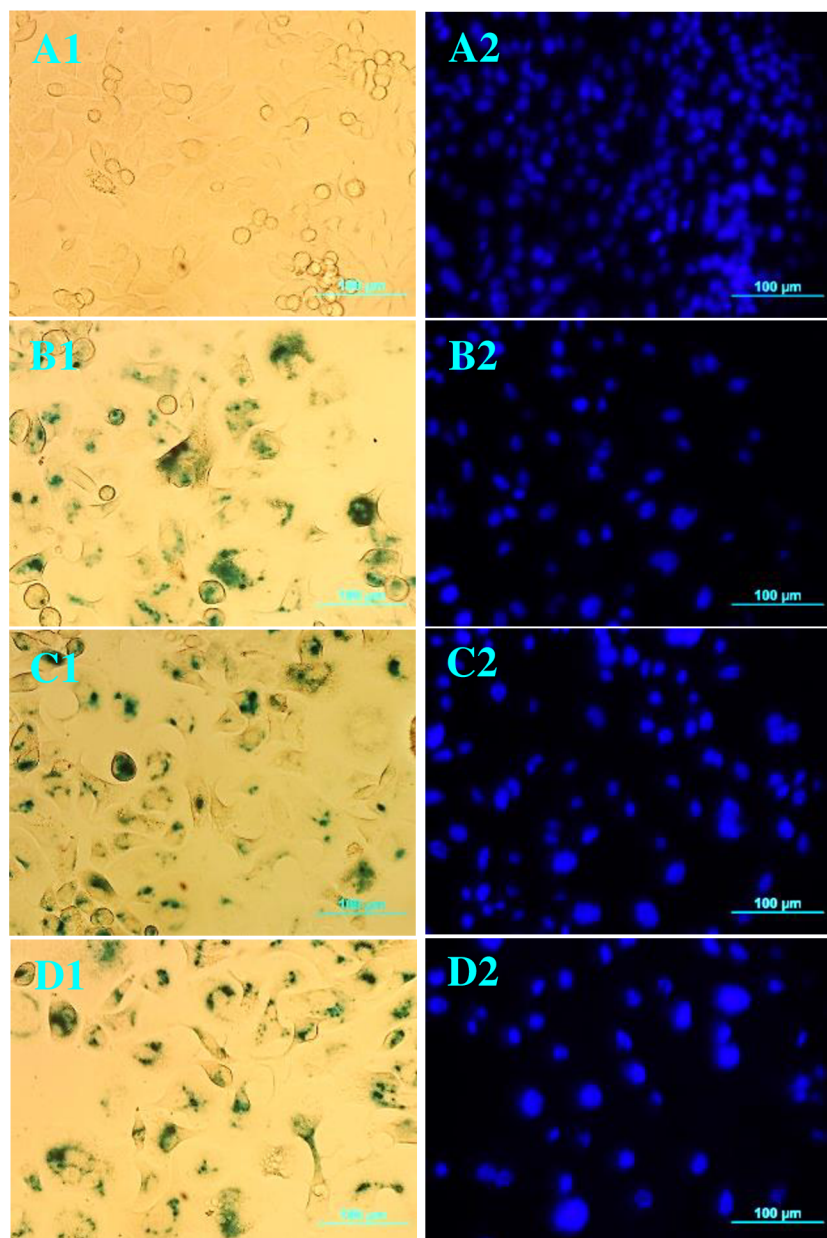
Buňky linie MCF-7 byly pro stanovení změn morfologie a aktivity  $\beta$ -galaktosidasy ovlivněny jednotně testovanými látkami i palbociclibem koncentrací  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Buňky linie SKBR3 byly ovlivněny látkami MT-PPC14-4B a MT-PPC20-4B v koncentraci  $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a palbociclibem v koncentraci  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Důvod použití nižší koncentrace látek u linie MCF-7 byla vysoká buněčná toxicita vedoucí k výrazné lethalitě, znemožňující tvorbu reprezentativního preparátu. Buňky byly s látkami inkubovány 7 dní, po nichž byly následně zafixovány a nabarveny (kapitola 3.2.6). Pro stanovení změny v hladině exprese p16 byly buněčné linie ovlivněny po dobu 70 hodin testovanými látkami o koncentracích 1 a  $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a palbociclibem v koncentraci  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Na obrázku 11 v části 1 lze vizuálně srovnat morfologii ošetřených buněk a aktivitu enzymu  $\beta$ -galaktosidasy. Testované látky ve srovnání se standardem neměly výrazný vliv na indukci morfologických změn ani proliferaci. Zatímco v kultuře buněk ošetřených palbociclibem lze pozorovat změnu tvaru a velikosti buněk, výrazný úbytek buněk a silnou aktivitu  $\beta$ -galaktosidasy, u testovaných látek není pozorovatelný rozdíl ve tvaru a množství buněk oproti kontrole. Jediným detekovaným markerem u linie MCF-7 je aktivita  $\beta$ -galaktosidasy, která je ve srovnání s palbociclibem přibližně poloviční (Obr. 11E). Ve vzorku ošetřeném palbociclibem byla detekována aktivita enzymu v 83,05 % ( $\sigma = \pm 8,9 \%$ ) analyzovaných buněk, zatímco ve vzorku s MT-PPC14-4B byla 42,7 % ( $\sigma = \pm 4,8 \%$ ) a MT-PPC20-4B byla 39,6 % ( $\sigma = \pm 4,3 \%$ ). V kontrolním vzorku byla naměřena aktivita enzymu v 1,2 % ( $\sigma = \pm 0,8 \%$ ) analyzovaných buněk. Z tohoto důvodu byla provedena proteinová analýza pro zjištění hladiny exprese p16 po 70hodinovém ošetření palbociclibem a testovanými látkami (Obr. 11F). Změny v hladině proteinu p16 však nebyly detekovány, neboť linie MCF-7 má tento gen mutován (Xu *et al.*, 1994).

Experiment byl opakován na linii karcinomu prsu SKBR3 s funkčním proteinem p16. Tentokrát byly látky použity v koncentracích  $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a palbociclib v koncentraci  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Z provedených experimentů je v tomto případě patrné, že látky obdobně jako palbociclib způsobily navození morfologických změn a zastavily proliferaci buněk. V preparátech po ovlivnění testovanými látkami MT-PPC14-4B, MT-PPC20-4B i palbociclibem lze pozorovat velké buňky protáhlého tvaru s deformovanými jádry



**Obrázek 11.** Senescence linie MCF-7 po 7denním ošetření palbociclibem a látkami MT-PPC14-4B, MT-PPC20-4B. Látky byly použity v koncentraci 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Část A-D reprezentativní snímky pořízené z mikroskopu. A: kontrola s DMSO, B: buňky ovlivněné látkou MT-PPC14-4B, C: látka MT-PPC20-4B, D: palbociclib (Pb). 1: Snímky pořízené v procházejícím světle, 2: DAPI. Měřitko je 200  $\mu\text{m}$ . E: Kvantifikace senescentních buněk ve vzorku. F: Detekce p16 a Bcl-2 metodou western blottingu po 70 hodinách ovlivnění látkami o koncentracích 1 a 2,5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Detekce PCNA jako kontrola nanášení vzorků.



**Obrázek 12.** Senescence linie SKBR3 po 7denním ošetření palbociclibem a látkami MT-PPC14-4B, MT-PPC20-4B. Látky byly použity v koncentraci 2,5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Část A-D reprezentativní snímky pořízené z mikroskopu. Měřítka je 100  $\mu\text{m}$ . A: Kontrola s DMSO, B: buňky ovlivněné látkou MT-PPC14-4B, C: MT-PPC20-4B, D: palbociclib (Pb). 1: Snímky pořízené v procházejícím světle, 2: DAPI. E: Kvantifikace senescentních buněk ve vzorku. F: Detekce p16 a Bcl-2 metodou western blottingu po 70 hodinách ovlivnění látkami o koncentracích 1 a 2,5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Detekce  $\beta$ -aktinu jako kontrola nanášení vzorků.



(Obr. 12). Morfologicky se ovlivněné buňky významně liší oproti kontrole a oproti ovlivněným buňkám linie MCF-7 (Obr. 11). Ve všech třech preparátech byla navíc detekována silná aktivita  $\beta$ -galaktosidasy. Procentuální zastoupení senescentních buněk (pozitivních na  $\beta$ -galaktosidasu) ve vzorku je přitom obdobné jako v preparátu zhotoveném z linie MCF-7 (Obr. 11E, 12E). Ve vzorku ošetřeném palbociclibem byla detekována aktivita  $\beta$ -galaktosidasy v 84,6 % ( $\sigma = \pm 3,4$  %) analyzovaných buněk, ve vzorku s MT-PPC14-4B byla 52,5 % ( $\sigma = \pm 8,2$  %) a MT-PPC20-4B byla 47,6 % ( $\sigma = \pm 10,3$  %). V kontrolním vzorku byla naměřena aktivita enzymu v 2,7 % ( $\sigma = \pm 1,9$  %) analyzovaných buněk.

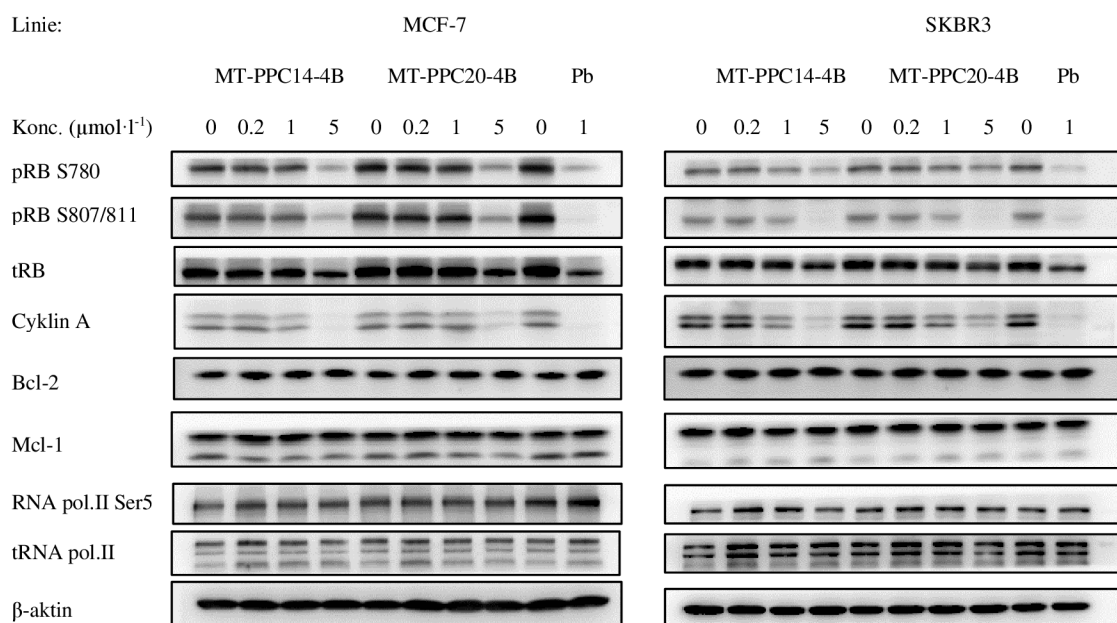
Proteinová analýza linie SKBR3 po 70 hodinách ovlivnění látkami MT-PPC14-4B a MT-PPC-20-4B v koncentracích 1 a 2,5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a palbociclibem v 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  ukázala, že testované látky zvyšují hladinu exprese proteinu p16 obdobně jako palbociclib (Obr. 12F). V tomto případě bylo prostřednictvím třech použitých markerů prokazatelně detekována senescence indukovaná testovanými látkami.

### 4.3 Proteinová analýza po ovlivnění inhibitory CDK4/6

Metodami průtokové cytometrie a stanovením  $\beta$ -galaktosidasy byl nepřímě prokázán CDK4 inhibiční účinek testovaných látek na nádorových liniích. Ačkoliv látky v obou případech vykazovaly obdobný efekt jako CDK4 inhibitor palbociclib, použitím těchto metod nebylo možné potvrdit specifitu a selektivitu látek. Proto byl studován účinek látek MT-PPC14-4B a MT-PPC20-4B na fosforylaci proteinu RB v koncentrační řadě 0,2; 1 a 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  po 24 hodinách ovlivnění (Obr. 13).

Společně s fosforylací RB byla sledována změna hladiny cyklinu A související se zastavením buněčného cyklu v G1 fázi. Pro vyloučení možnosti inhibice CDK7 byla sledována fosforylace RNA polymerasy II. U obou látek byla také sledována hladina anti-apoptických proteinů Bcl-2 a Mcl-1. Účinky látek byly srovnávány opět s palbociclibem při použité koncentraci 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Analýza western blot byla provedena na dvou nádorových liniích karcinomu prsu, které byly použity i pro stanovení senescence: ER<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> linii MCF-7 a ER<sup>-</sup>/HER2<sup>+</sup> linii SKBR3 (Obr. 13).

Látky obdobně jako palbociclib způsobily snížení fosforylace proteinu RB, což koreluje s cytometrickou analýzou provedenou na RB pozitivních buňkách (Obr. 9), kde byl detekován G1 blok buněčného cyklu při použité koncentraci 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  na linii MV4-11 a 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  na linii MCF-7. Pokles fosforylace RB byl pozorován Ser780



**Obrázek 13.** Výsledky z imunodetekce proteinů v liniích MCF-7 a SKBR3 po 24hodinovém ovlivnění látkami MT-PPC14-4B a MT-PPC20-4B a palbociklib (Pb). Použité koncentrace látek: 0,2, 1, 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a standardu 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Detekce  $\beta$ -aktinu jako kontrola nanášení vzorků.

a Ser807/811. Fosforylace RB na Ser780 je přímo odpovědná za disociaci inhibičního komplexu s transkripčním faktorem E2F a HDAC, takže detekovaný koncentračně závislý pokles je důkazem inhibice komplexu CDK4/cyklin D1, který vede ke G1 bloku buněčného cyklu (Obr. 9). Výrazný pokles fosforylace rezidua Ser780 byl detekován u linie MCF-7 při koncentraci 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , zatímco linie SKBR3 vykazovala vyšší citlivost buněk k cytostatickému účinku látek a pokles fosforylace byl detekován při koncentraci 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a vyšší.

Fosforylace Ser807/811 má kromě funkce uvolnění transkripčního faktoru E2F také důležitou roli v rámci udržení životaschopnosti buňky, kdy protein ve svém fosforylovaném stavu interaguje s antiapoptickým proteinem Bax (Antonucci *et al.*, 2014). Také v tomto případě byl pozorován koncentračně závislý pokles fosforylace, obdobně jako tomu bylo u rezidua Ser780. V rámci kontroly celkové hladiny u imunodetekce byla sledována i celková hladina proteinu RB. Zde lze vidět také koncentračně závislý pokles, který je neobvyklý, byl však již charakterizován ve starších publikacích a může mít souvislost s aktivací proteazomu po dlouhodobém ovlivnění (Chen *et al.*, 1997; Ramachandran *et al.*, 2014; Miettinen *et al.*, 2018).

Společně s fosforylací RB byla pomocí imunodetekce sledována hladina cyklinu A, k jehož expresi dochází až na přechodu mezi G1/S fází buněčného cyklu (Lehner & O'Farrel, 1989; Walker & Maller, 1991). V souladu s provedenou cytometrickou



analýzou byl pozorován koncentračně závislý pokles exprese cyklinu A2 po ovlivnění obou látek i palbociclibem.

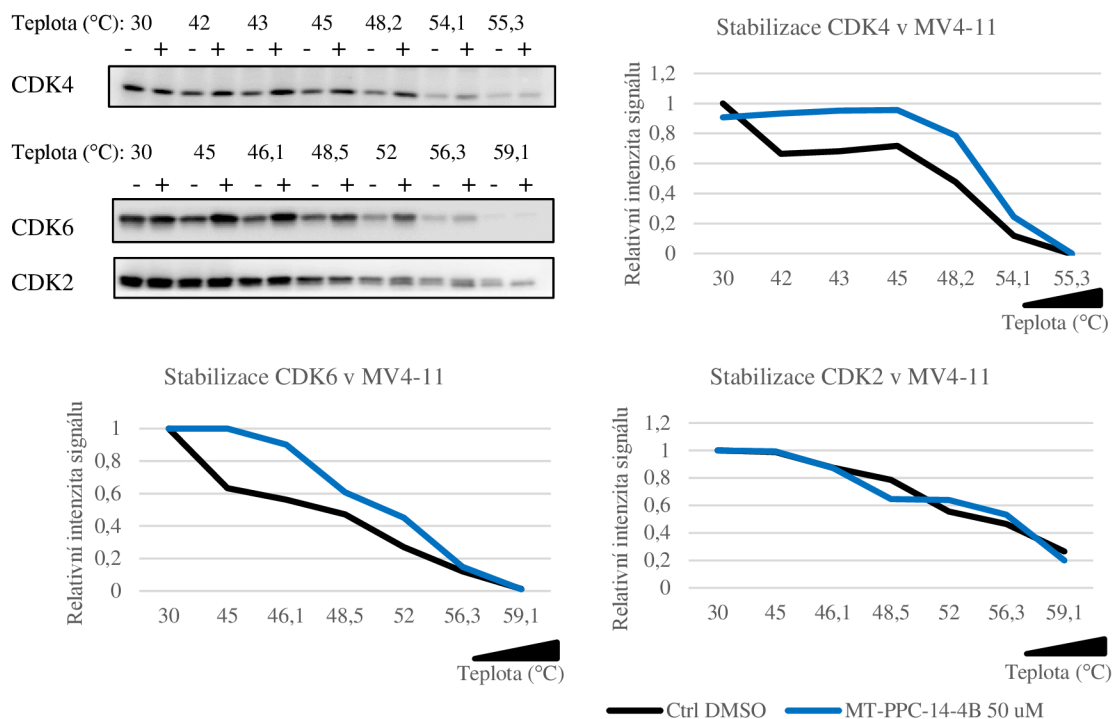
Pro stanovení účinku látek na buněčné linie byla také sledována hladina antiapoptického proteinu Bcl-2 a Mcl-1. Zatímco hladina proteinu Bcl-2 zůstala nezměněná při rostoucí koncentraci látek, u proteinu Mcl-1 byl pozorován mírný pokles hladiny po ovlivnění linie MCF-7 látkou MT-PPC20-4B při koncentraci  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , což naznačuje přítomnost aktivních kaspas. Oproti tomu látka MT-PPC14-4B vykazovala spíše cytostatický účinek obdobně jako palbociclib (Obr. 13).

Protože k indukci apoptózy může dojít vlivem inhibice CDK7 byla sledována hladina fosforylace a celková hladina RNA polymerasy II. K fosforylaci polymerasy přispívá aktivace CDK7, která je součástí transkripčního faktoru TFIIF. V G1 fázi buněčného cyklu je C-terminální doména polymerasy Ser5 rezidua minimálně fosforylovaná a k hyperfosforylaci dochází především až v M fázi. V případě inhibice CDK7 dochází k významnému poklesu fosforylace (Bregman *et al.*, 2000). Imunodetekcí nebyla pozorována žádná výrazná změna fosforylace proteinu (Obr. 13). Celkově lze účinek látek zhodnotit spíše jako cytostatický, který je charakteristický právě pro vysoce selektivní inhibitory CDK4.

#### **4.4 Interakce MT-PPC14-4B s CDK4**

Pro potvrzení interakce malé molekuly s daným proteinem v buňkách nebo v buněčném lyzátu se v poslední době využívá sledování změny profilu teplotní denaturace sledovaných proteinů. Metoda je označována jako CETSA (cellular thermal shift assay). Test se běžně provádí inkubací živých buněk s látkou, po níž následuje zahřátí na vyšší teploty a následně je analyzována změna hladiny rozpustných proteinů (Jafari *et al.*, 2014; CETSA [2. 1. 2022]; Perkin Elmer [2. 1. 2022]). Pro nezávislé potvrzení specifické interakce látky MT-PPC14-4B (která se jevila jako více selektivní) s CDK4 byla použita metoda CETSA po úpravě výchozího protokolu (kapitola 3.2.3).

Buněčný lyzáat linie MV4-11 byl po 30minutové inkubaci s látkou v koncentraci  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  rozdělen do PCR zkumavek a denaturován ve dvou teplotních gradientech. Gradient 42-55,3 °C byl použit pro imunodetekci stabilizace kinasu CDK4 a z důvodu rozdílnosti teplotní stability jednotlivých proteinů byl pro pozdější imunodetekci kinas



**Obrázek 14.** Záznam z imunodetekce po provedení termodenaturační metody na MV4-11. Termodenaturace v teplotním gradientu 42-55,3 °C pro imunodetekci CDK4, teplotní gradient 45-59,1 °C pro imunodetekci CDK2 a CDK6. Vzorek s DMSO a po ošetření látkou při 30 °C sloužil jako kontrola. Látka MT-PPC14-4B byla použita v koncentraci 50  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . (-): kontrola s DMSO, (+) vzorek s MT-PPC14-4B. Grafy znázorňují kvantifikaci jednotlivých proteinů.

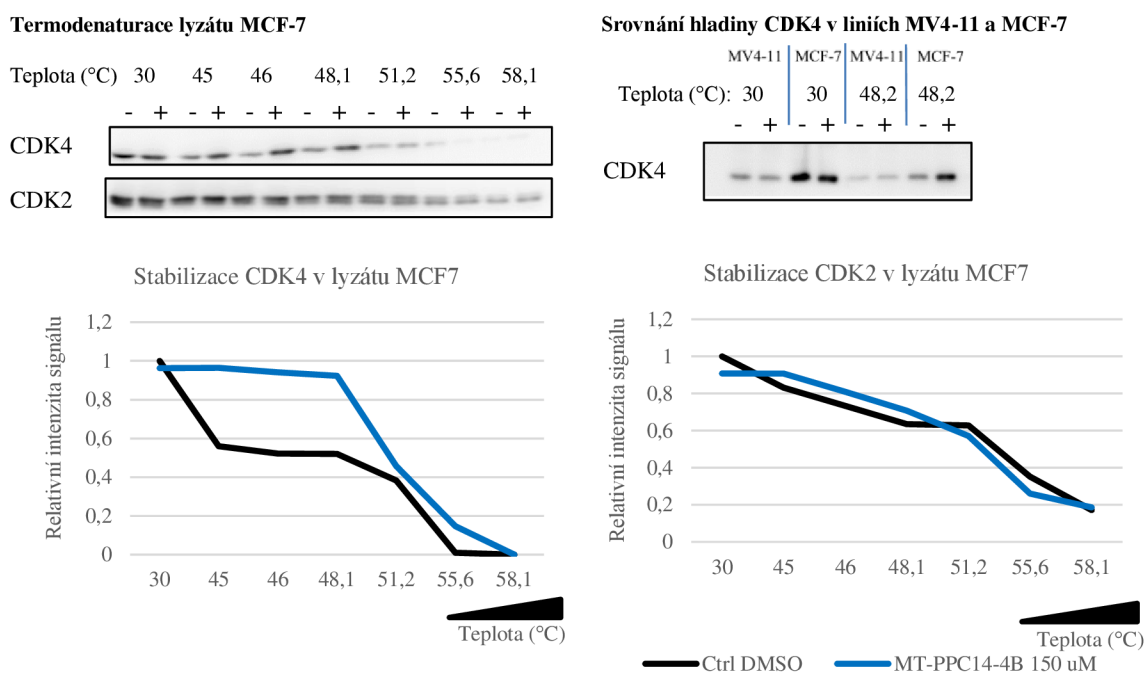
CDK2 a CDK6 použit teplotní gradient 45-59,1 °C. Pro oba gradienty lyzátu s látkou byla vytvořena také kontrolní řada buněčného lyzátu s DMSO (koncentrace ve vzorcích nepřesáhla 1 %). Pro kontrolu nanášení v kontrolním a ošetřeném vzorku před denaturací, byl vytvořen nedenaturovaný vzorek inkubovaný při 30 °C.

Výsledky termodenaturace buněčného lyzátu linie MV4-11 jsou zobrazeny na Obr. 14. Vzorky byly nanášeny na gel v pořadí teplot gradientu vzorků s testovanou látkou a k nim příslušná kontrola s DMSO. Z výsledků můžeme zřetelně vyčíst stabilizaci CDK4 při teplotách 43; 45 a 48,1 °C. Stabilizace byla také detekována na strukturním homologu CDK6 při teplotách 45; 46,1; 48,5 a 52 °C. Oproti tomu nebyla zjištěna stabilizace CDK2. Výsledky z imunodetekce byly podrobeny kvantitativní analýze, která byla vyhotovena pro všechny detekované proteiny CDK2, CDK4 a CDK6 (Obr. 14). Metodou se podařilo prokázat specifickou vazbu látky MT-PPC14-4B na CDK4 a CDK6.

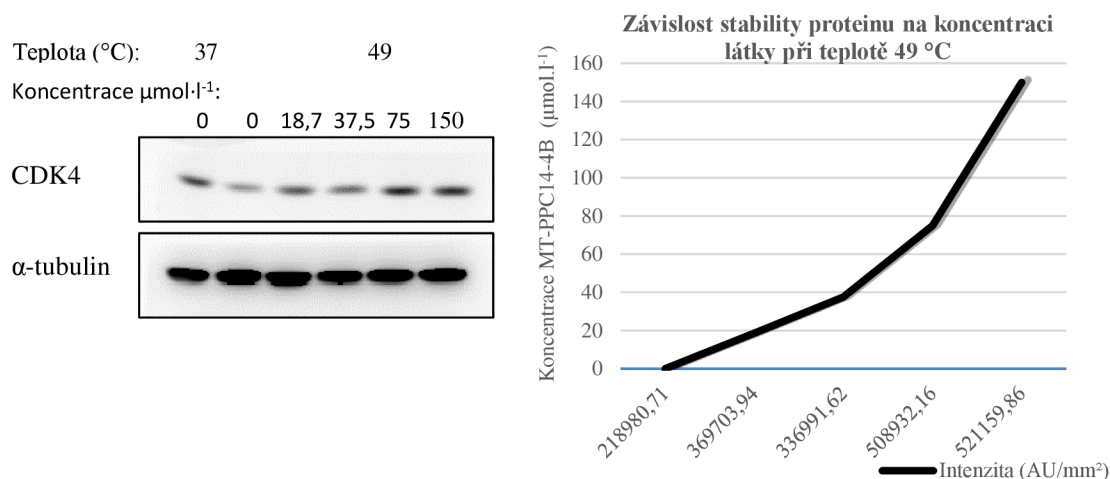
Studium teplotní stabilizace bylo následně provedeno na nádorové linii karcinomu prsu MCF-7, s níž byly provedeny také kombinační experimenty. Z důvodu vyšší hladiny proteinu CDK4 v této linii bylo nezbytné navýšit koncentraci testované látky MT-PPC14-

4B. Záznam z imunodetekce porovnání hladiny proteinu CDK4 v linii MV4-11 a MCF-7 je součástí Obr. 15. Buněčný lyzát MCF-7 byl inkubován 30 minut s látkou MT-PPC14-4B v koncentraci  $150 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Termodenaturace byla provedena v gradientu teplot 45-58,1 °C. Pro srovnání stabilizace byla opět použita neovlivněná kontrola při 30 °C a v teplotním gradientu a dále kontrola vzorku s testovanou látkou při 30 °C. Látka i v tomto případě vykazovala stabilizační účinek specificky na protein CDK4. V případě imunodetekce CDK2 nebyla pozorována žádná stabilizace.

Jelikož bylo nutné pro termodenaturaci buněčného lyzátu MCF-7 použít trojnásobně vyšší koncentraci než tomu bylo u MV4-11, byla provedena analýza závislosti stabilizace proteinu na koncentraci použité látky. Buněčný lyzát byl rozdělen do 6 PCR zkumavek a inkubován s koncentrační řadou látky MT-PPC14-4B a následně termodenaturován při jednotné teplotě (49 °C). Látka byla naředěna do lyzačního pufru tak, aby v každém vzorku včetně kontroly byla vždy stejná koncentrace DMSO. I zde byl analyzován kontrolní vzorek, který nebyl podroben teplotní denaturaci. Z provedené imunodetekce CDK4 byl vytvořen graf závislosti stabilizace na koncentraci látky (Obr. 16).



**Obrázek 15.** Záznam z imunodetekce po provedení termodenaturační metody na MCF-7. Termodenaturace v teplotním gradientu 45-58,1 °C pro imunodetekci CDK4 a CDK2. Vzorek s DMSO a po ošetření látkou při 30 °C sloužil jako kontrola. Látka MT-PPC14-4B byla použita v koncentraci  $150 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . (-): kontrola s DMSO, (+) vzorek s MT-PPC14-4B. Srovnání hladiny proteinu CDK4 v buněčných liniích MV4-11 a MCF-7. Grafy znázorňují kvantifikaci jednotlivých proteinů.



**Obrázek 16.** Záznam z imunodetekce po provedení termodenaturační metody na MCF-7 při teplotě 49 °C. Lyzát byl ošetřen látkou MT-PPC14-4B v koncentracích 0; 18,7; 37,5; 75; 150 μmol·l<sup>-1</sup>. Tubulin jako kontrola nanášení. Graf znázorňuje kvantifikaci proteinu CDK4 v závislosti na koncentraci látky.

## 4.5 Kombinační terapie s CDK4 inhibitory

Kombinační terapie s CDK4/6 inhibitory představuje výhody ve smyslu vzájemné synergie látek a potlačení vzniku rezistence k endokrinní a anti-HER2 terapii (Liu *et al.*, 2018 **b**; Szostakowska *et al.*, 2018).

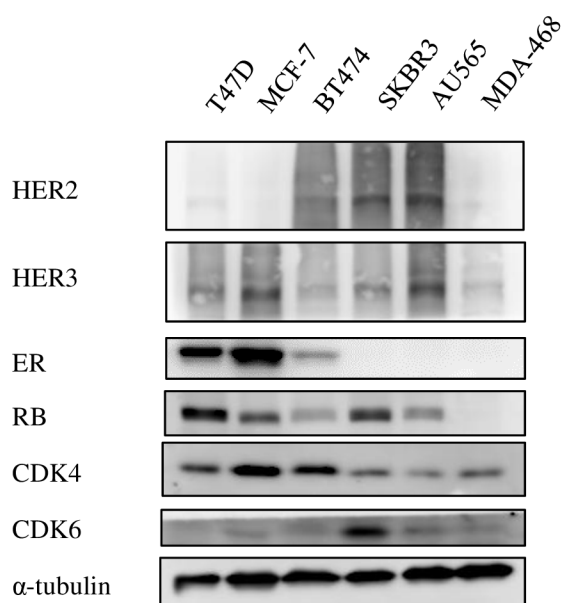
Prostřednictvím analýzy proteinů (western blot) byla provedena kontrola exprese jednotlivých terapeutických markerů u několika linií karcinomu prsu. Expres proteinů byla zjišťována v neovlivněných buňkách, díky čemuž bylo možné vybrat vhodné kandidátní linie, které byly později použity jako modely pro stanovení kombinačního efektu. Mezi zjišťovanými proteiny byly HER2 a HER3 receptory pro kombinovanou inhibici lapatinibem s testovanými MT-PPC14-4B a MT-PPC20-4B. Pro kombinaci endokrinních terapeutik s CDK4/6 inhibitory byla zjišťována exprese estrogenního receptoru. U všech linií byla také stanovována hladina exprese nejen CDK4 a CDK6 ale i RB, bez něhož by terapie nebyla účinná.

Pro kombinační terapii lapatinibem s inhibitory CDK4/6, linie adenokarcinomu prsu SKRB3, jako jediná z analyzovaných splňovala podmínky použití jako vhodného modelu HER2<sup>+</sup> buněk. (Obr. 17). Tato linie vykazovala expresi HER2 a androgenního receptoru, ale ne estrogenního receptoru. V případě kombinované inhibice CDK4/6 s antiestrogenní terapií dané kritérium splnily buněčné linie duktálního karcinomu T47D a metastatického karcinomu prsu MCF-7 (Obr. 17), které byly použity jako modelové linie pro stanovení

kombinačního efektu. Obě linie vykazovaly expresi estrogenního receptoru, přičemž hladina receptoru u MCF-7 byla znatelně vyšší.

Po selekci modelových linií bylo provedeno stanovení hodnot GI50 inhibitorů MT-PPC14-4B, MT-PPC20-4B a standardů lapatinibu a tamoxifenu. Hodnoty byly zjištěny na základě stanovení cytotoxicit jednotlivých látek měřením redukce resazurinu po 72 hodinách ovlivnění buněk. Naměřené hodnoty fluorescence resofurinu byly převedeny do grafu závislosti životaschopnosti buněk na koncentraci látky, z nichž byla zjištěna hodnota GI50 (Tab. 8).

Kombinační účinek látek byl stanoven měřením cytotoxicity s detekcí resazurinem. Linie v mikrotitrační desce byly ovlivněny kombinací dvou látek (popis v kapitole 3.2.5) a inkubovány po dobu 72 hodin. Celková odezva na účinek kombinace byla stanovena ze získaných výsledků cytotoxicit na buněčných liniích samostatné a kombinované inhibice. Prostřednictvím softwaru CombeneFit bylo vytvořeno prostorové grafické znázornění celkového účinku kombinace dvou látek na buněčnou linii. Výhodou tohoto zobrazení oproti klasickému stanovení kombinačního indexu (Chou & Talalay, 1984) je možnost pozorování i menších změn ve vzájemném působení dvou látek napříč širokým spektrem použitých koncentrací.



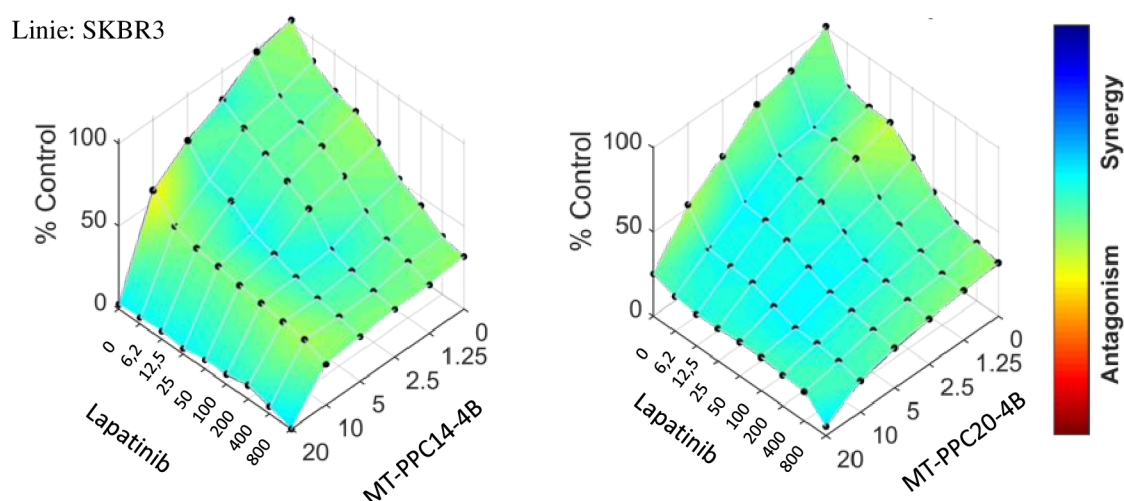
**Obrázek 17.** Srovnání exprese terapeutických cílů pro kombinační terapii v nádorových buněčných liniích odvozených od karcinomu prsu. Tubulin jako kontrola nanášení.

**Tabulka 8.** Cytotoxicita inhibitorů na nádorových liniích vyjádřená hodnotou GI50 ( $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

Testovaná látka	Hodnota GI50 ( $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )		
	MCF-7 ER <sup>+</sup>	T47D ER <sup>+</sup>	SKBR3 HER2 <sup>+</sup>
MT-PPC14-4B	17,5	14,3	13,5
MT-PPC20-4B	7,11	8,5	6,67
Fulvestrant	Nedosaženo	Nedosaženo	-
Tamoxifen	29,5	28,3	-
Lapatinib	-	-	0,08

#### 4.5.1 Kombinační účinek inhibitoru HER2 a CDK4/6

Měřením cytotoxicity po 72 hodinách bylo sledováno působení látek MT-PPC14-4B a MT-PPC20-4B v kombinaci s inhibitem HER2 receptoru lapatinibem. Látky MT-PPC14-4B a MT-PPC20-4B byly použity v koncentrační řadě od  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  s ředícím faktorem 2. Inhibitor lapatinib byl použit v koncentrační řadě od  $0,8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  taktéž s ředícím faktorem 2. Grafické vyjádření výsledků měření naznačuje, že kombinace nevykazovala signifikantní synergii při ovlivnění linie SKBR3 (Obr. 18). Celkový efekt se jeví spíše jako aditivní. I tento výsledek analýzy však lze považovat za pozitivní, protože lze u této kombinace přepokládat kýžený efekt v potlačení rezistence. Navíc užitím ředícího faktoru 2 dochází k výraznému snížení rozdílů ve viabilitě buněk mezi jednotlivými jamkami mikrotitračního panelu. Ředící faktor 2 byl zvolen z důvodu pokrytí co nejširšího koncentračního rozsahu.

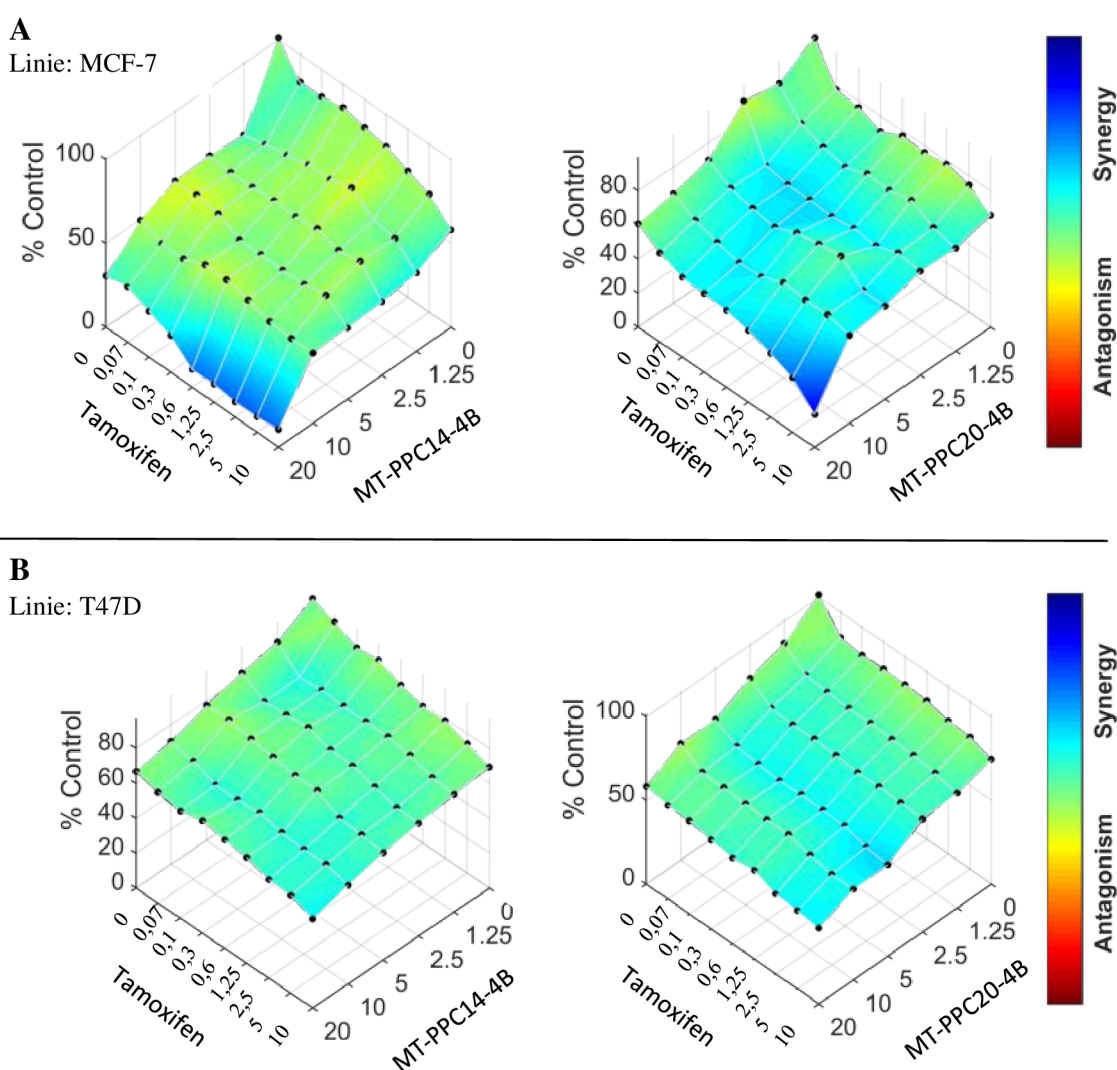


**Obrázek 18.** Kombinační efekt látek MT-PPC14-4B a MT-PPC20-4B s lapatinibem na linii SKBR3. Koncentrace látek MT-PPC14-4B a MT-PPC20-4B uvedeny v  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; koncentrace lapatinibu uvedena v  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; barevná škála zobrazuje účinek látek na % viability buněk.



#### 4.5.2 Kombinační účinek tamoxifenu s CDK4/6 inhibitory

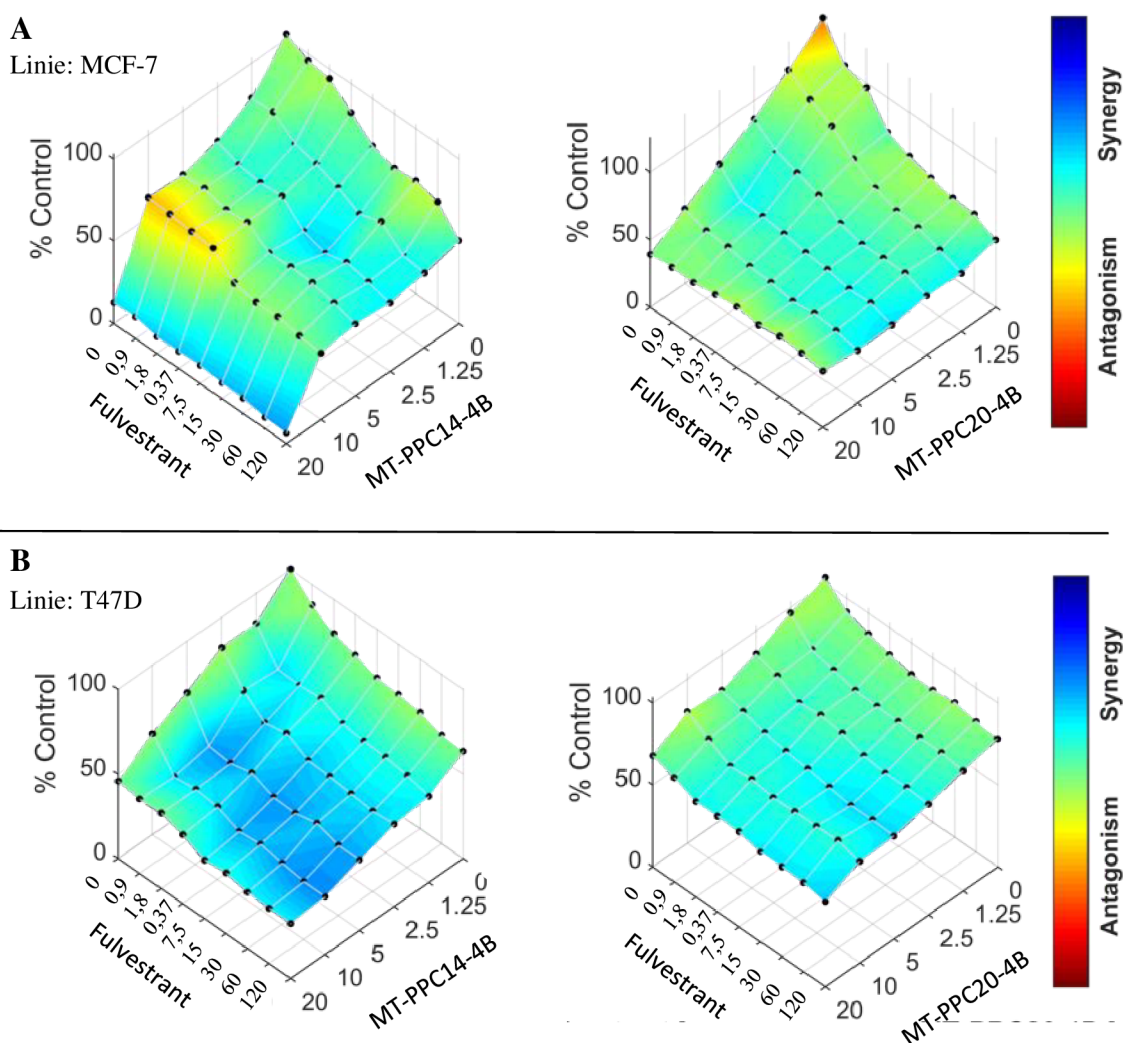
Stanovení účinku kombinace testovaných látek bylo na ER<sup>+</sup> liniích provedeno nejprve se selektivním modulátorem estrogenního receptoru, tamoxifenem (Obr. 19), následně s antagonistou receptoru, fulvestrantem (Obr. 20). V obou případech byly testované látky použity v koncentrační řadě od 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  s ředícím faktorem 2, tamoxifen byl použit v koncentrační řadě od 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  taktéž s ředícím faktorem 2. Z výsledků části A Obr. 19 na linii MCF-7 je patrné, že kombinace obou testovaných CDK4/6 inhibitorů s tamoxifenem vykazuje v nejvyšších koncentracích synergii. Oproti tomu na linii T47D nevykazuje tato kombinace žádný výrazný účinek (Obr. 19B).



**Obrázek 19.** Kombinační efekt látek MT-PPC14-4B a MT-PPC20-4B s tamoxifenem na liniích MCF-7 (A) a T47D (B). Koncentrace látek uvedeny v  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; barevná škála zobrazuje účinek látek na % viability buněk.

### 4.5.3 Kombinační účinek fulvestrantu s CDK4/6 inhibitory

Kombinace testovaných látek s fulvestrantem vykazovala na obou ER<sup>+</sup> liniích mírné rozdíly. Inhibitory CDK4/6 byly použity v koncentrační řadě od 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a fulvestrant byl použit v koncentrační řadě od 120  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , u všech látek byl ředící faktor roven 2. Zatímco látka MT-PCC14-4B vykazovala v této kombinaci na linii MCF-7 parciálně antagonické účinky při nízké koncentraci fulvestrantu, stejná kombinace se na linii T47D projevila mírnou synergií v širokém rozsahu použitých koncentrací. Kombinace látky MT-PPC20-4B s fulvestrantem se na žádné z linií neprojevila výrazným efektem. Celkově se tedy nejvíce příznivě jevila kombinace fulvestrantu s inhibitorem MT-PPC14-4B (Obr. 20B) a kombinace tamoxifenu s oběma inhibitory (Obr. 19A).



**Obrázek 20.** Kombinační efekt látek MT-PPC14-4B a MT-PPC20-4B s fulvestrantem na liniích MCF-7 (A) a T47D (B). Koncentrace látek MT-PPC14-4B a MT-PPC20-4B uvedeny v  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; koncentrace fulvestrantu v  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; barevná škála zobrazuje účinek látek na % viability buněk.



## 5 DISKUSE

Hlavním cílem diplomové práce bylo blíže charakterizovat účinky nově připravených látek MT-PPC14-4B a MT-PPC20-4B, které v předběžném testování vykazovaly významný inhibiční efekt vůči CDK4/cyklin D (Tab. 4). Na základě znalostí o buněčných účincích CDK4 inhibitorů byly navrženy experimenty, jimiž bylo možné prokázat specifitu účinku testovaných látek.

V důsledku inhibice CDK4 dochází k zablokování buněčného cyklu v G1 fázi v nádorových liniích s funkčním proteinem RB. Obě testované látky vykazovaly předpokládaný efekt v RB pozitivních liniích (MCF-7, MV4-11) obdobně jako palbociclib (Obr. 9), naopak nevykazovaly žádný účinek na RB negativních liniích (BT549, DU145), což primárně naznačuje selektivní inhibici CDK4 (Obr. 10). Obdobný účinek byl již dříve popsán u všech dosud schválených inhibitorů CDK4 palbociclibu, ribociclibu, abemaciclibu a trilaciclibu (Finn *et al.*, 2009; Goel *et al.*, 2018), ačkoliv například abemaciclib vykazuje při použití vyšších koncentrací zastavení buněčného cyklu v kontrolním bodě G2/M a také zvýšenou cytotoxicitu na nádorových liniích. Tento jev může souviset s inhibicí CDK1 a CDK2, jejichž aktivita je nutná pro progresi cyklu přes S fázi. Navíc ovlivnění RB deficientních linií palbociclibem a ribociclibem nemá žádný vliv na distribuci fází buněčného cyklu, což jen podporuje teorii, že zastavení cyklu v G2/M po ovlivnění abemaciclibem je indukováno nezávisle na inhibici CDK4/6 (Hafner *et al.*, 2019). Cytotoxické účinky jsou pravděpodobně způsobeny množstvím dalších molekulárních cílů abemaciclibu, jako například CDK9, DYRK, HIPK a PIM1 (Small *et al.*, 2017; Torres-Guzmán *et al.*, 2017). Interakci s CDK9 vykazovaly také molekuly PROTAC nesoucí ve své struktuře právě abemaciclib (Jiang *et al.*, 2019). Abemaciclib však není zdaleka jediný inhibitor CDK4 vykazující nižší selektivitu, což jen potvrzuje nezbytnost důkladného profilování všech vyvíjených inhibitorů.

Významný pokrok ve studiu molekulárních cílů zajistila metoda teplotního profilování proteomu buněk, která je založena na studiu změn v teplotní stabilitě buněčných proteinů a proteinových komplexů indukovaných interakcí s inhibitorem (Jafari *et al.*, 2014). Ve spojení s hmotnostní spektrometrií došlo k rozšíření možností detekce dalších molekulárních cílů do komplexního spektra v rámci celého proteomu (Hafner *et al.*, 2019). Pomocí této metody byla například zjištěna nespecifická teplotní stabilizace podjednotky 20S proteazomu v buněčné linii karcinomu prsu MCF-7 po ovlivnění

palbociclibem, která je spojená se zvýšenou aktivitou proteazomu v ovlivněných buňkách (Miettinen *et al.*, 2018). Tato aktivace je spojena s poklesem asociace ECM29 a proteazomu, což indukuje zastavení buněčné proliferace a přispívá k navození senescentního stavu buněk. Současně bylo zjištěno, že palbociclib nesespecificky interaguje s lipidovými kinasami PIK3R4, PIK3CD, PIP5K2C, PIP4K2 a kinasou TTK, s níž v menší míře také interaguje abemaciclib a ribociclib (Kim *et al.*, 2018; Hafner *et al.*, 2019). Ačkoliv je ribociclib považován za selektivnější inhibitor CDK4, vykazuje nižší účinnost než palbociclib (Uitdehaag *et al.*, 2019). Další molekulární cíle ribociclibu jsou kinasy CAMK2 a GAK (Sumi *et al.*, 2015). Vyšší selektivita inhibitorů je spojena s cytostatickým účinkem látek, který byl prokázán i v případě látky MT-PP14-4B stejně jako u ribociclibu a palbociclibu. Nižší selektivita a výskyt vyššího množství nesespecifických interakcí se projevuje zvýšenou cytotoxicitou látek, jako tomu bylo v případě linie MV4-11 po ovlivnění látkou MT-PPC20-4B. Zvýšená cytotoxicita látky MT-PPC20-4B byla pozorována rovněž v případě stanovení senescence na linii MCF-7, zde lze tedy předpokládat interakci této látky s dalšími buněčnými cíli. Vzhledem k možnosti dalších interakcí mimo CDK4 a rozdílnosti nádorových buněk ve svých vnitřních metabolických programech se tedy v komplexním měřítku mechanismy účinku jednotlivých inhibitorů CDK4 na jednotlivých buněčných typech mohou lišit. Příkladem lze uvést interakci palbociclibu s CDK6 v nádorových liniích T-lymfocytární leukémie, kde palbociclib vykazuje zvýšenou cytotoxicitu a indukci apoptózy v důsledku inhibice 6-fosfofruktokinasy a pyruvátkinasy, která vede k vysoké hladině ROS, zatímco v jiných nádorových liniích palbociclib vykazuje spíše cytostatický účinek (Wang *et al.*, 2017).

Významný jev, k němuž dochází v důsledku inhibice CDK4 je tzv. buněčná senescence. Obecně k senescenci dochází vlivem různých stresových situací k výraznému poškození makromolekul, které je nevratné, ale současně není často dostačující pro indukci programované buněčné smrti (Llanos *et al.*, 2019). Nejedná se tedy obecně o příliš specifický marker, protože buněčná senescence může být způsobena řadou jiných faktorů. Fyziologicky mohou senescenci způsobit epigenetické modifikace, zkrácení telomer, poškození DNA nebo mitochondriální dysfunkce, ze zástupců nízkomolekulárních látek jsou to právě CDK4/6 inhibitory, dále doxorubicin, bleomycin nebo látky indukující epigenetické změny (Petrova *et al.*, 2016). Lze však přepokládat, že senescence detekovaná po ovlivnění inhibitorem CDK4 je nejspíše důsledkem inhibice.

V průběhu senescence dochází k zablokování buněčného cyklu, nejedná se však o zástavu způsobenou nedostatkem růstových faktorů, ale o aktivní blokaci způsobenou expresí proteinů, které znemožňují průchod cyklem. Zásadní signální dráhy aktivované v průběhu senescence jsou p53/p21 a p16/pRB (Nacarelli & Sell, 2017). Některé buňky jsou v důsledku aktivace p53 podrobeny buněčné smrti, ostatní zůstanou rezistentní k apoptóze a dostanou se do senescentního stavu (Knights *et al.*, 2006; Capparelli *et al.*, 2012). Často také dochází k aktivaci antiapoptických proteinů (Bcl-2, Bcl-XL) a proteinkinasy B (AKT).

Charakteristickým morfoloogickým znakem je změna velikosti a tvaru buněk, které jsou větší a protáhlejší, specifickým znakem senescence je také zvýšená aktivita enzymu  $\beta$ -galaktosidasy a zvýšení hladiny inhibičního proteinu p16 (Tominaga, 2015; Valenzuela *et al.*, 2017). Tyto charakteristické znaky byly použity jako detekční markery pro posouzení vlivu studovaných látek na buněčné linie MCF-7 a SKBR3. Dle předpokladu byla detekována u obou buněčných linií zvýšená aktivita  $\beta$ -galaktosidasy, nicméně zvýšená hladina proteinu p16 byla pozorována pouze v ovlivněných buňkách SKBR3 (Obr. 12). Buněčná linie MCF-7 se totiž vyznačuje homozygotní delecí genu *Cdkn2A/Ink4A*, kódující protein p16 (Xu *et al.*, 1994). Zvýšení exprese p16 bylo již dříve pozorováno po ovlivnění buněčné linie SKBR3 selektivním modulátorem aktivity hERG, což obdobně jako v případě inhibice CDK4 vedlo k poklesu fosforylace RB a inaktivaci CDK1 (Lansu & Gentile, 2013). Současně je vedena diskuse na téma ztráty RB a vysoké exprese p16 ve spojitosti s rezistencí k inhibitorům CDK4. Na několika liniích byla totiž potvrzena souvislost mezi silnou expresí p16, inaktivací RB a necitlivostí k palbociclibu (Li *et al.*, 1994 **b**; Finn *et al.*, 2009), na druhou stranu vysoké a střední hladiny p16 a exprese *Cckn2A* byly pozorovány v buněčných liniích CAL120 a SKBR3, které jsou citlivé k účinku palbociclibu, ale současně funkční p16 chyběl v buňkách DU4475 a HCC1806 vykazujících rezistenci vůči palbociclibu (Raspé *et al.*, 2017).

Mezi jednoznačný důsledek inhibice CDK4 patří pokles fosforylace proteinu RB. Po ovlivnění testovanými látkami MT-PPC14-4B a MT-PPC20-4B byl detekován pokles fosforylace dvou reziduí Ser780 a Ser807/811 (Obr. 13), které jsou za fosforylovaného stavu přímo odpovědné za disociaci inhibičního komplexu s E2F a HDAC a také interakci s anti-apoptickými proteiny (Antonucci *et al.*, 2014). Zde však nelze stále hovořit ve vztahu k inhibici k CDK4 o jednoznačné selektivitě, protože ve skutečnosti může být RB fosforylován rovněž kinasou CDK2, jak bylo zjištěno na linii HCC1569 postrádající

aktivační fosforylaci Thr172 CDK4 (Raspé *et al.*, 2017), která je přímým markerem citlivosti k inhibici CDK4 (Bockstaele *et al.*, 2009). Bylo dokázáno, že ani bodové mutace RB (706F, 707W) nevyklučují jeho fosforylaci (Otterson *et al.*, 1999), jak bylo pozorováno u linie BT20 nesoucí mutaci RB (Raspé *et al.*, 2017). Navíc konkrétně CDK4 a CDK2 vykazují vysoce konzervovaný ATP-vazebný motiv, lišící se pouze v pěti AMK reziduích, přímo odpovědných za selektivitu k inhibitorům (Shafiq, 2012). V tomto ohledu tedy nelze vyloučit možnou inhibici CDK2, což dokazuje řada předešlých studií poukazujících na možnost současné inhibice CDK2 i CDK4 (Jorda *et al.*, 2015; Jorda *et al.*, 2019).

V případě látky MT-PPC20-4B byl pozorován pokles antiapoptického proteinu Mcl-1, což může značit probíhající apoptózu (Bockstaele *et al.*, 2009). Nedetekováním změn v hladině fosforylovaného Ser5 C-terminální domény RNA polymerasy II však bylo nepřímo prokázáno, že ačkoliv látka vykazuje zvýšenou cytotoxicitu, nejedná se o účinek spojený s inhibicí CDK7 (Bregman *et al.*, 2000).

Použitím metody buněčné termodenaturace bylo poté možné prokázat specifickou interakci látky s CDK4. Pro experimenty byla použita pouze látka MT-PPC14-4B, která se vzhledem k dosavadním výsledkům jevila jako více selektivní. Měřením bylo prokázáno, že inhibitor zvyšuje stabilitu CDK4 v buněčných liniích MCF-7 a MV4-11 za zvýšených teplot, navíc má podobný účinek na strukturně a funkčně homologní kinasu CDK6 v buněčné linii akutní myeloidní leukémie (Obr. 14, 15). Významnou roli tato interakce látky s CDK6 může mít pro vztah k její schopnosti inhibovat CDK6 v hematopoetických nádorových liniích, které obecně vykazují významnou závislost na signalizaci CDK6 (Scheicher *et al.*, 2015). Možnost účinné inhibice CDK4/6 v hematopoetických nádorových liniích byla současně prokázána cytometrickou analýzou na nádorové linii MV4-11 (Obr. 9). Obdobný účinek interakce CDK4 se selektivním inhibitorem byl zaznamenán v termodenaturační analýze proteomu buněk MCF-7 po ovlivnění palbociclibem. V této studii byl také potvrzen vliv palbociclibu na teplotní stabilizaci CDK6, ovšem stabilizace se projevila v nižší míře než na CDK4 (Miettinen *et al.*, 2018). Tento fakt může potenciálně souviset se specifickým mechanismem navození rezistence, který byl přednostně pozorován v metastatických buňkách karcinomu prsu, kdy v rámci desenzibilizace buňky nádoru začnou exprimovat více CDK6, která dle výsledků studie pravděpodobně s inhibitorem interaguje méně než CDK4 (Adon *et al.*, 2021). Navození rezistence k CDK4 inhibitorům může probíhat i jinými způsoby a také se liší v závislosti na použitém léčivu. Bylo prokázáno,

že dlouhodobá expozice palbociclibu vede ke zvýšené expresi cyklinu E, zatímco použití ribociclibu jako protinádorového terapeutika způsobuje spíše nárůst aktivity transkripčních faktorů E2F.

Právě vznikající léková rezistence je velmi diskutovanou problematikou léčby nádorových onemocnění (Sumi *et al.*, 2015). V případě karcinomu prsu je velká část diagnostikovaných karcinomů prsu je závislá buď na steroidní nebo HER2 signalizaci, řídící v nádorových buňkách procesy dělení a proliferace (Szostakowska *et al.*, 2018). Luminální typy karcinomů jsou pozitivní na expresi estrogenního nebo progesteronového receptoru. Většina těchto nádorů je v počáteční fázi vysoce citlivá k antiestrogenní terapii, která je považována za „zlatý standard“ léčby (Fínek, 2017). Bazální typy karcinomů s nadměrnou expresí HER2 jsou více problematické, ale většinou dobře reagují na léčbu anti-HER2 monoklonálními protilátkami (trastuzumab, pertuzumab). Potíž však nastává ve většině případů po dlouhodobé expozici endokrinní a anti-HER2 cílenou terapii, kdy vznikají rezistentní populace, odpovědné za následnou progresi onemocnění (Liu *et al.*, 2018 **b**). Mechanismy vzniku jsou založené buď na změnách fenotypu z receptor-pozitivního na receptor-negativní nebo mohou být způsobeny jinými molekulárními mechanismy nezávisle na expresi receptoru.

Účinným prostředkem pro zamezení vzniku rezistence je kombinování dvou a více terapeutik s odlišnými molekulárními účinky. Nejvyšší potenci pro léčbu metastatického karcinomu prsu prozatím zaznamenala anti-estrogenní terapie v kombinaci se selektivními inhibitory CDK4/6. Bylo prokázáno, že inhibitory CDK4/6 (palbociclib, ribociclib, abemaciclib) zvyšují míru odezvy a významně prodlužují dobu onemocnění bez progresu (Murphy, 2019), proto došlo k jejich schválení pro léčbu karcinomu prsu v kombinaci s nesteroidními inhibitory aromatasy. Abemaciclib byl navíc schválen FDA jako monoterapeutikum pro léčbu karcinomu prsu po předchozí neúspěšné chemoterapii nebo anti-estrogenní terapii a také v kombinaci s fulvestrantem (Sobhani *et al.*, 2019). Fulvestrant byl také schválen také v kombinaci s palbociclibem nebo ribociclibem (Walker *et al.*, 2016; Syed, 2017). Ačkoliv v případě palbociclibu a ribociclibu byl prokázán podobný profil toxicity, je nutno brát ohledy na rozdílnosti schválených CDK4/6 inhibitorů v toxicitě, farmakokinetických vlastnostech a účinnosti, která je odlišná v případě monoterapie a kombinace s další látkou (Murphy, 2019). Celkový účinek na různé podtypy karcinomu prsu tak může být heterogenní. Tento efekt se projevil ve výsledcích kombinace testovaných látek MT-PPC14-4B a MT-PPC20-4B s tamoxifenem a fulvestrantem, kdy byl zaznamenán odlišný účinek kombinací látek

na dvou ER<sup>+</sup> liniích MCF-7 a T47D. Zatímco kombinace inhibitorů CDK4 s tamoxifenem vykazovala synergii na linii MCF-7, na linii T47D byl výsledek téměř bez pozitivního efektu. Opačný případ nastal při použití CDK4 inhibitorů s fulvestrantem, kdy kombinace na linii T47D vykazovala synergii a v případě MCF-7 byl detekován napříč spektrem použitých koncentrací místy antagonický účinek. Tyto výsledky mohou mít spojitost s rozdílností vnitřního programu a metabolismu použitých linií.

V souvislosti s HER2<sup>+</sup> karcinomy prsu bylo zjištěno, že aktivní komplex CDK4/cyklin D přímo zprostředkovává rezistenci k anti-HER2 terapii, což byl hlavní předpoklad pro použití inhibitorů CDK4 k potlačení rezistence na monoklonální protilátky (Goel *et al.*, 2016). *In vitro* studie na buněčných liniích SKBR3 a BT474 rezistentních na trastuzumab ukázaly, že kombinace lapatinibu s abemaciclibem způsobila kromě poklesu fosforylace RB také snížení tuberinu (TSC2), důsledkem čehož došlo k utlumení aktivity mTORC1. Prostřednictvím tohoto mechanismu dochází k uvolnění zpětné vazby proti EGFR vedoucí k resenzibilizaci nádoru k inhibici anti-HER2/EGFR (Goel *et al.*, 2016). Kombinace lapatinibu s abemaciclibem vykazovala synergické účinky, ve srovnání s publikovanými daty testované látky MT-PPC14-4B a MT-PPC20-4B vykazovaly v kombinaci s lapatinibem spíše aditivní účinek s mírnou synergií (Obr. 18). Lze však přepokládat pozitivní účinek ve smyslu zamezení vzniku rezistence. Synergické účinky rovněž ukázala kombinace palbociclibu s pyrotinibem, což je pan-HER2 inhibitor potlačující signalizaci RAS/RAF/MEK/MAPK a PI3K/AKT. Tato kombinace vykazovala protinádorovou aktivitu *in vitro* a *in vivo* s projevy indukce silného G1 bloku a urychleného nástupu apoptózy (Zhang *et al.*, 2019).

Kromě zmíněných kombinací CDK4 inhibitorů na receptor-pozitivních typech karcinomu prsu byly publikovány výsledky účinných kombinací na triple-negativních karcinomech, které se vyskytují jako minoritní procento případů (10-15 %), ale patří mezi nejvíce progresivní a obtížně léčitelné typy nádorových onemocnění (Jhan & Andrechek, 2017). Ačkoliv mají obecně pacienti s TNBC ve srovnání s jinými typy lepší odpověď na systémovou chemoterapii, bez kompletní odpovědi stále zůstává velké procento případů, zde se tedy objevuje možný přínos cílené terapie. Synergickou inhibici proliferace TNBC nádorových linií (MB231, MB468, CAL148) způsobila kombinace palbociclibu s inhibitorem mTOR (MLN0128) (Yamamoto *et al.*, 2019). Některé kombinace s inhibitory CDK4 jsou již ve fázi klinického testování. Nedávno došlo k dokončení první fáze kombinace epirubicin hydrochloridu s inhibitorem druhé generace dinaciclibem a v počáteční fázi testování je kombinace trilaciclibu s gemcitabinem

a ribociclibu s bicalutamidem, pro léčbu TNBC pozitivních na androgenní receptor (Jhan & Andrechek, 2017). Bylo prokázáno, že inhibitor androgenního receptoru potencuje cytostatický účinek indukovaný inhibitorem CDK4. Díky své vysoké účinnosti je taktéž připravována klinická studie pro využití abemaciclibu jako monoterapeutika TNBC nádorů rezistentních k chemoterapii.

Dosavadní výsledky *in vitro* a následně i klinických studií ukazují význam použití inhibitorů CDK4 pro léčbu nádorových onemocnění ať už samostatně nebo v kombinaci s jiným léčivem. Vývoj rezistenčních mechanismů byl však pozorován i v nádorech vystavených dlouhodobé expozici inhibitorům CDK4 (Condorelli *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017). Z důvodu možnosti navození rezistence je současně na místě věnovat úsilí vývoji nových struktur či jiných alternativ s vysokou účinností a nízkou cytotoxicitou, jakou nabízejí například molekuly PROTAC (Ammazzalorso *et al.*, 2021).

## 6 ZÁVĚR

Prostřednictvím několika biochemických a molekulárně-biologických metod byly charakterizovány některé buněčné účinky dvou pteridinových derivátů MT-PPC14-4B a MT-PPC20-4B. Obě látky jsou různě selektivními inhibitory komplexu CDK4/cyklin D a vykazují rozdílnou cytotoxicitu na nádorových liniích, což bylo následně potvrzeno řadou použitých metod. Látka MT-PPC20-4B se jevila jako více cytotoxická a lze tedy přepokládat existenci dosud neidentifikovaných molekulárních cílů. Oproti tomu látka MT-PPC14-4B vykazovala nižší cytotoxicitu a obdobně jako klinicky používaný inhibitor palbociclib vykazovala spíše cytostatické účinky. Testované inhibitory v průběžných *in vitro* testech vykazovaly charakteristické účinky vlastní selektivním CDK4/6 inhibitorům, látka MT-PPC14-4B se navíc projevila jako vysoce selektivní na homology CDK4/6, když byla vyloučena její interakce s CDK2. Ačkoliv byla potvrzena její selektivita, s ohledem na počet dalších cílů klinicky dostupných inhibitorů (palbociclib, ribociclib, abemaciclib), bude třeba provést navazující experimenty zaměřené právě na další mechanismy účinku na buněčných liniích mimo CDK4/6 (Sumi *et al.*, 2015; Miettinen *et al.*, 2018; Hafner *et al.*, 2019).

Pro obě testované látky byl navíc studován význam pro použití v kombinaci s anti-estrogenní a anti-HER2 terapií. Jelikož se jedná o jeden z hlavních postupů pro zamezení vzniku lékové rezistence, je důležité studovat účinky různých kombinací léčiv (Adon *et al.*, 2021). U použitých kombinací byl po ovlivnění studován vliv na životaschopnost buněk. Ačkoliv kombinace nevykazovaly významnou synergii, stále nelze vyloučit pozitivní vliv na zamezení vzniku rezistence. Navíc tyto výsledky mohly být ovlivněny v důsledku spíše cytostatického působení látek, což nabízí příležitost pro detailnější studium účinku látek při samotném působení a v kombinaci či pro optimalizaci použitých postupů zaměřených spíše na schopnost buněk po ovlivnění proliferovat.



## 7 LITERATURA

- Adon, T., Shanmugarajan, D., Kumar, H. Y. (2021). CDK4/6 inhibitors: a brief overview and prospective research directions. *RSC Advances*, 47 (11), 29227-29246. <https://doi.org/10.1039/D1RA03820F>.
- Albanese, C., D'Amico, M., Reutens, A. T., Fu, M., Watanabe, G., Lee, R. J., Kitsis, R. N., Henglein, B., Avantiaggiati, M., Somasundaram, K., Thimmapaya, B., Pestell, R. G. (1999). Activation of the cyclin D1 gene by the E1A-associated protein p300 through AP-1 inhibits cellular apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 34186–34195. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.48.34186>.
- Ammazzalorso, A., Agamennone, M., De Filippis, B., Fantacuzzi, M. (2021). Development of CDK4/6 Inhibitors: A Five Years Update. *Molecules*, 26, 1488. <https://doi.org/10.3390/molecules26051488>.
- Anders, L., Ke, N., Hydbring, P., Choi, Y. J., Widlund, H. R., Chick, J. M., Zhai, H., Vidal, M., Gygi, S. P., Braun, P., Sicinski, P. (2011). A Systematic Screen for CDK4/6 Substrates Links FOXM1 Phosphorylation to Senescence Suppression in Cancer Cells. *Cancer Cell*, 20 (5), 620–634. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.10.001>.
- Anderson, N. A., Cryan, J., Ahmed, A., Dai, H., McGonagle, G. A., Rozier, C., Benowitz, A. B. (2020). Selective CDK6 degradation mediated by cereblon, VHL, and novel IAP-recruiting PROTACs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 30, 127106. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127106>.
- Antonucci, L. A., Egger, J. V., Krucher, N. A. (2014). Phosphorylation of the Retinoblastoma protein (Rb) on serine-807 is required for association with Bax. *Cell Cycle*, 13(22), 3611–3617. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.964093>.
- Asghar, U., Witkiewicz, A. K., Turner, N. C., Knudsen, E. S. (2015). The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14 (2), 130–146. <https://doi.org/10.1038/nrd4504>.
- Baker, S. J. & Reddy, E. P. (2012). CDK4: A Key Player in the Cell Cycle, Development, and Cancer. *Genes & Cancer*, 3 (11-12), 658–669. <https://doi.org/10.1177/1947601913478972>.
- Barrière, C., Santamaría, D., Cerqueira, A., Galán, J., Martín, A., Ortega, S., Malumbres, M., Dubus, P., Barbacid, M. (2007). Mice thrive without Cdk4 and Cdk2. *Molecular Oncology*, 1, 72-83. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2007.03.001>.
- Bienvenu, F., Gascan, H., Coqueret, O. (2001). Cyclin D1 represses STAT3 activation through a Cdk4-independent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 16840–16847. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100795200>.
- Bilgin, B., Sendur, M. A., Şener, D. D., Akinci, M. B., Yalçın, B. (2017). A current and comprehensive review of cyclin-dependent kinase inhibitors for the treatment of metastatic breast cancer. *Current Medical Research and Opinion*, 33, 1559–1569. <https://doi.org/10.1080/03007995.2017.1348344>.
- Bisi, J. E., Sorrentino, J. A., Jordan, J. L., Darr, D. D., Roberts, P. J., Tavares, F. X., Strum, J. C. (2017). Preclinical development of G1T38: A novel, potent and selective inhibitor of cyclin dependent kinases 4/6 for use as an oral antineoplastic in patients with CDK4/6 sensitive tumors. *Oncotarget*, 8, 42343-42358. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16216>.
- Blain, S.W. (2008). Switching cyclin D-Cdk4 kinase activity on and off. *Cell Cycle*, 7, 892-898. <https://doi.org/10.4161/cc.7.7.5637>.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Bregman, D. B., Pestell, R. G., Kidd, V. J. (2000). Cell cycle regulation and RNA polymerase II. *Frontiers in Bioscience*, 5 (1), 244-257. <https://doi.org/10.2741/bregman>.
- Bockstaele, L., Bisteau, X., Paternot, S., Roger, P. P. (2009). Differential regulation of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and CDK6, evidence that CDK4 might not be activated by CDK7, and design of a CDK6 activating mutation. *Mol Cell Biol*, 29, 4188 – 4200. <https://doi.org/10.1128/MCB.01823-08>.
- Bouclier, C., Simon, M., Laconde, G., Pellerano, M., Diot, S., Lantuejoul, S., Morris, M. C. (2020). Stapled peptide targeting the CDK4/Cyclin D interface combined with Abemaciclib inhibits KRAS mutant lung cancer growth. *Theranostics*, 10 (5), 2008–2028. <https://doi.org/10.7150/thno.40971>.
- Boutros, R., Lobjois, V., Ducommun, B. (2007). CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets?. *Nature Reviews Cancer*, 7, 495-507. <https://doi.org/10.1038/nrc2169>.
- Buchler, T. (2017). Epidemiologie karcinomu prsu. *Acta medicae*, 1, speciál 2017, 6-8. <http://www.actamedicae.cz/literatura.htm>.
- Capparelli, C., Guido, C., Whitaker-Menezes, D., Bonuccelli, G., Balliet, R., Pestell, T. G., Goldberg, A. F., Pestell, R. G., Howell, A., Sneddon, S., Birbe, R., Tsirigos, A., Martinez-Outschoorn, U., Sotgia, F., Lisanti, M. P. (2012). Autophagy and senescence in cancer-associated fibroblasts metabolically supports tumor growth and metastasis via glycolysis and ketone production. *Cell Cycle*, 11 (12), 2285-2302. <https://doi.org/10.4161/cc.20718>.
- Carozzi, F., Confortini, M., Palma, P. D., Mistro, A. D., Gillio-Tos, A., D Marco, L., Giorgi-Rossi, P., Pontenani, S. R., Sani, Ch., Sintoni, C., Segnan, N., Zorzi, M., Cuzick, J., Rizzolo, R., Ronco, G. (2008). Use of p16-INK4A overexpression to increase the specificity of human papillomavirus testing: a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *The Lancet Oncology*, 9, 937–945. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70208-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70208-0).
- CETSA. <https://www.cetsa.org/> [2. 1. 2022].
- Condorelli, R., Spring, L., O’Shaughnessy, J., Lacroix, L., Bailleux, C., Scott, V., Dubois, J., Nagy, R. J., Lanman, R. B., Iafrate, A. J., Andre, F., Bardia, A. (2018). Polyclonal RB1 mutations and acquired resistance to CDK 4/6 inhibitors in patients with metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*, 29 (3), 640–645. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx784>.
- Cornell, L., Wander S. A., Visal T., Wagle N., Shapiro G. I. (2019). MicroRNA-Mediated Suppression of the TGF- $\beta$  Pathway Confers Transmissible and Reversible CDK4/6 Inhibitor Resistance. *Cell Reports*, 26 (10), 2667-2680. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.023>.
- Costa, C., Wang, Y., Ly, A., Hosono, Y., Murchie, E., Walmsley, C. S., Huynh, T., Healy, C., Peterson, R., Yanase, S., Jakubik, C. T., Henderson, L. E., Damon, L. J., Timonina, D., Sanidas, I., Pinto, C. J., Mino-Kenudson, M., Stone, J. R., Dyson, N. J., Ellisen, L. W., Bardia, A., Ebi, H., Benes, C. H., Engelman, J. A., Juric, D. (2020). PTEN Loss Mediates Clinical Cross-Resistance to CDK4/6 and PI3K $\alpha$  Inhibitors in Breast Cancer. *Cancer Discov*, 10(1), 72-85. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0830>.
- Chen, W., Otterson, G., Lipkowitz, S., Otterson, G., Khleif, S., Coxon, A., Kaye, F. (1997). Apoptosis is associated with cleavage of a 5 kDa fragment from RB which mimics dephosphorylation and modulates E2F binding. *Oncogene*, 14, 1243–1248. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201096>.

- Chou, T.-C. & Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*, 22, 27–55. [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0065-2571(84)90007-4).
- Dange, Y., Bhinge, S., Salunkhe, V. (2017). Optimization and validation of RP-HPLC method for simultaneous estimation of palbociclib and letrozole. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 28 (3), 187-194. <https://doi.org/10.1080/15376516.2017.1388458>.
- 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., Jhota, H. (2009). Crystal structure of human CDK4 in complex with a D-type cyclin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106, 4166-4170. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809645106>.
- Deng, Y., Ma, G., Li, W., Wang, T., Zhao, Y., Wu, Q. (2018). CDK4/6 Inhibitors in Combination With Hormone Therapy for HR + /HER2 – Advanced Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Clinical Breast Cancer*, 18(5), 943-953. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2018.04.017>.
- Deshpande, A., Sicinski, P., Hinds, P. W. (2005). Cyclins and cdk in development and cancer: a perspective. *Oncogene*, 24, 2909-2915. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208618>.
- Dickson, C., Fantl, V., Gillett, C., Brookes, S., Bartek, J., Smith, R., Fisher, C., Barnes, D., Peters, G. (1995). Amplification of chromosome band 11q13 and a role for cyclin D1 in human breast cancer. *Cancer Letters*, 90, 43-50. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(94\)03676-a](https://doi.org/10.1016/0304-3835(94)03676-a).
- Diehl, J. A., Zindy, F., Sherr, C. J. (1997). Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes and development*, 11 (8), 957-972. <https://doi.org/10.1101/gad.11.8.957>.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92 (20), 9363–9367. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363>.
- Diril, M. K., Ratnacaram, C. K., Padmakumar, V. C., Du, T., Wasser, M., Coppola, V., Tessarollo, L., Kaldis, P. (2012). Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) is essential for cell division and suppression of DNA re-replication but not for liver regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (10), 3826-3831. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115201109>.
- Doi, T., Hewes, B., Kakizume, T., Tajima, T., Ishikawa, N., Yamada, Y. (2017). Phase I study of single-agent ribociclib in Japanese patients with advanced solid tumors. *Cancer Science*, 109 (1), 193–198. <https://doi.org/10.1111/cas.13428>.
- Echalier, A., Endicott, J. A., Noble, M. E. (2010). Recent developments in cyclin-dependent kinase biochemical and structural studies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804 (3), 511-519. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.10.002>.
- Elmi, A., Makvandi, M., Weng, C. C., Hou, C., Clark, A. S., Mach, R. H., Mankoff, D. A. (2019). Cell-proliferation imaging for monitoring response to CDK4/6 inhibition combined with endocrine-therapy in breast cancer: Comparison of [18F]FLT and [18F]ISO-1 PET/CT. *Clinical Cancer Research*, 25 (10), 3063-3073. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-18-2769>.
- Fassl, A., Brain, C., Abu-Remaileh, M., Stukan, I., Butter, D., Stepien, P., Feit, A. S., Bergholz, J., Michowski, W., Otto, T., Sheng, Q., Loo, A., Michael, W., Tiedt, R., DeAngelis, C., Schiff, R., Jiang, B., Jovanovic, B., Nowak, K., Ericsson, M., Cameron, M., Gray, N., Dillon, D., Zhao, J. J., Sabatini, D. M., Jeselsohn, R., Brown, M., Polyak, K., Sicinski, P. (2020).

- Increased lysosomal biomass is responsible for the resistance of triple-negative breast cancers to CDK4/6 inhibition. *Science Advances*, 6 (25). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb2210>.
- Finn, R. S., Dering, J., Conklin, D., Kalous, O., Cohen, D. J., Desai, A. J., Ginther, C., Atefi, M., Chen, I., Fowst, C., Los, G., Slamon, D. J. (2009). PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Res*, 11(5), R77. <https://doi.org/10.1186/bcr2419>.
- Fínek, J. (2017). Léčba karcinomu prsu. *Acta medicae*, 1, speciál 2017, 24-25. <http://www.actamedicinae.cz/literatura.htm>.
- Fisusi, F. A., & Akala, E. O. (2019). Drug Combinations in Breast Cancer Therapy. *Pharmaceutical nanotechnology*, 7(1), 3–23. <https://doi.org/10.2174/2211738507666190122111224>.
- Fry, D. W., Harvey, P. J., Keller, P. R., Elliott, W. L., Meade, M., Trachet, E., Albassam, M., Zheng, X., Leopold, W. R., Pryer, N. K., Toogood, P. L. (2004). Specific inhibition of cyclindependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3 (11), 1427–1438. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15542782/>.
- Fu, M., Rao, M., Wang, C., Sakamaki, T., Wang, J., Di Vizio, D., Zhang, X., Albanese, C., Balk, S., Chang, C., Fan, S., Rosen, E., Palvimo, J. J., Janne, O. A., Muratoglu, S., Avantaggiati, M. L., Pestell, R. G. (2003). Acetylation of androgen receptor enhances coactivator binding and promotes prostate cancer cell growth. *Molecular and Cell Biology*, 23, 8563–8575. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.23.8563-8575.2003>.
- Fu, M., Wang, C., Li, Z., Sakamaki, T., Pestell, R. G. (2004). Minireview: Cyclin D1: Normal and Abnormal Functions. *Endocrinology*, 145 (12), 5439–5447. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0959>.
- Gelbert, L. M., Cai, S., Lin, X., Sanchez-Martinez, C., del Prado, M., Lallena, M. J., Torres, R., Ajamie, R. T., Wishart, G. N., Flack, R. S., Neubauer, B. L., Young, J., Chan, E. M., Iversen, P., Cronier, D., Kreklau, E., 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. <https://doi.org/10.1007/s10637-014-0120-7>.
- Gene Cards. [https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CCND1#domains\\_families](https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CCND1#domains_families) [2. 2. 2022].
- Gene Cards. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CDK4> [2. 2. 2022].
- Goel, S., Wang, Q., Watt, A. C., Tolaney, S. M., Dillon, D. A., Li, W., Ramm, S., Palmer, A. C., Yuzugullu, H., Varadan, V., Tuck, D., Harris, L. N., Wong, K. K., Liu, X. S., Sicinski, P., Winer, E. P., Krop, I. E., Zhao, J. J. (2016). Overcoming Therapeutic Resistance in HER2-Positive Breast Cancers with CDK4/6 Inhibitors. *Cancer Cell*, 29 (3), 255–269. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.02.006>.
- Goel, S., DeCristo, M. J., McAllister, S. S., Zhao, J. J. (2018). CDK4/6 Inhibition in Cancer: Beyond Cell Cycle Arrest. *Trends in cell biology*, 28 (11), 911–925. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.07.002>.
- Guha, M. (2012). Cyclin-dependent kinase inhibitors move into Phase III. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11 (12), 892–894. <https://doi.org/10.1038/nrd3908>.

- Guiley, K. Z., Stevenson, J. W., Lou, K., Barkovich, K. J., Kumarasamy, V., Wijeratne, T. U., Bunch, K. L., Tripathi, S., Knudsen, E. S., Witkiewitz, A. K., Shokat, K. M., Rubin, S. M. (2019). p27 allosterically activates cyclin-dependent kinase 4 and antagonizes palbociclib inhibition. *Science*, 366(6471), eaaw2106. <https://doi.org/10.1126/science.aaw2106>.
- Guo, Z. & Stiller, J. W. (2004). Comparative genomics of cyclin-dependent kinases suggest co-evolution of the RNAP II C-terminal domain and CTD-directed CDKs. *BMC Genomics*, 5 (1), 69. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-5-69>.
- Hafner, M., Mills, C. E., Subramanian, K., Chen, C., Chung, M., Boswell, S. A., Everley, R. A., Liu, C., Walmsley, C. S., Juric, D., Sorger, P. K. (2019). Multiomics Profiling Establishes the Polypharmacology of FDA-Approved CDK4/6 Inhibitors and the Potential for Differential Clinical Activity. *Cell Chem Biol.*, 26(8), 1067-1080.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.05.005>.
- Hinds, P. W., Mitnacht, S., Dulic, V., Arnold, A., Reed, S. I., & Weinberg, R. A. (1992). Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell*, 70 (6), 993–1006. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90249-c](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90249-c).
- Hosokawa, Y. & Arnold, A. (1998). Mechanism of cyclin D1 (CCND1, PRAD1) overexpression in human cancer cells: analysis of allele-specific expression. *Genes Chromosomes Cancer*, 22 (1), 66–71. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2264\(199805\)22:1<66::aid-gcc9>3.0.co;2-5](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2264(199805)22:1<66::aid-gcc9>3.0.co;2-5).
- Huber, K. V. M., Olek, K. M., Müller, A. C., Tan, C. S. H., Bennett, K. L., Colinge, J., Superti-Furga, G. (2015). Proteome-wide drug and metabolite interaction mapping by thermal-stability profiling. *Nature Methods*, 12 (11), 1055–1057. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3590>.
- Iwata, H., Im, S. A., Masuda, N., Im, Y. H., Inoue, K., Rai, Y., Nakamura, R., Kim, J. H., Hoffman, J. T., Zhang, K., Giorgetti, C., Iyer, S., Schnell, P. T., Bartlett, C. H., Ro, J. (2017). PALOMA-3: Phase III trial of fulvestrant with or without palbociclib in premenopausal and postmenopausal women with hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer that progressed on prior endocrine therapy-safety and efficacy in Asian patients. *Journal of global oncology*, 3 (4), 289–303. <https://doi.org/10.1200/JGO.2016.008318>.
- Jafari, R., Almqvist, H., Axelsson, H., Ignatushchenko, M., Lundbäck, T., Nordlund, P., Molina, D. M. (2014). The cellular thermal shift assay for evaluating drug target interactions in cells. *Nature Protocols*, 9 (9), 2100–2122. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.138>.
- Jansa, J., Jorda, R., Škerlová, J., Pachel, P., Peřina, M., Řezníčková, E., Heger, T., Gucký, T., Řezáčová, P., Lyčka, A., Kryštof, V. (2021). Imidazo[1,2-c]pyrimidin-5(6H)-one inhibitors of CDK2: Synthesis, kinase inhibition and co-crystal structure. *Eur J Med Chem*, 216, 113309. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113309>.
- 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. <https://doi.org/10.1101/gad.851100>.
- Jhan, J. R. & Andrechek, E. R. (2017). Triple-negative breast cancer and the potential for targeted therapy. *Pharmacogenomics*, 18(17), 1595-1609. <https://doi.org/10.2217/pgs-2017-0117>.
- Jiang, B., Wang, E.S., Donovan, K.A., Liang, Y., Fischer, E.S., Zhang, T., Gray, N.S. (2019). Development of dual and selective degraders of cyclin-dependent kinases 4 and 6. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 58, 6321–6326. <https://doi.org/10.1002/anie.201901336>.

- Johnson, D. G. & Walker, C. L. (1999). CYCLINS AND CELL CYCLE CHECKPOINTS. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39 (1), 295–312. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1>.
- Jorda, R., Havlíček, L., McNae, I. W., Walkinshaw, M. D., Voller, J., Štunc, A., Navrátilová, J., Kuzma, M., Mistřík, M., Bártek, J., Strnad, M., Kryštof, V. (2011). Pyrazolo[4,3-d]pyrimidine Bioisostere of Roscovitine: Evaluation of a Novel Selective Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases with Antiproliferative Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(8), 2980–2993. doi:10.1021/jm200064p.
- Jorda, R., Schütznerová, E., Cankař, P., Brychtová, V., Navrátilová, J., Kryštof, V. (2015). Novel arylazopyrazole inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Bioorg Med Chem*, 23(9), 1975–1981. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.03.025>.
- Jorda, R., Havlíček, L., Štunc, A., Tušková, D., Daumová, L., Alam, M., Škerlová, J., Nekardová, M., Peřina, M., Pospíšil, T., Šíroká, J., Urbánek, L., Pachel, P., Řezáčová, P., Strnad, M., Klener, P., Kryštof, V. (2019). 3,5,7-Substituted Pyrazolo[4,3-d]pyrimidine Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases and Their Evaluation in Lymphoma Models. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(9), 4606–4623. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00189>.
- Juric, D., Ismail-Khan, R., Campone, M., García-Estévez, L., Becerra, C., De Boer, R., Hamilton, E., Mayer, I. A., Hui, R., Lathrop, K. I., Asano, S., Bhansali, S. G., Zhang, V., Hewes, B., Munster, P. (2016). Phase Ib study of ribociclib and alpelisib and letrozole in ER+, HER2–advanced breast cancer: Safety, preliminary efficacy, and molecular analysis. *Cancer Research*, 76 (4), Abstract P3-14-01. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.SABCS15-P3-14-01>.
- Khan, S., He, Y., Zhang, X., Yuan, Y., Pu, S., Kong, Q., Zheng, G., Zhou, D. (2020). PROTeolysis TArgeting Chimeras (PROTACs) as emerging anticancer therapeutics. *Oncogene*, 39 (26), 4909–4924. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1336-y>.
- Kim, S., Tiedt, R., Loo, A., Horn, T., Delach, S., Kovats, S., Haas, K., Engstler, B. S., Cao, A., Pinzon-Ortiz, M., Mulford, I., Acker, M. G., Chopra, R., Brain, C., di Tomaso, E., Sellers, W. R., Caponigro, G. (2018). The potent and selective cyclin-dependent kinases 4 and 6 inhibitor ribociclib (LEE011) is a versatile combination partner in preclinical cancer models. *Oncotarget*, 9 (81), 35226–35240. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26215>.
- King, R. W., Jackson, P. K., Kirschner, M. W. (1994). Mitosis in transition. *Cell*, 79 (4), 563–571. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90542-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90542-8).
- Konstantinidou, M., Li, J., Zhang, B., Wang, Z., Shaabani, S., Brake, F. T., Essa, K., Domling, A. (2019). PROTACs– a game-changing technology. *Expert Opin. Drug Discovery*, 14 (12), 1255–1268. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1659242>.
- Kotake, Y., Naemura, M., Murasaki, Ch., Inoue, Y., Okamoto, H. (2015). Transcriptional Regulation of the p16 Tumor Suppressor Gene. *Anticancer research*, 35, 4397–4402. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26168478>.
- Knights, C. D., Catania, J., Giovanni, S. D., Muratoglu, S., Perez, R., Swartzbeck, A., Swartzbeck, A., Quong, A. A., Zhang, X., Beerman, T., Pestell, R. G., Avantiaggiati, M. L. (2006). Distinct p53 acetylation cassettes differentially influence gene-expression patterns and cell fate. *The Journal of Cell Biology*, 173 (4), 533–544. <https://doi.org/10.1083/jcb.200512059>.
- Kryštof, V. & Strnad, M. (2001). Inhibitory cyklin dependentních kinas. *Chemické listy*, 95, 295–300. <https://www.chemicke-listy.cz/docs/full/archiv/2001/05-PDF/295-300.pdf>.

- Lansu K. & Gentile S. (2013). Potassium channel activation inhibits proliferation of breast cancer cells by activating a senescence program. *Cell death and disease*, 4, e652. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.174>.
- Lehner, C. F. & O'Farrell, P. H. (1989). Expression and function of drosophila cyclin A during embryonic cell cycle progression. *Cell*, 56 (6), 957–968. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90629-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90629-6).
- Li, R., Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., Stillman, B. (1994). Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNAdependent DNA replication and repair. *Nature*, 371, 534–537. <https://doi.org/10.1038/371534a0>. **a**
- Li, Y., Nichols, M. A, Shay JW, Xiong Y. (1994). Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. *Cancer Research*, 54, 6078–6082. <https://doi.org/10.1.1.319.7885>. **b**
- Li, Z., Wang, X., Eksterowicz, J., Gribble, M. W., Alba, G. Q., Ayres, M., Cho, R. (2014). Discovery of AMG 925, a FLT3 and CDK4 Dual Kinase Inhibitor with Preferential Affinity for the Activated State of FLT3. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57 (8), 3430–3449. <https://doi.org/10.1021/jm500118j>.
- Li, H., Sun, X., Miller, E., Wang, Q., Tao, P., Liu, L., Zhao, Y., Wang, M., Qi, Y., Li, J. (2017). BMI, reproductive factors, and breast cancer molecular subtypes: A case-control study and meta-analysis. *Journal of Epidemiology*, 27 (4), 143-151. <https://doi.org/10.1016/j.je.2016.05.002>.
- Li, Z., Razavi, P., Li, Q., Toy, W., Liu, B., Ping, Ch., Hsieh, W., Sanchez-Vega, F., Brown, D., Da Cruz-Paula, A. F., Morris, L., Selenica, P., Eichenberger, E., Shen, R., Schultz, N., Scaltriti, M., Brogi, E., Baselga, J., Reis-Filho, J. S., Chandarlapaty, S. (2018). Loss of the FAT1 Tumor Suppressor Promotes Resistance to CDK4/6 Inhibitors via the Hippo Pathway. *Cancer Cell*, 34, 893-905. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.11.006>.
- Lin, S. Y., Xia, W., Wang, J. C., Kwong, K. Y., Spohn, B., Wen, Y., Pestell, R. G., Hung, M. C. (2000).  $\beta$ -Catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 4262–4266. <https://doi.org/10.1073/pnas.060025397>.
- Lin, D. I., Barbash, O., Kumar, K. G., Weber, J. D., Harper, J. W., Klein-Szanto, A. J., Rustgi, A., Fuchs, S. Y., Diehl, A. J. (2006). Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin D1 by the SCF (Fbx4- $\alpha$ B crystallin) complex. *Molecular Cell*, 24, 355-366. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.09.007>.
- Liu, J. & Kipreos, E. T. (2000). Evolution of Cyclin-Dependent Kinases (CDKs) and CDK-Activating Kinases (CAKs): Differential Conservation of CAKs in Yeast and Metazoa. *Molecular Biology and Evolution*, 17 (7), 1061–1074. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev>.
- Liu, M., Xu, S., Wang, Y., Li, Y., Li, Y., Zhang, H., Liu, H., Chen, J. (2016). PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, sensitizes lung cancer cells to treatment with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Oncotarget*, 7 (51), 84951–84964. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13069>.
- Liu, C. Y., Lau, K. Y., Hsu, C. C., Chen, J. L., Lee, C. H., Huang, T. T., Chen, Y. T., Huang, C. T., Lin, P. H., Tseng, L. M. (2017). Combination of palbociclib with enzalutamide shows in vitro activity in RB proficient and androgen receptor positive triple negative breast cancer cells. *PLoS One*, 12(12), e0189007. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189007>.

- Liu, M., Liu, H., Chen, J. (2018). Mechanisms of the CDK4/6 inhibitor palbociclib (PD 0332991) and its future application in cancer treatment (Review). *Oncology Reports*, 1, 901-911. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6221>. **a**
- Liu, Y., Xu, J., Choi, H. H., Han, C., Fang, Y., Li, Y., Jeught, K., Xu, H., Zhang, L., Frieden, M., Wang, L., Eyvani, H., Sun, Y., Zhao, G., Zhang, Y., Liu, S., Wan, J., Huang, Ch., Ji., G., Lu., X., He, X., Zhang, X. (2018). Targeting 17q23 amplicon to overcome the resistance to anti-HER2 therapy in HER2+ breast cancer. *Nature Communications*, 9 (1), 4718. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07264-0>. **b**
- Llanos, S., Megias, D., Blanco-Aparicio, C., Hernández-Encinas, E., Rovira, M., Pietrocola, F., Serrano, M. (2019). Lysosomal trapping of palbociclib and its functional implications. *Oncogene*, 38, 3886-3902. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0695-8>.
- Long, F., He, Y., Fu, H., Li, Y., Bao, X., Wang, Q., Wang, Y., Xie, Ch., Lou, L. (2019). Preclinical characterization of SHR 6390, a novel CDK 4/6 inhibitor, in vitro and in human tumor xenograft models. *Cancer Science*, 110 (4), 1420-1430. <https://doi.org/10.1111/cas.13957>.
- Lukas, J., Bartkova, J., Rohde, M., Strauss, M., Bartek, J. (1995). Cyclin D1 is dispensable for G1 control in retinoblastoma gene-deficient cells independently of cdk4 activity. *Molecular and Cellular Biology*, 15, 2600–2611. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.5.2600>. **a**
- Lukas, J., Parry, D., Aagaard, L., Mann, D. J., Bartkova, J., Strauss, M., Peters, G., Bartek, J. (1995). Retinoblastomaprotein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature*, 375, 503–506. <https://doi.org/10.1038/375503a0>. **b**
- Malumbres, M. & Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 1 (3), 222–231. <https://doi.org/10.1038/35106065>.
- Malumbres, M., Harlow, E., Hunt, T., Hunter, T., Lahti, J. M., Manning, G., Morgan, D. O., Tsai, L.-H., Wolgemuth, D. J. (2009). Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nature Cell Biology*, 11 (11), 1275–1276. <https://doi.org/10.1038/ncb1109-1275>.
- Malumbres, M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology*, 15 (6), 122. <https://doi.org/10.1186/gb4184>.
- Massagué, J. (2004). G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*, 432 (7015), 298–306. <https://doi.org/10.1038/nature03094>.
- Matsuura, I., Denissova, N. G., Wang, G., He, D., Long, J., Liu, F. (2004). Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature*, 430 (6996), 226-231. <https://doi.org/10.1038/nature02650>.
- McInnes, C., Wang, S., Anderson, S., O'Boyle, J., Jackson, W., Kontopidis, G., Meades, Ch., Mezna, M., Thomas, M., Wood, G., Lane, D. P., Fischer, P. M. (2004). Structural Determinants of CDK4 Inhibition and Design of Selective ATP Competitive Inhibitors. *Chemistry & Biology*, 11 (4), 525–534. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.03.02>.
- McIntosh, G. G., Anderson, J. J., Milton, I., Steward, M., Parr, A. H., Thomas, M. D., Henry, J. A., Angus, B., Lennard, T. W., Horne, C. H. (1995). Determination of the prognostic value of cyclin D1 overexpression in breast cancer. *Oncogene*, 11 (5), 885-891. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7675447/>.
- Medscape. <http://emedicine.medscape.com/article/1945957-overview> [4. 2. 2022].
- Miettinen, T. P., Peltier, J., Härtlova, A., Gierliński, M., Jansen, V. M., Trost, M., Björklund, M. (2018). Thermal proteome profiling of breast cancer cells reveals proteasomal activation by



- CDK4/6 inhibitor palbociclib. *The EMBO Journal*, 37 (10), e98359. <https://doi.org/10.15252/embj.201798359>.
- Molenaar, J. J., Ebus, M. E., Koster, J., van Sluis, P., van Noesel, C. J., Versteeg, R., Caron, H. N. (2008). Cyclin D1 and CDK4 activity contribute to the undifferentiated phenotype in neuroblastoma. *Cancer Research*, 68, 2599–2609. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5032>.
- Molina, D. M., Jafari, R., Ignatushchenko, M., Seki, T., Larsson, E. A., Dan, Ch., Sreekumar, L., Cao, Y., Nordlund, P. (2013). Monitoring Drug Target Engagement in Cells and Tissues Using the Cellular Thermal Shift Assay. *Science*, 341 (6141), 84–87. <https://doi.org/10.1126/science.1233606>.
- Morgan, D. O. (1997). CYCLIN-DEPENDENT KINASES: Engines, Clocks, and Microprocessors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13 (1), 261–291. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1>.
- Murphy, C. G. (2019). The Role of CDK4/6 Inhibitors in Breast Cancer. *Curr Treat Options Oncol.*, 20(6), 52. <https://doi.org/10.1007/s11864-019-0651-4>.
- Nacarelli, T. & Sell, C. (2017). Targeting metabolism in cellular senescence, a role for intervention. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 455, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.08.049>.
- Nebenfuehr, S., Kollmann, K., Sexl, V. (2020). The role of CDK6 in cancer. *International Journal of Cancer*, 29 (15), 4188–4200. <https://doi.org/10.1002/ijc.33054>.
- Niesvizky, R., Badros, A. Z., Costa, L. J., Ely, S. A., Singhal, S. B., Stadtmauer, E. A., Haideri, N. A., Yacoub, A., Hess, G., Lentzsch, S., Spicka, I., Chanan-Khan, A. A., Raab, M. S., Tarantolo, S., Vij, R., Zonder, J. A., Huang, X., Jayabalan, D., Di Liberto, M., Huang, X., Jiang, Y., Kim, S. T., Randolph, S., Chen-Kiang, S. (2015). Phase 1/2 study of cyclin-dependent kinase (CDK)4/6 inhibitor palbociclib (PD-0332991) with bortezomib and dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma. *Leukemia & Lymphoma*, 56 (12), 3320-3328. <https://doi.org/10.3109/10428194.2015.1030641>.
- Nigg, E. A. (1993). Targets of cyclin-dependent protein kinases. *Current Opinion in Cell Biology*, 5 (2), 187-193. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(93\)90101-u](https://doi.org/10.1016/0955-0674(93)90101-u).
- O'Brien, N. A., McDermott M. S. J., Conklin D., Luo, T., Ayala, R., Salgar, S., Chau, K., DiTomaso, E., Babbar, N., Su, F., Gaither, A., Huttvitz, S. A., Linnartz, R., Rose, K., Hirawat, S., Slamon, D. J. (2020). Targeting activated PI3K/mTOR signaling overcomes acquired resistance to CDK4/6-based therapies in preclinical models of hormone receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Research*, 22 (1), 1-17. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01320-8>.
- O’Leary, B., Finn, R. S., Turner, N. C. (2016). Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 13 (7), 417–430. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.26>.
- Otterson, G. A., Modi, S., Nguyen, K., Coxon, A. B., Kaye, F. J. (1999). Temperature-sensitive RB mutations linked to incomplete penetrance of familial retinoblastoma in 12 families. *Am J Hum Genet*, 65, 1040 – 1046. <https://doi.org/10.1086/302581>.
- Parise, C. A. & Caggiano, V. (2017). Risk factors associated with the triple--negative breast cancer subtype within four race/ethnicities. *Breast Cancer Research and Treatment*, 163 (1), 151–158. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4159-y>.

- Parry, D., Guzi, T., Shanahan, F., Davis, N., Prabhavalkar, D., Wiswell, D., Seghezzi, W., Paruch, K., Dwyer, M. P., Doll, R., Nomeir, A., Windsor, W., Fischmann, T., Wang, Y., Oft, M., Chen, T., Kirschmeier, P., Lees, E. M. (2010). Dinaciclib (SCH 727965), a novel and potent cyclin-dependent kinase inhibitor. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9 (8), 2344–2353. <https://doi.org/10.1158/1535-7163>.
- Pavletich, N. P. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *Journal of Molecular Biology*, 287, 821–828. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2640>.
- Perkin Elmer. <https://www.perkinelmer.com/lab-products-and-services/application-support-knowledgebase/alpha-cetsa-knowledgebase.html> [2. 1. 2022].
- Petrova, N. V., Velichko, A. K., Razin, S. V., Kantidze, O. L. (2016). Small molecule compounds that induce cellular senescence. *Aging Cell*, 15 (6), 999–1017. <https://doi.org/10.1111/acel.12518>.
- Peyressatre, M., Prével, C., Pellerano, M., Morris, C. (2015). Targeting Cyclin-Dependent Kinases in Human Cancers: From Small Molecules to Peptide Inhibitors. *Cancers*, 7, 179–237. <https://doi.org/10.3390/cancers7010179>.
- Powell, K., & Prasad, V. (2021). Concerning FDA approval of trilaciclib (Cosela) in extensive-stage small-cell lung cancer. *Translational oncology*, 14(11), 101206. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101206>.
- Rader, J., Russell, M. R., Hart, L. S., Nakazawa, M. S., Belcastro, L. T., Martinez, D., Li, Y., Carpenter, E. L., Attiyeh, E. F., Diskin, S. J., Kim, S., Parasuraman, S., Caponigro, G., Schnepf, R. W., Wood, A. C., Pawel, B., Cole, K. A., Maris, J. M. (2013). Dual CDK4/CDK6 inhibition induces cell-cycle arrest and senescence in neuroblastoma. *Clin Cancer Res.*, 19 (22), 6173–6182. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1675>.
- Ramachandran, R. P., Madhivanan, S., Sundararajan, R., Lin, W., Sankaranarayanan, K. (2014). An in vitro study of electroporation of leukemia and cervical cancer cells. *Electroporation-Based Therapies for Cancer*, 1, 161–183. <https://doi.org/10.1533/9781908818294.161>.
- Rana, S., Bendjennat, M., Kour, S., King, H. M., Kizhake, S., Zahid, M., Natarajan, A. (2019). Selective degradation of CDK6 by a palbociclib based PROTAC. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 29, 1375–1379. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.03.035>.
- Raspé, E., Coulonval, K., Pita, J. M., Paternot, S., Rothé, F., Twyffels, L., Brohée, S., Craciun, L., Larsimont, D., Kruys, V., Sandras, F., Salmon, I., Van Laere, S., Piccart, M., Ignatiadis, M., Sotiriou, Ch., Roger, P. P. (2017). CDK4 phosphorylation status and a linked gene expression profile predict sensitivity to palbociclib. *EMBO Molecular Medicine*, 9 (8), 1052–1066. <https://doi.org/10.15252/emmm.201607084>.
- Rickert, P., Seghezzi, W., Shanahan, F., Cho, H., Lees, E. (1996). Cyclin C/CDK8 is a novel CTD kinase associated with RNA polymerase II. *Oncogene*, 12, 2631–2640. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8700522/>.
- Roskoski, R. (2016). Cyclin-dependent protein kinase inhibitors including palbociclib as anticancer drugs. *Pharmacological Research*, 107, 249–275. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.03.012>.
- Royce, M., Osgood, C., Mulkey, F., Bloomquist, E., Pierce, W. F., Roy, A., Kalavar, S., Ghosh, S., Philip, R., Rizvi, F., Mixter, B. D., Tang, S., Pazdur, R., Beaver, J. A., Amiri-Kordestani, L. (2022). FDA Approval Summary: Abemaciclib With Endocrine Therapy for High-Risk Early Breast Cancer. *J Clin Oncol*, 40 (11), 1155–1162. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.02742>.

- Sanchez-Martinez, C., Gelbert, L. M., Shannon, H., De Dios, A., Staton, B. A., Ajamie, R. T., Sawada, G., Wishart, G. N., Raub, T. J. (2011). LY2835219, a potent oral inhibitor of the cyclin-dependent kinases 4 and 6 (CDK4/6) that crosses the blood–brain barrier and demonstrates in vivo activity against intracranial human brain tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10, Abstract B234. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.TARG-11-B234>.
- Scaltriti, M., Eichhorn, P. J., Cortés, J., Prudkin, L., Aura, C., Jiménez, J., Chandarlapaty, S., Serra, V., Prat, A., Ibrahim, Y. H., Guzmán, M., Gili, M., Rodríguez, O., Rodríguez, S., Pérez, J., Green, S. R., Mai, S., Rosen, N., Hudis, C., Baselga, J. (2011). Cyclin E amplification/overexpression is a mechanism of trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (9), 3761–3766. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014835108>.
- Shafiq, M. I., Steinbrecher, T., Schmid, R. (2012). Fascaplysin as a specific inhibitor for CDK4: Insights from molecular modelling. *PLoS ONE*, 7 (8), e42612. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042612>.
- Sharma, G. N., Dave, R., Sanadya, J., Sharma, P., Sharma, K. K. (2010). Various types and management of breast cancer: an overview. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 1 (2), 109-126. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22247839/>.
- Schafer, K. A. (1998). The Cell Cycle: A Review. *Veterinary Pathology*, 35 (6), 461–478. <https://doi.org/10.1177/030098589803500601>.
- Scheicher, R., Hoelbl-Kovacic, A., Bellutti, F., Tigan, A. S., Prchal-Murphy, M., Heller, G., Schneckleithner, C., Salazar-Roa, M., Zöchbauer-Müller, S., Zuber, J., Malumbres, M., Kollmann, K., Sexl, V. (2015). CDK6 as a key regulator of hematopoietic and leukemic stem cell activation. *Blood*, 125 (1), 90-101. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-06-584417>.
- Schwartz, G. K., LoRusso, P. M., Dickson, M. A., Randolph, S. S., Shaik, M. N., Wilner, K. D., Courtney, R., O'Dwyer, P. J. (2011). Phase I study of PD 0332991, a cyclin-dependent kinase inhibitor, administered in 3-week cycles (Schedule 2/1). *British Journal of Cancer*, 104, 1862–1868. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.177>.
- Small, J., Washburn, E., Millington, K., Zhu, J., Holder, S. L. (2017). The addition of abemaciclib to sunitinib induces regression of renal cell carcinoma xenograft tumors. *Oncotarget*, 8(56), 95116-95134. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19618>.
- Sobhani, N., D'Angelo, A., Pittacolo, M., Roviello, G., Miccoli, A., Corona, S. P., Bernocchi, O., Generali, D., Otto, T. (2019). Updates on the CDK4/6 Inhibitory Strategy and Combinations in Breast Cancer. *Cells*, 8(4), 321. <https://doi.org/10.3390/cells8040321>.
- Soumarová, R. (2017). Aktualita radioterapie časného karcinomu prsu. *Acta medicae*, 1, speciál 2017, 18-20. <http://www.actamedicinae.cz/literatura.htm>.
- Su, S., Yang, Z., Gao, H., Yang, H., Zhu, S., An, Z., Wang, J., Li, Q., Chandarlapaty, S., Deng, H. (2019). Potent and preferential degradation of CDK6 via proteolysis targeting chimera degraders. *J. Med. Chem.*, 62, 7575–7582. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00871>.
- Sumi, N., Kuenzi, B., Knezevic, C., Rix, L., Rix, U. (2015). Chemoproteomics reveals novel protein and lipid kinase targets of clinical CDK4/6 inhibitors in lung cancer. *ASC Chemical Biology*, 10 (12), 2680–2686. <https://doi.org/10.1021/acschembio.5b00368>.
- Syed, Y. Y. (2017). Ribociclib: First Global Approval. *Drugs*, 77 (7), 799-807. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0742-0>.
- Szostakowska, M., Trębińska-Stryjewska, A., Grzybowska, E. A., Fabisiwicz, A. (2018). Resistance to endocrine therapy in breast cancer: molecular mechanisms and future goals.

- Breast Cancer Research and Treatment*, 173, 489-497. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-5023-4>.
- Tadesse, S., Yu, M., Mekkonen, L., Lam, F., Islam, S., Tomusange, K., Rahaman, M., Noll, B., Basnet, S. K. C., Teo, T., Albrecht, H., Milne, R., Wang, S. (2017). Highly Potent, Selective, and Orally Bioavailable 4-Thiazol-N-(pyridin-2-yl)pyrimidin-2-amine Cyclin-Dependent Kinases 4 and 6 Inhibitors as Anticancer Drug Candidates: Design, Synthesis, and Evaluation. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60 (5), 1892–1915. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01670>.
- Tan, A. R., Wright, G. S., Thummala, A. R., Danso, M. A., Popovic, L., Pluard, T. J., O'Shaughnessy, J. (2019). Trilaciclib plus chemotherapy versus chemotherapy alone in patients with metastatic triple-negative breast cancer: a multicentre, randomised, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, 20 (11), 1587-1601. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(19\)30616-3](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(19)30616-3).
- Teh, J. L., Purwin, T. J., Greenawalt, E. J., Chervoneva, I., Goldberg, A., Davies, M. A., Aplin, A. E. (2016). An in vivo reporter to quantitatively and temporally analyze the effects of CDK4/6 inhibitor-based therapies in melanoma. *Cancer Research*, 76, 5455–5466. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3384>.
- Tominaga, K. (2015). The emerging role of senescent cells in tissue homeostasis and pathophysiology. *Pathobiology of Aging & Age-Related Diseases*, 5 (1), 27743. <https://doi.org/10.3402/pba.v5.27743>.
- Torres-Guzmán, R., Calsina, B., Hermoso, A., Baquero, C., Alvarez, B., Amat, J., McNulty, A. M., Gong, X., Boehnke, K., Du, J., de Dios, A., Beckmann, R. P., Buchanan, S., Lallena, M. J. (2017). Preclinical characterization of abemaciclib in hormone receptor positive breast cancer. *Oncotarget*, 8(41), 69493-69507. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17778>.
- Tripathy, D., Bardia, A., Sellers, W. R. (2017). Ribociclib (LEE011): Mechanism of Action and Clinical Impact of This Selective Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor in Various Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*, 23 (13), 3251–3262. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-16-3157>.
- Uitdehaag, J. C. M., Kooijman, J. J., de Roos, J. A. D. M., Prinsen, M. B. W., Dylus, J., Willemsen-Seegers, N., Kawase, Y., Sawa, M., de Man, J., van Gerwen, S. J. C., Buijsman, R. C., Zaman, G. J. R. (2019). Combined Cellular and Biochemical Profiling to Identify Predictive Drug Response Biomarkers for Kinase Inhibitors Approved for Clinical Use between 2013 and 2017. *Mol Cancer Ther*, 18 (2), 470-481. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-0877>.
- Valenzuela, C. A., Vargas, L., Martinez, V., Bravo, S., Brown, N. E. (2017). Palbociclib-induced autophagy and senescence in gastric cancer cells. *Experimental Cell Research*, 360 (2), 390–396. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.09.031>.
- VanderWel, S. N., Harvey, P. J., McNamara, D. J., Repine, J. T., Keller, P. R., Quin, J. 3rd, Booth, R. J., Elliott, W. L., Dobrusin, E. M., Fry, D. W., Toogood, P. L. (2005). Pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-ones as specific inhibitors of cyclin-dependent kinase 4. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(7), 2371-2387. <https://doi.org/10.1021/jm049355+>.
- Walker, D. H. & Maller, J. L. (1991). Role for cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication. *Nature*, 354 (6351), 314–317. <https://doi.org/10.1038/354314a0>.
- Walker, A. J., Wedam, S., Amiri-Kordestani, L., Bloomquist, E., Tang, S., Sridhara, R., Chen, W., Palmby, T. R., Fourie Zirkelbach, J., Fu, W., Liu, Q., Tilley, A., Kim, G., Kluetz, P. G.,

- McKee, A. E., Pazdur, R. (2016). FDA Approval of Palbociclib in Combination with Fulvestrant for the Treatment of Hormone Receptor-Positive, HER2-Negative Metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res*, 22 (20), 4968-4972. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0493>.
- Wang, C., Li, Z., Fu, M., Bouras, T., & Pestell, R. G. (2004). Signal Transduction Mediated by Cyclin D1: from Mitogens to Cell Proliferation: A Molecular Target with Therapeutic Potential. *Cancer Treatment and Research*, 119, 217–237. [https://doi.org/10.1007/1-4020-7847-1\\_11](https://doi.org/10.1007/1-4020-7847-1_11).
- Wang, H., Nicolay, B. N., Chick, J. M., Gao, X., Geng, Y., Ren, H., Gao, H., Yang, G., Williams, J. A., Suski, J. M., Keibler, M. A., Sicinska, E., Gerdemann, U., Haining, W. N., Roberts, T. M., Polyak, K., Gygi, S. P., Dyson, N. J., Sicinski, P. (2017). The metabolic function of cyclin D3-CDK6 kinase in cancer cell survival. *Nature*, 546(7658), 426-430. <https://doi.org/10.1038/nature22797>.
- Watkins, E. J. (2019). Overview of breast cancer. *Journal of the American Academy of Physician Assistants*, 32 (10), 13–17. <https://doi.org/10.1097/01.jaa.0000580524.957>.
- Weinstat-Saslow, D., Merino, M.J., Manrow, R.E., Lawrence, J. A., Bluth, R. F., Wittenbel, K. D., Simpson, J. F., Steeg, P. S. (1995). Overexpression of cyclin D mRNA distinguishes invasive and in situ breast carcinomas from non-malignant lesions. *Nature Medicine*, 1 (12), 1257-1260. <https://doi.org/10.1038/nm1295-1257>.
- Weiss, J. M., Csoszi, T., Maglakelidze, M., Hoyer, R. J., Beck, J. T., Domine Gomez, M., Lowczak, A., Aljumaily, R., Lima C. M. R., Boccia, R. V., Hanna, W., Nikolinakos, P., Chiu, V. K., Owonikoko, T. K., Schuster, S. R., Hussein, M. A., Richards, D. A., Sawrycki, P., Bulat, I., Hamm, J. T., Hart, L. L., Adler, S., Antal, J. M., Lai, A. Y., Sorrentino, J. A., Yang, Z., Malik, R. K., Morris, S. R., Roberts, P. J., Dragnev, K. H. (2019). Myelopreservation with the CDK4/6 inhibitor trilaciclib in patients with small-cell lung cancer receiving first-line chemotherapy: a phase Ib/randomized phase II trial. *Annals of Oncology*, 30 (10), 1613–1621. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz278>.
- Whittaker, S. R., Walton, M. I., Garrett, M. D. Workman, P. (2004). The Cyclin-dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine) inhibits retinoblastoma protein phosphorylation, causes loss of Cyclin D1, and activates the mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Research*, 64, 262–272. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-0110>.
- Xu, L., Sgroi, D., Sterner, C. J., Beauchamp, R. L., Pinney, D. M., Keel, S., Ueki, K., Rutter, J. L., Buckler, A. J., Louis, D. N. (1994). Mutational analysis of CDKN2 (MTS1/p16ink4) in human breast carcinomas. *Cancer Research*, 54 (20), 5262-5264. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7923151/>.
- Xu, X., Pan, X., Wang, T., Wang, J., Yang, B., He, Q., & Ding, L. (2020). Intrinsic and acquired resistance to CDK4/6 inhibitors and potential overcoming strategies. *Acta Pharmacologica Sinica*, 42 (2), 171-178. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0416-4>.
- Yamamoto, T., Kanaya, N., Somlo, G., Chen, S. (2019). Synergistic anti-cancer activity of CDK4/6 inhibitor palbociclib and dual mTOR kinase inhibitor MLN0128 in pRb-expressing ER-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 174(3), 615-625. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-05104-9>.
- Yang, C., Li, Z., Bhatt, T., Dickler, M., Giri, D., Scaltriti, M., Baselga, J., Rosen, N., Chanderlapaty, S. (2017). Acquired CDK6 amplification promotes breast cancer resistance to CDK4/6 inhibitors and loss of ER signaling and dependence. *Oncogene*, 36, 2255–2264. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.379>.

- Yuan, K., Wang, X., Dong, H., Min, W., Hao, H., Yang, P. (2021). Selective inhibition of CDK4/6. A safe and effective strategy for developing anticancer drugs. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11 (1), 30–54. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.05.001>.
- Zárubová, L. (2017). Současné možnosti chirurgické léčby karcinomu prsu. *Acta medicae*, 1, speciál 2017, 12-14. <http://www.actamedicinae.cz/literatura.htm>.
- Zhang, Y., Hsu, C. P., Lu, J. F., Kuchimanchi, M., Sun, Y. N., Ma, J., Xu, G., Zhang, Y., Xu, Y., Weidner, M., Huard, J., D'Argenio, D. Z. (2014). FLT3 and CDK4/6 inhibitors: signaling mechanisms and tumor burden in subcutaneous and orthotopic mouse models of acute myeloid leukemia. *J Pharmacokinet Pharmacodyn.*, 41(6), 675-691. <https://doi.org/10.1007/s10928-014-9393-x>.
- Zhang, K., Hong, R., Kaping, L., Xu, F., Xia, W., Qin, G., Zheng, Q., Lu, Q., Zhai, Q., Shi, Y., Yuan, Z., Deng, W., Chen, M., Wang, S. (2019). CDK4/6 inhibitor palbociclib enhances the effect of pyrotinib in HER2-positive breast cancer. *Cancer Lett.*, 447, 130-140. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.01.005>.
- Zhao, B. & Burgess, K. (2019). PROTACs suppression of CDK4/6, crucial kinases for cell cycle regulation in cancer. *Chem. Commun.*, 55, 2704–2707. <https://doi.org/10.1039/C9CC00163H>.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AKT	RAC-alpha Ser/Thr-protein kinase
ALK	ALK receptor tyrosine kinase
AMK	Aminokyselina
AML	Akutní myeloidní leukémie
APS	Peroxodisíran amonný
AR	Androgen receptor
ATP	Adenosintrifosfát
Bcl-2	Bcl-2 apoptosis regulator
BRAF	B-RAF proto-oncogene Ser/Thr kinase
BRCA	BRCA DNA repair associated
BSA	Bovinní sérový albumin
CAK	CDK activating kinase complex
CAMK2	Calcium/calmodulin dependent protein kinase II
CAML2 $\alpha,\beta$	Calcium-modulating cyclophilin ligand
Cdc25	Cell division cycle 25
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDKL	CDK-like kinase
CETSA	Cellular thermal shift assay
cIAP	Cytokine induced inhibitor of apoptosis
Cip/kip	CDK interacting protein/ Kinase inhibitory protein
CLK	CDC-like kinase
c-MYC	Myc proto-oncogene
CRBN	Cereblon
CYP3A	Cytochrome P450, family 3, subfamily A
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DMEM	Dulbecem modifikované Eaglovo médium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
DYRK	Dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase
E2F	E2F transcription factor
ECL	Enhanced chemiluminiscent substrate
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGTA	Kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraoctová
ER+/-	Estrogen receptor positive/ negative
FAT1	FAT atypical cadherin 1
FDA	Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1
FLT3	Fms-related receptor tyrosine kinase 3
FOXM1	Forkhead box M1
FS	Fetální sérum

GAK	Cyclin G associated kinase
GSK	Glykogen synthase-kinase
HDAC	Histondeacetylase
HER2 +/-	Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 positive/ negative
hERG	Potassium voltage-gated channel subfamily H member 2
HIPK	Homeodomain interacting protein kinase 1
HR +/-	Hormonreceptor positive/ negative
HSP90	Heat shock protein 90
Ig	Imunoglobulin
IGF-1	Insulin like growth factor 1
Il-6	Interleukin 6
INK4	Cyclin dependent kinase inhibitor 4A
JAK	Janus kinase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Mcl-1	Mcl-1 apoptosis regulator, Bcl-2 family member
Mdm-2	MDM2 proto-oncogene
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
miRNA	Mikro RNA
mTOR	Mechanistic target of rapamycin kinase
Myc	MYC proto-oncogene
Myt I	Myelin transcription faktor 1
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfat
NST	Non-special type
p(16,21,27,53)	Protein 16, 19, 21, 27, 53
PARP	Poly(ADP-ribose)polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PIM 1	Pim-1 proto-oncogene
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIK3R1	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1
PIK3CD	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta
PIP5K2C	Phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase type 2 gamma
PIP4K2	Phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase type 2
PEG	Polyethylene glycol
PMSF	Fenylmethylsulfonyl fluorid
PR +/-	Progesterone receptor positive/ negative
PROTAC	Proteolysis targeting chimera
PRTM5	Arginin methyltransferase 5
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RAM	Rabbit anti mouse
RAS	RAS proto-oncogene GTPase
RB	RB transcriptional corepressor
ROS	Reactive oxygen species



RPMI 1640	Médium Roswell Park Memorial Institute 1640
SDS	Dodecylsírán sodný
SMAD3	SMAD family member 3
SRC	SRC proto-oncogene
STAT3	Signal transducer and aktivátor of transcription 3
SULT2A1	Sulfotransferase family 2A member 1
SWAR	Swine anti rabbit
TBS	TRIS-buffered saline
TBS-T	Promývací roztok TBS s tween-20
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin
TFIIH	Transkripční faktor II H
TGF- $\beta$	Transforming growth factor- $\beta$
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTK	TTK protein kinase
VHL	Von Hippel-Lindau tumor supressor
WEE I = Chk1	WEE I: G2 checkpoint kinase 1
YAP/TAZ	Yes1 associated transcriptional regulator/ Tafazzin
$\gamma$ -H2A.X	H2A.X variant histone