

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Selektivní inhibice cyklin-dependentních kinas u hematologických malignit

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Miroslav Peřina
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Radek Jorda, Ph.D.
Rok:	2020

Prohlášení

„Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval 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. Byl jsem seznámen 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 1. 5. 2020

Bc. Miroslav Peřina

Poděkování

„Rád bych tímto poděkoval svému školiteli Mgr. Radku Jordovi, Ph.D. za odborné vedení, vstřícný přístup a čas, který mi věnoval. Zároveň bych chtěl poděkovat panu doc. RNDr. Vladimíru Kryštofovi, Ph.D. a Mgr. Evě Řezníčkové, Ph.D. za cenné konzultace. Poděkování patří také všem členům Laboratoře růstových regulátorů za pomoc a rady, především Janě Hudcové za technickou podporu. Taktéž děkuji institucím LRR a ÚEB AV ČR, v. v. i. za poskytnutý prostor a prostředky k vypracování diplomové práce.“

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Miroslav Peřina
Název práce	Selektivní inhibice cyklin-dependentních kinas u hematologických malignit
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Radek Jorda, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Cyklin-dependentní kinasy 4 a 6 jsou klíčovými regulátory buněčného cyklu a jejich dlouhodobě zvýšená aktivita je přítomna u mnoha lidských malignit. Inhibice cyklin dependentních kinas 4 a 6 je schváleným přístupem pro léčbu metastatického karcinomu prsu.

Praktická část této diplomové práce se věnuje studiu efektů vybraných inhibitorů cyklin-dependentních kinas 4 a 6 na buněčné úrovni, především na modelu leukemie, a vzájemnému porovnání jejich mechanismu účinku.

Byla potvrzena inhibice tyrosinkinasy FLT3, zásadní pro buňky akutní myeloidní leukemie, a jí podřízené signalizace u inhibitorů ON 123300 a AMG 925, především však u Trilaciclibu a Lerociclibu.

Dále byl odhalen výrazný pro-apoptický účinek Lerociclibu a AMG 925, pravděpodobně vyvolaný inhibicí mitotické kinasy Mps1/TTK. Po působení ON 123300 a AMG 925 na buňky s deletovaným genem retinoblastomového proteinu byly pozorovány tetraploidní populace buněk.

Na základě porovnání vybraných látek, profilovaných jako inhibitory cyklin-dependentních kinas 4 a 6, byly nalezeny výrazné rozdíly v jejich působení na buněčné úrovni. Vzhledem k tomu, že všechny zkoumané látky jsou klinicky testované (a tři z nich jsou schválenými léčivy), může mít studium jejich rozdílných účinků klinický význam. Tato práce poukazuje na potenciál využití inhibitorů cyklin-dependentních kinas 4 a 6 pro kombinační léčbu akutní myeloidní leukemie nebo pro vývoj nových inhibitorů vykazujících podobně příznivé vedlejší efekty.

Klíčová slova	Cyklin-dependentní kinasy, inhibitor, selektivita, „ <i>drug repurposing</i> “
Počet stran	83
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Miroslav Peřina
Title	Selective inhibition of cyclin-dependent kinases in haematological malignancies
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	Radek Jorda, Ph.D.
The year of presentation	2020

Abstract

Cyclin-dependent kinases 4 and 6 are key regulators of the cell cycle and its long-term increased activity is present in many human malignancies. Inhibition of cyclin-dependent kinases 4 and 6 is an approved approach for the treatment of metastatic breast cancer.

The experimental part of this thesis was focused on the monitoring of effects of selected cyclin-dependent kinases 4 and 6 inhibitors in cell lines, especially in the model of leukemia and, further, the comparison of their mechanism of action.

Inhibition of FLT3, tyrosine kinase essential for acute myeloid leukemia cells, and its downstream signalling was confirmed for ON 123300 and AMG 925 inhibitors, but especially also for Trilaciclib and Lerociclib.

Furthermore, a marked apoptosis-inducing effect of Lerociclib and AMG 925 was revealed, possibly caused by inhibition of mitotic kinase Mps1/TTK. Tetraploid cell populations were observed upon treatment with ON 123300 and AMG 925 in retinoblastoma protein-negative cells.

Comparison of selected CDK4/6 inhibitors revealed significant differences in their cellular mode of action. Regarding to the fact, that all are clinically investigated compounds, we suppose that the study of their off-targets may also have the clinical significance. This thesis points to the potential use of inhibitors of cyclin-dependent kinases 4 and 6 for the combination therapy against the acute myeloid leukemia or for the development of new inhibitors showing similarly beneficial side-effects.

Keywords	Cyclin-dependent kinases, inhibitor, selectivity, drug repurposing
Number of pages	83
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	9
2.1	Cyklin-dependentní kinasy	9
2.2	Funkce cyklin-dependentních kinas 4 a 6	11
2.2.1	Aktivita CDK4/6 a její regulace	13
2.2.2	CDK4/6 jako terapeutické cíle	14
2.3	Selektivní inhibitory CDK	15
2.3.1	Vývoj selektivních inhibitorů CDK4/6	17
2.3.2	Palbociclib	18
2.3.3	Ribociclib	19
2.3.4	Abemaciclib.....	19
2.4	Další inhibitory CDK4/6 v klinickém testování	20
2.4.1	ON 123300	21
2.4.2	AMG 925.....	21
2.4.3	Trilaciclib a Lerociclib	22
2.5	Selektivita a vedlejší cíle inhibitorů.....	24
2.5.1	Srovnání selektivity vybraných inhibitorů	25
2.5.2	FLT3	29
2.5.3	Doposud známé účinky inhibitorů CDK4/6 na modelu leukemie	30
2.5.4	Mps1/TTK	31
2.5.5	Využití vedlejších cílů inhibitorů pro léčbu	32
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
3.1	Materiál	34
3.1.1	Chemikálie	34
3.1.2	Roztoky	35
3.1.3	Biologický materiál	36
3.1.4	Protilátky	36
3.1.5	Komerční inhibitory	38
3.2	Přístrojové vybavení a příslušenství.....	38
3.3	Metody	40
3.3.1	Kultivace buněk.....	40
3.3.2	Cytometrická analýza buněčného cyklu.....	40
3.3.3	Ovlivnění, sklizení a lýze buněk	42
3.3.4	Polyakrylamidová elektroforéza, Western blot a imunodetekce proteinů.....	43
4	VÝSLEDKY	46
4.1	Analýza zastoupení FLT3 na úrovni proteinů v modelových buňkách	46
4.2	Analýza buněčného cyklu po ošetření buněk inhibitory ve vztahu k FLT3	47
4.3	Studium signální dráhy FLT3 po ošetření modelových buněk inhibitory	54
4.3.1	Studium signální dráhy FLT3 – koncentrační a časová závislost	59
4.4	Efekty na buněčném cyklu po 48 hodinovém ošetření inhibitory.....	63
5	DISKUSE.....	68
6	ZÁVĚR	73
7	LITERATURA	74
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	82

CÍLE PRÁCE

Teoretická část

Seznámit se s problematikou selektivní inhibice cyklin-dependentních kinas, především inhibice cyklin-dependentní kinas 4 a 6.

Vypracovat literární rešerši na témata: význam inhibice cyklin-dependentních kinas (CDK), vývoj a selektivita inhibitorů cyklin-dependentních kinas 4 a 6, molekulární mechanismy působení inhibitorů a jejich vliv na buněčný cyklus.

Experimentální část

Osvojit si metody: práce s buněčnými kulturami, ošetřování buněk studovanými inhibitory, stanovení koncentrace proteinů, Western blotting, imunodetekce, průtoková cytometrie.

Prozkoumat rozdíly mezi známými inhibitory cyklin dependentních kinas 4 a 6 a poukázat na důležité vlastnosti, jež by mohly být výhodné pro potenciální léčbu hematologických malignit. Na základě efektů na buněčné úrovni popsat význam inhibice vedlejších cílů studovaných látek a vybrat vhodné inhibitory k dalšímu testování.

1 ÚVOD

Cyklin-dependentní kinasy (CDK) jsou důležité regulační enzymy, interagující s proteiny zvanými cykliny. CDK katalyzují fosforylaci důležitých substrátů, čímž regulují zásadní biologické procesy, především buněčný cyklus a transkripci (Malumbres a Barbacid, 2001). CDK4 a CDK6 zajišťují kontrolu nad přechodem z fáze G1 do fáze S buněčného cyklu a jsou velmi intenzivně studovanými cíli (Choi a Anders, 2014).

Vzhledem k zásadní roli CDK probíhá již tři desetiletí intenzivní vývoj jejich inhibitorů. Díky strukturální odlišnosti CDK4/6 oproti ostatním CDK byly vyvinuty vysoce selektivní látky a tři z nich (Palbociclib, Ribociclib a Abemaciclib) byly před několika lety schváleny jako léčebný přístup vůči metastatickému karcinomu prsu (Chen *et al.*, 2016). Ve srovnání s konvenční chemoterapií nebo endokrinní léčbou přinášejí selektivní inhibitory CDK4/6 výrazné prodloužení doby přežití bez progresu a tolerovatelné vedlejší účinky a toxicitu (Marra a Curigliano, 2019).

Vývoj inhibitorů CDK však nadále pokračuje a existuje i několik dalších slibných inhibitorů CDK4/6, které jsou v klinickém testování. V literatuře byly popsány některé odlišnosti mezi inhibitory CDK4/6 a vedlejší cíle, jež jsou klíčové pro buňky hematologických malignit, především akutní myeloidní leukemie. Inhibice těchto cílů však u většiny nebyla potvrzena na buněčné úrovni (Klaeger *et al.*, 2017; Hafner *et al.*, 2019).

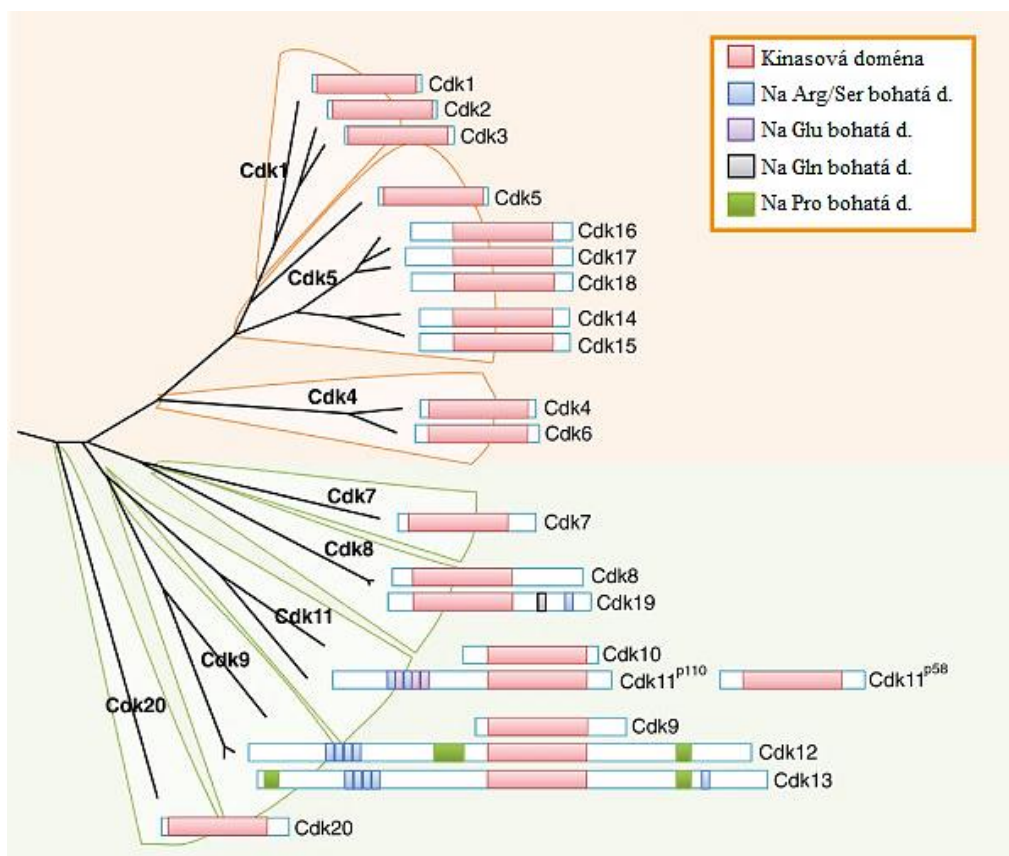
Teoretická část předkládané práce se věnuje popisu role a významu CDK4/6, vývoje inhibitorů CDK4/6 a jejich selektivity. Na základě předchozích zjištění bylo cílem předkládané práce porovnat účinky vybraných inhibitorů na modelu buněk akutní myeloidní leukemie (což v dané šíři dosud není k dispozici) a potvrdit inhibici některých vedlejších cílů.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Cyklin-dependentní kinasy

Cyklin-dependentní kinasy (CDK) (EC 2.7.11.22) jsou skupinou serin/threoninových proteinkinasy, jejichž enzymová aktivita závisí na vazbě oddělené podjednotky, cyklinu (Cyc). Exprese cyklinů se při průchodu buněčným cyklem periodicky mění, jak už napovídá jejich název, čímž ovlivňují aktivitu CDK (Norbury a Nurse, 1992). CDK jsou klíčovými regulačními enzymy, které na základě intracelulární i extracelulární signalizace katalyzují přenos fosfátu z ATP na substráty regulující především buněčný cyklus a transkripci (Malumbres a Barbacid, 2001).

Na základě studia kvasinek, modelových eukaryotických organismů, bylo identifikováno šest různých CDK (Cao *et al.*, 2014). Naproti tomu v lidských buňkách bylo dosud objeveno 20 CDK (Liu a Kipreos, 2000). Kompletní soubor všech CDK kódovaný genomem určitého organismu se nazývá CDK-kinom (Obr. 1).

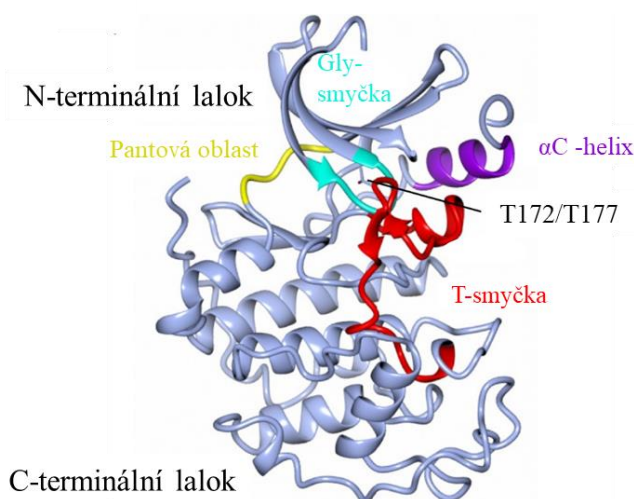


Obr. 1 Fylogenetický strom známých lidských CDK. V horní části jsou zobrazeny vývojové vztahy CDK spojených s buněčným cyklem, ve spodní části CDK spojených s transkripcí. Schematicky jsou vyobrazeny kinasové a další domény jednotlivých zástupců CDK (převzato a upraveno z Malumbres, 2014).

Podle fylogenetické analýzy bylo navrženo rozdělení CDK do 8 podskupin, reprezentovaných CDK1, CDK4 a CDK5 (spojené s buněčným cyklem) poté CDK7, CDK8, CDK9, CDK11 a CDK20 (aktivační a transkripční CDK) (Liu a Kipreos, 2000). Rodina CDK4 zahrnuje pouze dva zástupce, CDK4 a CDK6, často označované díky své homologii jako CDK4/6 (Obr. 1). Jelikož jedinou nezbytnou CDK pro savčí cyklus je CDK1, vyřazení CDK4/6 z funkce není letální, avšak může vést k poruchám vývoje mléčných žláz nebo krvetvorby (Sherr a Roberts, 2004; Santamaria *et al.*, 2007).

Podobně jako u ostatních kinas je terciární struktura kinasové domény CDK dvoulaločnatá. Katalytická kapsa s aktivním místem se nachází mezi N-terminálním lalokem tvořeným především β -skládanými listy a C-terminálním lalokem bohatým na α -helixy. Monomerní forma naprosté většiny CDK bez navázaného cyklinu je neaktivní z důvodu uzavření katalytické kapsy tzv. T-smyčkou, která zabraňuje enzymové reakci (Obr. 2). Vazba cyklinů a fosforylace vedou ke změně struktury a umožňují aktivaci CDK (Echalier *et al.*, 2010).

CDK jsou důležitými regulačními kinasami, které mimo funkce v rámci transkripce a buněčného cyklu ovlivňují i translaci a apoptosu. Při analýze jejich funkcí bylo postupně zjištěno, že moduluji odpověď na poškození DNA (Jirawatnotai *et al.*, 2011), podílejí se na epigenetické methylaci DNA a histonů (Zeng *et al.*, 2011) i proteasomové degradaci proteinů (D'Angiolella *et al.*, 2013). Jejich okrajovými funkcemi je regulace diference a samoobnovy embryonálních kmenových buněk (Becker *et al.*, 2006) nebo regulace spermatogeneze (Mikolcevic *et al.*, 2012).



Obr. 2 Dvoulaločnatá struktura modelu CDK4 s důležitými strukturálními motivy. T172 a T177 jsou aktivační residua citlivá na fosforylaci u CDK4, resp. CDK6 (převzato a upraveno z Wood a Endicott, 2018).

Pokud vezmeme v úvahu všechny důležité regulační funkce CDK, je zřejmé, že jejich mutace a deregulace mohou vést k rozvoji mnohých onemocnění. Proto je studium funkce a regulace CDK zásadní z pohledu vývoje inhibitorů a klinické léčby nejen onkologických onemocnění, ale i virových chorob včetně HIV (Schang *et al.*, 2002), nebo parazitických (prvokových) onemocnění (Walker *et al.*, 2011).

2.2 Funkce cyklin-dependentních kinas 4 a 6

Hlavním cílem buněčného cyklu je zajištění jedné úspěšné replikace DNA (v S fázi) a rozdělení identických kopií chromosomů do dceřiných buněk (v M fázi). Součástí buněčného cyklu jsou tzv. kontrolní body, zabraňující přechodu do další fáze, bez úspěšného dokončení předchozí. Při vstupu do fáze G1 buňky reagují na extracelulární signály, na jejichž základě projdou dalším buněčným cyklem nebo vstoupí do klidového stavu (G0). Na rozdíl od ostatních fází buněčného cyklu je G1 fáze u zdravých buněk regulována mitogeny a může být zablokována přítomností antiproliferačních cytokinů. Rakovinné buňky unikají této kontrole a vykazují tendenci udržet se v jednom buněčném cyklu za druhým, jelikož vystoupení z buněčného cyklu vede k dozrávání a konečně diferenciaci, které jsou u rakovinných buněk také narušeny (Pardee, 1989; Sherr, 1994).

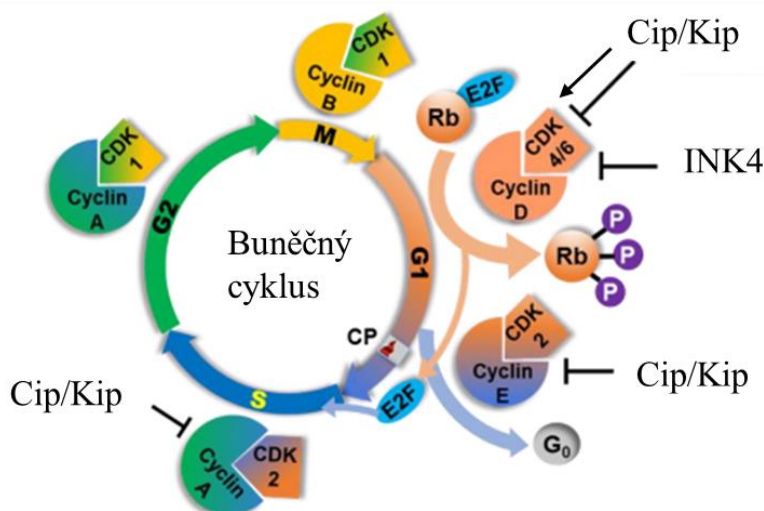
Aktivní CDK4/6 spouští kaskádu vedoucí k průchodu do S fáze buněčného cyklu a brání také vnitřním, buněčným obranným mechanismům (senescenci a apoptose). Proto jsou klíčovými uzly v signální síti integrující velké množství mitogenních signálů, čímž dokážou regulovat specifické transkripční programy (Choi a Anders, 2014).

Vzhledem k sadě aktivačních i inhibičních vstupních signálů (viz kapitola 2.2.1), je v buňkách zajištěna pečlivá kontrola aktivity CDK4/6. CDK4/6 mohou působit v signálních a regulačních drahách dvěma způsoby. Prvním způsobem je přímá fosforylace proteinových substrátů a přenos signálu, tzv. cesta závislá na kinasové aktivitě. Naopak regulace ve smyslu vazby či vyvázání jiných proteinů je označována jako nezávislá na kinasové aktivitě (Sherr a Roberts, 1999).

Ve většině případů fosforylují CDK4/6, tak jako ostatní CDK, proteinové substráty na serinovém nebo threoninovém residuu, po němž v sekvenci následuje prolin (tzv. motiv S/T-P) (Songyang *et al.*, 1994). Fosforylace katalyzovaná CDK často probíhá na více místech jednoho substrátu. Přestože se členové rodiny CDK při rozpoznávání fosforylačních míst neliší, identita a počet substrátů jednotlivých CDK je různá. Výjimku tvoří právě CDK4/6, jež disponují vysokou mírou substrátové selektivity (jako jediné CDK spojené s buněčným cyklem nefosforylují histony) (Sherr a Roberts, 1999).

Nejlépe charakterizovanými přímými fosforylačními substráty CDK4/6 jsou Rb1 a jemu podobné proteiny – retinoblastomovému proteinu podobný protein 1 a 2 (RbL1 a RbL2). Proteiny Rb disponují několika vazebnými místy, klíčovými pro tvorbu multiproteinových komplexů, především s rodinou transkripčních faktorů E2F. Pokud v buňce není nastartován buněčný cyklus, transkripční faktory E2F jsou vázány na promotory genů a reprimovány vazbou proteinů Rb, skrze působení DNA methylas a histon deacetylas. Toto umlčení transkripce (Vandel *et al.*, 2001) je zvráceno aktivací CDK4/6. Po fosforylaci Rb, RbL1 a RbL2 je totiž destabilizována interakce s E2F a zeslabena vazba histon deacetylas (Zhang *et al.*, 2000). Důsledkem je uvolnění proteinů Rb a dereprese genů, předtím blokových E2F. Geny transkribované pomocí E2F 1-3 kódují proteiny tvořící DNA-replikační aparát a DNA-opravné komplexy. Jedná se o signalizaci vedoucí k expresi genů spojených s proliferací, a jelikož exprimované proteiny zprostředkovávají přechod z G1 do S fáze (např. cyklin E), je tato signalizace označována jako tzv. G1-S transkripční program (Ren *et al.*, 2002).

Následně se v buněčném cyklu projevuje i funkce CDK4/6 nezávislá na kinasové aktivitě. Jelikož CDK4/6 pro svou aktivaci vyžadují interakci s fosforylovanými proteiny Cip/Kip, výrazně snižují jejich buněčnou hladinu. Limitovaná dostupnost Cip/Kip (taktéž účinné inhibitory CDK2) umožňuje souběžnou aktivaci CDK2, také díky zvýšené expresi CycE (Sherr a Roberts, 1999). Aktivní CDK2/CycE vede k počátku replikace DNA, po poklesu exprese cyklinu E v brzké S fázi dochází k tvorbě komplexů CDK2/CycA, jež regulují S fázi. Poslední regulační CDK je CDK1 v komplexech s CycA a následně s CycB, jejíž aktivita umožňuje přechod k mitose (Sherr a Roberts, 2004) (Obr. 3).



Obr. 3 Schematické zobrazení buněčného cyklu s jednotlivými fázemi a regulačními komplexy CDK/Cyklin. Je zobrazena regulační funkce proteinů Cip/Kip a INK4, mechanismus regulace Rb/E2F a hlavní kontrolní bod (CP) (upraveno z Lutful Kabir *et al.*, 2015).

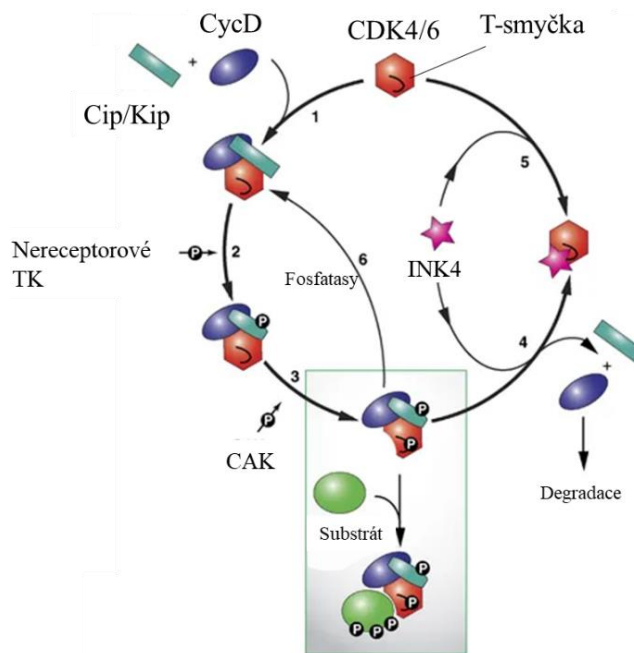
2.2.1 Aktivita CDK4/6 a její regulace

Plná katalytická aktivita CDK4/6 závisí na čtyřech hlavních faktorech. Jsou jimi vazba cyklinů D, fosforylace T-smyčky katalyzovaná CDK-aktivačním komplexem (CAK) a interakce s endogenními proteiny, tzv. s CDK-interagujícími proteiny/kinasovými inhibičními proteiny (Cip/Kip) nebo inhibitory třídy CDK4 (INK4) (Russo *et al.*, 1996).

Existují tři typy cyklinů D (Cyc D1, D2, D3), které byly postupně objeveny jako regulační podjednotky pro specifickou aktivaci CDK4/6 a dávají vzniknout třem odlišným heterodimerům CDK4/6-CycD (Xiong *et al.*, 1991). Cykliny typu D jsou často označovány jako *senzory mitogenních signálů*, jejich hladiny ne přímo cyklují, spíše se mění na základě podmínek prostředí, v němž se buňky nacházejí. Změny abundance cyklinů D jsou vyvolány změnami míry transkripce jejich genů, stabilizace a jaderné lokalizace (Sherr a Roberts, 1999). Vazebný mód cyklinů D s CDK4/6 se výrazně liší od všech ostatních interakcí CDK-cyklin. Vazebný povrch je překvapivě malý a na rozdíl od ostatních CDK nedochází po vazbě cyklinů D ke strukturní remodelaci katalytické podjednotky a dosažení aktivní konformace. Tyto strukturní skutečnosti vedly k objevu, že pro dosažení plně katalyticky aktivní formy CDK4/6 je nutná interakce s dalšími kofaktory (Takaki *et al.*, 2009).

Proteiny Cip/Kip jsou druhou, výrazně odlišnou skupinou regulátorů, zahrnující proteiny p21, p27 a p57. Působení těchto bifaciálních proteinů je komplexní, mohou fungovat jako pozitivní i negativní regulátory. Nefosforylované proteiny Cip/Kip se nacházející v buňkách ve stavu kontaktní inhibice nebo při nedostatku živin a přímo inhibují enzymovou aktivitu CDK4/6. Přechod z inhibičního do aktivačního módu je způsoben fosforylací na tyrosinových residuích katalyzovanou nереceptorovými tyrosin-kinasami jako je např. Abl nebo Src (James *et al.*, 2008). Fosforylované proteiny Cip/Kip jsou nutné pro správné složení a úplnou aktivaci komplexů CDK4/6-CycD i jejich import do jádra (Sherr a Roberts, 1999) (Obr. 4).

Po tvorbě ternárního komplexu CycD-CDK4/6-Cip/Kip je umožněna fosforylace T-smyčky na sensitivním residuu, u CDK4 na T172 a u CDK6 na T177 (Kaldis *et al.*, 2001) katalyzovaná CAK. Po fosforylaci se T-smyčka remodeluje a uvolňuje přístup do katalytické kapsy, dále zesiluje interakci s cyklinem a substrátem. Protikladem je působení fosfatas, jež katalyzují defosforylaci samotné CDK i proteinů Cip/Kip. Defosforylace vede k destabilizaci aktivní konformace, zabránění vstupu do katalytické kavity až k rozpadu komplexů (Bockstaele *et al.*, 2009).



Obr. 4 Aktivační cyklus CDK4/6 zobrazující tvorbu aktivního komplexu a působení jednotlivých regulátorů (převzato a upraveno z Choi a Anders, 2014).

Posledními důležitými regulátory aktivity CDK4/6 jsou proteiny INK4 zahrnující p15, p16, p18 a p19. Tato skupina proteinů zajišťuje specifickou buněčnou inhibici aktivity pouze CDK4/6 (Hirai *et al.*, 1995). Proteiny INK4 se vážou jak na ternární komplexy CycD-CDK4/6-Cip/Kip, tak na monomerní CDK4/6. Jejich vazba vede ke konformačním změnám celé kinasové domény, disociaci aktivních komplexů a degradaci cyklinů D (Jeffrey *et al.*, 2000) (Obr. 4). Pokud dojde ke zvýšení hladiny proteinů INK4 (při ztrátě funkce proteinu Rb, poškození DNA, stárnutí buňky), tvoří se binární komplexy INK4-CDK4/6, které nevykazují žádnou kinasovou aktivitu (Serrano *et al.*, 1993).

2.2.2 CDK4/6 jako terapeutické cíle

Velké množství experimentálních výsledků identifikovalo CDK4/6 jako vhodné hlavní cíle protirakovinné léčby. A to na základě jejich důležité funkce pro rakovinné buňky na několika úrovních. Na úrovni genomové jsou u lidských malignit jedny z nejčastějších genetických změn amplifikace, chromosomové translokace a delece vedoucí právě k trvalé aktivaci CDK4/6. Z pohledu signalizace jsou obě kinasy klíčovými regulátory pro mnoho dalších onkoproteinů, které mohou dále zesilovat jejich aktivaci. Jejich pozitivní regulátory, cykliny, jsou často nadexprimované u různých lidských malignit. Zvýšená exprese cyklinu D1 byla pozorována u lymfomu B-buněk (lymfom pláštěvých buněk, difuzní lymfom) i u tumorů prsu, močového měchýře, plic (Mullany *et al.*, 2008).

Naopak vysoká exprese cyklinu D3 byla zaznamenána u hematologických malignit (mnohočetného myelomu), glioblastomu a karcinomů ledvin (Hedberg *et al.*, 2002). Z preklinických studií vyplynulo, že široká řada jak rakovinných buněčných linií *in vitro*, tak nádorových modelů *in vivo* je závislá na aktivitě CDK4/6. Náhlé zablokování funkce těchto kinas vede k aktivaci vnitřních tumor-supresorových mechanismů, jež vyústí v senescenci nebo apoptosu nádorových, ne však zdravých buněk. Proto je inhibice CDK4/6 velmi slibným a v dnešní době i klinicky uznávaným přístupem pro léčbu některých lidských malignit (Choi a Anders, 2014).

2.3 Selektivní inhibitory CDK

Během posledních dvou dekad vzbudily klinické výsledky inhibice CDK vzrůstající zájem o vývoj selektivních, nízkomolekulárních látek využitelných k léčbě onkologických malignit. Na základě vazebného místa se známé inhibitory rozdělují na ATP-kompetitivní inhibitory a ATP-nekompetitivní. I přes rozdílnou chemickou strukturu se všechny ATP-kompetitivní látky vážou do vazebného místa pro ATP v katalytické kapse CDK, kde mimikují jeho strukturu.

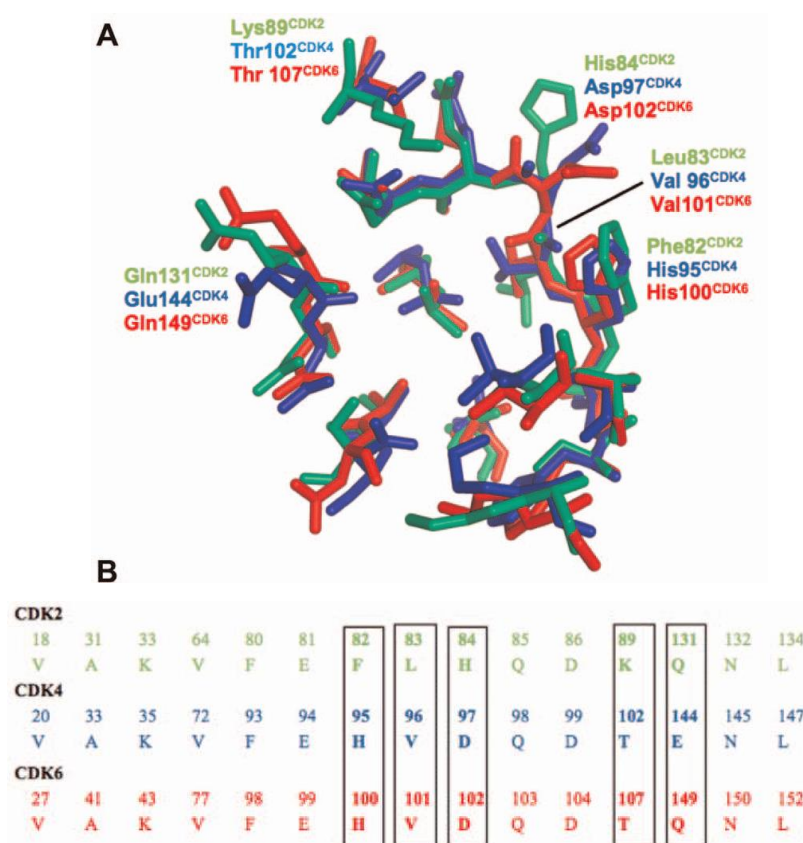
Jelikož jsou aminokyselinová residua v katalytickém místě CDK vysoce konzervovaná, byla první generace inhibitorů CDK označena jako pan-selektivní. První generace ATP-kompetitivních látek totiž inhibovala většinu členů rodiny CDK, včetně nežádoucí CDK1. Mezi nejvíce prozkoumané pan-selektivní inhibitory CDK patří Flavopiridol a R-roskovitin (Hall a Peters, 1996). I když byly velmi slibnými látkami, nebyly schváleny pro léčebné využití z důvodu mnoha vedlejších účinků při vhodné terapeutické koncentraci (Heptinstall *et al.*, 2018).

Slibné výsledky zaznamenaly ATP-nekompetitivní látky, vážající se mimo aktivní místo a ovlivňující asociaci s cyklinem, konformaci katalytické kapsy nebo mimikující vazbu inhibičních regulátorů. Obecně jsou ATP-nekompetitivní inhibitory CDK více selektivní, než ATP-kompetitivní alternativy, avšak v posledních 15 letech byly vyvinuty vysoce selektivní ATP-kompetitivní inhibitory CDK4/6, které prošly klinickými fázemi testování a byly schváleny pro léčbu karcinomu prsu (Heptinstall *et al.*, 2018).

Jak již bylo nastíněno dříve, CDK4/6 se od ostatních CDK do jisté míry strukturně odlišují a disponují i odlišným mechanismem aktivace. Ze známých struktur CDK4, CDK6 a CDK2 (model ostatních CDK) uložených v Proteinové databance (PDB) byl překrytím a srovnáním odpovídajících aminokyselinových residuí vytvořen model ve formě superpozice třech zmíněných CDK. Ve vazebném místě pro ATP bylo nalezeno

5 aminokyselinových residuí, jež se u CDK4/6 shodují, ale u CDK2 liší. Tato residua jsou uvedena na Obr. 5 a zdůvodňují vysokou selektivitu schválených inhibitorů CDK4/6 vůči CDK2 a ostatním CDK (Shafiq *et al.*, 2012).

Mimo vysoce selektivní inhibitory CDK4/6 byly v poslední době vyvinuty i látky vykazující selektivní inhibici dalších CDK. Na základě screeningu a molekulárního modelování byla identifikována série thienochinolonových derivátů vykazující selektivní inhibici CDK5 (Heptinstall *et al.*, 2018). Dále byly také vyvinuty selektivní inhibitory transkripčních CDK. Vůči CDK7 byly např. identifikovány dva silné kovalentní inhibitory THZ1 (Kwiatkowski *et al.*, 2014) a SY-1365 (Hu *et al.*, 2019). Dále jsou známy selektivní inhibitory CDK9, AZD4573 (Cidado *et al.*, 2020) a Atuveciclib (Lücking *et al.*, 2017) i selektivní kovalentní inhibitor CDK12, THZ531 (Zhang *et al.*, 2016). Inhibice transkripčních CDK se projevuje výrazným antiproliferačním a pro-apoptickým účinkem, většina zmíněných látek je v klinickém testování.



Obr. 5 Konzervovanost aminokyselinových residuí v aktivním místě CDK2, 4 a 6. (A) Stukturní překryv residuí aktivního místa CDK2 (zeleně, PDB: 1FIN), CDK4 (modře, PDB: 2W96) a CDK6 (červeně, PDB: 1G3N). (B) Odpovídající srovnání sekvence aminokyselinových residuí daných CDK (převzato z Shafiq *et al.*, 2012).

2.3.1 Vývoj selektivních inhibitorů CDK4/6

Z generace tzv. pan-selektivních CDK inhibitorů se jako první zástupce v klinickém testování objevil v roce 1997 Flavopiridol (pod obch. názvem Alvocidib) (Shapiro, 2004), následovaný *R*-roskovitinem (obch. název Seliciclib, CYC202), jenž je klinicky testován od roku 2002 (McClue *et al.*, 2002). Žádný zástupce pan-selektivních inhibitorů CDK však klinickým testováním úspěšně neprošel. Po objevu Flavopiridolu výrazně vzrostl zájem o vývoj selektivních inhibitorů CDK, přesto bylo mezi lety 1992 a 2004 objeveno velmi málo potentních a selektivních látek pro inhibici CDK4/6 (Heptinstall *et al.*, 2018).

Jedním z prvních inhibitorů, jenž vykazovaly určitou míru selektivity vůči CDK4, na rozdíl od CDK1 a CDK2, byl thioakridonový derivát NSC625987 (Kubo *et al.*, 1999). Avšak analýza jeho vlivu na buněčné úrovni ukázala pouze mírný G1 blok, ale vysokou míru apoptosy. Takový efekt poukazuje na nízkou inhibici CDK4/6 a účinek na jiné molekulární cíle (Jorda *et al.*, 2018).

Dalším publikovaným inhibitorem byl benzothiazolový derivát Ryuvidin, u něhož byla zjištěna mírná, ale selektivní inhibice CDK4 (s hodnotou $IC_{50} = 6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) (Ryu *et al.*, 2000). Působení Ryuvidinu na buněčné úrovni ale nebylo spojeno s G1 blokem, spíše došlo k akumulaci buněk v S-fázi, což ukázalo taktéž na zapojení dalších vedlejších cílů (Jorda *et al.*, 2018).

Látka CINK4 vykazovala inhibici CDK4 v řádu jednotek $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Soni *et al.*, 2001), avšak následně u ní byla potvrzena asi dvakrát slabší inhibice CDK2 i CDK1. Vliv CINK4 na buněčný cyklus se proto v nižších koncentracích projevoval G1 blokem, avšak při vyšších koncentracích ($>10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) došlo ke G2/M bloku (Jorda *et al.*, 2018).

Později vyvinuté indolokarbazolové látky Arcyriaflavin A (Sanchez-Martinez *et al.*, 2003) a jeho bromovaný derivát označovaný jako „CDK4 inhibitor“ (Zhu *et al.*, 2003) jsou strukturně podobné multikinasovému inhibitoru Staurosporinu. I přesto, že obě látky vykazují preferenci k CDK4/6, inhibují současně i CDK2 a CDK5 (Jorda *et al.*, 2018).

Na základě strukturního modelování, analýz vlivu na buňky a strukturní odlišnosti aktivního místa CDK4/6 bylo identifikováno slibné pyrido[2,3-*d*]pyrimidinové jádro. Jeho optimalizace vedla v roce 2004 k identifikaci Palbociclibu, jenž v roce 2005 vstoupil do klinického testování. Následně byl v roce 2013 identifikován Ribociclib a v roce 2014 Abemaciclib, jenž oba v roce 2014 vstoupili do klinického testování. Palbociclib se roku 2015 stal prvním schváleným inhibitorem CDK pro léčbu rakoviny prsu, následovaný v roce 2017 dalšími dvěma zmíněnými (Heptinstall *et al.*, 2018).

2.3.2 Palbociclib

Preklinický vývoj Palbociclibu (PD-0332991, obch. název Ibrance®) pramení z výchozí struktury pyrido[2,3-*d*]pyrimidinu. Při vývoji byly optimalizovány substituenty v pozicích C-2, C-6, C-7 a N-8. Vysoké selektivity *in vitro* bylo dosaženo především zavedením (piperazin-1-yl)pyridin-2-ylového postranního řetězce v poloze C-2 a metylu v poloze C-5 (Obr. 6). Palbociclib se vyznačoval silnou inhibicí komplexů CycD-CDK4/6, s IC_{50} v řádu $nmol \cdot l^{-1}$, snižoval fosforylaci proteinu Rb a vedl k výraznému bloku v G1 fázi u buněčných linií s funkčním Rb. Současně však nevykazoval známky inhibice CDK2 ani CDK1. Po působení Palbociclibu byl pozorován také antiproliferační efekt vůči většině buněčných linií s nadexprimovanou nebo zvýšeně aktivovanou CDK4/6 (liposarkom, lymfom plášťových buněk, myelom, karcinomy prsu, ovarií a střeva) (Fry *et al.*, 2004). Zatímco v případě Flavopiridolu docházelo k zesílení protirakovinného efektu při kombinaci s cytotoxickou léčbou, u Palbociclibu byl efekt kombinační terapie *in vivo* komplikovanější. Jelikož cytotoxické látky vyžadují průchod buněčným cyklem a Palbociclib způsoboval cytostatický G1 blok, u myši disponujících tumory s funkčním Rb snižoval účinnost karboplatiny. Naopak při kombinaci Palbociclibu s radioterapií došlo k příznivému zesílení efektu léčby. Nejvýznamnější efekty vykazoval Palbociclib v kombinační terapii s Trastuzumabem (Herceptin, terapeutická monoklonální protilátka blokující receptor herregulinu 2 (HER2)) a Tamoxifenem (inhibitor estrogenního receptoru (ER)) i Letrozolem (inhibitor aromatasy) (Clark *et al.*, 2016).

Palbociclib je perorálně aplikovatelná látka, u níž byly na modelu myši zjištěny příznivé farmakokinetické vlastnosti. Při klinickém testování byly u stanovených terapeutických dávek nejčastější vedlejší efekty nevolnost, průjem, leukopenie a neutropenie. V rámci studie v kombinaci s Letrozolem došlo k prodloužení celkového přežití i délky přežití bez progresu (ve srovnání se samotným Letrozolem), proto je od roku 2015 v této kombinaci Palbociclib schválen do první linie léčby vůči metastatickému karcinomu prsu (ER pozitivní a HER2 negativní) pro post-menopauzální ženy (Finn *et al.*, 2016). Jako první schválený inhibitor CDK4/6 umožnil komplexní studium vlivu G1- blokujících terapeutik i přínosů pro pacienty a podnítil další vývoj inhibitorů CDK4/6, jež se zdají být jedněmi z nejslibnějších v rámci rodiny CDK. Současně je však Palbociclib stále v klinickém testování, většinou v kombinaci s dalšími terapiemi, pro léčbu lymfomu plášťových buněk, melanomu a sarkomu (de Dueñas *et al.*, 2018).

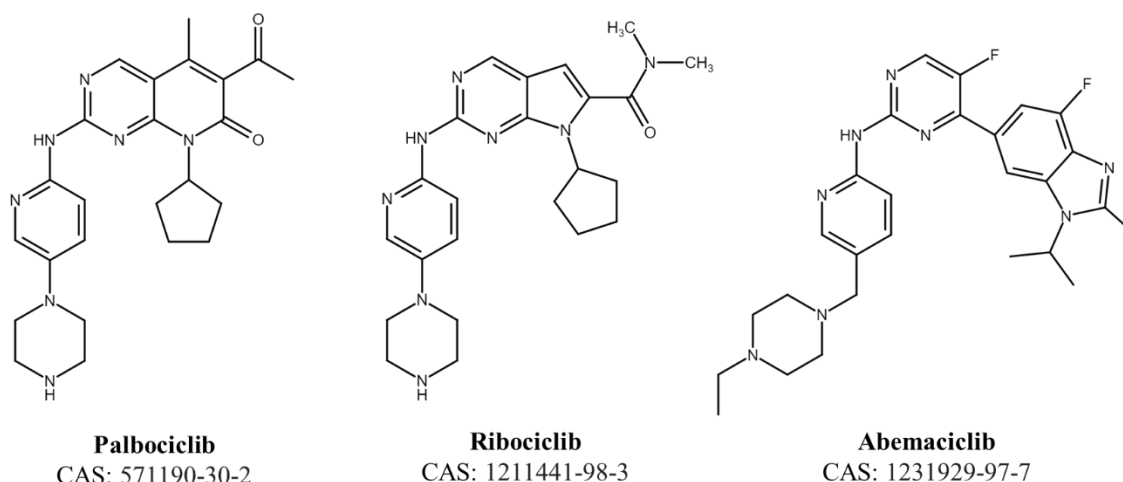
2.3.3 Ribociclib

Ribociclib (LEE011, obch. název Kisqali[®]) se strukturně velmi podobá Palbociclibu, na rozdíl od něj je sice jeho základem pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinové jádro, avšak substituenty v polohách C-2 a C-7 jsou totožné (Rader *et al.*, 2013) (Obr. 6). Ribociclib je podobně jako Palbociclib vysoce selektivním inhibítorem CDK4/6. V preklinické analýze vedlo jeho působení k defosforylaci proteinu Rb spojené s G1 blokem a senescencí u několika různých buněčných linií, včetně melanomu, liposarkomu, neuroblastomu a karcinomu prsu.

Na modelech tumorů *in vivo* disponoval výraznou aktivitou u malignit se zvýšenou aktivitou CDK4/6, ať už samotný, nebo v kombinaci s jinými terapiemi (Rader *et al.*, 2013). V klinických studiích byl účinek Ribociclibu, také perorálně aplikovaného inhibítora, studován v kombinaci s Letrozolem nebo Exmestanem (steroidní inhibítorem aromatasy). Častými vedlejšími účinky byla neutropenie, leukopenie, závratě a slabost. Pro léčbu (hormonálně senzitivních a HER2 negativních karcinomů prsu) byla zatím schválena kombinace Ribociclibu s Letrozolem, u níž bylo pozorováno prodloužení celkového přežití i delší doba přežití bez progresu (Munster *et al.*, 2014). Další klinické studie kombinační léčby s Ribociclibem nadále pokračují, např. pro léčbu karcinomů prostaty (Scheinberg *et al.*, 2020).

2.3.4 Abemaciclib

Abemaciclib (LY2835219, (obch. název Verzenio[®])) je posledním dosud schváleným vysoce selektivním inhibítorem CDK4/6. Abemaciclib byl vyvinut na základě intenzivního screeningu chemických databází, po identifikaci slibné struktury substituovaného 6-pyrimidin-benzimidazolu. Na rozdíl od Palbociclibu a Ribociclibu disponuje (4-ethylpiperazin-1-yl)methylpyridin-2-yllovým řetězcem v poloze C-2 pyrimidinu a atomy fluoru v pozicích C-5 na pyrimidinu a C-4 na benzimidazolu (Obr. 6). Abemaciclib vykazoval v preklinickém testování obdobné efekty jako Palbociclib a Ribociclib, inhibice CDK4/6 byla výrazná, v řádu jednotek nmol·l⁻¹ (Gelbert *et al.*, 2014).



Obr. 6 Strukturní vzorce a srovnání schválených inhibitorů CDK4/6 Palbociclibu, Ribociclibu a Abemaciclibu.

Na buněčné úrovni vedlo působení Abemaciclibu k inhibici fosforylace proteinu Rb a G1 bloku *in vitro*. Zastavení buněčného cyklu a potlačená exprese genů regulovaných drahou Rb-E2F přetrvávaly i po 24 hodinách od jedné dávky (Gelbert *et al.*, 2014). Na myších modelech se působení Abemaciclibu *in vivo* projevovalo inhibicí růstu modelových nádorů různého typu, včetně nitrolebních gliomů, jelikož Abemaciclib jako jediný ze schválených inhibitorů může prostupovat hematoencefalickou bariérou. Současně zvyšoval efekt působení cytotoxických látek, což podporuje jeho využití v kombináční léčbě (Tate *et al.*, 2014). V klinickém testování byl účinek Abemaciclibu nejdříve sledován u pacientek s metastatickým karcinomem prsu. Při podávání byl dobře tolerován, s akceptovatelnými vedlejšími účinky jako bylo průjem, nevolnost, zvracení či anémie. Abemaciclib v kombinaci s Fulvestrantem (inhibitor ER) vykazoval prodloužení celkového přežití a přežití bez progresu, současně s přijatelnou toxicitou a v této kombinaci byl schválen pro léčbu hormonálně senzitivních a HER2 negativních karcinomů prsu, i u pokročilých a metastatických (na rozdíl od Palbociclibu a Ribociclibu) (Sledge *et al.*, 2017). Další stále probíhající klinické studie zahrnují testování vlivu u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic nebo lymfomem plášťových buněk (Goldman *et al.*, 2016; Tanaka *et al.*, 2020).

2.4 Další inhibitory CDK4/6 v klinickém testování

Významný úspěch schválených inhibitorů CDK4/6 podnítil vývoj dalších látek vykazujících selektivitu pro CDK4/6. Vzhledem k využití a příznivému účinku

kombinačních terapií však byly vyvinuty i látky cílící na další molekulární cíle, jež by mohly rozšířit jejich terapeutické využití a oddálit nástup případné rezistence. Hlavní myšlenkou bylo spojení regulace buněčného cyklu s inhibicí molekulárního cíle zásadního pro jinou skupinu malignit. Následující kapitoly popisují vybrané inhibitory, s velmi slibnými preklinickými výsledky, které jsou stále v klinickém testování.

2.4.1 ON 123300

Spojení farmakokinetické strategie (cytotoxicita pro buňky gliomů a průchod hematoencefalickou bariérou) spolu se známým výchozím pyrido[2,3-*d*]pyrimidinovým jádrem vedlo k identifikaci látky ON 123300 (Lv *et al.*, 2013; Reddy *et al.*, 2014). Tato látka se strukturně podobá Palbociclibu, avšak liší se v řetězci na pozici C-2 přítomností anilinu a na pozici C-6 disponuje kyano-skupinou (Obr. 7). ON 123300 se sice vyznačuje vysokou potencí k inhibici CDK4/6 a kinasy ARK5 (zahrnuté v procesech buněčné adheze, proliferace a progresu) v řádu jednotek $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, avšak mimo těchto inhibuje v řádu $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ i několik dalších cílů, především tyrosinkinasy. V preklinickém testování vykazoval inhibici dráhy Rb/E2F, ale také pro-apoptický účinek (Zhang *et al.*, 2014). Na myších modelech rakoviny prsu *in vivo* vedlo působení k zablokování růstu tumorů bez známek toxicity a ztráty hmotnosti a byla potvrzena jeho potence vůči gliomu, mnohočetnému myelomu a lymfomu plášťových buněk. Je v iniciační fázi klinického testování (Divakar *et al.*, 2016; Perumal *et al.*, 2016).

2.4.2 AMG 925

V roce 2014 byla jako nový inhibitor CDK4/6 objevena látka disponující strukturou substituovaného pyrido[4',3':4,5]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinu (Obr. 7). Tato látka inhibovala CDK4/6 i FMS-(onkogen Feline-McDonoughova sarkomu) příbuznou tyrosinkinasu 3 (FLT3), zásadní pro leukemické buňky. Prostřednictvím několika optimalizačních úprav výchozí struktury byla vyvinuta látka AMG 925, jež se vyznačovala příznivými farmakokinetickými parametry i selektivitou k CDK4/6 a FLT3 vůči CDK1 (Li *et al.*, 2014). V preklinických analýzách vedlo působení AMG 925 k inhibici dráhy signálního přenašeče a aktivátoru transkripce 5 (STAT5) i dráhy Rb-E2F *in vitro*, což potvrdilo inhibici FLT3 a CDK4/6. Na myších modelech *in vivo* se látka vyznačovala výrazným efektem především vůči tumorům akutní myeloidní leukemie (AML) (Keegan *et al.*, 2014). Velkým potenciálem této a podobných látek či kombinační

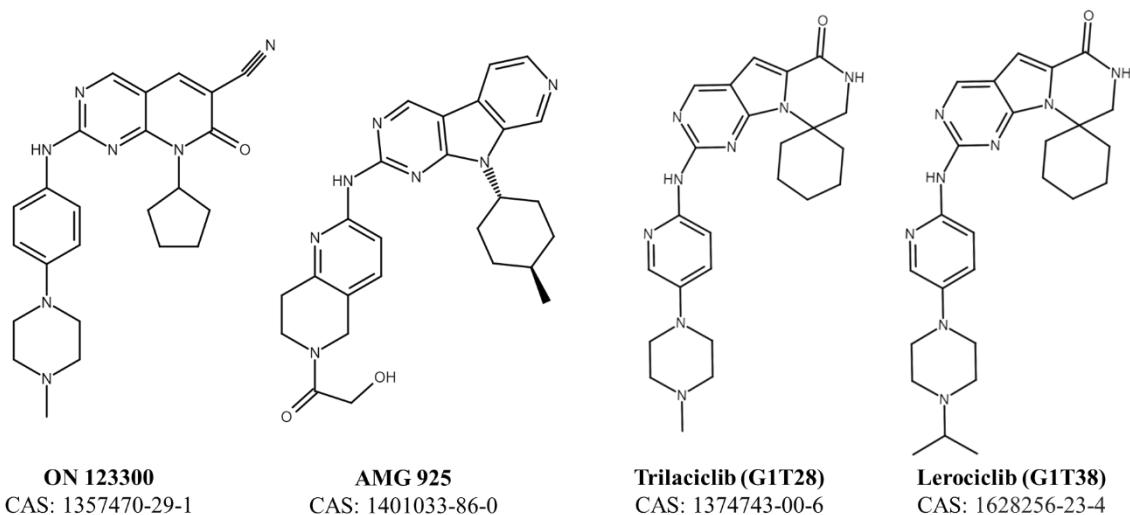
léčby je překonání resistance samotných inhibitorů FLT3 u pacientů s AML právě kombinovanou inhibicí s CDK4/6. AMG 925 je ve fázi I klinického testování u pacientů s akutní myeloidní leukemií (Li *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2018).

2.4.3 Trilaciclib a Lerociclib

Trilaciclib (G1T28) je dalším slibným selektivním inhibitorem CDK4/6. S výše jmenovanými zástupci sdílí zásadní pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinové jádro, jenž bylo na základě modelování upraveno do formy spiro(cyklohexan-1,9'-pyrazino[1',2':1,5]pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidonu. Řetězec na pozici C-2 jádra kombinuje přítomnost 4-methylové skupiny na piperazinu (jako u ON 123300) a přítomnost 2-aminopyridinu (jako u schválených inhibitorů CDK4/6) (Obr. 7) (Bisi *et al.*, 2016).

Trilaciclib, vyvinutý v roce 2016, vykazuje *in vitro* selektivní inhibici CDK4/6 v řádu jednotek $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ současně s asi 50 krát slabší inhibicí CDK9. Vývoj Trilaciclibu si kladl za cíl vytvořit silný a selektivní inhibitor CDK4/6, ale také ochranou látku proti myelosupresi vyvolané z léčby jinými terapiemi (Bisi *et al.*, 2016). V současné době totiž myelosuprese představuje hlavní (dávku-limitující) vedlejší účinek cytotoxické i cílené terapie. Dlouhodobá myelosuprese (projevující se jako neutropenie, anemie či trombocytopenie) může vést k celkovému oslabení organismu, krvácení až sepsi, proto je přínosné ji omezit (Johnson *et al.*, 2010). Účinek Trilaciclibu se na buněčné linii HS68 (model hematopoetických kmenových buněk závislých na CDK4/6) *in vitro* projevil zmírněním poškození DNA vyvolaného cytotoxickými látkami. Dále se ukázalo, že Trilaciclib přechodně a reverzibilně reguluje *in vivo* proliferaci hematopoetických kmenových buněk myši a psí kostní dřeně a poskytuje jim ochranu před toxickou léčbou a proliferačním vyčerpáním, ke kterému při ní dochází (Bisi *et al.*, 2016; He *et al.*, 2017). V současné době je Trilaciclib ve fázích II klinického testování pro léčbu metastatického karcinomu prsu a malobuněčného karcinomu plic, obojí v kombinaci s cytotoxickou terapií karboplatinou (Weiss *et al.*, 2019).

Lerociclib byl v roce 2017 vyvinut stejnou výzkumnou skupinou jako Trilaciclib. Oba inhibitory jsou strukturně totožné, až na rozdíl v koncovém substituentu řetězce vycházejícího z pozice C-2 na piperazinu je namísto methylové skupiny (přítomné u Trilaciclibu) skupina isopropylová (Obr. 7). Tato změna vedla k zachování potence vůči inhibici CDK4/6 za současného zlepšení farmakokinetických vlastností a perorální dostupnosti (Bisi *et al.*, 2017).



Obr. 7 Srovnání strukturálních vzorců vybraných inhibitorů CDK4/6, které jsou v klinickém testování.

Podobně jako u Trilaciclibu, vedlo působení Lerociclibu *in vitro* k poklesu fosforylace Rb a G1 bloku na buněčných liniích závislých na CDK4/6, včetně buněčných linií odvozených od melanomu, leukemie, lymfomů či karcinomů prsu. Účinek Lerociclibu *in vivo* vedl k výrazné inhibici růstu tumorů ER-pozitivního karcinomu prsu, ve srovnatelné, až lepší míře než v případě Palbociclibu. Navíc bylo zjištěno, že se Lerociclib u myši výrazně akumuluje v implantovaných nádorech, na rozdíl od plasmy (Bisi *et al.*, 2017).

U psů byla tato vlastnost prozkoumána na základě kontinuálního podávání Lerociclibu po dobu 28 dní, jež nevyvolalo propuknutí neutropenie. Vzhledem k jeho slibným preklinickým výsledkům by byl vhodným kontinuálně podávaným protirakovinným léčivem. V současné době je Lerociclib ve fázi I klinického testování pro léčbu hormon-senzitivního a HER2 negativního metastatického karcinomu prsu, v kombinaci s Fulvestrantem. Dále je také ve fázi I klinického testování pro léčbu nemalobuněčného karcinomu s mutovaným receptorem pro epidermální růstový faktor (EGFR) v kombinaci s Osimertinibem (inhibitor mutovaného EGFR) (Bisi *et al.*, 2017).

Slibný účinek Trilaciclibu i Lerociclibu byl pozorován *in vitro* i *in vivo* na modelu resistantních karcinomů prostaty. Trilaciclib i Lerociclib byly u zvířecích modelů karcinomu prostaty *in vivo* stejně účinné jako Docetaxel (cytostatický taxan), ale s výrazně slabším toxickým efektem na organismus. Účinek byl přetrvávající a především pozorovaný u karcinomů prostaty s androgenním receptorem (AR) bez mutací, mutovaným AR (resistentní) a dokonce i bez exprese AR. Tyto výsledky ukazují, že

inhibitory CDK4/6, Trilaciclib a Lerociclib, by mohly být pro léčbu karcinomů prostaty (resistentních vůči endokrinní terapii) lepší alternativou k taxanům (Stice *et al.*, 2017).

2.5 Selektivita a vedlejší cíle inhibitorů

Objev a následné schválení Palbociclibu, Ribociclibu a Abemaciclibu ukázalo, že je možné vyvinout selektivní inhibitory CDK4/6, přinášející výrazné benefity při léčbě pacientů. V dnešní době je mnoho dalších kombinací těchto schválených inhibitorů s odlišnými terapiemi v klinickém testování, vedle dalších vyvinutých látek (z nich některé jsou popsány výše). Jelikož byly schválené inhibitory CDK4/6 vyvinuty v relativně krátkém časovém rozmezí, je v poslední době zájem o detailní popis jejich odlišností. Rozdíly v selektivitě totiž ovlivňují působení inhibitorů na buněčné úrovni a mohou být také příčinou farmakologických rozdílů sledovaných při léčbě (Marra a Curigliano, 2019).

Poptávku po vývoji selektivních inhibitorů odůvodňuje klinický neúspěch pan-selektivních inhibitorů, jež vykazovaly velmi slibné preklinické účinky. Hlavní důvody neúspěchu nedostatečně selektivních inhibitorů byly tři. Zaprvé se jednalo o nejasný hlavní mechanismus působení (které CDK jsou opravdu *in vivo* inhibovány), který by byl základem léčebného účinku. Např. působení Flavopiridolu vedlo k zastavení buněčného cyklu, apoptose i autofagii (Mahoney *et al.*, 2013). Zadruhé, většina studií neprobíhala na specificky oddělených skupinách pacientů, protože nebyly a dodnes nejsou dostatečně známé biomarkery, které by určily citlivé pacienty. Nakonec, u neselektivních látek nebylo nalezeno terapeutické okno (rozmezí dávek, při nichž pozitivní účinky převažovaly nad negativními), jelikož pan-selektivní inhibitory CDK inhibovaly v použitých koncentracích kinasy zásadní pro proliferaci (CDK1) a přežití (CDK9) i zdravých buněk, což vedlo k rozsáhlým vedlejším účinkům (Asghar *et al.*, 2015).

Studium selektivity jednotlivých látek na buněčných či zvířecích modelech není vhodné, jelikož existuje mnoho nadbytečných nebo zastupitelných kinasových aktivit, nedostatek jedinečných substrátů a specifické signální sítě. U rakovinných buněk mají např. Palbociclib, Ribociclib i Abemaciclib podobné účinky, avšak u netransformovaných buněk se výrazně liší (Chen *et al.*, 2016). Pro studium selektivity se s úspěchem využívají metody popisu na molekulární úrovni, tedy inhibice samotných kinas mimo buňku, chemicko-proteomický přístup, sledování teplotní denaturace kinasy v přítomnosti inhibitoru, výpočetní analýza založená na struktuře a modelování (Huang *et al.*, 2009). Na základě profilů selektivity získaných pro stovky klinicky zajímavých látek (včetně

inhibitorů CDK4/6) byly porovnány jejich rozdíly a byly odhaleny jejich nové vedlejší cíle. Na základě těchto informací by mohly být některé látky využity pro léčbu jiných typů onkologických onemocnění (nebo úplně odlišných nemocí), než vůči kterým jsou primárně testovány, tzv. *drug repurposing* (Pushpakom *et al.*, 2019) Současně je také možné vyjít z údajů o inhibici některé kinasy a využít strukturu dané látky pro vývoj nových látek (Chen *et al.*, 2016).

2.5.1 Srovnání selektivity vybraných inhibitorů

Selektivita komerčně či klinicky používaných inhibitorů je zásadním faktorem ovlivňující šíři jejich účinků na molekulární a buněčné úrovni. Důkladná analýza selektivity u inhibitorů identifikovaných před desítkami let byla provedena a publikována až výrazně později. V dnešní době jsou inhibitory analyzovány z pohledu užší selektivity již v průběhu vývoje a následně je jejich selektivita ověřena v rámci dostupně testovaného kinomu (Chen *et al.*, 2016; Klaeber *et al.*, 2017).

Celokinomové analýzy však bývají součástí větších studií a konkrétní informace o inhibitech nejsou na první pohled dohledatelné v literatuře, většinou jsou součástí dodatečných informací k publikacím.

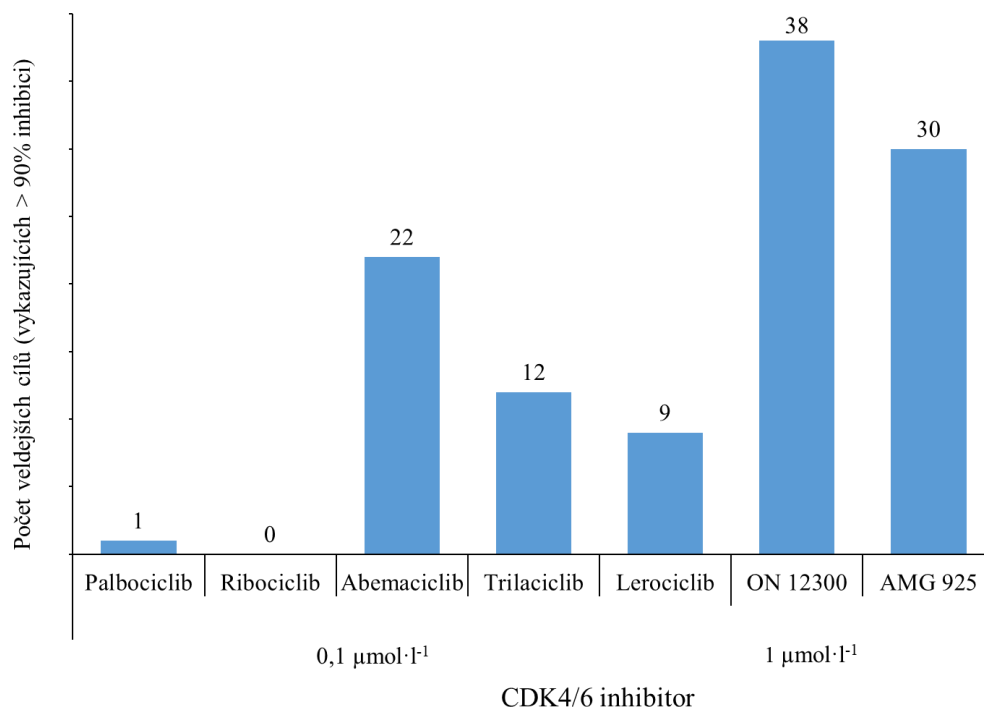
Z databází a původních článků byly získány a zpracovány dostupné informace o selektivě vybraných inhibitorů CDK4/6. Analýza selektivity byla u všech inhibitorů nejdříve provedena přístupem tzv. KINOMEscan[®] od společnosti Discoverx, který zjišťuje míru inhibice studovanou látkou na panelu 468 lidských kinas zahrnující všechny kinasové rodiny. Prvotní představu o selektivě udává počet vedlejších cílů (inhibovaných kinas mimo CDK4/6), jež jsou inhibovány více než z 90 %. To odpovídá residuální aktivitě kinasy < 10 % po působení určité koncentrace inhibitoru, ve srovnání s neošetřenou kontrolou. Bohužel koncentrace, při které jsou inhibitory analyzovány, není sjednocena, některé inhibitory jsou studovány v několika koncentracích (např. 0,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 5 nebo 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), některé však pouze při jedné koncentraci, což výrazně komplikuje jejich vzájemné porovnání z pohledu počtu vedlejších cílů. Při porovnání schválených inhibitorů CDK4/6 je možné vycházet z většího množství dat, z důvodu možnosti srovnání s ostatními byla využita data získaná při koncentraci 0,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, data o selektivě inhibitorů ON 123300 a AMG 925 jsou bohužel k dispozici pouze při 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Moret *et al.*, 2019).

Ze všech 7 studovaných inhibitorů disponuje nejvyšší selektivitou Ribociclib, u něhož v koncentraci 0,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ nebyl nalezen žádný vedlejší cíl, následovaný Palbociclibem

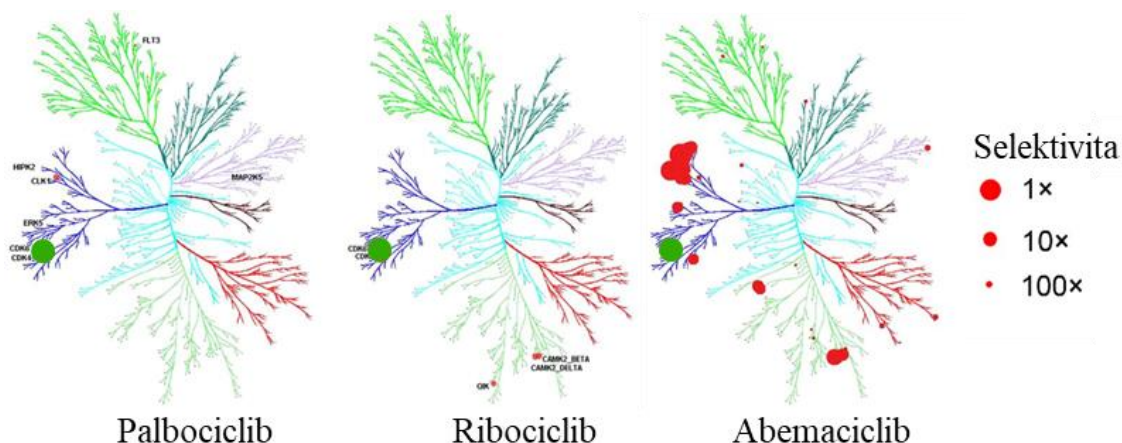
s jedním vedlejším cílem. Abemaciclib vykazuje ze schválených inhibitorů nejvíce vedlejších cílů, více než novější látky Trilaciclib a Lerociclib. Porovnání ON 123300 a AMG 925 s ostatními inhibitory přímo není možné, při koncentraci $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ se však vyznačovaly značným počtem vedlejších cílů, přičemž ON 123300 je pravděpodobně ze zkoumaných inhibitorů nejméně selektivní (Obr. 8) (Chen *et al.*, 2016; Klaeger *et al.*, 2017).

Platforma KINOME scan však mimo samotného počtu vedlejších cílů nabízí popis konkrétních kinas a porovnání síly interakce mezi primárním a vedlejším cílem inhibitoru. Na základě získaných dat ohledně selektivity je poté vytvořena vizualizace, kdy jsou vedlejší cíle a intenzita interakce s nimi (včetně např. mutovaných forem kinas) vyobrazeny (Obr. 9). Po objasnění konkrétních cílů je možné provést dodatečnou analýzu pro stanovení konkrétní hodnoty IC_{50} nebo inhibiční konstanty (K_I), popisující přímo inhibici enzymové aktivity (Hafner *et al.*, 2019).

Nižší selektivita inhibitorů je obecně považována za nežádoucí, protože při inhibici vedlejších cílů dochází i k různým projevům na buněčné úrovni, které mohou působit proti inhibici primárního cíle, snižovat potenci a v klinické fázi vést k vedlejším účinkům.



Obr. 8 Srovnání počtu vedlejších cílů inhibovaných z více než 90 % zkoumanými inhibitory. U Palbociclibu, Ribociclibu, Abemaciclibu, Trilaciclibu a Lerociclibu stanoveno při $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, u ON 123300 a AMG 925 při $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (zdroje Moret *et al.*, 2019; Bisi *et al.*, 2016; 2017; Reddy *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014).



Obr. 9 Selektivita inhibitorů CDK4/6 vizualizovaná na kinomu. Zelený kruh označuje primární cíl, červené vedlejší cíle, jejichž velikost zobrazuje afinitu. Čím větší je červený kruh, tím větší je afinita ve srovnání s primárním cílem (převzato z Chen *et al.*, 2016).

Existence vedlejšího cíle, jehož inhibice působící protirakovinně může být i přínosná a omezovat vývoj rezistence vůči léčbě (Klein *et al.*, 2018). Při studiu vedlejších cílů mezi schválenými inhibitory CDK4/6 bylo např. zjištěno že Palbociclib jako jediný ze zmíněných tří inhibuje rodinu fosfatidylinositol-5-fosfát 4-kinas (PIP4K), ovlivňující aktivitu proteinkinasy B (Akt), což vede k indukci autofagie u buněk karcinomu plic a hepatocelulárního karcinomu (Sumi *et al.*, 2015). Na rozdíl od Palbociclibu a Ribociclibu vykazuje Abemaciclib inhibici většího množství kinas, např. výrazně inhibuje kasein-kinasu 2 (CSNK 2), čímž může aktivovat kaspasovou kaskádu. Taktéž je známá interakce s kinasou NIMA 10 (NEK10) regulující odpověď na poškození DNA a přechod G2/M, i rodinou proto-onkogenních kinas (PIM), jež prohlubují nádorovou progresi (Moret *et al.*, 2019). Abemaciclib vykazuje i inhibici CDK9 (asi 20 krát slabší než CDK4/6). Na buněčné úrovni však nebyl sledován projev inhibice CDK9, tedy pokles fosforylace C-terminální domény RNA polymerasy II (Sumi *et al.*, 2015). Z důvodu inhibice většího počtu kinas vykazuje Abemaciclib jako jediný ze schválených inhibitorů CDK4/6 toxicitu i na buněčných liniích nezávislých na Rb (Knudsen *et al.*, 2017).

Novější inhibitory Trilaciclib a Lerociclib vykazují ve srovnání s Abemaciclibem vyšší selektivitu, přičemž Lerociclib je při koncentraci $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ selektivnější než Trilaciclib. Hlavními společnými vedlejšími cíli inhibovanými z více než 90 % při $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ jsou: FLT3, včetně mutovaných forem; NEK10; rodina proteinkinasy D (PRKD), které prodlužují trvání diacylglycerolové signalizace a podporují buněčnou proliferaci prostřednictvím MAPK-dráhy. Důležitým vedleším cílem Lerociclibu, ne však Trilaciclibu, v dané míře a koncentraci je monopolární vřetenková threonin/tyrosin kinasa (Mps1/TTK) (Bisi *et al.*, 2016; 2017). Tato kinasa je důležitou součástí

kontrolního bodu dělicího vřeténka při mitose, současně se v poslední době ukazuje, že může být vhodným biomarkerem rakovinných buněk a cílem protirakovinné terapie.

Jelikož nejméně selektivní inhibitory AMG 925 a ON 123300 byly studovány pouze při $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, byly brány v potaz pouze jejich vedlejší cíle s nejvyšší afinitou. AMG 925 mimo své primární cíle (CDK4/6 a FLT3) výrazně inhibuje také Mps1/TTK, rodinu Cdc-příbuzných kinas (CLK), jejíž inhibice potlačuje buněčný růst a indukuje apoptosu prostřednictvím modulace sestřihu pre-mRNA. Dále AMG 925 inhibuje mimo FLT3 i další receptorové tyrosinkinasy třídy III a to tyrosin-protein kinasu (c-KIT) a tyrosin kinasu receptoru pro destičkový růstový faktor (PDGFR) (Li *et al.*, 2014).

Inhibitor ON 123300 vykazuje při $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ široké spektrum vedlejších cílů (mimo primární cíle CDK4/6 a ARK5), včetně FLT3, c-KIT, PDGFR. Taktéž výrazně inhibuje nereceptorové tyrosinkinasy *sarcoma-protein* (Src), a Abelsonovu tyrosin kinasu (Abl). Obě tyto kinasy podporují proliferaci, přežití buněk a angiogenezi či adhezi (Reddy *et al.*, 2014).

Jednotlivé (nejvíce inhibované) vedlejší cíle studovaných inhibitorů jsou přehledně uvedeny v Tab. 1.

Popsané inhibitory spolu sdílejí strukturní motivy i některé vedlejší cíle. Ačkoliv interakce na molekulární úrovni byla s vedlejšími cíli prokázána, není jasné, zda a jakým způsobem se projeví i na buněčné úrovni. V dalších kapitolách jsou podrobněji popsány dva nejzajímavější a u několika inhibitorů společné vedlejší cíle, FLT3 a Mps1/TTK.

Tab. 1 Přehled nejvíce inhibovaných vedlejších cílů (mimo CDK4/6) studovaných inhibitorů. Vedlejší cíle společné alespoň dvěma inhibitorům jsou označeny tučně. Zdroje: Moret *et al.*, 2019; Bisi *et al.*, 2016; Bisi *et al.*, 2017; Reddy *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014.

	Nejvíce inhibované vedlejší cíle inhibitorů v řádu 100 -1000 nmol·l ⁻¹
Palbociclib	PIP4K, PI42C, ULK2
Ribociclib	ABL
Abemaciclib	CAMK2, CIT, CSNK2 , DYRK, ERK8, GSK3A, GSK3B, HIPK1, HIPK2, HIPK3, IRAK1, NEK10 , PIM1, PIM3,
Trilaciclib	FLT3(D835V) , FLT3(ITD, D835V) , GAK, MEK5, NEK10, PIP5K2C, PRKD1, PRKD2 , PRKD3, SLK, SNARK, ULK1, ULK2
Lerociclib	FLT3(D835V) , FLT3(ITD,D835V) , NEK10 , PRKD2 , PRKD3, SLK, SNARK, TTK, ULK2
AMG 925	c-KIT , CLK1, CLK2 , CLK4, CSF1R, CSNK2 , DYRK, ERK8, FLT3 , FLT3(ITD) , GAK, MEK5, PDGFR , PRKD2 , STK16, TTK ,
ON 123300	ABL, ARK5, c-KIT , c-Src, CLK2 , CDK9, CSNK2 , FLT3 , FYN, LCK, LYN, PDGFR , PRKD2 , TTK

2.5.2 FLT3

FLT3 (EC 2.7.10.1) je důležitou receptorovou tyrosinkinasou typu III, jež je exprimována především v hematopoetických progenitorových buňkách a hraje klíčovou roli v proliferaci, diferenciaci a přežití buněk myeloidní řady. Častou mutací genu pro tuto kinasu je tzv. vnitřní tandemová duplikace (FLT3-ITD), kdy dochází k prodloužení transmembránové části a změně konformace intracelulární domény, jež vede ke konstitutivní aktivitě FLT3 (Naoe a Kiyoi, 2004).

Aktivovaná FLT3 podporuje několik uzlů podřízených signálních drah, např. STAT5, MAPK-dráhu a Akt, čímž nakonec blokuje apoptosu a diferenciaci myeloidních buněk, což je jednou z hlavních příčin leukemogeneze. Mutace FLT3-ITD se nachází asi u 30 % pacientů s AML, malignitou resistantní vůči konvenční chemoterapii (Wu *et al.*, 2018).

V posledním desetiletí byly vyvinuty selektivní inhibitory FLT3 i FLT3-ITD, z nichž některé byly i schváleny pro léčbu, např. Midostaurin a Gilteritinib, další jsou v klinickém testování. Avšak při léčbě cílenými inhibitory FLT3 dochází velmi často k resistenci a relapsu onemocnění, na základě aktivačních mutací (substitucí) v kinasové doméně, omezujících interakci s léčivem (Smith *et al.*, 2017). Nejčastější pozicí mutace je důležité aminokyselinové residuum Asp835 (D835), které je součástí aktivační domény a koresponduje s hlavní mutační pozicí i u kinas KIT, PDGFR či Abl (Dixit *et al.*, 2009). V současné době jsou ve vývoji a testování inhibitory vykazující vysokou potenci i vůči FLT3 s mutacemi v kinasové doméně.

Při prozkoumání selektivity inhibitorů bylo zjištěno, že potence k inhibici Palbociclibem, Ribociclibem a Abemaciclibem se s mutacemi v kinasové doméně FLT3 může zvyšovat. Především u substituční mutace D835V (nahrazení Asp-Val) a kombinované mutace ITD a D835V vykazoval Abemaciclib výraznou míru inhibice (Tab. 2) (Moret *et al.*, 2019). V případě Trilaciclibu a Lerociclibu byly mezi nejvíce inhibovanými vedlejšími cíli právě také FLT3-D835V a FLT3-ITD-D835V. V případě AMG byla pozorována vysoká míra inhibice vůči FLT3, včetně mutovaných forem (Tab. 2). Při strukturní analýze aktivního místa CDK4 a FLT3 byla zjištěna výrazná strukturní homologie a je zřejmé, že substituční mutace vedou i ke změně konformace aktivního místa (Li *et al.*, 2014), ovlivňující míru interakce s inhibitory (Obr. 10).

Tab. 2 Residuální aktivita jednotlivých forem FLT3 po působení inhibitorů CDK4/6 v daných koncentracích (sloučení dat z databází použitých v Moret *et al.*, 2019; Bisi *et al.*, 2016; Bisi *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2014; Reddy *et al.*, 2014) (n. s. – nebylo studováno, n. p. – nebylo publikováno).

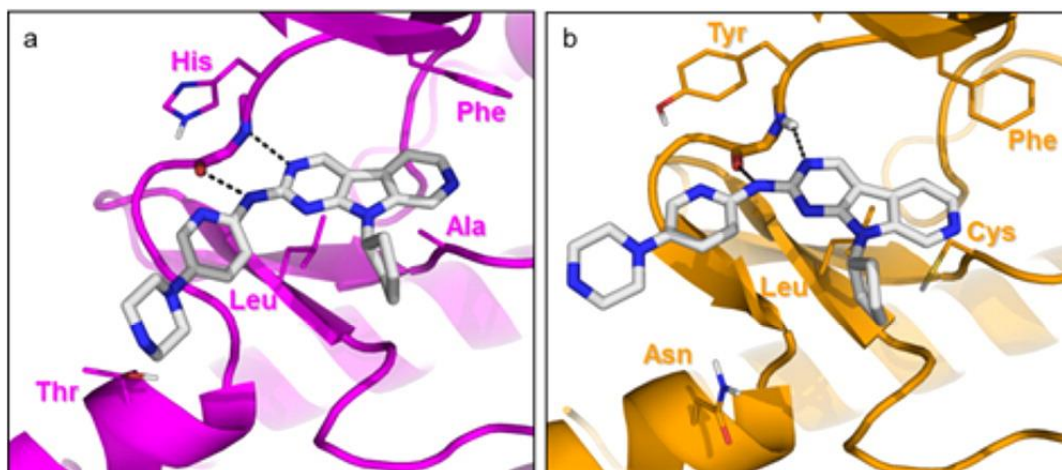
Forma kinasy	Residuální aktivita po působení 100 nmol·l ⁻¹ inhibitoru (%)					Res. aktivita po působení 1 μmol·l ⁻¹ inhibitoru (%)	
	Palbo-ciclib	Ribo-ciclib	Abema-ciclib	Trila-ciclib	Lero-ciclib	AMG 925	ON 123300
FLT3	98	100	85	n. p.	n. p.	0,3	1
FLT3(ITD)	100	100	100	n. p.	n. p.	0,3	n. s.
FLT3(D835H)	100	80	78	n. p.	n. p.	2,9	n. s.
FLT3(D835V)	66	88	20	<10	<10	n. s.	n. s.
FLT3(D835Y)	100	84	96	n. p.	n. p.	1,0	n. s.
FLT3(ITD, D835V)	83	100	29	<10	<10	n. s.	n. s.

2.5.3 Doposud známé účinky inhibitorů CDK4/6 na modelu leukemie

Při studování role komplexů CDK/Cyc u buněk AML byla stanovena zvýšená aktivita komplexů CDK4/6-CycD, z důvodu vyšší exprese cyklinů D, především CycD3. Následně bylo zjištěno, že leukemické buňky disponující FLT3-ITD jsou závislé na CDK6, avšak ne na CDK4. Signalizace vedoucí od FLT3-ITD přispívá expresi CDK6, prostřednictvím kaskády zahrnující nереceptorovou kinasu hematopoetických buněk (HCK) (Lopez *et al.*, 2016). CDK6 zpětnově přímo reguluje transkripci genů *Flt3* a *Pim1*, a myši hematopoetické buňky s vyřazeným genem pro CDK6^{-/-} nepodléhají transformaci způsobené FLT3-ITD (Uras *et al.*, 2016).

Nejvíce prozkoumaným inhibitorem CDK4/6 na modelu leukemie a konkrétně AML je Palbociclib. Inhibice Palbociclibem *in vitro* vedla u buněk disponujících FLT3-ITD k apoptose. Kombinované působení Palbociclibu a inhibitoru FLT3 vyústilo v synergickou cytotoxicitu. Palbociclib navíc vykazoval i protinádorové působení a blokoval progresi tumorů i expresi FLT3 i PIM1 na myších modelech *in vivo* (Uras *et al.*, 2016).

Nedávno bylo potvrzeno i vyvolání apoptosy po působení Palbociclibu na buňky AML disponující mutací FLT3-D835Y *in vitro* i *in vivo* a současně byla rozšířena transkripční regulace CDK6 o geny *AuroraA* a *Akt*. Zatímco inhibitory AURORA a Akt mají terapeutický potenciál, jako samotné nebyly dostatečně efektivní. Avšak kombinace s Palbociclibem byla *in vitro* účinná a mohla by být i klinicky využita (Uras *et al.*, 2018).



Obr. 10 Vazba AMG 925 do aktivního místa CDK6 (vlevo, růžově), na základě kokystalové struktury (PDB: 4P41) a FLT3 (vpravo žlutě) na základě modelu. Klíčová katalytická residua jsou zobrazena a popsána. V obou strukturách interaguje pyridinový řetězec s residuem Phe koordinujícím vstup do aktivního místa, zatímco aminopyridinový kruh tvoří dvě vodíkové interakce s residui pantové smyčky. Na základě struktur a vazebných interakcí je patrná možnost duální inhibice FLT3/CDK4/6 (převzato z Li *et al.*, 2014).

Působení Ribociclibu bylo podrobeno několik linií T-buněčné akutní lymfoblastické leukemie (T-ALL), na nichž v případě funkčního Rb vykazoval výrazný cytostatický efekt (G1 blok) a synergistický efekt s kortikosteroidy (Pikman *et al.*, 2017). Velmi podobných výsledků bylo dosaženo na liniích B-buněčné akutní lymfoblastické leukemie (B-ALL) (Bortolozzi *et al.*, 2018).

Účinek Abemaciclibu na AML byl prozkoumán *in vitro* na linii MV-4-11 v rámci cytometrické analýzy a analýzy cytotoxicity. Byl potvrzen výrazný G1 blok a následně bylo studováno i působení *in vivo* na myším modelu subkutánního tumoru MV-4-11, kde se projevila výrazná inhibice růstu. Působení Abemaciclibu se na rozdíl od Palbociclibu projevilo poklesem fosforylace proteinu BAD, přímého substrátu kinas PIM (Gelbert *et al.*, 2014).

Působení AMG 925 bylo na modelu AML studováno důkladně, vzhledem k jeho povaze duálního inhibitoru CDK4/6 a FLT3, zatímco o účinku ON 123300, Trilaciclibu ani Lerociclibu na AML zatím nejsou informace k dispozici. Srovnání společných vlastností inhibitorů na více modelech buněk AML zatím provedeno nebylo.

2.5.4 Mps1/TTK

Mps1 (EC 2.7.12.1) je klíčovou kinasou pro kontrolní bod mitotického vřeténka, který zajišťuje správné rozdělení chromosomů do dceřiných buněk. U zdravých buněk se

vyskytuje ve velmi nízkých hladinách, na rozdíl od výrazného zastoupení u lidských nádorových onemocnění, např. buněk glioblastomu, karcinomu prsu, štítné žlázy nebo prostaty. Bylo vyvinuto několik inhibitorů Mps1, jenž zastavují proliferaci rakovinných buněk a *in vivo* prodlužují přežití laboratorních zvířat s uvedenými lidskými malignitami. Inhibice Mps1 zvyšuje počet chyb v segregaci chromosomů a vážně snižuje životaschopnost rakovinných buněk. Touto inhibicí jsou selektivně ovlivněny rakovinné buňky s vyšší mírou aneuploidie, zatímco netransformované buňky jsou ušetřeny. Několik inhibitorů Mps1 je v klinickém testování, v kombinaci s jinými látkami (Xie *et al.*, 2017).

Mps1 by mohla mimo roli léčebného cíle sloužit i jako imunogenní epitop pro vyvolání protirakovinné imunitní odpovědi. Specifická část jejího řetězce by mohla být použita jako ideální antigenní peptid pro aktivaci cytotoxických T-lymfocytů vůči rakovinným buňkám s výrazným zastoupením Mps1. Současně by mohla sloužit jako biomarker onemocnění a průběhu léčby. Na základě krystalové struktury s ATP-kompetitivními inhibitory bylo zjištěno, že aktivační smyčka v neaktivním stavu zabraňuje vazbě ATP, mnohem méně však brání vazbě některých inhibitorů (Roorda *et al.*, 2019).

Při porovnání struktury inhibitorů CDK4/6 a Mps1 byly nalezeny podobné strukturní motivy (benzyl-amino-pyrimidin, řetězce v pozici C-2 na pyrimidinu), což by mohlo vysvětlovat interakci inhibitorů CDK4/6 s aktivním místem Mps1.

2.5.5 Využití vedlejších cílů inhibitorů pro léčbu

Jak již bylo zmíněno výše, existence vedlejšího cíle, jehož inhibice působí proti nádorovému bujení, může být přínosná pro léčbu malignit. V případě, že se příznivý efekt prokáže i na klinické úrovni, je možné rozšířit využití dané látky i pro jiné typy onemocnění. Tento koncept, tzv. *drug repurposing* je v poslední době na poli vývoje a výzkumu léčiv často diskutován i využíván. Hlavní výhodou takového přístupu je dostatek informací o schválených látkách, především z pohledu farmakokinetiky a toxicity, není tedy třeba provádět analýzu těchto faktorů znovu (Cha *et al.*, 2018).

Koncept využití již existujících či schválených látek nezahrnuje pouze onkologická onemocnění, ale i řadu dalších nemocí, včetně virových. V posledních měsících bylo navrženo a laboratorně testováno několik existujících léčiv, která by mohla působit proti novému typu koronaviru způsobujícího těžký akutní respirační syndrom (SARS-CoV-2). Mezi nimi je např. Camostat (inhibitor serinových proteas), Baricitinib (inhibitor

Janusovy kinasy) nebo antimalarika Arbidol a Chlorochinon. Tyto látky by mohly inhibovat fúzi s buněčnou membránou a vstup viru do buněk (Li *et al.*, 2020).

První případy znovuvyužití byly založeny na klinickém pozorování (Sildenafil vyvinutý pro léčbu anginy pectoris, nově využitý pro léčbu erektilní dysfunkce; Rituximab pro léčbu lymfomů, využitý u revmatoidní artritidy), současné metody však zahrnují screening databází, molekulární modelování, vazebné i genetické analýzy (Pushpakom *et al.*, 2019). Studium selektivity kinasových inhibitorů je také důležitým aspektem, jelikož inhibitory vyvinuté proti jedné kinase jich mohou inhibovat několik. Profily selektivity včetně vedlejších cílů jsou pro většinu známých inhibitorů k dispozici, avšak jejich působení na buněčné úrovni není objasněno (Klaeger *et al.*, 2017).

Dalšími příklady „*drug repurposingu*“ může být účinek Cabozantinibu (inhibitor MET a VEGFR) na modelu AML disponující FLT3-ITD, jenž je momentálně ve druhé fázi klinického testování u pacientů s těmito malignitami (Lu *et al.*, 2016). Inhibitor Brutonovy tyrosin-kinasy (BTK) Ibrutinib vyvinutý pro B-buněčné malignity se taktéž projevil výrazným účinkem na AML disponující FLT3-ITD (Pillinger *et al.*, 2015) a nemalobuněčný karcinom plic s mutovaným EGFR (Gao *et al.*, 2014). Inhibice vedlejších cílů může mít pro léčbu pozitivní i negativní efekt a studium selektivity je nutné u klinicky využívaných inhibitorů, jelikož u některých byl až po klinickém testování objasněn primární mechanismus jejich působení (Lin *et al.*, 2019).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

- 2-merkptoethanol ($\geq 97\%$, Serva, Německo)
- akrylamid - AA (VWR, USA)
- aprotinin, lyofilizovaný (Sigma-Aldrich, USA)
- bovinní sérový albumin – BSA (VWR, USA)
- bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, Rakousko)
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, USA)
- dihydrogenfosforečnan draselný bezvodý (Lachema, ČR)
- dimethylsulfoxid (DMSO), pro buněčné kultury (PanReac AppliChem, Německo)
- dithiotreitol (DTT) (Roche, Německo)
- dodecylsírán sodný (SDS) ($\geq 98\%$, Lach-ner, ČR)
- Dulbeccem modifikované Eaglovo médium (DMEM) (Sigma-Aldrich, USA)
- ethanol 96% (Lach-ner, ČR)
- fenylmethansulfonylfluorid (PMSF) (Sigma-Aldrich, Čína)
- fetální bovinní sérum (FS) (Biowest, Francie)
- fluorid sodný ($\geq 98\%$, Lach-ner, ČR)
- glycin ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, USA)
- hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (PENTA, ČR)
- hydroxid sodný ($\geq 98\%$, Penta, ČR)
- chemiluminiscenční kit SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate a West Pico PLUS Chemiluminiscent Substrate (Thermo Fisher Scientific, USA)
- chlorid draselný ($\geq 99\%$, Lachema, ČR)
- chlorid hořečnatý (hexahydrát, $\geq 98\%$, Lach-Ner, ČR)
- chlorid sodný (PENTA, Česká republika)
- kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová (HEPES) ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, USA)
- kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) ($\geq 98,5\%$ Sigma-Aldrich, Čína)
- kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctová (EGTA) ($\geq 97\%$, Sigma-Aldrich, USA)

- kyselina fosforečná 85% (PENTA, Česká republika)
- kyselina chlorovodíková 35% (Lach-Ner, ČR)
- kyselina octová 99% (Lach-Ner, ČR)
- kyselina trihydrogenfosforečná 85% (Lach-ner, ČR)
- leupeptin, lyofilizovaný (Sigma-Aldrich, USA)
- L-glutamin, pro buněčné kultury (Sigma-Aldrich, USA)
- marker molekulových hmotností proteinů Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (ThermoFisher, USA)
- médium Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) (Biowest, Francie)
- methanol (PENTA, Česká republika)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Čína)
- N,N'-metylenbisakrylamid (BIS) ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, Čína)
- Nonidet P 40 (Fluka, Švýcarsko)
- orthovanadičnan sodný (Sigma-Aldrich, USA)
- penicilin-streptomycin v 0,9% NaCl, pro buněčné kultury – 10 000 U/ml penicilinu a 10 mg/ml streptomycinu (Sigma-Aldrich, USA)
- peroxodisíran amonný (APS) ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, Japonsko)
- propidium jodid ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, USA)
- Ponceau S (SERVA, Německo)
- tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) ($\geq 99\%$ Serva, Německo)
- TWEEN 20 (Sigma-Aldrich, USA)

3.1.2 Roztoky

- Kultivační médium DMEM s 10% FS: 10 g práškového média v 1 l sterilní dH₂O; doplněno: 10% (v/v) fetální bovinní sérum; penicilin 100 U·ml⁻¹; streptomycin 100 µg·ml⁻¹; 2 mmol·l⁻¹ L-glutamin
- Kultivační médium RPMI 1640 s 10% FS: 10 g práškového média v 1 l sterilní dH₂O; doplněno: 10% (v/v) fetální bovinní sérum; penicilin 100 U·ml⁻¹; streptomycin 100 µg·ml⁻¹; 2 mmol·l⁻¹ L-glutamin
- Fosfátový pufr (PBS): 137 mmol·l⁻¹ NaCl; 2,7 mmol·l⁻¹ KCl; 1,5 mmol·l⁻¹ KH₂PO₄; 6,4 mmol·l⁻¹ Na₂HPO₄; v dH₂O, pH = 7,4
- Lyzační pufr W: 10 mmol·l⁻¹ HEPES; 5 mmol·l⁻¹ KCl; 1,5 mmol·l⁻¹ MgCl₂; 1 mmol·l⁻¹ EDTA; 1 mmol·l⁻¹ EGTA; 0,5% (v/v) Nonidet NP40; v dH₂O, pH = 7,4.

Před použitím přidáno 2 mmol·l⁻¹ NaF; 1 mmol·l⁻¹ PMSF; 1 mmol·l⁻¹ Na₂VO₃; 1 mmol·l⁻¹ DTT; 2 µg·ml⁻¹ aprotinin; 0,5 µg·ml⁻¹ leupeptin; v dH₂O

- Vzorovací pufr (5x): 0,3 mol·l⁻¹ Tris pH = 6,8; 10% (w/v) SDS; 50% (v/v) glycerol; 0,05% (w/v) bromfenolová modř; 5% (v/v) 2-merkaptoethanol;
- Tris-HCl pH 6,8: 1 mol·l⁻¹ Tris v dH₂O; konc. HCl upraveno pH na hodnotu 6,8
- Tris-HCl pH 8,8: 1 mol·l⁻¹ Tris v dH₂O; konc. HCl upraveno pH na hodnotu 8,8
- Tris- pufr (TBS): 20 mmol·l⁻¹ Tris; 137 mmol·l⁻¹ NaCl; v dH₂O; pH upraveno pomocí koncentrované HCl na výslednou hodnotu 7,6
- Tris – pufr s Tweenem (TBS-T): k TBS přídavek 0,05% (v/v) TWEEN 20
- Tris-glycinový elektrodotový pufr: 25 mmol·l⁻¹ Tris; 192 mmol·l⁻¹ glycin; 0,1% SDS (w/v); v dH₂O; pH = 8,3
- Bradfordovo činidlo: 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250; 4,7% (v/v) EtOH; 8,5% (v/v) H₃PO₄; v dH₂O
- 30% AA + 0,8% Bis: 30% (w/v) AA; 0,08% (w/v) Bis v dH₂O
- Blotovací pufr: 25 mmol·l⁻¹ Tris; 192 mmol·l⁻¹ glycin; v dH₂O
- Roztok Ponceau S: 0,2% (w/v) Ponceau S v 1% (v/v) kyselině octové v dH₂O

3.1.3 Biologický materiál

Buněčné linie pocházející z banky German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (Německo) – v závorce uvedeno katalogové číslo:

- MOLM-13 – odvozené od akutní myeloidní leukemie (ACC 554)
- EOL-1 – odvozené od akutní (eosinofilní) myeloidní leukemie (ACC 386)
- U2932 – odvozené od B-buněčného lymfomu (ACC 633)

Buněčné linie pocházející z The American Type Culture Collection - ATCC (USA)

- MV-4-11 – odvozené od akutní myeloidní leukemie (ATCC CRL-9591)
- K562 – odvozené od chronické myeloidní leukemie (ATCC CCL-243)

3.1.4 Protilátky

Pro imunodetekci proteinů byly použity primární protilátky uvedené v Tab. 3, kde je popsán jejich vazebný cíl, původ, výrobce a ředění. V Tab. 4 jsou uvedeny sekundární protilátky, jejich popis, výrobce a ředění.

Tab. 3 Použité primární protilátky, popis jejich cíle, zdroje, výrobce a ředění.

Zkrácený název	Celý název cíle	Molekulová hmotnost (kDa)	Protilátka: klon/zdroj	Výrobce	Ředění
c-Myc	homolog virového onkogenu ptačí myelocytomatosy	60	D3N8F/ králičí monoklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
CDK4	cyklin -dependentní kinasa 4	30	DCS156/ myši monoklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
CDK6	cyklin -dependentní kinasa 6	36	D4S8S/ králičí monoklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
CycD3	cyklin D3	31	myši monoklonální	Invitrogen (USA)	1:200
ERK 1/2	extracel. signálem regulovaná kinasa 1/2	42/44	králičí polyklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
pERK 1/2 (T202/Y204)	fosforylovaná ERK 1/2	42/44	králičí polyklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
FLT3	FMS-příbuzná tyrosin kinasa 3	130, 160	8F2/ králičí monoklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
pFLT3 (Y589/Y591)	fosforylovaná FLT3	130, 160	30D4/ králičí monoklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
Mcl-1	myeloid cell leukemia	40	D35A5/králičí monoklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
PARP	poly(ADP- ribosa)polymerasa	110, 89	46D11/ králičí monoklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
PDGFRa	receptor pro destičkový růstový faktor	110	D1E1E/ králičí monoklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
pPDRFRa (Y849)	fosforylovaný PDGFRa	110	C43E9/ králičí monoklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
Rb	retinoblastomový protein	110	4H1/myši monoklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
pRb (Ser807/811)	fosforylovaný Rb	110	D20B12/ králičí monoklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
RNA Pol II	RNA Polymerasa II	235	kozí polyklonální	Merck (Německo)	1:1000
pRNA Pol II	fosforylovaná RNA Pol II	235	3E10/ krysí monoklonální	Merck (Německo)	1:1000
STAT1	signální přenašeč a aktivátor transkripce 1	84, 91	D1K9Y/ králičí monoklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
pSTAT1 (Y701)	fosforylovaný STAT1	84, 91	D4A7/ králičí monoklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
STAT5	signální přenašeč a aktivátor transkripce 5	90	D2O6Y/ králičí monoklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
pSTAT5 (Y694)	fosforylovaný STAT5	90	C71E5/ králičí monoklonální	Cell Signalling (USA)	1:500
α -tubulin		50	DM1A/myši monoklonální	Merck (Německo)	1:5000

Tab. 4 Použité sekundární protilátky, jejich popis, výrobce a ředění.

Zkrácený název	Celý název	Popis protilátky	Výrobce	Ředění
SWAR	swine anti-rabbit Ig	HRP-konjugovaná prasečí Ig proti králičí Ig	Cell Signalling (USA)	1: 10 000
RAM	rat anti-mouse Ig	HRP-konjugovaná krysí Ig proti myší Ig	Cell Signalling (USA)	1: 50 000
G anti-rat	goat anti-rat Ig	HRP-konjugovaná kozí Ig proti krysí Ig	Merck (Německo)	1: 50 000
R anti-goat	rabbit anti-goat Ig	HRP-konjugovaná králičí Ig proti kozí Ig	Abcam (UK)	1: 10 000

3.1.5 Komerční inhibitory

V experimentální části byly použity komerčně dostupné inhibitory, jež jsou popsány v Tab. 5.

3.2 Přístrojové vybavení a příslušenství

- analytická váha KERN ABT 120-5DM (KERN, Německo)
- aparatura pro western blot Mini Trans-Blot Module (Bio-Rad, USA)
- autokláv MLS-3750 (Sanyo, Japonsko)
- automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- CCD kamera s příslušenstvím Luminescent image analyzer LAS-4000 (Fujifilm, Japonsko)
- centrifuga ROTINA 420 / 420 R (HETTICH, Německo)
- centrifuga Thermo megafuge 16-R (ThermoFisher, USA)
- CO₂ inkubátor MCO-17AIC (Sanyo, Japonsko)

Tab. 5 Použité komerčně dostupné inhibitory, jejich prodejce, čistota a metoda jejího stanovení.

Látka	CAS	Prodejce	Čistota (%)	Metoda stanovení čistoty
Palbociclib	571190-30-2	MedChemExpress	99	LC/MS
Ribociclib	1211441-98-3	MedChemExpress	99	LC/MS
Abemaciclib	1231929-97-7	MedChemExpress	99	LC/MS
ON 123300	1357470-29-1	MedChemExpress	98	LC/MS
AMG 925	1401033-86-0	MedChemExpress	99	LC/MS
Trilaciclib	1374743-00-6	MedChemExpress	98	LC/MS
Lerociclib	1628256-23-4	MedChemExpress	98	LC/MS
NU6140	444723-13-1	Santa Cruz Biotechnology	95	HPLC

- hlubokomrazicí box New Brunswick Innova U535 (New Brunswick Scientific, USA)
- inverzní mikroskop CK2 (Olympus, Japonsko)
- kývačka Mini-Rocker Shaker, MR-1 (Biosan, Lotyšsko)
- laboratorní váhy KERN PCB 200-2 (KERN, Německo)
- laminární box OS-N (Merci, Česká republika)
- laminární box VBH Compact, VBH36 C2 (Steril, Itálie)
- lednice Liebherr FKvsl 5413 (Liebherr, Německo)
- magnetická míchačka Arex-6 (VELP Scientifica, Itálie)
- míchačka zkumavek s bezdotykovým spínačem (VELP Scientifica, Itálie)
- minicentrifuga D1008 (DLAB, Čína)
- mraznička Innova (Fagor, Thajsko)
- pH metr pH 50 (XS Instruments, Itálie) a skleněná pH elektroda (Sentek, Velká Británie)
- pipetor accu-jet-pro (BrandTech Scientific, USA)
- pipetor Swiftpet Pro (HTL, Polsko)
- průtokový cytometr BD FACSVersé (BD Biosciences, USA)
- předvážky KERN-PCB (Kern, Německo)
- souprava pro SDS-PAGE Mini-Protean Tetra Systém (Bio-Rad, USA)
- spektrofotometr UV-1800 (Shimadzu, Japonsko)
- stolní centrifuga Centrifuge 5424 R a Centrifuge 5702 R (Eppendorf, Německo)
- stolní centrifuga Heraeus Megafuge 16 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- systém na úpravu vody SIMS600CP Millipore Simplicity Personal Ultrapure Water System (EMD Millipore, Německo)
- termoblok Compact Digital Dry Bath/Block Heater (Thermo Fisher Scientific, USA)
- ultrazvuková vana VWR Ultrasonic Cleaner (VWR, USA)
- váhy ABT 120 - 5DM (Kern, Německo)
- vodní lázeň GFL 1032 (GFL Gesellschaft für Labortechnik, Německo)
- zdroj pro SDS-PAGE PowerPac Basic (Bio-Rad, USA)

Spotřební zboží: sterilní zkumavky o objemu 10 ml a 15 ml (GAMA GROUP, Česká republika), sterilní Petriho misky Ø 100 mm a 50 mm (TPP, Švýcarsko), mikrozukavky 0,5 ml; 1,5 ml; 5 ml (Eppendorf, Německo), nitrocelulosaová membrána pro western blot (Bio-Rad, USA), Bürkerova komůrka (Meopta, Česká republika).

Běžné laboratorní vybavení: kádinky, odměrné válce, skleněné tyčinky, chemické lžičky, váženky, špičky, zkumavky, stříčky, stojan na zkumavky, stojan na mikrozksamavky, odměrné válce, skalpel, pinzety.

3.3 Metody

3.3.1 Kultivace buněk.

Kultivace buněk probíhala v inkubátoru v atmosféře s 5% CO₂, za teploty 37 °C, při 100% vzdušné vlhkosti. Buňky MV-4-11, EOL-1, MOLM-13 a U2932 byly kultivovány v médiu RPMI 1640 s 10% FS. Buňky K562 byly kultivovány v médiu DMEM s 10% FS.

Všechny buněčné linie byly odvozeny od hematologických malignit, jednalo se tedy pouze o suspenzní kultury buněk. Linie byly pravidelně (průměrně jednou za tři dny) pasážovány. Ve sterilním prostředí laminárního boxu byla suspenze buněk převedena do sterilní centrifugační zkumavky a centrifugována za laboratorní teploty po dobu 5 min při 200 g. Supernatant byl následně odebrán a pelet tvořený buňkami byl resuspendován v čerstvém médiu. Z této suspenze byla část převedena do sterilní Petriho misky a doplněna čerstvým médiem. Subkultura buněk byla naředěna podle potřeby množství buněk pro experimenty.

3.3.2 Cytometrická analýza buněčného cyklu

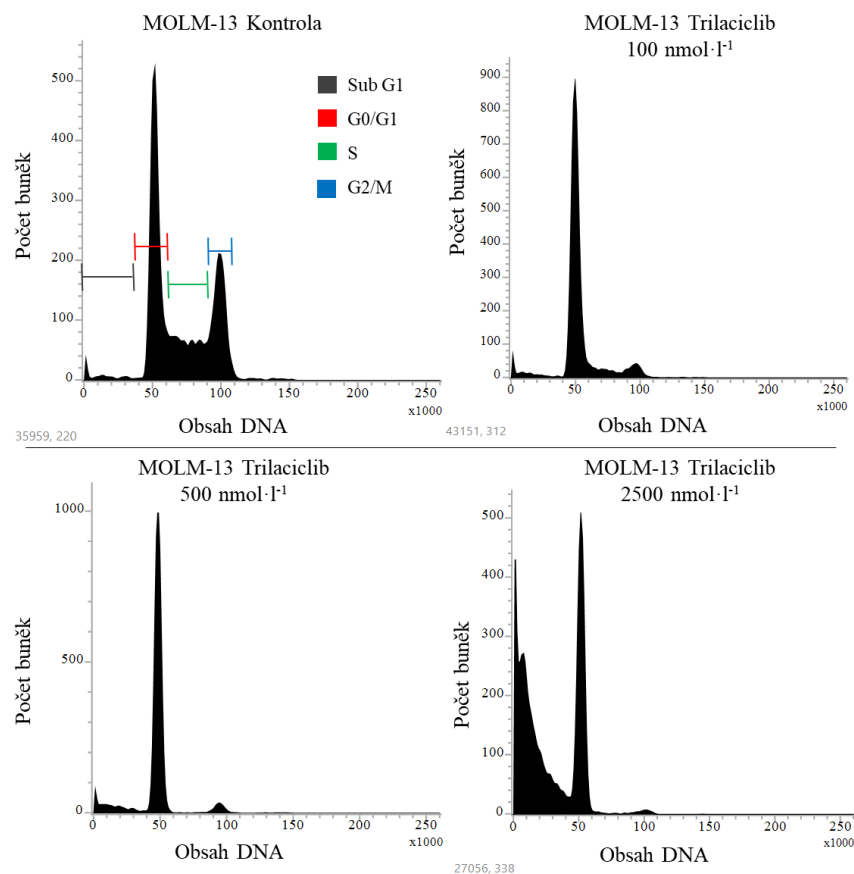
Suspenze asynchronních buněk kultivovaných v Petriho miskách Ø 100 mm byla převedena do sterilní centrifugační zkumavky a byla centrifugována za laboratorní teploty po dobu 5 min při 200 g. Kultivační médium bylo od buněčného peletu odsáto a pelet byl resuspendován v přesném objemu čerstvého média. Následně bylo sterilně odebráno 10 µl suspenze a napipetováno do Bürkerovy komůrky. Byl určen počet buněk obsažených v 1 ml suspenze, která byla dále naředěna podle uspořádání daného experimentu. Ze suspenze buněk bylo poté odebíráno přesně 5 ml, které byly převedeny do sterilních Petriho misek Ø 50 mm. Násady jednotlivých buněčných linií byly následující:

- MV-4-11, MOLM-13, U- 2932: 1 000 000 buněk v 5 ml média
- EOL-1: 2 000 000 buněk v 5 ml média
- K562: 500 000 buněk v 5ml média

Buňky byly v Petriho miskách přeneseny do inkubátoru a inkubovány nejméně 1 hodinu. Následně byly k buněčné suspenzi přidány roztoky inhibitorů v DMSO předem naředěné na potřebnou koncentraci, tak aby koncentrace DMSO v médiu nepřekročila 0,1 % (v/v). Buňky byly poté dále inkubovány v inkubátoru po stanovenou dobu, ve většině experimentů 24 h, popř. 48 h.

Po uplynutí inkubační doby byly buněčné suspenze tzv. sklizeny do vychlazených centrifugačních zkumavek (převedeny z misky, jež byla následně opláchnuta 1 ml PBS, taktéž přidaného k suspenzi) na ledu. Suspenze byly centrifugovány po dobu 8 minut při 1000 g a 4°C. Po centrifugaci byly pelety rozsuspendovány v 1 ml PBS. Centrifugační a promývací krok byl ještě jednou zopakován a po poslední centrifugaci byl buněčný pelet rozsuspendován ve 100 µl PBS a po kapkách za stálého míchání byl k suspenzi přikapáván 1 ml 70% ethanolu pro zafixování buněk. Takto připravené vzorky byly uchovány při -20°C alespoň 24 hodin, nejdéle asi 14 dní.

Před samotnou cytometrickou analýzou byly vzorky přeneseny na led, důkladně promíchány a centrifugovány po dobu 8 minut při 1000 g a 4°C. Po odsátí supernatantu byl pelet rozsuspendován v 1 ml PBS a inkubován asi 5 minut na ledu. Následně proběhla druhá centrifugace za stejných podmínek, po níž byl opět odsát supernatant a pelet byl rozsuspendován v 600 µl filtrovaného PBS (u delších experimentů a většího objemu buněčného peletu byl tento ještě předtím adekvátně naředěn filtrovaným PBS). Následně byl přidán roztok propidium jodidu v PBS do konečné koncentrace 0,1 mg·ml⁻¹ a vzorky byly inkubovány po dobu 30 minut ve tmě za pokojové teploty s občasným promícháváním. Nakonec byla provedena analýza vzorků pomocí průtokového cytometru za využití excitačního laseru o vlnové délce 488 nm pro analýzu obsahu jaderné DNA a stanovení zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Měření bylo prováděno v duplikátu, získané histogramy (Obr. 11) byly analyzovány v software ModFit LT 5.0 (Verity Software house, USA). Průměrné hodnoty z měření byly následně vyneseny ve formě grafu zobrazujícího procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Bylo vyhodnoceno procento intaktních buněk, u nichž byla podle obsahu DNA stanovena fáze buněčného cyklu a zvláště procento fragmentů a zbytků buněk ze všech analyzovaných partikulí v cytometru. U sledování efektů na buněčný cyklus po delším ošetření byly výsledky pro přehlednost prezentovány pouze ve formě histogramů získaných přímo při měření.



Obr. 11 Příklady histogramů získaných z cytometrického měření buněk MOLM-13 (DNA označena propidium jodidem) po 24 hodinách ovlivnění Trilaciclibem. U kontrolního vzorku jsou barevně vyznačeny rozsahy jednotlivých fází buněčného cyklu.

3.3.3 Ovlivnění, sklizení a lýze buněk

Buněčná kultura vybraných buněk pro analýzu Western blot byla připravena podobně jako v případě analýzy buněčného cyklu. Vhodný objem suspenze buněk byl převeden do sterilní centrifugační zkumavky a centrifugován za laboratorní teploty po dobu 5 min při 200 g. Kultivační médium bylo odsáto a pelet byl resuspendován v přesném objemu čerstvého média. Následně bylo sterilně odebráno 10 μ l suspenze a napipetováno do Bürkerovy komůrky. Byl určen počet buněk obsažených v 1 ml suspenze, která byla dále naředěna podle uspořádání daného experimentu. Ze suspenze buněk bylo poté odebíráno přesně 10 ml, které byly převedeny do sterilních Petriho misek \varnothing 100 mm. Násady jednotlivých buněčných linií byly následující:

- MV-4-11, MOLM-13, U- 2932: 4 000 000 buněk v 10 ml média
- EOL-1: 5 000 000 buněk v 10 ml média
- K562: 3 000 000 buněk v 10 ml média

Po nejméně 1 hodině inkubace v inkubátoru byly k buněčné suspenzi přidány roztoky inhibitorů na definovanou dobu, předem naředěné v DMSO, tak aby koncentrace DMSO v médiu nepřekročila 0,1 % (v/v). Po uplynutí doby ošetření byly buňky sklizeny centrifugací po dobu 8 minut při 1000 g a 4°C. Pelety byly dvakrát promyty 1 ml PBS a nakonec převedeny do mikrozkušavek, zbytek PBS byl u každého důkladně odsát a byly uskladněny při - 80°C.

Lýze buněk probíhala po volném roztání vzorků přenesených na led. K vzorkům byl přidán adekvátní objem vychlazeného lyzačního pufru W (150 – 300 µl) a pelet byl důkladně rozsuspendován. V následujících 30 minutách byl každý z vzorků alespoň třikrát rozsuspendován a třikrát promíchán. Proces pokračoval centrifugací po dobu 20 minut při 14 000 g a 4 °C. Supernatanty byly na ledu převedeny do čistých mikrozkušavek, přičemž byl zaznamenán jejich objem.

Koncentrace celkových proteinů v lyzátech byla stanovena Bradfordovou metodou (Bradford, 1976), přičemž proteinovým standardem pro vytvoření kalibrační závislosti byl BSA. Do 1 ml Bradfordova činidla byl napipetován 1 µl buněčného lyzátu, vzorek byl promíchán a inkubován za laboratorní teploty po dobu 10 minut. Poté byla stanovena absorbance vzorku při 595 nm pomocí spektrofotometru. Stanovení koncentrace proteinů bylo u každého vzorku provedeno v duplikátu. Na základě průměrné koncentrace proteinů ve vzorcích byla jejich hodnota sjednocena na nejnižší naměřenou, a to přidáním lyzačního pufru W k jednotlivým lyzátům. Ke vzorkům byl následně přidán denaturační vzorkovací pufr (5x), v objemu odpovídajícím ¼ objemu vzorku. Vzorky byly promíchány a zahřívány při 95 °C po dobu 5 minut a následně uskladněny při – 20 °C.

3.3.4 Polyakrylamidová elektroforéza, Western blot a imunodetekce proteinů

Separace proteinů ve vzorcích probíhala elektroforézou v 1 mm silných polyakrylamidových gelech, v tzv. diskontinuálním uspořádání podle Laemmliho (1970), za denaturujících podmínek (SDS-PAGE). Podle molekulové hmotnosti studovaných proteinů byly využity 10% nebo 12,5% separační gely, v kombinaci s 5% zaostřovacím gelem. Složení roztoků pro přípravu gelů zobrazuje Tab. 6.

Tab. 6 Objemy jednotlivých složek použité na přípravu 1 mm silných gelů pro SDS-PAGE.

Složka	Separáční gel 10% (2 gely)	Separáční gel 12,5% (2 gely)	Zaostřovací gel 5% (2 gely)
AA/BIS	3,13 ml	3,90 ml	0,84 ml
Destilovaná voda	2,67 ml	1,94 ml	3,51 ml
Tris pH 8,8	3,50 ml	3,50 ml	
Tris pH 6,8			0,63 ml
SDS (10%)	94,00 μ l	94,00 μ l	50,00 μ l
TEMED	6,25 μ l	6,25 μ l	5,00 μ l
APS (10%)	37,50 μ l	37,50 μ l	30,00 μ l

Nejprve byly ve zkumavce smíseny roztoky pro přípravu separáčn ho gelu, nakonec byl p řidán roztok APS, jenž nastartoval polymeraci. Směs byla okamžit  napipetována mezi skleněné desky a p řevrstvena p ř kapkami deionizované vody. Po 30 minutách byl povrch gelu propláchnut deionizovanou vodou a byl p řevrstven směsí pro přípravu zaostřovacího gelu. Mezi skla byl vložen h řb nek pro vytvoření jamek k nanášení vzorků. Po dalších 20 minutách tuhnutí byl p řipravený gel p řenesen do elektroforetické komůrky.

Do elektroforetické vany i komůrky byl nalit elektrodov  pufr (Tris-glycinov ). Mezitím byly proteinov  vzorky vyjmuty z mrazničky, byly ponechány za laboratorn  teploty do roztání. Následn  byly zahřívány p ř 95 °C po dobu 2 minut. Do jamek p řipraven ho gelu byl nanášen objem vzorků odpovídající 50 μ g celkových proteinů a 3 μ l markeru molekulových hmotností. Elektroforetická souprava byla p řipojena ke zdroji, nejdřív  separace probíhala p ř napětí 80 V a po vstupu vzorků do separáčn ho gelu p ř 120 V. Po ukončení elektroforézy byl polakrylamidov  gel s rozdělen mi proteiny p řenesen do blotovací soupravy, p řekryt nitrocelulosovou membránou a v prostředí blotovacího pufru, po p řipojení ke zdroji, probíhal p řenos proteinů metodou Western blot. V p řub hu p řenosu trvajícího 3 h byl pufr stále chlazen ledov m blokem a proud procházející soupravou dosahoval konstantn  hodnoty 270 mA. Následn  byla nitrocelulosov  membrána vyjmuta a p řenesen  proteiny byly vizualizovány jejím obarven m v roztoku Ponceau S. Poté byla membrána ponechána oschnout na filtračním papíře za laboratorn  teploty.

Z obarven  nitrocelulosov  membrány byly podle markeru molekulových hmotností vyřezány proužky obsahující oblasti odpovídající hmotnosti požadových proteinů pro detekci. Vyřezan  proužky byly o islov ny, byly odbarveny v roztoku TBS a n sledn  inkubovány na kývačce po dobu 1 hodiny v roztoku 4% BSA v TBS-T. Tím byla tzv.

zablokována membrána vůči nespecifické vazbě protilátek. Poté byly proužky membrán přeneseny na vyvýšené víčko v krabičce obklopené malou vrstvou vody. Na membrány byl nanesen roztok primární protilátky (podle detekovaného proteinu) naředěné ve 4% BSA v TBS-T (viz kapitola 3.1.4). Následovala inkubace přes noc v uzavřené krabičce při teplotě 4°C. Poté byly membrány promývány na kývačce podle schématu: 5 min v TBS, 5 min v TBS-T, 5 min v TBS a 10 min v TBS (v každém kroku byl vyměněn promývací roztok). Membrány byly poté inkubovány se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidasou (podle zdroje primární protilátky) po dobu 1 h za laboratorní teploty. Konečné promývání membrán bylo provedeno následovně: 10 min v TBS, 5 min v TBS-T, 5 min v TBS a 15 min v TBS. Promývací kroky sloužily k odstranění nespecificky navázaných protilátek a zlepšení kvality signálu.

Promyté membrány s navázanými protilátkami byly osušeny, naskládány na destičku a okamžitě překryty vrstvou chemiluminiscenčního substrátu West Pico, který je charakterizován detekčním limitem cca 1 pg. Po 5 minutách inkubace byla destička vložena do vyvolávacího přístroje a byl zaznamenáván obrazový chemiluminiscenční signál. V ojedinělých případech nebyl signál dostatečně silný, poté bylo přistoupeno k promytí membrány v TBS po dobu 5 minut a byl nanesen chemiluminiscenční substrát West Femto, jenž se vyznačuje vyšší citlivostí a nižším detekčním limitem (desítky fg). Získaný záznam byl zpracován v programu Multi Gauge 2.2 (Fujifilm, Japonsko).

4 VÝSLEDKY

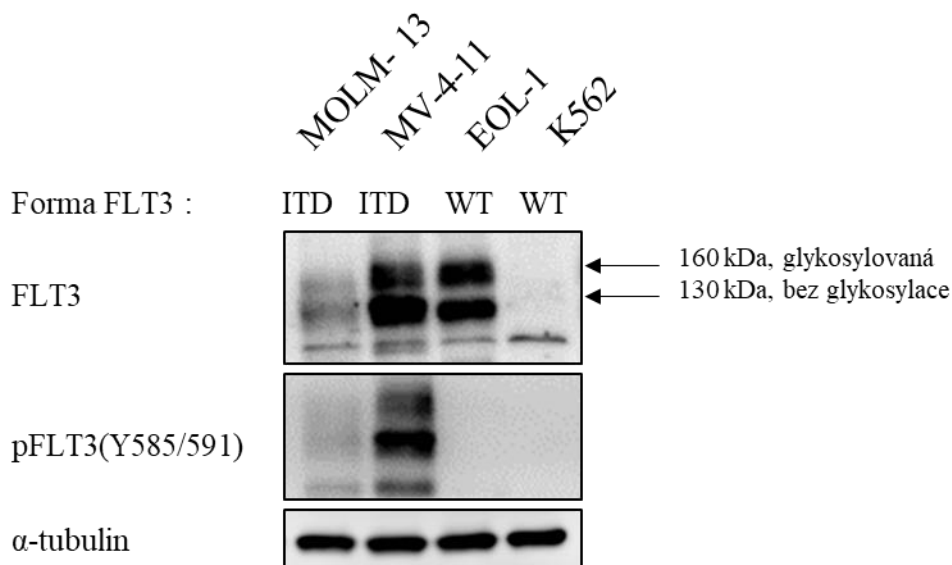
Experimenty provedené v praktické části diplomové práce jsou součástí širšího a dlouhodobějšího výzkumu prováděného na pracovišti Laboratoře růstových regulátorů. Jelikož je na pracovišti k dispozici rozsáhlá knihovna různě selektivních nízkomolekulárních inhibitorů CDK a mnoha dalších kinas, je věnováno značné úsilí studiu jejich selektivity (Jorda *et al.*, 2018), ale i aktivnímu vývoji nových látek (Jorda *et al.*, 2019; Jorda *et al.*, 2020). V poslední době se pracoviště podílí na vývoji nových, selektivních inhibitorů CDK4/6 a duálních inhibitorů CDK a FLT3 (Gucký *et al.*, 2018). Jelikož jsou inhibitory CDK4/6 jako jediné zatím schválené inhibitory CDK pro léčbu a při profilování jejich selektivity byly nalezeny také klinicky zajímavé vedlejší cíle (FLT3, Mps1), byly pro analýzu v diplomové práci vybrány právě komerčně dostupné inhibitory CDK4/6.

Tato diplomová práce nastiňuje důležité rozdíly mezi projevy vybraných inhibitorů CDK4/6 na buněčné úrovni, plynoucí z jejich rozdílné selektivity a dokazuje fenotypový projev inhibice jejich vedlejších cílů. Další studium by mohlo vést k jejich využití pro léčbu jiných typů malignit (viz kapitola 2.5.3 a 2.5.5) nebo alespoň využití jejich struktur pro vývoj nových léčiv.

Výsledková část se věnuje popisu efektů daných inhibitorů na modelových buněčných liniích. Jelikož FLT3 je zásadní receptorová tyrosinkinasa pro buňky myeloidní krevní řady, byly jako modelové linie použity buněčné linie odvozené od AML. Mps1 je poměrně novým slibným cílem i markerem onkologických onemocnění, je ve vysoké míře exprimována v mnoha typech malignit a je zásadní pro správné proběhnutí mitosy. Proto by inhibice Mps1 mohla v případě studovaných inhibitorů prohlubovat jejich efekt na rakovinné buňky, nezávisle na stavu proteinu Rb. Získané výsledky byly z výše uvedených důvodů rozděleny do dvou větví, zabývajících se FLT3 a Mps1.

4.1 Analýza zastoupení FLT3 na úrovni proteinů v modelových buňkách

Před analýzou efektů inhibitorů na modelových buněčných liniích byla pomocí imunodetekce stanovena míra exprese a fosforylace proteinu FLT3. U linií MV-4-11 a EOL-1 byla stanovena vysoká exprese FLT3, na rozdíl od MOLM-13 a K562. U linií disponujících mutací FLT3-ITD byla detekována i fosforylovaná forma, ve výrazně vyšší míře u MV-4-11 (Obr. 12).



Obr. 12 Záznam z imunodetekce zastoupení FLT3 v buněčných lyzátech vybraných modelových linií. Proužky odpovídají hladině proteinu FLT3 a míře jeho fosforylace, signál α -tubulinu je kontrolou stejnoměrného nanesení jednotlivých vzorků. Forma FLT3 označuje přítomnost mutace ITD (vnitřní tandemová duplikace), nebo nemutovaný typ WT (divoký typ).

4.2 Analýza buněčného cyklu po ošetření buněk inhibitory ve vztahu k FLT3

Vzhledem k publikovaným informacím o selektivitě a vedlejších cílech vybraných inhibitorů CDK4/6 (viz kapitola 2.5, Tab. 2) byly v rámci rutinního screeningu provedeny dva typy prvotní analýzy. Nejdříve bylo provedeno měření na úrovni enzymové inhibice FLT3 a FLT3-ITD, následované stanovením viability modelových buněk (FLT3-ITD a Rb pozitivních) po ošetření studovanými inhibitory.

Na enzymové úrovni byla zaznamenána významná inhibice FLT3-ITD u inhibitorů Lerociclibu a Trilaciclibu s hodnotou IC_{50} řádově ve stovkách $nmol \cdot l^{-1}$ (dosud nepublikovaná data), podobně jako v potvrzených případech u AMG 925 a ON 123300. Na buněčné úrovni byl po ošetření inhibitory ON 123300, Lerociclibem, Trilaciclibem pozorován pokles viability modelových buněk MV-4-11 a MOLM-13 s hodnotou EC_{50} v řádu stovek $nmol \cdot l^{-1}$ (dosud nepublikovaná data).

V rámci diplomové práce byla proto nejdříve provedena analýza buněčného cyklu po ošetření buněk MV-4-11 (disponujících mutací FLT3-ITD a funkčním proteinem Rb) studovanými inhibitory. Pro prvotní představu o efektu inhibitorů na buňky byla zvolena koncentrační řada 20 - 100 - 500 a 2500 $nmol \cdot l^{-1}$ působící na buňky po dobu 24 h.

Po působení schválených inhibitorů Ribociclibu, Palbociclibu a Abemaciclibu byl sledován očekávaný efekt, kumulace buněk v G1 fázi, tzv. G1 blok bez výraznější apoptosy (

Obr. 13). I přestože mezi těmito inhibitory byly pozorovány drobné rozdíly (nástup G1 bloku u Ribociclibu až při $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, mírný nárůst buněk v G2/M fázi a nárůst apoptosy u Abemaciclibu při $2500 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$), odrážející jejich potenci, je možné je všechny v daném koncentračním rozmezí označit jako selektivní vůči CDK4/6.

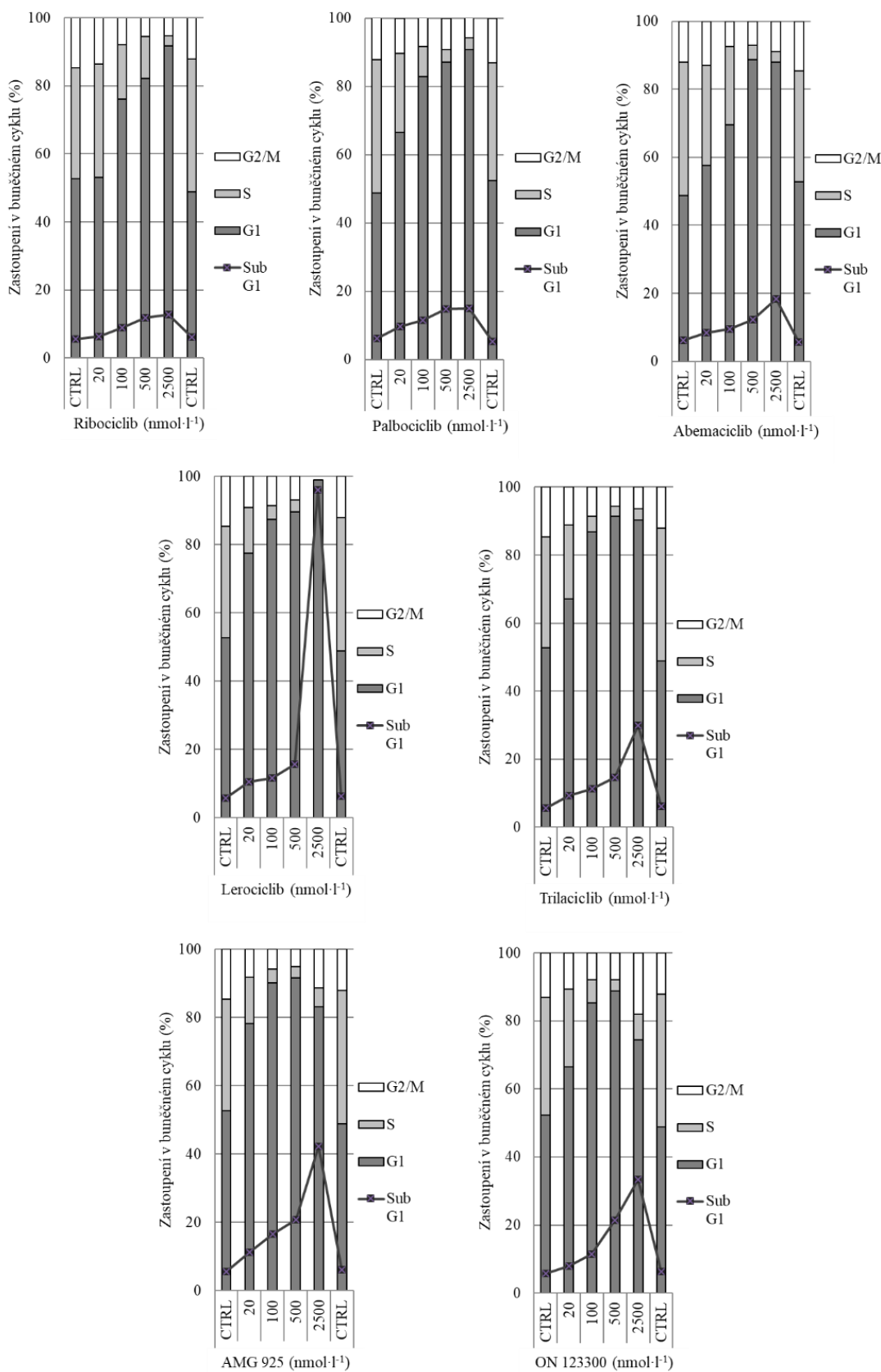
Naopak po ošetření inhibitory AMG 925, Trilaciclibem, Lerociclibem a ON 123300, byly pozorovány mírně odlišné efekty. Zatímco u Trilaciclibu byl sledován nárůst apoptosy nad 30 % mezi 500 a $2500 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ bez výraznější změny zastoupení ve fázích buněčném cyklu, u AMG 925 a ON 123300 došlo spolu s podobným nárůstem apoptosy i k nárůstu populace buněk v G2/M fázi. U Lerociclibu byla sledována vysoká míra apoptosy při koncentraci $2500 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, dosahující až 96 % (

Obr. 13). Tyto efekty dokazují nižší selektivitu jmenovaných inhibitorů a možnou inhibici vedlejších cílů.

Pro ověření účinku studovaných inhibitorů na modelu dalších buněk disponujících mutací FLT3-ITD byly jejich působení podrobeny buňky MOLM-13. Vzhledem k efektům pozorovaným na MV-4-11 byla zvolena užší koncentrační řada $100 - 500$ a $2500 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ působící na buňky taktéž po dobu 24 h.

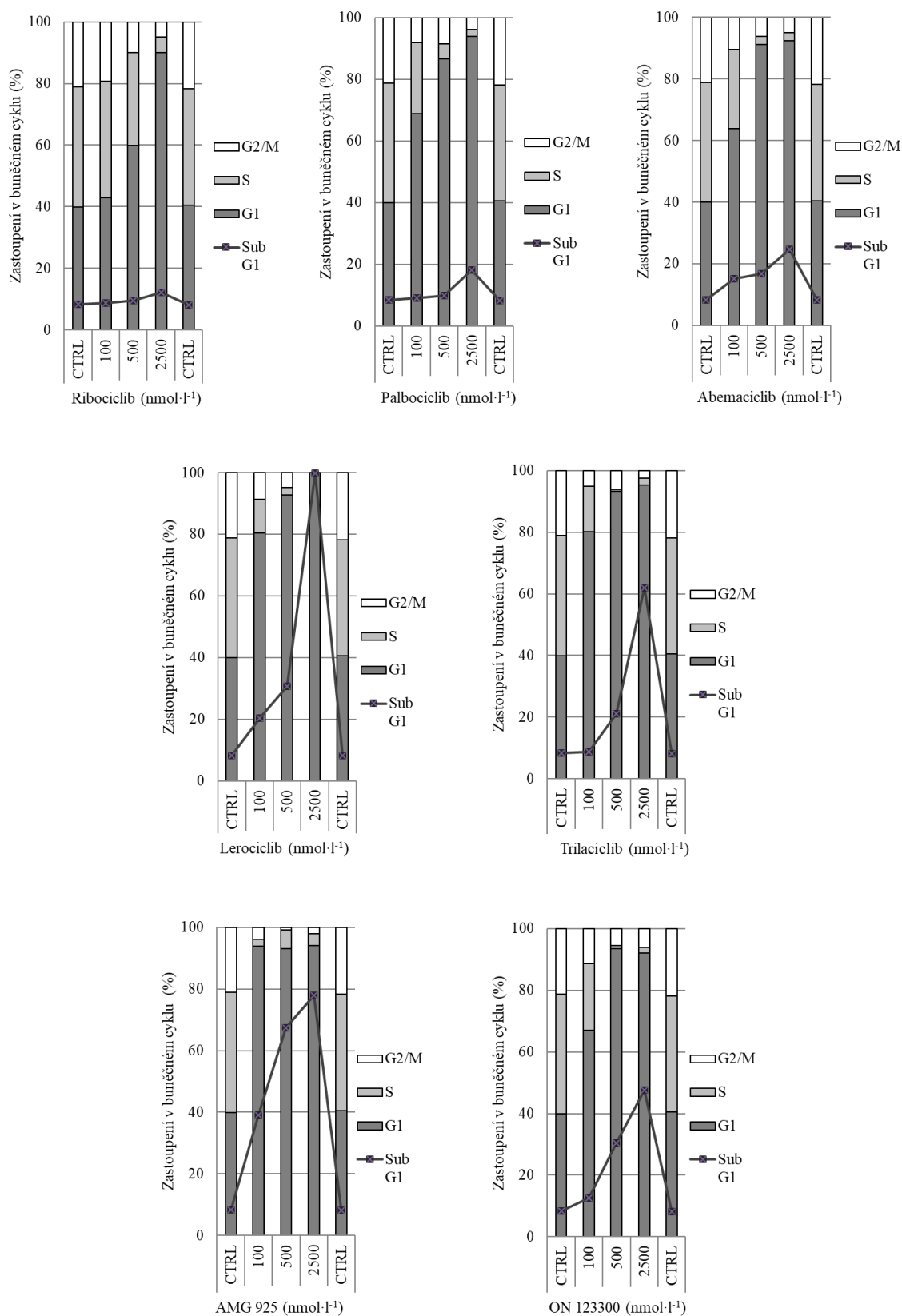
Po ošetření schválenými inhibitory byl pozorován G1 blok, ve srovnání s MV-4-11 došlo u Palbociclibu a Abemaciclibu k mírně vyššímu nárůstu apoptosy (20-25 %) při koncentraci $2500 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Působení ostatních inhibitorů vedlo taktéž ke G1 bloku, avšak spojenému s vysokou mírou apoptosy (nad 50 %) při koncentraci $2500 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ vzrůstající ve směru: ON 123300, Trilaciclib, AMG 925, Lerociclib (Obr. 14). Tyto efekty ukazují obecně na vyšší citlivost buněk MOLM-13 vůči studovaným inhibitorům, vliv inhibice vedlejších cílů je zde patrně silnější.

MV-4-11, 24 h



Obr. 13 Procentuální zastoupení buněk MV-4-11 ve fázích buněčného cyklu po 24 h ošetření uvedenou koncentrační řadou inhibitorů (stanoveno průtokovou cytometrií po označení DNA propidium jodidem). Grafy zobrazují průměrné hodnoty ze dvou měření.

MOLM-13, 24 h



Obr. 14 Procentuální zastoupení buněk MOLM-13 ve fázích buněčného cyklu po 24 h ošetření uvedenou koncentrační řadou inhibitorů (stanoveno průtokovou cytometrií po označení DNA propidium jodidem). Grafy zobrazují průměrné hodnoty ze dvou měření.

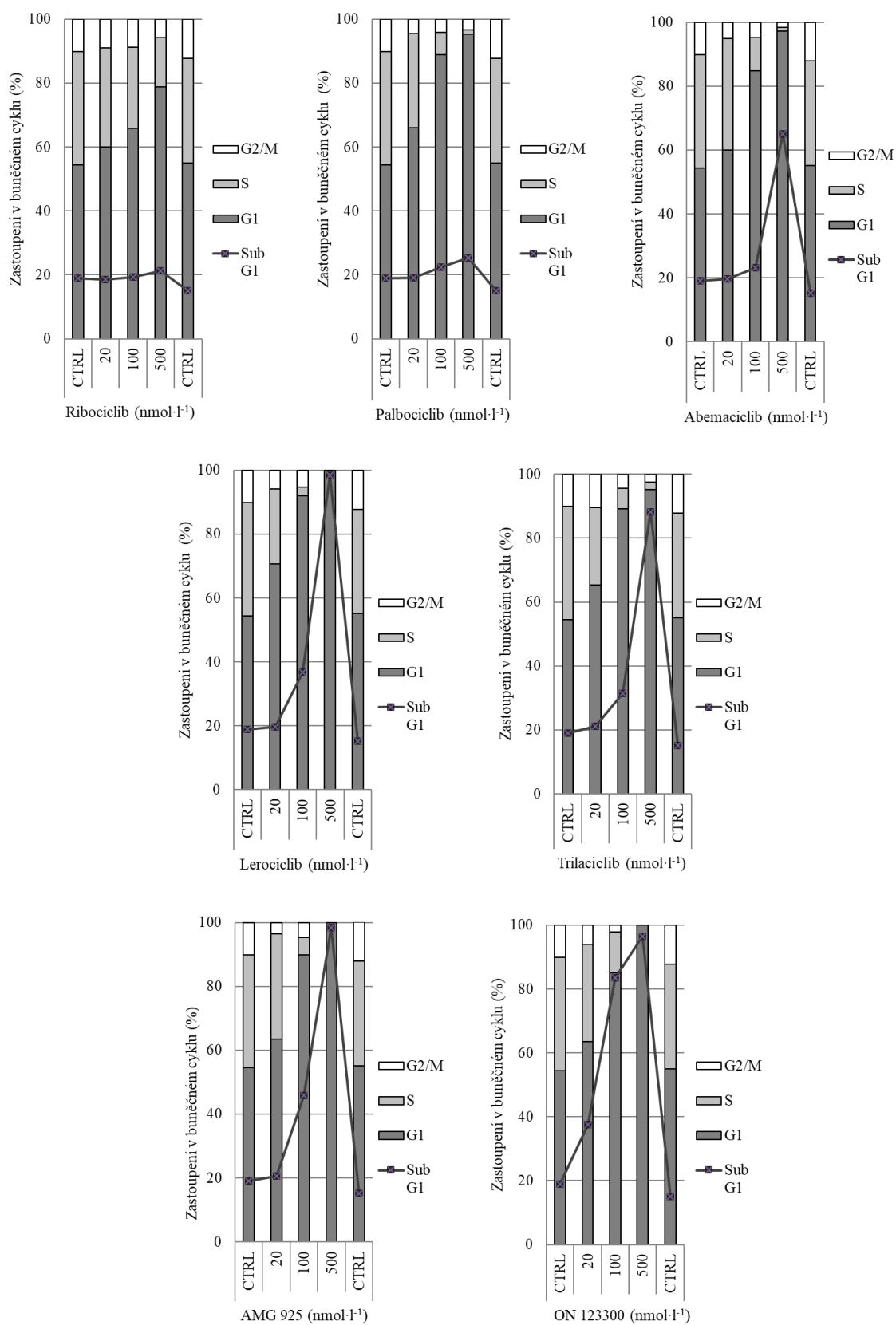
Pro srovnání účinků inhibitorů na buňkách MV-4-11 a MOLM-13 byly dále jejich působení podrobeny buňky EOL-1, u nichž byla potvrzena vysoká míra exprese FLT3 v přirozené, nemutované formě. Naopak buňky EOL-1 disponují aktivační mutací v PDGFRa. Jelikož z předběžných výsledků při screeningu vlivu vybraných inhibitorů CDK4/6 vyplynulo, že buňky EOL-1 jsou na jejich působení citlivější, byla zvolena koncentrační řada: 20 – 100 a 500 nmol·l⁻¹, působící na buňky po dobu 24 h jako u předchozích experimentů.

Ve srovnání s buňkami MV-4-11 a MOLM-13 byla u buněk EOL-1 sledována asi čtyřikrát vyšší bazální hladina apoptosy, což může být vysvětleno jejich vyšší citlivostí na vnější vlivy a větším nárokům na přítomnost prorůstových cytokinů v kultivačním médiu. Při srovnání účinku Ribociclibu, Palbociclibu a Abemaciclibu byly zjištěny zásadní rozdíly. Zatímco ošetření Ribociclibem a Palbociclibem vedlo ke G1 bloku (u Palbociclibu s prudkým nástupem) s nepatrným nárůstem apoptosy při 500 nmol·l⁻¹, Abemaciclib se vyznačoval taktéž prudkým nástupem G1 bloku, avšak s výrazným nárůstem apoptosy na hodnotu přes 60 %. Ošetření inhibitory Lerociclibem, Trilaciclibem a AMG 925 vedlo k velmi podobnému efektu, prudkému nástupu G1 bloku s dosažením téměř 100% apoptosy při 500 nmol·l⁻¹. Jako nejúčinnější inhibitor se na buněčné linii EOL-1 projevil ON 123300, jehož působení vedlo ke G1 bloku a dosažení asi 80% apoptosy již při koncentraci 100 nmol·l⁻¹ (Obr. 15).

Poslední buněčnou linií podrobenou působení byla linie K562, u níž byla stanovena nízká exprese FLT3, bez přítomnosti mutací. Buňky linie K562 disponují tzv. Philadelphským chromosomem kódujícím fúzní protein Bcr-Abl. Jelikož tyto buňky nejsou závislé na aktivitě FLT3, byl předpokládán slabší účinek studovaných inhibitorů CDK4/6, proto byla zvolena koncentrační řada: 100 - 500 a 2500 nmol·l⁻¹ působící 24 h.

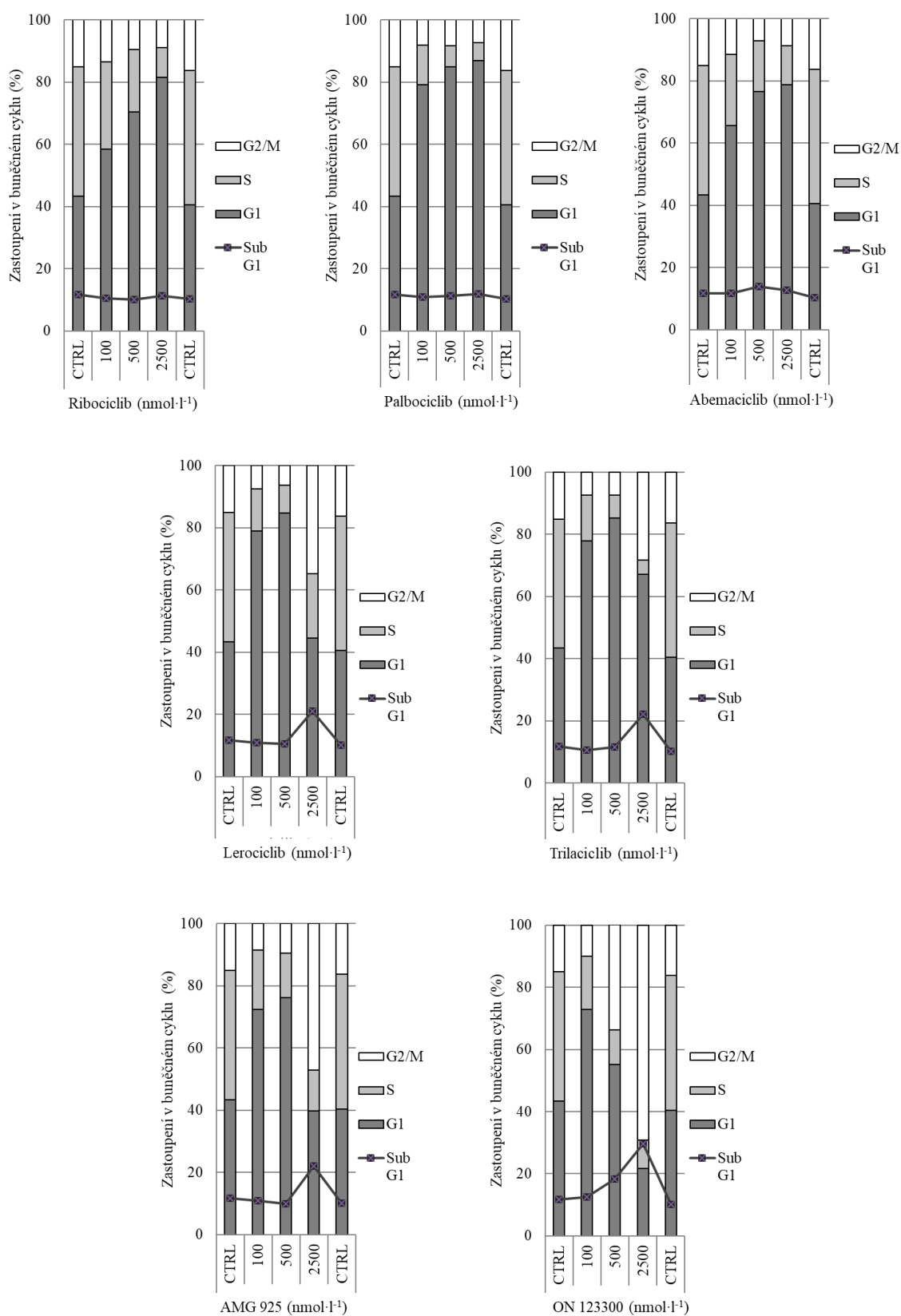
Ribociclib, Palbociclib i Abemaciclib se na buňkách K562 projeví všechny G1 blokem (u Ribociclibu a Abemaciclibu s pozvolnějším nástupem ve srovnání s Palbociclibem), bez nárůstu apoptosy. Naopak efekt po ošetření ostatními inhibitory byl překvapivý. U Trilaciclibu, Lerociclibu a AMG došlo mezi 500 a 2500 nmol·l⁻¹ k výraznému nárůstu populace buněk v G2/M fázi, u ON 123300 dokonce k tzv. G2/M bloku, ve všech případech doprovázeného nárůstem apoptosy na hodnotu asi 20 % (Obr. 16). Takový projev jasně ukazuje na inhibici určitého vedlejšího cíle, vzhledem ke G2/M bloku by se mohlo jednat o některou z mitotických kinas, jejíž inhibice mohla být u ostatních buněčných linií maskována inhibicí FLT3.

EOL-1, 24 h



Obr. 15 Procentuální zastoupení buněk EOL-1 ve fázích buněčného cyklu po 24 h ošetření uvedenou koncentrační řadou inhibitorů (stanoveno průtokovou cytometrií po označení DNA propidium jodidem). Grafy zobrazují průměrné hodnoty ze dvou měření.

K562, 24 h



Obr. 16 Procentuální zastoupení buněk K562 ve fázích buněčného cyklu po 24 h ošetření uvedenou koncentrační řadou inhibitorů (stanoveno průtokovou cytometrií po označení DNA propidium jodidem). Grafy zobrazují průměrné hodnoty ze dvou měření.

Při cytometrické analýze buněčného cyklu byly nalezeny zásadní rozdíly mezi studovanými inhibitory. Ošetření inhibitory Ribociclibem, Palbociclibem a Abemaciclibem v daných koncentracích vedlo u všech buněčných linií k předpokládanému efektu G1 bloku. Abemaciclib se ve srovnání se zbylými dvěma schválenými inhibitory vyznačoval vyšším nárůstem apoptosy (především u EOL-1).

Ostatní studované inhibitory však vyvolávaly rozdílné efekty. U buněčných liniích disponujících vyšší expresí FLT3 (EOL-1) a/nebo mutací FLT-ITD (MV-4-11 a MOLM-13) došlo po ošetření k nástupu G1 bloku a v nejvyšší použité koncentraci také k masivnímu nárůstu apoptosy (především u Lerociclibu ve všech případech). Naopak u buněčné linie s nízkou expresí FLT3 a bez jejích mutací (K562) byly pozorovány pouze mírné nárůsty apoptosy, ale u nejvyšších použitých koncentrací docházelo k nárůstu populace buněk v G2/M fázi, až G2/M bloku. Tím byla prokázána inhibice vedlejších cílů.

4.3 Studium signální dráhy FLT3 po ošetření modelových buněk inhibitory

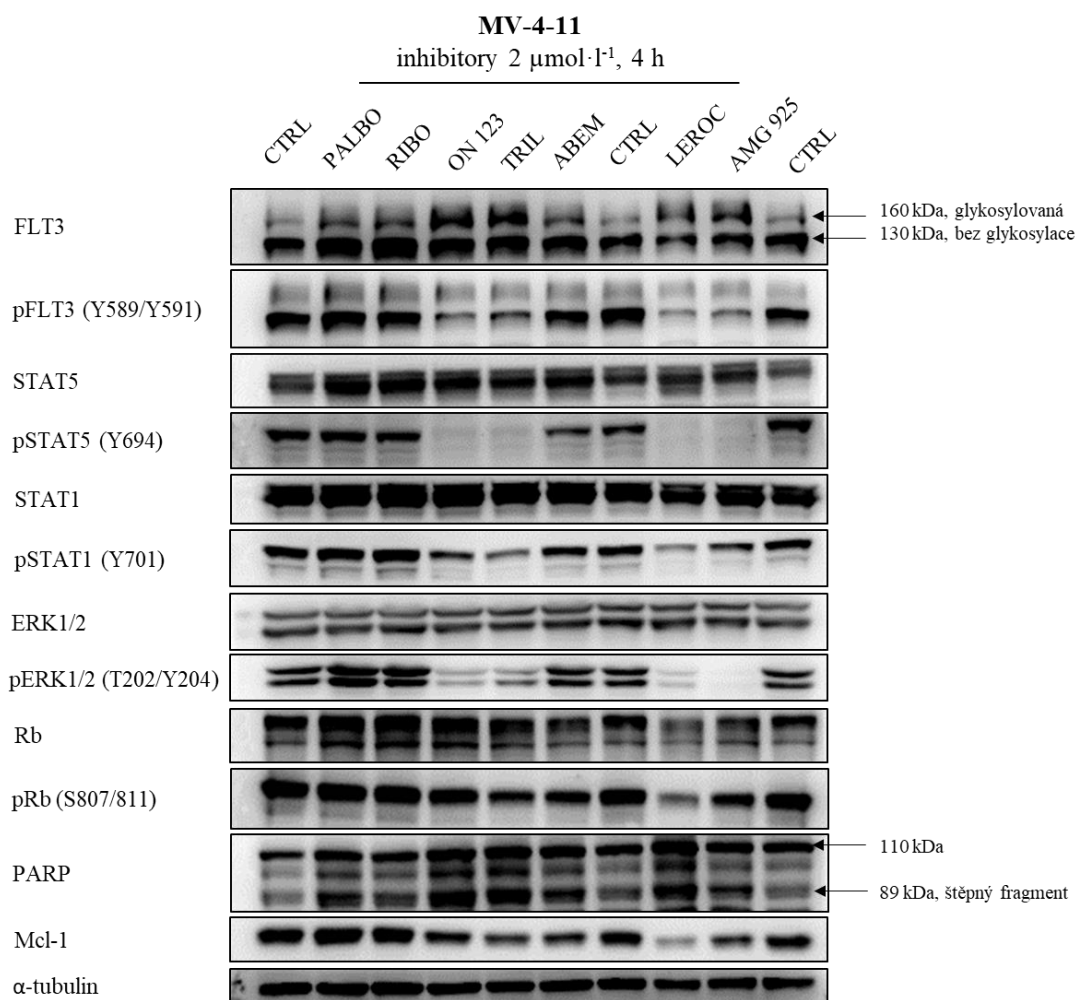
V rámci imunochemické detekce proteinů v modelových buňkách odvozených od leukemie byly detekovány především zásadní proteiny v signalizačních drahách vedoucích od FLT3 a jejich fosforylované formy, proteiny MAPK signální dráhy a proteiny spojené s buněčným cyklem nebo apoptosou.

Nejdříve byla provedena imunochemická analýza zastoupení klíčových proteinů (STAT1, STAT5, ERK1/2 a jejich fosforylovaných forem) po ošetření buněk MV-4-11 inhibitory v koncentraci 500 a 1000 nmol·l⁻¹ po dobu 1 hodiny. Po tomto působení, kdy se projevují rychlé změny v buněčné signalizaci, však nebyl pozorován žádný výrazný efekt (data nezobrazena). Proto bylo následně zvoleno ošetření inhibitory v koncentraci 2000 nmol·l⁻¹ po dobu 4 hodin. Toto ošetření odkrylo výrazné rozdíly mezi inhibitory, podobně jako předchozí analýza buněčného cyklu.

Po ošetření selektivními, schválenými inhibitory Ribociclibem, Palbociclibem a Abemaciclibem nebyl sledován žádný výrazný efekt, až na mírnou odlišnost Abemaciclibu od ostatních dvou zmíněných inhibitorů v aktivaci štěpení proteinu PARP a poklesu hladiny proteinu Mcl-1. Naopak po ošetření Lerociclibem, Trilaciclibem, ON 123300 a AMG 925 došlo k poklesu fosforylace FLT3 (u neglykosylované formy), korespondujícího s poklesem fosforylace podřízeného proteinu STAT5. Pokles

fosforylace byl sledován taktéž u STAT1, výraznější ale v případě Trilaciclibu a Lerociclibu. Prokazatelně došlo také k poklesu fosforylace proteinů ERK1/2 (nejvíce v případě AMG 925), což ukazuje na inhibici MAPK dráhy. Po ošetření inhibitory Trilaciclibem, Lerociclibem a ON 123300 byla také detekována fragmentace proteinu PARP korelující s poklesem Mcl-1, ukazující na aktivaci kaspas a nástup apoptosy. Mírné změny byly pozorovány u fosforylace proteinu Rb, o výraznějším poklesu lze mluvit v případě Lerociclibu, u něhož došlo i k poklesu celkového proteinu Rb (Obr. 17).

Pro srovnání bylo stejné ošetření 2000 nmol·l⁻¹ inhibitory po dobu 4 hodin provedeno na buňkách linie MOLM-13. U těchto buněk však nebylo možné s dostatečným signálem detekovat fosforylovanou formu FLT3 ani získat kvalitní záznam fosforylovaného STAT5 (v tomto směru bude v rámci dalšího výzkumu metoda optimalizována).

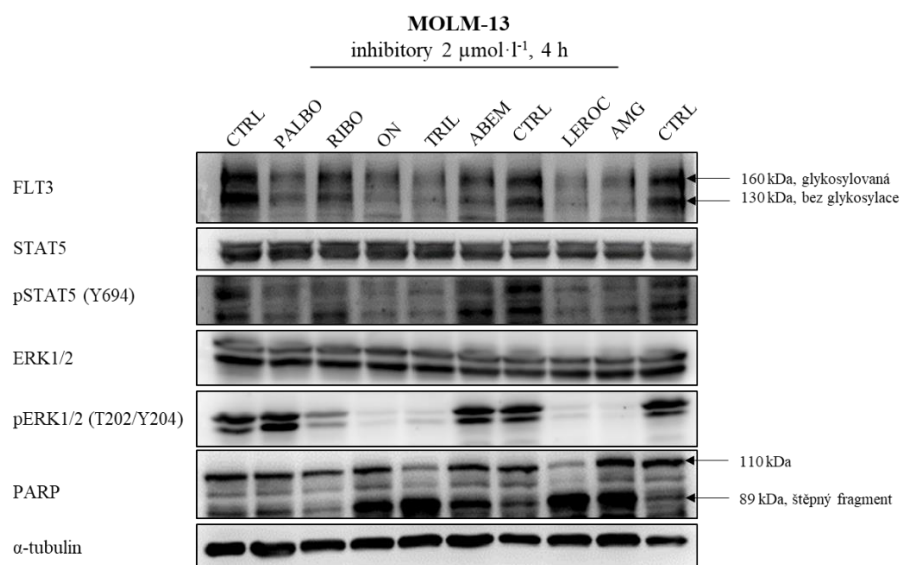


Obr. 17 Záznam z imunodetekce vybraných proteinů v buněčné linii MV-4-11 po ošetření 2 μmol·l⁻¹ inhibitory po dobu 4 hodin. Proužky odpovídají hladinám proteinů nebo míře jejich fosforylace, signál α-tubulinu je kontrolou stejnoměrného nanesení jednotlivých vzorků.

I přesto mohl být pozorován efekt na buněčné úrovni a určité rozdíly mezi inhibitory. Ve srovnání s buňkami MV-4-11 došlo u MOLM-13 k poklesu hladiny celkové FLT3 (glykosylované i neglykosylované formy) oproti kontrole po ošetření všemi inhibitory, nejvýrazněji u Trilaciclibu a Lerociclibu. Tato skutečnost by mohla vysvětlovat vyšší citlivost buněk MOLM-13 k působení inhibitorů, korelující s výsledky cytometrické analýzy. Taktéž byl pozorován pokles fosforylace STAT5 oproti kontrole. Po ošetření inhibitory Trilaciclibem, Lerociclibem, AMG 925 a ON 123300 došlo k výraznému poklesu fosforylace ERK1/2, ukazujícímu na inhibici MAPK dráhy. U těchto čtyř inhibitorů byla také pozorována vysoká míra fragmentace proteinu PARP, což je důkaz aktivace kaspas a směřování k apoptose (Obr. 18).

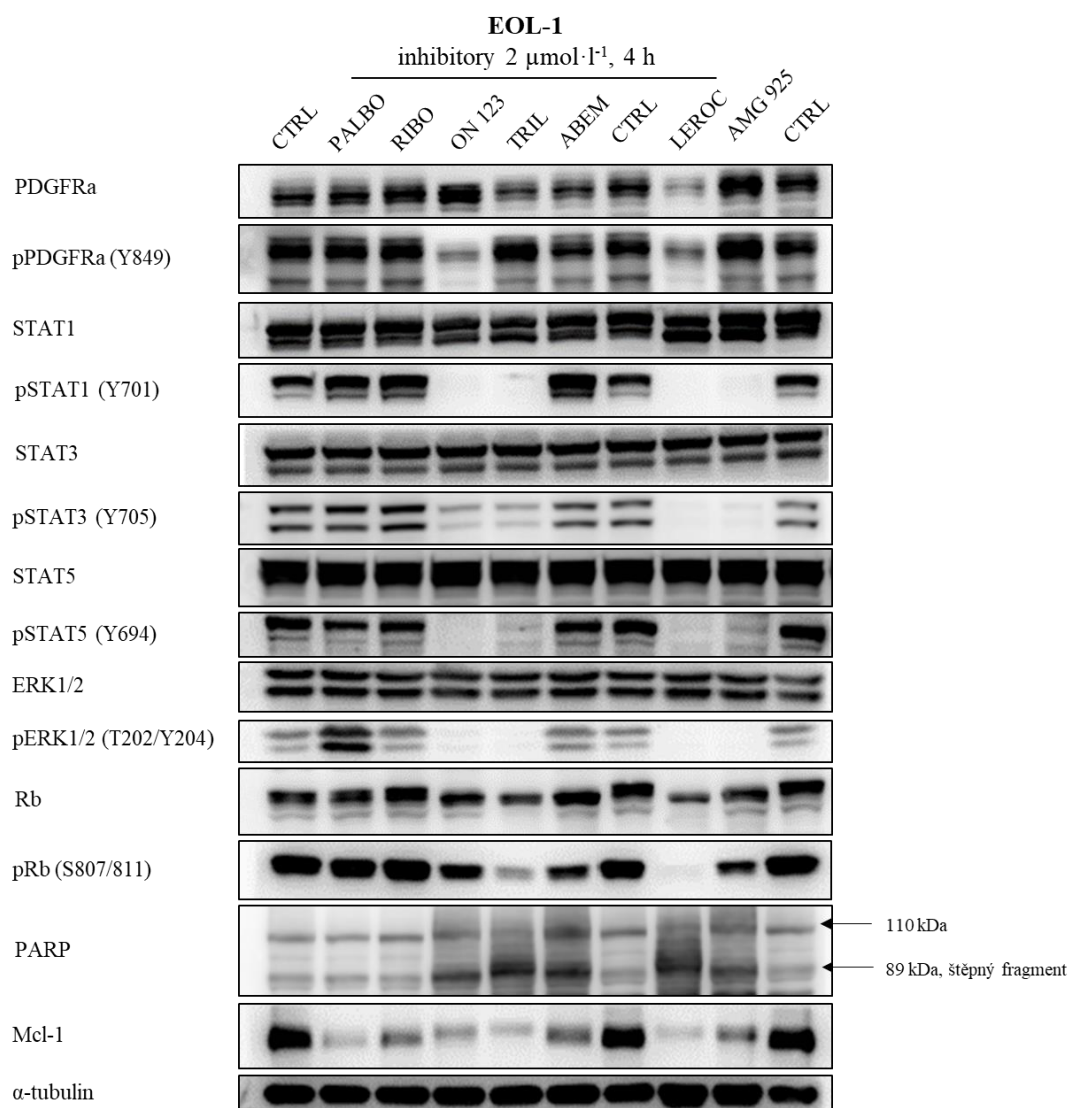
Dále byla působení inhibitorů ve stejném uspořádání vystavena linie EOL-1, disponující vysokou expresí FLT3 (Obr. 12) bez mutací a konstitutivně aktivovaným PDGFRa. Co se týče PDGFRa, míra jeho fosforylace byla snížena pouze po působení inhibitoru ON 123300, v případě Lerociclibu došlo k poklesu hladiny celkového proteinu (včetně fosforylované formy) (Obr. 19).

Na základě cytometrických měření byla analyzována i míra inhibice rekombinantního PDGFRa studovanými inhibitory, přičemž u schválených inhibitorů CDK4/6 byla stanovena hodnota IC_{50} větší než $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. U Trilaciclibu se tato hodnota pohybovala okolo $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, u Lerociclibu a AMG 925 v řádu stovek $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (dosud nepublikovaná data) a ON 123300 vykazoval nejsilnější inhibici, s IC_{50} v řádu desítek $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$.



Obr. 18 Záznam z imunodetekce vybraných proteinů v buněčné linii MOLM-13 po ošetření $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ inhibitory po dobu 4 hodin. Proužky odpovídají hladinám proteinů nebo míře jejich fosforylace, signál α -tubulinu je kontrolou stejnoměrného nanesení vzorků.

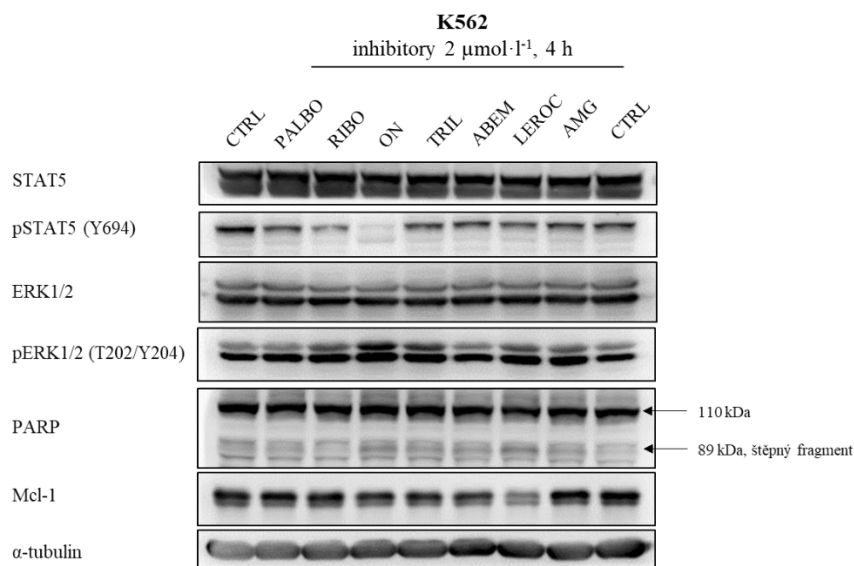
Nezávisle na PDGFR došlo po ošetření Trilaciclibem, Lerociclibem, ON 123300 a AMG 925 k poklesu fosforylace STAT1, 3 i 5 a také ERK1/2, podobně jako u MV-4-11. Po působení inhibitorů Trilaciclibu a Lerociclibu byl sledován výrazný pokles fosforylace proteinu Rb, po působení ON 123300 a AMG 925 slabší pokles fosforylace proteinu Rb, ve všech případech ale způsobený poklesem celkového Rb. Všechny čtyři studované neschválené inhibitory vedly po působení na EOL-1 ke štěpení proteinu PARP, u této buněčné linie však stejným efektem vyznačoval i Abemaciclib (což koreluje s vyšší toxicitou a mírou apoptosy ve srovnání s Palbociclibem a Ribociclibem zjištěnou při cytometrické analýze). K poklesu hladiny proteinu Mcl-1 došlo po působení všech studovaných inhibitorů (Obr. 19).



Obr. 19 Záznam z imunodetekce vybraných proteinů v buněčné linii EOL-1 po ošetření 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ inhibitory po dobu 4 hodin. Proužky odpovídají hladinám proteinů nebo míře jejich fosforylace, signál α -tubulinu je kontrolou stejnoměrného nanesení jednotlivých vzorků.

Nakonec byl pro kontrolu studován vliv inhibitorů na linii K562, s velmi nízkou mírou exprese FLT3 (nemutované formy) (Obr. 12), avšak disponující fúzní Bcr-Abl. V tomto případě byl pozorován pokles fosforylace STAT5 pouze u inhibitoru ON 123300, ve srovnání s liniemi MV-4-11, MOLM-13 a EOL-1. Tyto výsledky korelují s cytometrickým měřením buněčného cyklu i s nízkou selektivitou inhibitoru ON 123300. Změny ve fosforylaci proteinu ERK1/2 a tím i MAPK dráhy nebyly pozorovány u žádné ze studovaných látek. Co se týče fragmentace proteinu PARP a poklesu hladiny Mcl-1, oba dva efekty provázející aktivaci kaspas, byly v malé míře detekovány po působení Lerociclibu (Obr. 20). U Lerociclibu byly zmíněné markery aktivace kaspas nejvíce patrné i při ošetření ostatních linií.

Obecně byly na základě sledování hladin klíčových proteinů a jejich fosforylace zjištěny základní informace o působení inhibitorů a rozdíly mezi nimi. Zatímco u linií s vysokou expresí FLT3 (EOL-1) a mutací FLT3-ITD (MV-4-11, MOLM-13) došlo po působení inhibitorů Trilaciclibu, Lerociclibu, ON 123300 a AMG 925 k poklesu fosforylace podřízených proteinů STAT a ERK1/2. Současně po působení všech těchto inhibitorů došlo k fragmentaci proteinu PARP, jež však byla v různé míře pozorována i po působení Abemaciclibu. Na linii nezávislé na FLT3 (K562) tyto efekty nebyly pozorovány, až na výjimku ON 123300, jehož působení vedlo k poklesu fosforylace STAT, ne však ERK1/2.



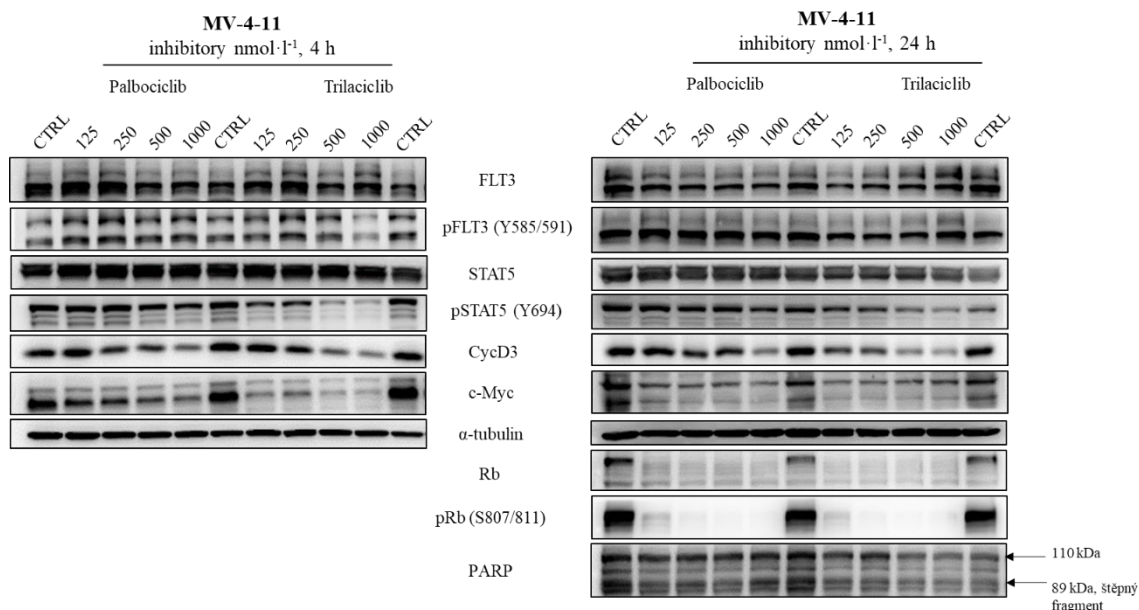
Obr. 20 Záznam z imunodetekce vybraných proteinů v buněčné linii MOLM-13 po ošetření 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ inhibitory po dobu 4 hodin. Proužky odpovídají hladinám proteinů nebo míře jejich fosforylace, signál α -tubulinu je kontrolou stejnoměrného nanesení jednotlivých vzorků.

4.3.1 Studium signální dráhy FLT3 – koncentrační a časová závislost

Pro získání detailnějších informací o působení schválených a dosud klinicky testovaných inhibitorů na modelu buněk akutní myeloidní leukemie byly linie MV-4-11 a EOL-1 podrobeny působení inhibitorů Palbociclibu a Trilaciclibu v koncentrační řadě 125 – 250 – 500 a 1000 nmol·l⁻¹ po dobu 4 h nebo 24 h. Koncentrační řada byla zvolena na základě terapeuticky relevantní koncentrace < 1000 nmol·l⁻¹. Tyto dva inhibitory byly vybrány proto, že Palbociclib je ověřeným selektivním inhibitorem CDK4/6, byl jako první schválen pro léčbu a v prvotních výsledcích u něj nebyl pozorován téměř žádný efekt na dvě uvedené vybrané linie, čímž byla potvrzena jeho selektivita. Naopak Trilaciclib stále prochází klinickým testováním, po jeho působení byly na obou vybraných buněčných liniích sledovány efekty odpovídající inhibici signální dráhy vedoucí od FLT3, přes proteiny STAT a inhibice MAPK dráhy. Na základě předchozích výsledků byly dané efekty na buněčné úrovni prozkoumány více dopodrobna.

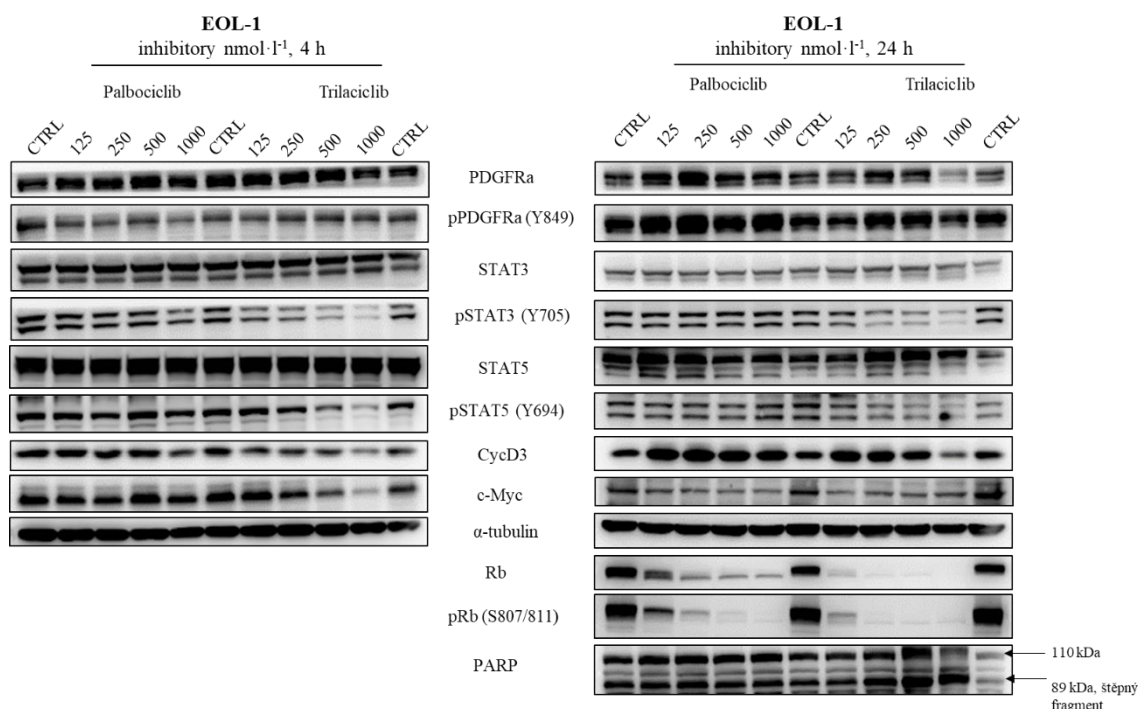
Po působení Palbociclibu a Trilaciclibu na linii MV-4-11 byly pozorovány totožné rozdíly mezi oběma inhibitory jako u předchozích experimentů. Po 4 hodinovém ošetření byl pozorován pokles fosforylace FLT3 a STAT5 pouze u Trilaciclibu při koncentraci 500 a 1000 nmol·l⁻¹. U obou inhibitorů byl dále pozorován pokles hladiny CycD3 od 250 nmol·l⁻¹ a c-Myc již od 125 nmol·l⁻¹ (Obr. 21).

Naopak po 24 hodinovém nedošlo k poklesu fosforylace FLT3 vůbec, pokles fosforylace STAT5 byl ve srovnání se 4 h mírnější. Snížení hladin proteinů CycD3 a c-Myc se projevilo u obou inhibitorů, u Trilaciclibu však výrazně silněji. Hladina proteinu Rb byla po působení obou inhibitorů snížena na minimum (pravděpodobně docházelo ke fragmentaci), což způsobilo i pokles fosforylované formy Rb (Obr. 22). Nebylo tedy možné určit koncentrační závislost poklesu fosforylace Rb, typickou pro inhibitory CDK4/6. Velmi zajímavým byl také efekt na protein PARP, kde nebylo sledováno žádné výraznější štěpení (Obr. 22), ke kterému však došlo při ošetření MV-4-11 Trilaciclibem při 2 μmol·l⁻¹ po 4 hodinách (Obr. 21). Tato diskrepance byla dále prostudována při časovém působení Trilaciclibu.



Obr. 21 Záznam z imunodetekce vybraných proteinů v buněčné linii MV-4-11 po ošetření koncentrační řadou 125 – 250 – 500 a 1000 nmol·l⁻¹ Palbociclibu a Trilaciclibu po dobu 4 h nebo 24 h. Proužky odpovídají hladinám proteinů nebo míře jejich fosforylace, signál α-tubulinu je kontrolou stejnoměrného nanesení jednotlivých vzorků.

Analogický experiment srovnávající působení Palbociclibu a Trilaciclibu po 4 a 24 hodinách byl proveden na buněčné linii EOL-1. Po 4 hodinovém působení došlo k poklesu fosforylace STAT3 a STAT5, bez signifikantních změn v hladině celkového a fosforylovaného PDGFRA. Pokles u proteinů c-Myc a CycD3 byl sledován ve větší míře po působení Trilaciclibu. Ve srovnání s ošetřením buněk MV-4-11 a se 4 hodinovým ošetřením, byly po 24 hodinovém ošetření EOL-1 pozorovány mírně odlišné efekty. Došlo k poklesu zastoupení celkového proteinu PDGFRA a mírně i fosforylované formy u 1000 nmol·l⁻¹ Trilaciclibu. Pokles fosforylace STAT3 byl detekovaný již po působení 250 nmol·l⁻¹ Trilaciclibu, zatímco pokles fosforylace STAT5 byl sice zachován, ale byl méně výrazný. Zatímco pokles zastoupení proteinu c-Myc byl po 24 hodinách pozorován u obou inhibitorů již od nejnižší použité koncentrace, pokles CycD3 byl oproti 4 hodinám výrazně slabší, pouze u 1000 nmol·l⁻¹ Trilaciclibu. Hladiny celkového i fosforylovaného proteinu Rb byly sníženy na minimum, výrazněji po působení Trilaciclibu. Výrazným rozdílem byla fragmentace proteinu PARP, detekovaná pouze po působení Trilaciclibu od 250 nmol·l⁻¹, dosahující až kompletního rozštěpení při 1000 nmol·l⁻¹ Trilaciclibu (Obr. 22). Ve srovnání s buňkami MV-4-11 koreluje přetrvání defosforylačních efektů a míra fragmentace proteinu PARP s vyšší citlivostí buněk EOL-1, především vůči Trilaciclibu a dalším třem dosud neschváleným studovaným inhibitorům.



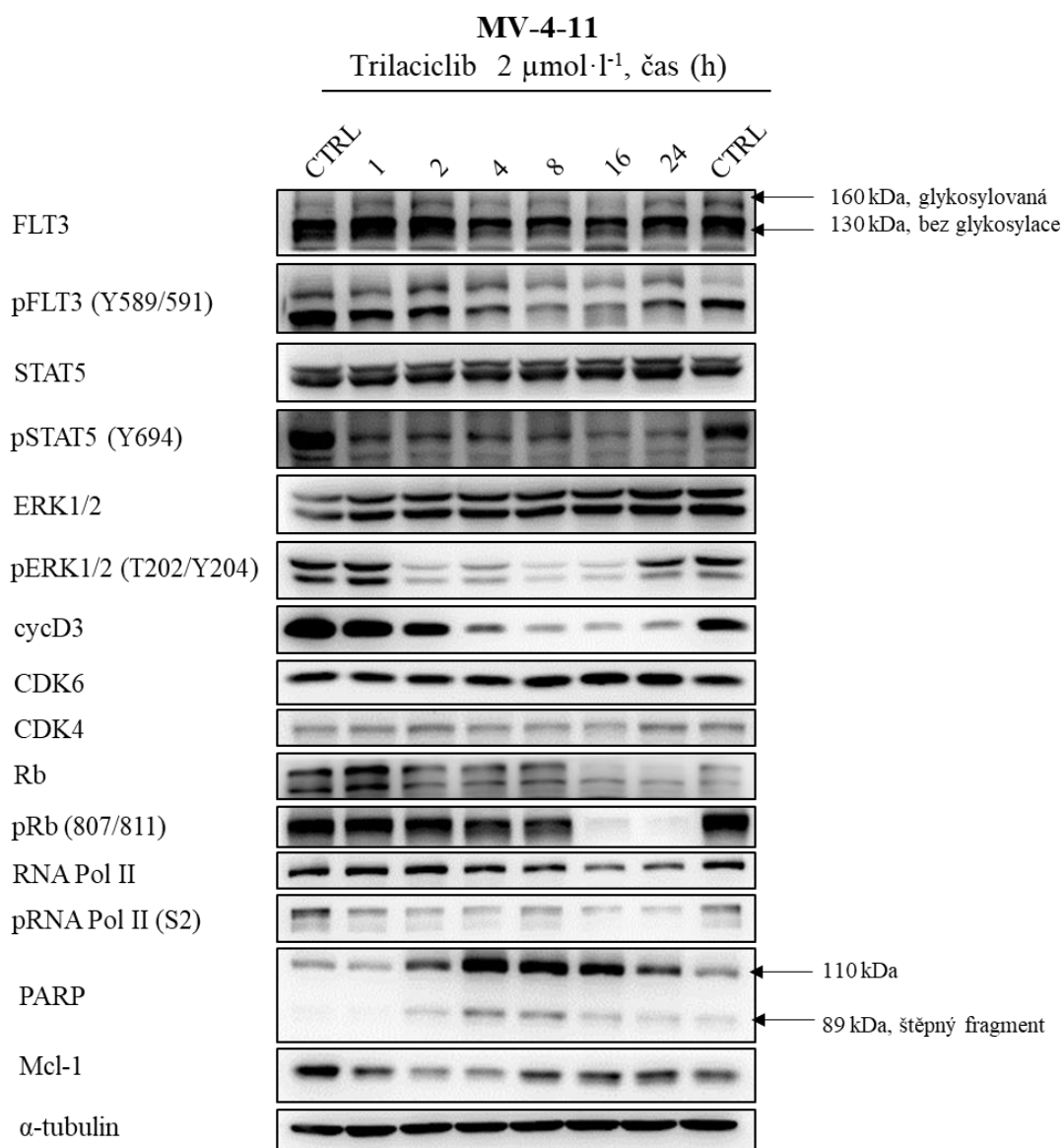
Obr. 22 Záznam z imunodetekce vybraných proteinů v buněčné linii EOL-1 po ošetření koncentrační řadou 125 – 250 – 500 a 1000 nmol·l⁻¹ Palbociclibu a Trilaciclibu po dobu 4 h nebo 24 h. Proužky odpovídají hladinám proteinů nebo míře jejich fosforylace, signál α-tubulinu je kontrolou stejnoměrného nanesení jednotlivých vzorků.

Vzhledem k diskrepancím v získaných výsledcích, především rozdílech mezi 4 hodinovým a 24 hodinovým působením Trilaciclibu na buňky linie MV-4-11 byl proveden časový experiment právě této kombinace látky a buněk při jednotné koncentraci 2 μmol·l⁻¹. Působení Trilaciclibu bylo studováno v časech 1-2-4-8-16 a 24 hodin po ošetření. Pokles fosforylace FLT3 (neglykosylované formy) byl detekován od 4. do 16. hodiny, ve 24. hodině byl však zeslaben. Tento efekt koreluje s poklesem fosforylace ERK1/2 pozorovaným od 2. do 16. hodiny a opětovným nárůstem ve 24. hodině, naopak výrazně se liší pokles fosforylace STAT5 detekovaný od 1. do 24. hodiny (Obr. 23).

Pokles hladiny proteinu CycD3 byl sledován od 4. do 24. hodiny po ošetření, ale nebyl doprovázen poklesem partnerských CDK4 a 6, jejichž hladiny zůstaly nezměněny. Pokles fosforylace Rb bylo možné sledovat od 4. hodiny po ošetření, výrazný pokles zastoupení fosforylovaného i celkového Rb v 16. a 24. hodině. Hladiny celkové i fosforylované RNA Pol II byly sníženy velmi mírně po 16. a 24. hodinách působení. U markerů aktivace kaspas, PARP a Mcl-1 byl pozorován přechodný efekt, jak nastiňovaly předchozí experimenty. Ve 4. a 8. hodině po ošetření došlo k výraznější fragmentaci proteinu PARP, ale taktéž ke vzrůstu zastoupení jeho neštěpené formy, ve 24. hodině byl však tento projev

výrazně zeslaben. Podobně bylo zastoupení pro-apoptického proteinu Mcl-1 sníženo v 2. a 4. hodině, poté se vrátilo na úroveň kontroly (Obr. 23).

Po detailním prozkoumání efektů, jež vyvolalo působení Trilaciclibu na buňkách linie MV-4-11 byla potvrzena inhibice FLT3 a pokles fosforylace proteinů STAT a ERK1/2. U ostatních studovaných inhibitorů, pro něž jsou k dispozici pouze prvotní předkládané výsledky (viz kapitoly 4.2 a 4.3), se předpokládá stejný mechanismus účinku, avšak vzhledem k rozdílům zjištěným při cytometrické analýze bude v budoucnu detailně prozkoumáno i jejich působení, v rámci koncentrační a časové závislosti.

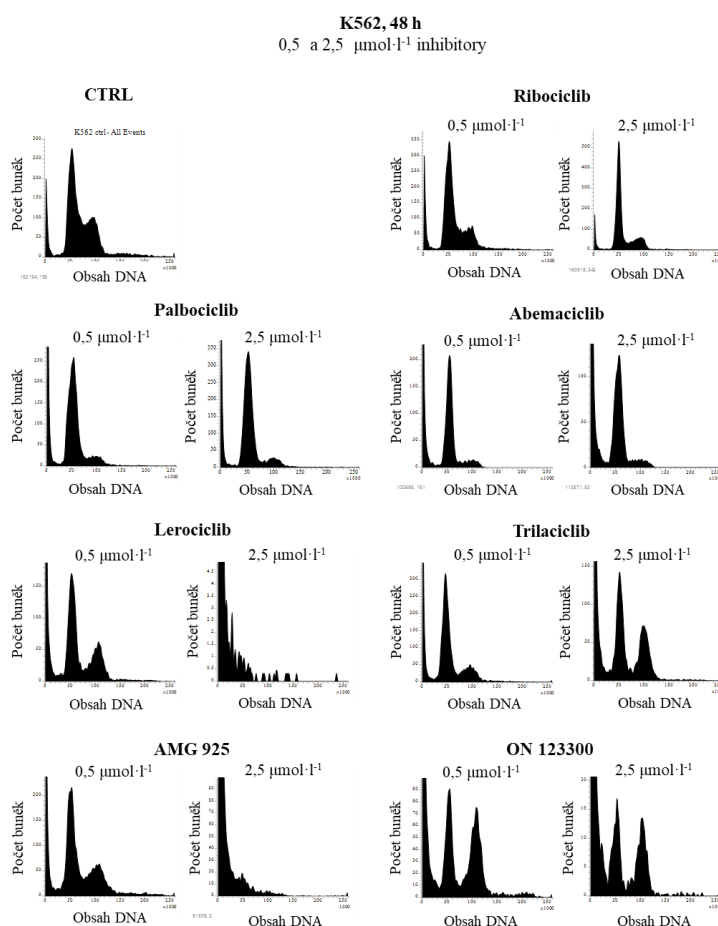


Obr. 23 Záznam z imunodetekce vybraných proteinů v buněčné linii MV-4-11 po ošetření Trilaciclibem o koncentraci $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 1-2-4-8-16 a 24 hodin. Proužky odpovídají hladinám proteinů nebo míře jejich fosforylace, signál α -tubulinu je kontrolou stejnoměrného nanesení jednotlivých vzorků.

4.4 Efekty na buněčném cyklu po 48 hodinovém ošetření inhibitory

Při cytometrické analýze buněčného cyklu po působení studovaných inhibitorů na linii K562 byl sledován nepředpokládaný efekt (přechod do G2/M bloku v relativně nízkých koncentracích, Obr. 16). Proto byly buňky linie K562 podrobeny působení studovaných inhibitorů v koncentracích $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 48 hodin. Delší vystavení buněk inhibitorům mělo objasnit jejich případný efekt na mitotické kinasy.

Schválené selektivní inhibitory Ribociclib, Palbociclib a Abemaciclib se projevily typickým G1 blokem, což koreluje s účinkem sledovaným po 24 hodinách. U ostatních inhibitorů byl po 24 hodinách pozorován nárůst populace buněk v G2/M fázi. Tento nárůst se u inhibitoru ON 123300 po 48 hodinách projevil už při $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, u Trilaciclibu při $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, ani v jednom případě však nedošlo k výraznější apoptose. Naproti tomu působení Lerociclibu a AMG 925 při $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ po 48 hodin vedlo k výrazné apoptose, kdy byla detekována pouze populace buněk v sub-G1 fázi (Obr. 24).



Obr. 24 Histogramy získané při cytometrickém měření po ošetření buněk linie K562 studovanými inhibitory v koncentracích $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 48 hodin (stanoveno průtokovou cytometrií po označení DNA propidium jodidem).

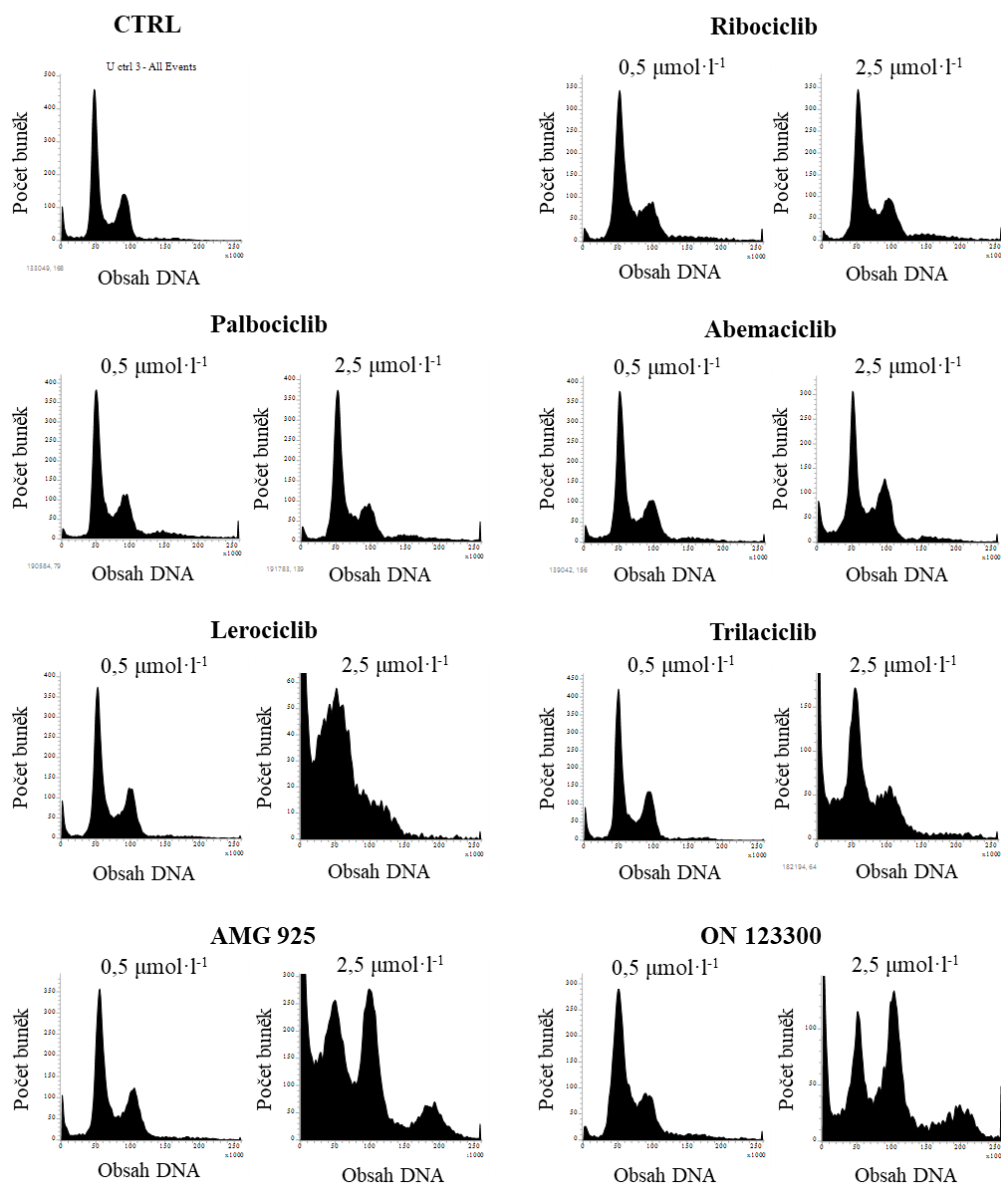
Výše zmíněné efekty a netypický fenotypový projev působení inhibitorů mohl být na buňkách linie K562 maskován nebo zeslaben inhibicí primárních cílů, tedy CDK4/6. Proto byla pro další studium působení inhibitorů vybrána linie U2932, která nedisponuje funkčním proteinem Rb a u níž by inhibice CDK4 a CDK6 neměla ovlivnit buněčný cyklus. Ve všech následujících experimentech byly buňky podrobeny působení inhibitorů po dobu 48 hodin, aby se dostatečně projevil jejich vliv na regulaci mitosy.

Po ošetření buněk linie U2932 schválenými inhibitory Ribociclibem, Palbociclibem a Abemaciclibem nebyl pozorován žádný zásadní efekt na buněčný cyklus (až na mírný nárůst populace buněk v G2/M fázi po ošetření $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Abemaciclibem). Současně po působení všech čtyř testovaných neschválených inhibitorů nedošlo při koncentraci $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ k žádným výrazným změnám, avšak v koncentraci $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ byly opět sledovány nepředpokládané efekty na buněčný cyklus. Po působení Trilaciclibu došlo v dané koncentraci k mírnému nárůstu zastoupení apoptických buněk asi na 30 % ze všech detekovaných, zatímco u Lerociclibu se stejným projevem byl nárůst apoptosy mnohem markantnější, na přibližně 80 % (Obr. 25).

Působení inhibitorů AMG 925 a ON 123300 vedlo také k velmi podobnému efektu, a to k markantnímu nárůstu zastoupení buněk v G2/M fázi (4N) spolu s přítomností DNA-tetraploidní populace, jež byla odhalena na základě píku odpovídajícího 8N sadám chromosomů. Správnost interpretace byla potvrzena na základě prozkoumání závislosti bočního rozptylu a přímého rozptylu, přičemž bylo vyloučeno, že by se jednalo o shluky buněk. Pravděpodobně došlo účinkem těchto inhibitorů k endoreduplikaci, tedy ke zdvojení chromosomů v interfázi, následné mitotické dělení buněčného jádra už však neproběhlo. Mezi působením inhibitorů AMG 925 a ON 123300 byl pozorován rozdíl pouze v zastoupení apoptických buněk, jež bylo u inhibitoru AMG 925 značně vyšší (Obr. 25). Tyto skutečnosti jasně ukázaly na inhibici určitých vedlejších cílů, nezávislých na funkčnosti proteinu Rb a pravděpodobně souvisejících s regulací G2/M fáze a mitosy.

Jelikož byly pro prvotní analýzu použity pouze dvě koncentrace v poměrně širokém rozmezí, bylo dalším cílem blíže zjistit, při jaké koncentraci dochází ke sledovaným efektům na buněčném cyklu. Proto byly buňky linie U2932 dále podrobeny působení tří vybraných inhibitorů Lerociclibu, AMG 925 a ON 123300 v koncentrační řadě $0,625 - 1,25$ a $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, opět po dobu 48 hodin.

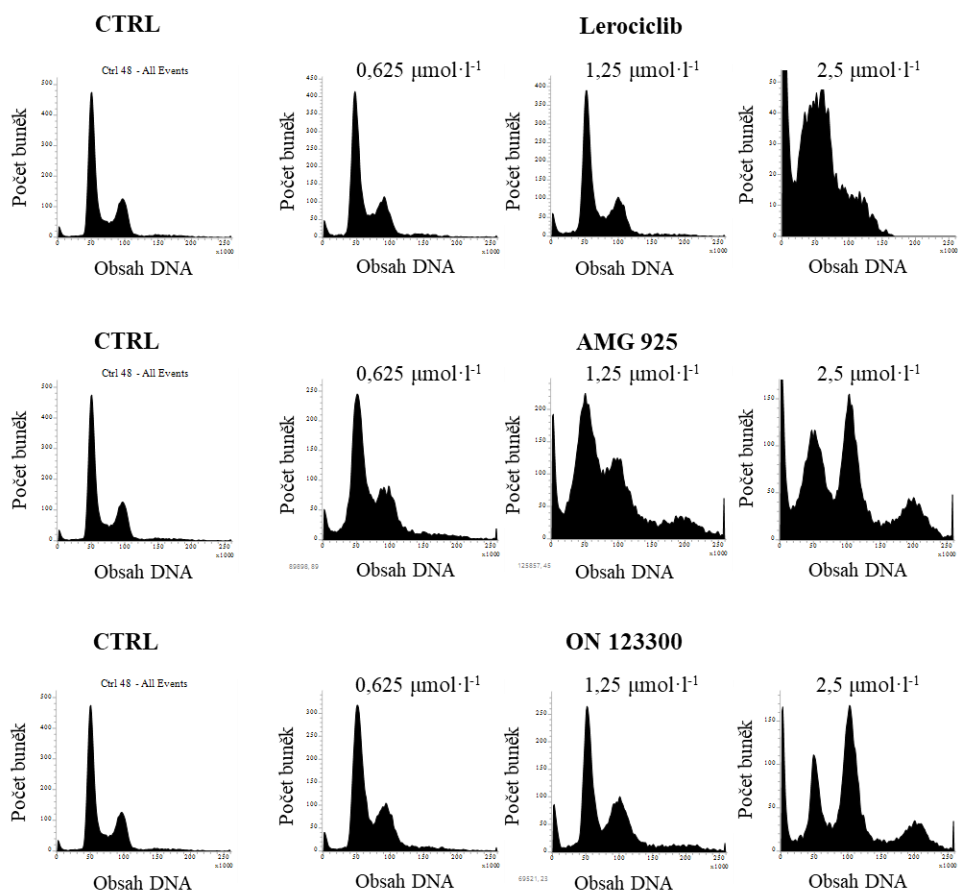
U2932, 48 h
0,5 a 2,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ inhibitory



Obr. 25 Histogramy získané při cytometrickém měření po ošetření buněk linie U2932 studovanými inhibitory v koncentracích 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 2,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 48 hodin (stanoveno průtokovou cytometrií po označení DNA propidium jodidem).

Zatímco při 0,625 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentraci inhibitorů nebyly pozorovány žádné změny v buněčném cyklu, u 1,25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ AMG 925 jako jediného ze tří dále studovaných inhibitorů došlo k nárůstu populace buněk 4N a zřetelné přítomnosti tetraploidní populace (8N) (Obr. 26) Při koncentraci 2,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ byly výsledky konzistentně zreplikovány a byly pozorovány stejné efekty jako na Obr. 25.

U2932, 48 h
 0,625; 1,25 a 2,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
 Lerociclib, AMG 925 a ON 123300



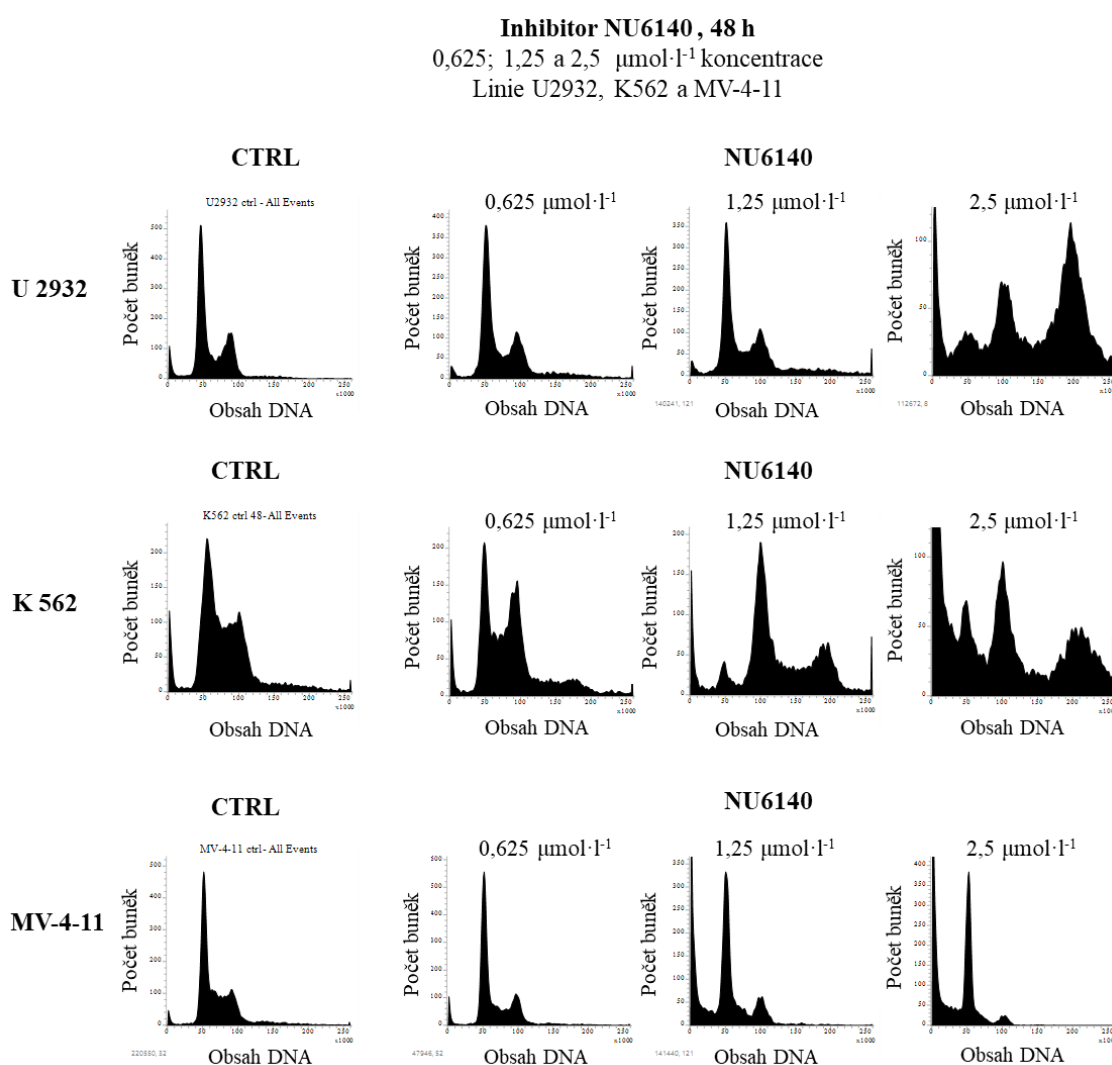
Obr. 26 Histogramy získané při cytometrickém měření po ošetření buněk linie U2932 studovanými inhibitory Lerociclibem, AMG 925 a ON 123300 v koncentracích 0,625 – 1,25 a 2,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 48 hodin (stanoveno průtokovou cytometrií po označení DNA propidium jodidem).

Jelikož endoreduplikace a tetraploidie nastává ve většině případů po inhibici kinasy Aurora B, jako pozitivní kontrola byl nakonec využit inhibitor NU6140, u něhož byla potvrzena inhibice kinas Aurora A, B i C (Jorda *et al.*, 2018). Jeho účinku byly vystaveny tři ze zkoumaných buněčných linií: U2932, K562 a MV-4-11. Byly zvoleny stejné koncentrace jako u předchozího experimentu: 0,625 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 1,25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 2,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, působící opět po dobu 48 h. Účinek inhibitoru NU6140 se na vybraných buněčných liniích značně různil. Zatímco na buňkách linie U2932 se efekt projevil až při 2,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ s velmi výrazným zastoupením tetraploidní populace, u buněk linie K562 došlo již při 0,625 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ k nárůstu populace 4N i > 4N a s koncentrační závislostí se zvyšovalo zastoupení populace 4N i 8N. Na buňkách linie K562 však nebyla míra

tetraploidie tak vysoká jako u buněk linie U2932, naopak působení 2,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NU6140 na buňky linie K562 vedlo k výraznějšímu nárůstu apoptické populace (Obr. 27).

Na buňkách linie MV-4-11 se neprojevil žádný výrazný efekt na buněčný cyklus (až na mírný pokles populace buněk v G2/M fázi), pouze mírný nárůst apoptické populace buněk (Obr. 27).

Na základě ošetření inhibitorem NU6140 bylo ověřeno, že inhibice Aurora kinas vede u buněk linie U2932 a K562 k projevu tetraploidie, zatímco na buňkách linie MV-4-11 tento efekt sledován nebyl. Pravděpodobně zde existují určité rozdíly mezi zastoupením nebo mutačním profilem ovlivněných kinas, které je při studiu selektivity a buněčného působení inhibitorů nutno brát v potaz.



Obr. 27 Histogramy získané při cytometrickém měření po ošetření buněk linií U2932, K562 a MV-4-11 inhibitorem NU6140 v koncentracích 0,625 – 1,25 a 2,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 48 hodin (stanoveno průtokovou cytometrií po označení DNA propidium jodidem).

5 DISKUSE

V praktické části předkládané práce byly stanoveny a prozkoumány efekty vybraných inhibitorů CDK4/6 na buněčných liniích odvozených od lidských malignit, především myeloidní leukemie. Všechny studované inhibitory se vyznačují vysokou potencí k inhibici CDK4/6, selektivita této inhibice se však mezi jednotlivými liší. Ze tří schválených inhibitorů CDK4/6 jsou vysoce selektivními Palbociclib a Ribociclib, selektivita Abemaciclibu je ve srovnání s nimi nižší, mezi ostatními známými inhibitory CDK4/6 však stále významná (Jorda *et al.*, 2018; Hafner *et al.*, 2019). Další a zároveň nejnovější inhibitory CDK4/6, Trilaciclib a Lerociclib, disponují mírně vyšší inhibicí CDK4/6 než Palbociclib, avšak také vykazují vyšší selektivitu než Abemaciclib (Bisi *et al.*, 2016; Bisi *et al.*, 2017; Klaeger *et al.*, 2017). Inhibitor ON 123300 je multikinasový (Reddy *et al.*, 2014) a AMG 925 je označován jako duální inhibitor CDK4/6 a FLT3, vykazuje však také několik dalších, výrazně inhibovaných vedlejších cílů (Li *et al.*, 2014).

V literatuře byly v poslední době popsány odlišnosti mezi inhibitory CDK4/6 a vedlejší cíle, klíčové pro buňky akutní myeloidní leukemie. Na základě těchto zjištění byly v práci porovnány vybrané inhibitory na buněčné úrovni, pro sjednocené srovnání jejich efektů (které na modelu AML není k dispozici) a potvrzení inhibice vedlejších cílů.

Při cytometrické analýze buněčného cyklu po 24 hodinovém působení inhibitorů na linie MV-4-11 a MOLM-13 (obě disponující mutací FLT3-ITD, Obr. 12) byly pozorovány první rozdíly mezi inhibitory. Výrazný G1 blok od $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ s překročením hranice 90 % buněk v G1 fázi při $500 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ u schválených inhibitorů koresponduje publikovanými daty pro Palbociclib a Abemaciclib na totožných buněčných liniích (Matsuo *et al.*, 2018). Vyšší citlivost buněk MOLM-13 ve srovnání s MV-4-11 je taktéž v souladu s publikovaným porovnáním jejich viability po působení Palbociclibu (Uras *et al.*, 2016) a míry apoptosy po působení AMG 925 (Li *et al.*, 2014). U Trilaciclibu a ON 123300 není působení na tyto linie popsáno, zvýšená míra apoptosy koreluje s publikovanou mírou inhibice FLT3-ITD (Bisi *et al.*, 2016; Reddy *et al.*, 2014). Výrazný nárůst apoptosy u Lerociclibu při $2500 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ odpovídá publikovanému vlivu vyšší koncentrace na buněčnou linii WM2664 odvozenou od melanomu (Rb pozitivní), kde nad $300 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ docházelo k výraznému poklesu buněk v G1 fázi a nárůstu apoptosy (Bisi *et al.*, 2017). Takové působení však nebylo u velmi podobného Trilaciclibu

pozorováno, což ukazuje na rozdíl nutně způsobený vedlejším cílem, v němž se tyto dva inhibitory liší.

Buňky EOL-1 byly vybrány jako modelové buňky vykazující vysokou expresi nemutované FLT3, potvrzené na základě srovnání buněčných linií pomocí western blotu (Obr. 12) i průtokové cytometrie za použití protilátek proti FLT3 (Ampasavate *et al.*, 2019). Současně však disponují fúzním genem FIP1L1-PDGFRa a tedy konstitutivně aktivním proteinem PDGFRa (Cools *et al.*, 2004). Buňky EOL-1 se ukázaly být velmi citlivé na působení většiny testovaných inhibitorů. Nejcitlivější byly na inhibitor ON 123300, u něhož již při působení v koncentraci $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ po dobu 24 h bylo přes 80 % buněk apoptických. Tento výsledek odpovídá silné inhibici PDGFR, kterou ON 123300 vykazuje (Reddy *et al.*, 2014). Výrazná míra apoptosy detekovaná po působení $500 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ AMG 925 odráží již dříve popsanou skutečnost, že inhibitory FLT3 vykazují jako vedlejší cíl velmi často právě PDGFR, vzhledem ke strukturní podobnosti jejich kinasové domény. Některé látky fungují jako multikinasové inhibitory FLT3, PDGFR a c-KIT, např. Quizartinib (Kampa-Schittenhelm *et al.*, 2013). Působení silných inhibitorů PDGFR vyvinutých na pracovišti LRR vedlo taktéž k výrazné apoptose buněk EOL-1 již při $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ po 24 h (Řezníčková *et al.*, 2019). Trilaciclib a Lerociclib vykazují podobný cytometrický profil jako AMG 925, inhibují FLT3-ITD, (Bisi *et al.*, 2016; 2017), ale míra inhibice PDGFR je u Lerociclibu asi šestrát vyšší než u Trilaciclibu (viz kapitola 4.3). Navíc po působení Lerociclibu došlo již po 4 hodinách k poklesu celkové hladiny PDGFRa. Tyto výsledky poukazují na inhibici vedlejšího cíle společného Trilaciclibu i Lerociclibu, avšak také na výrazný pro-apoptický efekt Lerociclibu, jenž by mohl být způsoben inhibicí Mps1 (Mason *et al.*, 2017). U Abemaciclibu však nebyla zjištěna inhibice PDGFR ani při $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Moret *et al.*, 2019), přesto byla při $500 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ pozorována více než 60% míra apoptosy, na rozdíl od 20 % u Ribociclibu a Palbociclibu. Tento efekt může být způsoben inhibicí CSNK2 nebo kombinovanou inhibicí CDK2 a CDK9, jelikož buňky EOL-1 se ukázaly být výrazně citlivé na působení inhibitoru CYC065, inhibujícího nejvíce právě CDK2/9 (Frame *et al.*, 2015). Ribociclib i Palbociclib se na buňkách linie EOL-1 projeví jako selektivní inhibitory CDK4/6, protože po jejich působení došlo pouze ke G1 bloku bez nárůstu míry apoptosy.

Rozdíly ve fenotypovém projevu po působení inhibitorů byly pozorovány i u buněk linie K562 (bez exprese FLT3). Schválené inhibitory vyvolávaly G1 blok bez nárůstu apoptosy, což odpovídá efektem i koncentračním vlivem jejich profilování provedenému

na pracovišti již dříve (Jorda *et al.*, 2018). Ani působení ostatních inhibitorů nevedlo k výraznému nárůstu apoptosy, avšak u všech čtyř ostatních inhibitorů došlo při $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentraci k nárůstu populace buněk v G2/M, nejméně u ON 123300. Tento efekt byl v koncentracích vyšších než $3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pozorován u Abemaciclibu a v koncentracích vyšších než $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ u Palbociclibu na Rb pozitivních i Rb negativních buňkách odvozených od rakoviny prsu (Hafner *et al.*, 2019). Zatím není znám přesný molekulární cíl, jehož inhibice způsobuje tento efekt, bude se jednat pravděpodobně o kinasu regulující přechod G2/M, která nemusí být u všech čtyř inhibitorů totožná.

Analýza fosforylace klíčových proteinů signální dráhy vedoucí od FLT3-ITD v buňkách MV-4-11 pomocí imunodetekce prokázala zřetelnou inhibici této dráhy po působení $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ON 123300 a AMG 925, u nichž je potvrzena vysoká potence k inhibici FLT3 i FLT3-ITD (Reddy *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014). Působení Trilaciclibu i Lerociclibu vedlo ke stejnému efektu, což odráží inhibici FLT3-ITD jako vedlejšího cíle. Zajímavým efektem však bylo, že na rozdíl od potentních a selektivních inhibitorů FLT3, např. Quizartinibu (Gunawardane *et al.*, 2013) nebo na pracovišti vyvinutých (Gucký *et al.*, 2018), nedošlo po působení studovaných inhibitorů CDK4/6 k úplnému potlačení autofosforylace FLT3-ITD. I přesto podřízené STAT5 a ERK vykazovaly téměř nulovou hladinu fosforylace, podobný efekt byl pozorován po působení Sorafenibu, (inhibitor receptorových tyrosin kinas VEGFR, PDGFR, KIT, FLT3), inhibujícího angiogenesi (Bruner *et al.*, 2017).

Při analýze vlivu inhibitorů v koncentraci $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu čtyř hodin na linii MOLM-13 byl pozorován analogický efekt odpovídající inhibici signalizace od FLT3-ITD. Pokles celkové hladiny FLT3 a fosforylace STAT5 po působení všech neschválených inhibitorů i Palbociclibu odpovídá dříve publikovaným údajům o vlivu Palbociclibu na buňky linie MOLM-14 a může vysvětlovat větší citlivost linie MOLM-13 ve srovnání s MV-4-11 (Uras *et al.*, 2016).

U buněk obou linií (MV-4-11 i MOLM-13) došlo po působení neschválených inhibitorů již po 4 hodinách k fragmentaci PARP. To odpovídá efektu výrazné inhibice signální dráhy podřízené FLT3, u specifických inhibitorů pozorovanému již v řádu desítek $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Gunawardane *et al.*, 2013; Yoshida *et al.*, 2014).

Působení inhibitorů na buňky EOL-1 odhalilo další odlišnosti. Zatímco prokazatelná inhibice PDGFRa po působení $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ON 123300 souhlasí s jeho inhibičním profilem (Reddy *et al.*, 2014), pokles fosforylace PDGFRa po působení Lerociclibu byl zapříčiněn

poklesem celkové hladiny PDGFR. Nezávisle na stavu PDGFRa však došlo po působení neschválených inhibitorů k poklesu fosforylace všech podřízených STAT i ERK. Tento efekt by mohl být způsoben inhibicí rodiny PRKD, jejíž členové figurují mezi nejvíce inhibovanými kinasami u Trilaciclibu, Lerociclibu, ON 123300 i AMG 925 (Bisi *et al.*, 2016; 2017; Reddy *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014). Bylo totiž prokázáno, že umlčení genu PRKD3 vede k zablokování signální dráhy STAT1/3 – MAPK (Baker *et al.*, 2018) a inhibice PRKD1/2 vede k na modelu karcinomů pankreatu a kolorektálního karcinomu k aktivaci kaspas, snížení exprese anti-apoptických proteinů rodiny Bcl-2 a nakonec až k apoptose (Harikumar *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2014).

Necitlivost buněk K562 vůči studovaným inhibitorům, kromě ON 123300, souhlasí se studiem cytotoxicity provedeným na pracovišti v dřívějších fázích studia (dosud nepublikovaná data). Ze studovaných látek vykazuje inhibici Bcr-Abl právě pouze ON 123300 a aktivní Bcr-Abl udržuje aktivovanou i dráhu STAT-MAPK. Na základě toho pozorování je možné, že studované inhibitory CDK4/6 vykazují dané efekty výrazněji u buněk s aktivačními mutacemi FLT3 nebo buněk výrazně závislými na cytokinové signalizaci (JAK/STAT) (Uras *et al.*, 2016).

Na základě studia koncentračního vlivu inhibitorů Palbociclibu a Trilaciclibu na buňkách MV-4-11 i EOL-1 byla po působení Trilaciclibu potvrzena inhibice studované signální dráhy v řádu 250 -500 nmol·l⁻¹, což je ve srovnání s jednotkami nmol·l⁻¹ Quizartinibu (Gunawardane *et al.*, 2013) výrazně slabší potence. Pokles fosforylace Rb pozorovaný již od koncentrace 125 nmol·l⁻¹ koresponduje s výraznou inhibicí CDK4/6, byl však ve všech případech doprovázen i výrazným poklesem hladiny celkového Rb. Pokles hladiny Rb může pramenit z vyšší míry degradace nebo může být způsoben štěpením katalyzovaným kaspasami v prvotních fázích apoptosy a byl již dříve pozorován na několika buněčných modelech (Boutillier *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2014; Sumi *et al.*, 2015).

Efekt Trilaciclibu byl v obou případech výraznější při působení po dobu 4 h, ve srovnání s 24 h, což vedlo k dalšímu prozkoumání v jednotlivých časech. Přechodný efekt Trilaciclibu pozorovaný na opětovné aktivaci FLT3 i MAPK dráhy koresponduje s analogickou reaktivací těchto signálních drah po adaptaci leukemických buněk na tyrosinkinasevé inhibitory Sorafenib, Quizartinib, Lestaurtinib a Crenolanib (Bruner *et al.*, 2017). Přechodné štěpení PARP a pokles Mcl-1 byl již také dříve pozorován u Quizartinibu (Gunawardane *et al.*, 2013). Přetrvávající suprese fosforylace STAT5 sice koresponduje s efektem tyrosinkinasevých inhibitorů (Bruner *et al.*, 2017),

avšak může ukazovat na zapojení dalšího vedlejšího cíle (již zmiňované PRKD) a suprese fosforylace Rb spolu s poklesem hladiny CycD3 může zajistit déle trvající efekt vedoucí až k apoptose.

Při důkladnější cytometrické analýze efektů studovaných inhibitorů byla na buňkách linie K562 po působení 2,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Lerociclibu a AMG 925 pozorována úplná apoptosa. Tento efekt by mohl souviset se velmi silnou inhibicí Mps1/TTK popsanou právě u těchto dvou inhibitorů při studiu selektivity *in vitro* (Bisi *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2014). Inhibice Mps1 totiž vede k narušení kontrolního bodu mitotického vřeténka, aneuploidii a buněčné smrti. Vyvinuté inhibitory Mps1 vykazují stejný efekt, i když v řádově nižších koncentracích, např. na modelu karcinomů prsu nebo plic (Mason *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2019).

Na linii U2932, jejíž buňky nedisponují funkčním Rb, se však ukázal překvapivý efekt. Zatímco působení Lerociclibu vedlo k apoptose, což může být způsobeno kombinovanou inhibicí Mps1 a Nek10 (kinasa regulující přechod G2/M) (Moniz a Stambolic, 2011), působení AMG 925 a ON 123300 vedlo k přítomnosti populace tetraploidních buněk (8N). Tetraploidní populace buněk byly nejčastěji pozorovány po inhibici nebo umlčení Aurory B (Shi *et al.*, 2007; Vidarsdottir *et al.*, 2012). Určitou míru inhibice Aurory B vykazuje ON 123300, avšak ne AMG 925. Společnými cíli s vysokou mírou inhibice jsou pro oba inhibitory kinasy podobné Cdc (CLK), především CLK2 a CLK4 (Reddy *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014). Aktivita těchto kinas je nutná pro kompletní aktivaci Aurory B a pro cytokinesi. Jejich inhibice narušuje správnou lokalizaci a aktivaci Aurory B a může vést také k tetraploidii (Petsalaki a Zachos, 2016). Následně byly proto tři studované buněčné linie podrobeny působení potvrzeného inhibitoru kinas Aurora NU6140 (Jorda *et al.*, 2018), čímž bylo u buněk linie U2932 a K562 dosaženo podobného efektu, ale ve větší míře než u studovaných inhibitorů CDK4/6. Skutečnost, že buňky MV-4-11 byly k působení inhibitoru resistantní, by mohla ukazovat na odlišný profil mutací. Absence projevu tetraploidie K562 v přítomnosti některých inhibitorů CDK4/6 na rozdíl od NU6140 by mohla souviset s vyšší hladinou Mps1 a převážením apoptosy popř. s resistencí právě k inhibici CLK2/4.

6 ZÁVĚR

Využití schválených inhibitorů CDK4/6 v klinické praxi výrazně změnilo léčebný přístup pro metastatický karcinom prsu. Na základě schválení Palbociclibu, Ribociclibu a Abemaciclibu byla vyvinuta řada dalších látek se zajímavými preklinickými účinky a v současné době probíhá mnoho dalších klinických testů pro jejich léčebné využití (Heptinstall *et al.*, 2018). Některé případy, kdy byl u látek objasněn hlavní terapeutický cíl až po jejich klinickém testování (Lin *et al.*, 2019) však ukázaly, že je nutné provádět důkladné studium selektivity na buněčné úrovni ještě před jejich klinickým využitím.

V praktické části práce byly proto studovány odlišnosti v působení vybraných inhibitorů CDK4/6 na buněčné úrovni. Ačkoliv nižší selektivita cílených látek se všeobecně považuje za nežádoucí, inhibice některých vedlejších cílů inhibitorů může vykazovat příznivý účinek pro léčbu. Studium inhibice vedlejších cílů proto může vést k využití konkrétního inhibitoru pro léčbu jiného druhu choroby (nové využití stávající látky, tzv. „*drug repurposing*“) (Pushpakom *et al.*, 2019).

Na základě studia projevu vybraných inhibitorů CDK4/6 na buněčné úrovni byla potvrzena inhibice FLT3(ITD) a podřízené signalizace u inhibitorů ON 123300 a AMG 925, především však u Trilaciclibu a Lerociclibu, kde efekt na buněčné úrovni dosud pozorován nebyl. Na základě detailní analýzy koncentrační i časové závislosti bylo navrženo i zapojení inhibice kinas PRKD, zesilující supresi zmiňované signální dráhy (Baker *et al.*, 2018). Ze studovaných inhibitorů měl na modelu AML nejsilnější účinek Lerociclib, jehož působení vedlo k výrazné apoptose.

Cytometrická měření po působení inhibitorů na buňky nezávislé na FLT3 odhalila i výrazný účinek Lerociclibu a AMG 925 vyvolávající apoptosu, pravděpodobně prostřednictvím inhibice mitotické kinas Mps1/TTK. Po působení ON 123300 a AMG 925 na buňky s nefunkčním proteinem Rb byly pozorovány tetraploidní populace buněk. Tetraploidie byla nejpravděpodobněji vyvolána inhibicí kinas CLK, čímž došlo k zeslabení funkce Aurory B a endoreduplikacím (Petsalaki a Zachos, 2016). Inhibice těchto vedlejších cílů bude v budoucnu dále studována.

Na základě účinků inhibitorů CDK4/6 přesahujících jejich hlavní léčebnou skupinu (karcinom prsu) by bylo vhodné uvažovat o rozšíření jejich využití i pro jiná maligní onemocnění, především v kombinaci s dalšími cílenými léčivy. Výsledky této práce ukazují potenciál využití inhibitorů CDK4/6 v kombinační léčbě AML nebo pro vývoj nových inhibitorů vykazujících podobně příznivé efekty.

7 LITERATURA

- Ampasavate C., Jutapakdee W., Phongpradist R., Tima S., Tantiworawit A., Charoenkwan P., Chinwong D., Anuchapreeda S. (2019): FLT3, a prognostic biomarker for acute myeloid leukemia (AML): Quantitative monitoring with a simple anti-FLT3 interaction and flow cytometric method. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **33**, e22859.
- 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**, 130-146.
- Baker J., Falconer A. M. D., Wilkinson D. J., Europe-Finner G. N., Litherland G. J., Rowan A. D (2018): Protein kinase D3 modulates MMP1 and MMP13 expression in human chondrocytes. *PLoS One* **13**, e0195864.
- Becker K. A., Ghule, P. N., Therrien J. A., Lian J. B., Stein J. L., van Wijnen A. J., Stein G. S. (2006): Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase. *Journal of Cellular Physiology* **209**, 883-893.
- 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.
- Bisi J. E., Sorrentino J. A., Roberts P. J., Tavares F. X., Strum J. C. (2016): Preclinical Characterization of G1T28: A Novel CDK4/6 Inhibitor for Reduction of Chemotherapy-Induced Myelosuppression. *Molecular Cancer Therapeutics* **15**, 783-793.
- 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. *Molecular and Cellular Biology* **29**, 4188-4200.
- Bortolozzi R., Mattiuzzo E., Trentin L., Accordi B., Basso G., Viola G. (2018): Ribociclib, a Cdk4/Cdk6 kinase inhibitor, enhances glucocorticoid sensitivity in B-acute lymphoblastic leukemia (B-ALL). *Biochemical Pharmacology* **153**, 230-241.
- Boutillier A. L., Trinh E., Loeffler J. P. (2000): Caspase-dependent cleavage of the retinoblastoma protein is an early step in neuronal apoptosis. *Oncogene* **19**, 2171-2178.
- 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**, 248-54.
- Bruner J. K., Ma H. S., Li L., Qin A. C. R., Rudek M. A., Jones R. J., Levis M. J., Pratz K. W., Pratilas C. A., Small D. (2017): Adaptation to TKI Treatment Reactivates ERK Signaling in Tyrosine Kinase-Driven Leukemias and Other Malignancies. *Cancer Research* **77**, 5554-5563.
- Cao L., Chen F., Yang X., Xu W., Xie J., Yu L. (2014): Phylogenetic analysis of CDK and cyclin proteins in premetazoan lineages. *BMC Evolutionary Biology* **14**, 10.
- Cidado J., Boiko S., Proia T., Ferguson D., Criscione S. W., San Martin M., Pop-Damkov P., Su N., Roamio Franklin V. N., Sekhar Reddy Chilamakuri C., D'Santos C. S., Shao W., Saeh J. C., Koch R., Weinstock D. M., Zinda M., Fawell S. E., Drew L. (2020): AZD4573 Is a Highly Selective CDK9 Inhibitor That Suppresses MCL-1 and Induces Apoptosis in Hematologic Cancer Cells. *Clin Cancer Research* **26**, 922-934.
- Clark A. S., Karasic T. B., DeMichele A., Vaughn D. J., O'Hara M., Perini R., Zhang P., Lal P., Feldman M., Gallagher M., O'Dwyer P. J. (2016): Palbociclib (PD0332991)-a Selective and Potent Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor: A Review of Pharmacodynamics and Clinical Development. *JAMA Oncology* **2**, 253-260.
- Cools J., Quentmeier H., Huntly B. J., Marynen P., Griffin J. D., Drexler H. G., Gilliland D. G. (2004): The EOL-1 cell line as an in vitro model for the study of FIP1L1-PDGFR α -positive chronic eosinophilic leukemia. *Blood* **103**, 2802-2805.
- D'Angiolella V., Esencay M., Pagano M. (2013): A cyclin without cyclin-dependent kinases: cyclin F controls genome stability through ubiquitinmediated proteolysis. *Trends in Cellular Biology* **23**, 135-140.

- de Dueñas E. M., Gavila-Gregori J., Olmos-Antón S., Santaballa-Bertrán A., Lluch-Hernández A., Espinal-Domínguez E. J., Rivero-Silva M., Llombart-Cussac A. (2018): Preclinical and clinical development of palbociclib and future perspectives. *Clinical & Translational Oncology* **20**, 1136-1144.
- Divakar S. K., Ramana Reddy M. V., Cosenza S. C., Baker S. J., Perumal D., Antonelli A. C., Brody J., Akula B., Parekh S., Reddy E. P. (2016): Dual inhibition of CDK4/Rb and PI3K/AKT/mTOR pathways by ON123300 induces synthetic lethality in mantle cell lymphomas. *Leukemia* **30**, 86-93.
- Dixit A., Yi L., Gowthaman R., Torkamani A., Schork N. J., Verkhivker G. M. (2009): Sequence and structure signatures of cancer mutation hotspots in protein kinases. *PLoS One* **4**, e7485.
- Echalier A., Endicott J. A., Noble M. E. (2010): Recent developments in cyclin-dependent kinase biochemical and structural studies. *Biochimica et Biophysica acta* **3**, 511-519.
- Finn R. S., Crown J. P., Lang I., Boer K., Bondarenko I. M., Kulyk S. O. (2015): The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *Lancet Oncology* **16**, 25-35.
- Frame S., Saladino C., Davis S., Blake D., Zheleva, D. (2015): CYC065, potential therapeutic agent for AML and MLL leukaemia. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* **15**, 183.
- Fry D. W., Harvey P. J., Keller P. R., Elliott W. L., Meade M., Trachet E. (2004): Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics* **3**, 1427-1438.
- Gao W., Wang M., Wang L., Lu H., Wu S., Dai B., Ou Z., Zhang L., Heymach J. V., Gold K. A., Minna J., Roth J. A., Hofstetter W. L., Swisher S. G., Fang B. (2014): Selective antitumor activity of ibrutinib in EGFR-mutant non-small cell lung cancer cells. *Journal of the National Cancer Institute* **106**, dju204.
- 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**, 825-837.
- Goldman J. W., Shi P., Reck M., Paz-Ares L., Koustenis A., Hurt K. C. (2016): Treatment Rationale and Study Design for the JUNIPER Study: A Randomized Phase III Study of Abemaciclib With Best Supportive Care Versus Erlotinib With Best Supportive Care in Patients With Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer With a Detectable KRAS Mutation Whose Disease Has Progressed After Platinum-Based Chemotherapy. *Clinical Lung Cancer* **17**, 80-84.
- Gunawardane R. N., Nepomuceno R. R., Rooks A. M., Hunt J. P., Ricono J. M., Belli B., Armstrong R. C. (2013): Transient exposure to quizartinib mediates sustained inhibition of FLT3 signaling while specifically inducing apoptosis in FLT3-activated leukemia cells. *Molecular Cancer Therapeutics* **12**, 438-447.
- 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 Chemical Biology* **26**, 1067-1080.
- Hall M., Peters G. (1996): Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Advances in Cancer Research* **68**, 67-108.
- Harikumar K. B., Kunnumakkara A. B., Ochi N., Tong Z., Deorukhkar A., Sung B., Kelland L., Jamieson S., Sutherland R., Raynham T., Charles M., Bagherzadeh A., Foxton C., Boakes A., Farooq M., Maru D., Diagaradjane P., Matsuo Y., Sinnett-Smith J., Gelovani J., Krishnan S., Aggarwal B. B., Rozengurt E., Ireson C. R., Guha S. (2010): A novel small-molecule inhibitor of protein kinase D blocks pancreatic cancer growth in vitro and in vivo. *Molecular Cancer Therapeutics* **9**, 1136-46.
- He S., Roberts P. J., Sorrentino J. A., Bisi J. E., Storrie-White H., Tiessen R. G., Makhuli K. M., Wargin W. A., Tadema H., van Hoogdalem E. J., Strum J. C., Malik R., Sharpless N. E. (2017):

- Transient CDK4/6 inhibition protects hematopoietic stem cells from chemotherapy-induced exhaustion. *Science Translational Medicine* **9**, 387.
- Hedberg Y., Davoodi E., Ljungberg B., Roos G., Landberg G. (2002): Cyclin E and p27 protein content in human renal cell carcinoma: clinical outcome and associations with cyclin D. *International Journal of Cancer* **102**, 601-607.
- Heptinstall A. B., Adiyasa I., Cano C., Hardcastle I. R. (2018): Recent advances in CDK inhibitors for cancer therapy. *Future Medicinal Chemistry* **10**, 1369-1388.
- Hirai H., Roussel M. F., Kato J. Y., Ashmun R. A., Sherr C. J. (1995): Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 2672-2681.
- Hu S., Marineau J. J., Rajagopal N., Hamman K. B., Choi Y. J., Schmidt D. R., Ke N., Johannessen L., Bradley M. J., Orlando D. A., Alnemy S. R., Ren Y., Ciblat S., Winter D. K., Kabro A., Sprott K. T., Hodgson J. G., Fritz C. C., Carulli J. P., di Tomaso E., Olson E. R. (2019): Discovery and Characterization of SY-1365, a Selective, Covalent Inhibitor of CDK7. *Cancer Research* **79**, 3479-3491.
- Cha Y., Erez T., Reynolds IJ, Kumar D, Ross J, Koytiger G, Kusko R, Zeskind B, Risso S, Kagan E, Papapetropoulos S, Grossman I, Laifenfeld D. (2018): Drug repurposing from the perspective of pharmaceutical companies. *British Journal of Pharmacology* **175**, 168-180.
- Chen P., Lee N. V., Hu W., Xu M., Ferre R., Lam H., Bergqvist S., Solowiej J., Diehl W., He Y. A., Yu X., Nagata A., VanArsdale T., Murray B. (2016): Spectrum and Degree of CDK Drug Interactions Predicts Clinical Performance. *Molecular Cancer Therapeutics* **15**, 2273-2281.
- Choi Y. J., Anders L. (2014): Signaling through cyclin D-dependent kinases. *Oncogene* **33**, 1890-1903.
- James M. K., Ray A., Leznova D., Blain S. W. (2008): Differential modification of p27Kip1 controls its cyclin D-cdk4 inhibitory activity. *Molecular and Cellular Biology* **28**, 498-510.
- 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.
- Jirawatnotai S., Hu Y., Michowski W., Elias J. E., Becks L., Bienvenu F., Zagodzón A., Goswami T., Wang Y. E., Clark A. B., Kunkel T. A., van Harn T., Xia B., Correll M., Quackenbush J., Livingston D., Gygi S., Sicinski P. (2011): A function for cyclin D1 in DNA repair uncovered by protein interactome analyses in human cancers. *Nature* **474**, 230-234.
- Johnson S. M., Torrice C. D., Bell J. F., Monahan K. B., Jiang Q., Wang Y., Ramsey M. R., Jin J., Wong K. K., Su L., Zhou D., Sharpless N. E. (2010): Mitigation of hematologic radiation toxicity in mice through pharmacological quiescence induced by CDK4/6 inhibition. *Journal of Clinical Investigation* **120**, 2528-2536.
- Jorda R., Hendrychová D., Voller J., Řezníčková E., Gucký T., Kryštof V. (2018): How Selective Are Pharmacological Inhibitors of Cell-Cycle-Regulating Cyclin-Dependent Kinases? *Journal of Medicinal Chemistry* **61**, 9105-9120.
- Jorda R., Magar P., Hendrychová D., Pauk K., Dibus M., Pilařová E., Imramovský A., Kryštof V. (2020): Novel modified leucine and phenylalanine dipeptides modulate viability and attachment of cancer cells. *European Journal of Medicinal Chemistry* **188**, 112036.
- Jorda R., Řezníčková E., Kiełczewska U., Maj J., Morzycki J. W., Siergiejczyk L., Bazgier V., Berka K., Rárová L., Wojtkielewicz A. (2019): Synthesis of novel galeterone derivatives and evaluation of their in vitro activity against prostate cancer cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry* **179**, 483-492.
- Kaldis P., Ojala P. M., Tong L., Makela T. P., Solomon M. J. (2001): CAK-independent activation of CDK6 by a viral cyclin. *Molecular Biology of the Cell* **12**, 3987-3999.
- Kampa-Schittenhelm K. M., Heinrich M. C., Akmut F., Döhner H., Döhner K., Schittenhelm M. M. (2013): Quizartinib (AC220) is a potent second generation class III tyrosine kinase inhibitor that displays a distinct inhibition profile against mutant-FLT3,-PDGFRA and -KIT isoforms. *Molecular Cancer* **12**, 19.
- Keegan K., Li C., Li Z., Ma J., Ragains M., Coberly S., Hollenback D., Eksterowicz J., Liang L., Weidner M., Huard J., Wang X., Alba G., Orf J., Lo M. C., Zhao S., Ngo R., Chen A., Liu L., Carlson T., Quéva C., McGee L. R., Medina J., Kamb A., Wickramasinghe D., Dai K. (2014):

- Preclinical evaluation of AMG 925, a FLT3/CDK4 dual kinase inhibitor for treating acute myeloid leukemia. *Molecular Cancer Therapeutics* **13**, 880-889.
- Klaeger S., Heinzlmeir S., Wilhelm M., Polzer H., Vick B., Koenig P. A., Reinecke M., Ruprecht B., Petzoldt S., Meng C., Zecha J., Reiter K., Qiao H., Helm D., Koch H., Schoof M., Canevari G., Casale E., Depaolini S. R., Feuchtinger A., Wu Z., Schmidt T., Rueckert L., Becker W., Huenges J., Garz A. K., Gohlke B. O., Zolg D. P., Kayser G., Vooder T., Preissner R., Hahne H., Tönisson N., Kramer K., Götze K., Bassermann F., Schlegl J., Ehrlich H. C., Aiche S., Walch A., Greif P. A., Schneider S., Felder E. R., Ruland J., Médard G., Jeremias I., Spiekermann K., Kuster B. (2017): The target landscape of clinical kinase drugs. *Science* **358**, eaan4368.
- Klein M. E., Kovatcheva M., Davis L. E., Tap W. D., Koff A. (2018): CDK4/6 Inhibitors: The Mechanism of Action May Not Be as Simple as Once Thought. *Cancer Cell* **34**, 9-20.
- Knudsen E. S.; Hutcheson J.; Vail P.; Witkiewicz A. K. (2017): Biological specificity of CDK4/6 inhibitors: dose response relationship, in vivo signaling, and composite response signature. *Oncotarget* **8**, 43678–43691.
- Kubo A., Nakagawa K., Varma R. K., Conrad N. K., Cheng J. Q., Lee W. C., Testa J. R., Johnson B. E., Kaye F. J., Kelley M. J. (1999): The p16 status of tumor cell lines identifies small molecule inhibitors specific for cyclin-dependent kinase 4. *Clinical Cancer Research* **5**, 4279-4286.
- Kwiatkowski N., Zhang T., Rahl P. B., Abraham B. J., Reddy J., Ficarro S. B., Dastur A., Amzallag A., Ramaswamy S., Tesar B., Jenkins C. E., Hannett N. M., McMillin D., Sanda T., Sim T., Kim N. D., Look T., Mitsiades C. S., Weng A. P., Brown J. R., Benes C. H., Marto J. A., Young R. A., Gray N. S. (2014): Targeting transcription regulation in cancer with a covalent CDK7 inhibitor. *Nature* **511**, 616-620.
- Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Li C., Liu L., Liang L., Xia Z., Li Z., Wang X., McGee L. R., Newhall K., Sinclair A., Kamb A., Wickramasinghe D., Dai K. (2015): AMG 925 is a dual FLT3/CDK4 inhibitor with the potential to overcome FLT3 inhibitor resistance in acute myeloid leukemia. *Molecular Cancer Therapeutics* **14**, 375-383.
- Li H., Zhou Y., Zhang M., Wang H., Zhao Q., Liu J. (2020): Updated approaches against SARS-CoV-2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pii: AAC.00483-20.
- Li Z., Wang X., Eksterowicz J., Gribble M. W. Jr., Alba G. Q., Ayres M., Carlson T. J., Chen A., Chen X., Cho R., Connors R. V., DeGraffenreid M., Deignan J. T., Duquette J., Fan P., Fisher B., Fu J., Huard J. N., Kaizerman J., Keegan K. S., Li C., Li K., Li Y., Liang L., Liu W., Lively S. E., Lo M. C., Ma J., McMinn D. L., Mihalic J. T., Modi K., Ngo R., Pattabiraman K., Piper D. E., Queva C., Ragains M. L., Suchomel J., Thibault S., Walker N., Wang X., Wang Z., Wanska M., Wehn P. M., Weidner M. F., Zhang A. J., Zhao X., Kamb A., Wickramasinghe D., Dai K., McGee L. R., Medina J. C. (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**, 3430-3449.
- Lin A., Giuliano C. J., Palladino A., John K. M., Abramowicz C., Yuan M. L., Sausville E. L., Lukow D. A., Liu L., Chait A. R., Galluzzo Z. C., Tucker C., Sheltzer J. M. (2019): Off-target toxicity is a common mechanism of action of cancer drugs undergoing clinical trials. *Science Translational Medicine* **11**, eaaw8412.
- 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**, 1061-1074.
- Lopez S., Voisset E., Tisserand J. C., Mosca C., Prebet T., Santamaria D., Dubreuil P., De Sepulveda P. (2016): An essential pathway links FLT3-ITD, HCK and CDK6 in acute myeloid leukemia. *Oncotarget* **7**, 51163-51173.
- Lu J. W., Wang A. N., Liao H. A., Chen C. Y., Hou H. A., Hu C. Y., Tien H. F., Ou D. L., Lin L. (2016): Cabozantinib is selectively cytotoxic in acute myeloid leukemia cells with FLT3-internal tandem duplication (FLT3-ITD). *Cancer Letters* **376**, 218-225.

- Lücking U., Scholz A., Lienau P., Siemeister G., Kosemund D., Bohlmann R., Briem H., Terebesi I., Meyer K., Prella K., Denner K., Bömer U., Schäfer M., Eis K., Valencia R., Ince S., von Nussbaum F., Mumberg D., Ziegelbauer K., Klebl B., Choidas A., Nussbaumer P., Baumann M., Schultz-Fademrecht C., Rührter G., Eickhoff J., Brands M. (2017): Identification of Atuveciclib (BAY1143572), the First Highly Selective, Clinical PTEFb/CDK9 Inhibitor for the Treatment of Cancer. *ChemMedChem* **12**, 1776-1793.
- Lutful Kabir F. M., Alvarez C. E., Bird R. C. (2015): Canine Mammary Carcinomas: A Comparative Analysis of Altered Gene Expression. *Veterinary Sciences* **3**, 25.
- Lv H., Zhang X., Sharma J., Reddy M. V., Reddy E. P., Gallo J. M. (2013): Integrated pharmacokinetic-driven approach to screen candidate anticancer drugs for brain tumor chemotherapy. *AAPS Journal* **1**, 250-257.
- Mahoney E., Byrd J. C., Johnson A. J. (2013): Autophagy and ER stress play an essential role in the mechanism of action and drug resistance of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol. *Autophagy* **9**, 434-435.
- Malumbres M., Barbacid M. (2001): To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature Reviews Cancer* **1**, 222-231.
- Malumbres, M. (2014): Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology* **15**, 122.
- Marra A., Curigliano G. (2019): Are all cyclin-dependent kinases 4/6 inhibitors created equal? *NPJ Breast Cancer* **5**, 27.
- Mason J. M., Wei X., Fletcher G. C., Kiarash R., Brox R., Hodgson R., Beletskaya I., Bray M. R., Mak T. W. (2017): Functional characterization of CFI-402257, a potent and selective Mps1/TTK kinase inhibitor, for the treatment of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**, 3127-3132.
- Matsuo H., Yoshida K., Fukumura K., Nakatani K., Noguchi Y., Takasaki S., Noura M., Shiozawa Y., Shiraishi Y., Chiba K., Tanaka H., Okada A., Nannya Y., Takeda J., Ueno H., Shiba N., Yamato G., Handa H., Ono Y., Hiramoto N., Ishikawa T., Usuki K., Ishiyama K., Miyawaki S., Itonaga H., Miyazaki Y., Kawamura M., Yamaguchi H., Kiyokawa N., Tomizawa D., Taga T., Tawa A., Hayashi Y., Mano H., Miyano S., Kamikubo Y., Ogawa S., Adachi S. (2018): Recurrent CCND3 mutations in MLL-rearranged acute myeloid leukemia. *Blood Advances* **2**, 2879-2889.
- McClue S. J., Blake D., Clarke R., Cowan A., Cummings L., Fischer P. M., MacKenzie M., Melville J., Stewart K., Wang S., Zhelev N., Zheleva D., Lane D. P. (2002): In vitro and in vivo antitumor properties of the cyclin dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine). *International Journal of Cancer* **102**, 463-468.
- Mikolcevic P., Sigl R., Rauch V., Hess M. W., Pfaller K., Barisic M., Pelliniemi L. J., Boesl M., Geley S. (2012): Cyclin-dependent kinase 16/PCTAIRE kinase 1 is activated by cyclin Y and is essential for spermatogenesis. *Molecular and Cellular Biology* **32**, 868-879.
- Moniz L. S., Stambolic V. (2011): Nek10 mediates G2/M cell cycle arrest and MEK autoactivation in response to UV irradiation. *Molecular and Cellular Biology* **31**, 30-42.
- Moret N., Clark N. A., Hafner M., Wang Y., Lounkine E., Medvedovic M., Wang J., Gray N., Jenkins J., Sorger P. K. (2019): Cheminformatics Tools for Analyzing and Designing Optimized Small-Molecule Collections and Libraries. *Cell Chemical Biology* **26**, 765-777.
- Mullany L. K., White P., Hanse E. A., Nelsen C. J., Goggin M. M., Mullany J. E., Anttila C. K., Greenbaum L. E., Kaestner K. H., Albrecht J. H. (2008): Distinct proliferative and transcriptional effects of the D-type cyclins in vivo. *Cell Cycle*. **7**, 2215-2224.
- Munster P. N., Hamilton E. P., Estevez L. G., De Boer R. H., Mayer I. A., Campone M. (2014): Phase IB study of LEE011 and BYL719 in combination with letrozole in ER+, HER2- breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* **32**, 143.
- Naoe T., Kiyoi H. (2004): Normal and oncogenic FLT3. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**, 2932-2938.
- Norbury C., Nurse P. (1992): Animal cell cycles and their control. *Annual Review of Biochemistry* **61**, 441 – 470.
- Pardee A. B. (1989): G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* **246**, 603-608.
- Perumal D., Kuo P. Y., Leshchenko V. V., Jiang Z., Divakar S. K., Cho H. J., Chari A., Brody J., Reddy M. V., Zhang W., Reddy E. P., Jagannath S., Parekh S. (2016): Dual Targeting of CDK4

- and ARK5 Using a Novel Kinase Inhibitor ON123300 Exerts Potent Anticancer Activity against Multiple Myeloma. *Cancer Research* **76**, 1225-1236.
- Petsalaki E., Zachos G. (2016): Clks 1, 2 and 4 prevent chromatin breakage by regulating the Aurora B-dependent abscission checkpoint. *Nature Communication* **7**, 11451.
- Pikman Y., Alexe G., Roti G., Conway A. S., Furman A., Lee E. S., Place A. E., Kim S., Saran C., Modiste R., Weinstock D. M., Harris M., Kung A. L., Silverman L. B., Stegmaier K. (2017): Synergistic Drug Combinations with a CDK4/6 Inhibitor in T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clinical Cancer Research* **23**, 1012-1024.
- Pillinger G., Abdul-Aziz A., Zaitseva L., Lawes M., MacEwan D. J., Bowles K. M., Rushworth S. A. (2015): Targeting BTK for the treatment of FLT3-ITD mutated acute myeloid leukemia. *Scientific Reports* **5**, 12949.
- Pushpakom S., Iorio F., Eyers P. A., Escott K. J., Hopper S., Wells A., Doig A., Williams T., Latimer J., McNamee C., Norris A., Sanseau P., Cavalla D., Pirmohamed M. (2019): Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nature Reviews Drug Discovery* **18**, 41-58.
- 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. *Clinical Cancer Research* **19**, 6173-6182.
- Reddy M. V, Akula B., Cosenza S. C., Athuluridivakar S., Mallireddigari M. R., Pallela V. R., Billa V. K., Subbaiah D. R., Bharathi E. V., Vasquez-Del Carpio R., Padgaonkar A., Baker S. J., Reddy E.P. (2014): Discovery of 8-cyclopentyl-2-[4-(4-methyl-piperazin-1-yl)-phenylamino]-7-oxo-7,8-dihydro-pyrido[2,3-d]pyrimidine-6-carbonitrile (7x) as a potent inhibitor of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and AMPK-related kinase 5 (ARK5). *Journal of Medicinal Chemistry* **57**, 578-99.
- Ren B., Cam H., Takahashi Y., Volkert T., Terragni J., Young R. A. (2002): E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G2/M checkpoints. *Genes & Development* **16**, 245–256.
- Roorda J. C., Joosten R. P, Perrakis A., Hiruma Y. (2019): A crystal structure of the human protein kinase Mps1 reveals an ordered conformation of the activation loop. *Proteins* **87**, 348-352.
- Russo A. A., Jeffrey P. D., Patten A. K., Massagué J., Pavletich N. P. (1996): Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* **382**, 325-331.
- Ryu C. K., Kang H. Y., Lee S. K., Nam K. A., Hong C. Y., Ko W. G., Lee B. H. (2000): 5-Arylamino-2-methyl-4,7-dioxobenzothiazoles as inhibitors of cyclin-dependent kinase 4 and cytotoxic agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **10**, 461-464.
- Řezníčková E., Gucký T., Kováčová V., Ajani H., Jorda R., Kryštof V. (2019): Activity of 2,6,9-trisubstituted purines as potent PDGFR α kinase inhibitors with antileukaemic activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* **182**, 111663.
- Sanchez-Martinez C., Shih C., Faul M. M., Zhu G., Paal M., Somoza C., Li T., Kumrich C. A., Winneroski L. L., Xun Z., Brooks H. B., Patel B. K., Schultz R. M., DeHahn T. B., Spencer C. D., Watkins S. A., Considine E., Dempsey J. A., Ogg C. A., Campbell R. M., Anderson B. A., Wagner J. (2003): Aryl[a]pyrrolo[3,4-c]carbazoles as selective cyclin D1-CDK4 inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **13**, 3835-3839.
- Santamaria D., Barriere C., Cerqueira A., Hunt S., Tardy C., Newton K., Caceres J. F., Dubus P., Malumbres M., Barbacid M. (2007): Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* **448**, 811–815.
- Serrano M., Hannon G. J., Beach D. (1993): A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **366**, 704–707.
- Shafiq M. I., Steinbrecher T., Schmid R. (2012): Fascaplysin as a specific inhibitor for CDK4: Insights from molecular modelling. *PLoS ONE* **7**, e42612.
- Shapiro G. I. (2004): Preclinical and clinical development of the cyclindependent kinase inhibitor flavopiridol. *Clinical Cancer Research* **10**, 4270-4275.
- Sherr C. J. (1994): G1 phase progression: cycling on cue. *Cell*. **79**, 551-555.

- Sherr C. J., Roberts J. M. (1999): CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development* **13**, 1501–1512.
- Sherr C. J., Roberts J. M. (2004): Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes & Development* **18**, 2699–2711.
- Shi Y., Reiman T., Li W., Maxwell C. A., Sen S., Pilarski L., Daniels T. R., Penichet M. L., Feldman R., Lichtenstein A. (2007): Targeting aurora kinases as therapy in multiple myeloma. *Blood* **109**, 3915–3921.
- Schang L. M., Bantly A., Knockaert M., Shaheen F., Meijer L., Malim M.H., Gray N. S., Schaffer P. A. (2002): Pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors inhibit replication of wild-type and drug-resistant strains of herpes simplex virus and human immunodeficiency virus type 1 by targeting cellular, not viral, proteins. *Journal of virology* **76**, 7874–7882.
- Scheinberg T., Kench J., Stockler M., Mahon K. L., Sebastian L., Stricker P., Joshua A. M., Woo H., Thanigasalam R., Ahmadi N., Centenera M. M., Butler L. M., Horvath L. G. (2020): Pharmacodynamics effects of CDK4/6 inhibitor LEE011 (ribociclib) in high-risk, localised prostate cancer: a study protocol for a randomised controlled phase II trial (LEEP study: LEE011 in high-risk, localised Prostate cancer). *BMJ Open* **10**, e033667.
- Sledge G. W. Jr., Toi M., Neven P., Sohn J., Inoue K., Pivot X., Burdaeva O., Okera M., Masuda N., Kaufman P. A., Koh H., Grischke E. M., Frenzel M., Lin Y., Barriga S., Smith I. C., Bourayou N., Llombart-Cussac A. (2017): MONARCH 2: Abemaciclib in Combination With Fulvestrant in Women With HR+/HER2- Advanced Breast Cancer Who Had Progressed While Receiving Endocrine Therapy. *Journal of Clinical Oncology* **35**, 2875–2884.
- Smith C. C., Paguirigan A., Jeschke G. R., Lin K. C., Massi E., Tarver T., Chin C. S., Asthana S., Olshen A., Travers K. J., Wang S., Levis M. J., Perl A. E., Radich J. P., Shah N. P. (2017): Heterogeneous resistance to quizartinib in acute myeloid leukemia revealed by single-cell analysis. *Blood* **130**, 48–58.
- Songyang Z., Blechner S., Hoagland N., Hoekstra M. F., Pivnicka-Worms H., Cantley L. C. (1994): Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases. *Current Biology* **4**, 973–982.
- Soni R., O'Reilly T., Furet P., Muller L., Stephan C., Zumstein-Mecker S., Fretz H., Fabbro D., Chaudhuri B. (2001): Selective in vivo and in vitro effects of a small molecule inhibitor of cyclin-dependent kinase 4. *Journal of the National Cancer Institute* **93**, 436–46.
- Stice J. P., Wardell S. E., Norris J. D., Yllanes A. P., Alley H. M., Haney V. O., White H. S., Safi R., Winter P. S., Cocce K. J., Kishton R. J., Lawrence S. A., Strum J. C., McDonnell D. P. (2017): CDK4/6 Therapeutic Intervention and Viable Alternative to Taxanes in CRPC. *Molecular Cancer Research* **15**, 660–669.
- Sumi N. J., Kuenzi B. M., Knezevic C. E., Remsing Rix L. L., Rix U. (2015): Chemoproteomics Reveals Novel Protein and Lipid Kinase Targets of Clinical CDK4/6 Inhibitors in Lung Cancer. *ACS Chemical Biology* **10**, 2680–2686.
- Takaki T., Echaliier A., Brown N. R., Hunt T., Endicott J. A., Noble M. E. (2009): The structure of CDK4/cyclin D3 has implications for models of CDK activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 4171–4176.
- Tanaka Y., Momose S., Tabayashi T., Sawada K., Yamashita T., Higashi M., Sagawa M., Tokuhira M., Rosenwald A., Kizaki M., Tamaru J. I. (2020): Abemaciclib, a CDK4/6 inhibitor, exerts preclinical activity against aggressive germinal center-derived B-cell lymphomas. *Cancer Science* **111**, 749–759.
- Tate S. C., Cai S., Ajamie R. T., Burke T., Beckmann R. P., Chan E. M., De Dios A., Wishart G., Gelbert L. M., Cronier D. M. (2014): Semi-mechanistic pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of the antitumor activity of LY2835219, a new cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor, in mice bearing human tumor xenografts. *Clinical Cancer Research* **20**, 3763–3774.
- Uras I. Z., Maurer B., Nebenfuhr S., Zojer M., Valent P., Sexl V. (2018): Therapeutic Vulnerabilities in FLT3-Mutant AML Unmasked by Palbociclib. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, E3987.
- Uras I. Z., Walter G. J., Scheicher R., Bellutti F., Prchal-Murphy M., Tigan A. S., Valent P., Heidel F. H., Kubicek S., Scholl C., Fröhling S., Sexl V. (2016): Palbociclib treatment of

- FLT3-ITD+ AML cells uncovers a kinase-dependent transcriptional regulation of FLT3 and PIM1 by CDK6. *Blood* **127**, 2890-902.
- Vandel L., Nicolas E., Vaute O., Ferreira R., Ait-Si-Ali S., Trouche D. (2001): Transcriptional repression by the retinoblastoma protein through the recruitment of a histone methyltransferase. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 6484–6494.
- Vidarsdottir L., Steingrimsdottir G., Bodvarsdottir S. K., Ogmundsdottir H. M., Eyfjord J. E. (2012): Sensitivity of BRCA2 mutated human cell lines to Aurora kinase inhibition. *Investigational New Drugs* **30**, 425-434.
- Walker R. G., Thomson G., Malone K., Nowicki M. W., Brown E., Blake D. G., Turner N. J., Walkinshaw M. D., Grant K. M., Mottram J. C. (2011): High throughput screens yield small molecule inhibitors of Leishmania CRK3:CYC6 cyclin-dependent kinase. *PLoS neglected tropical diseases* **5**, 1033.
- Wei N., Chu E., Wipf P., Schmitz J. C. (2014): Protein kinase d as a potential chemotherapeutic target for colorectal cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* **13**, 1130-1141.
- Weiss J. M., Csozsi T., Maglakelidze M., Hoyer R. J., Beck J. T., Domine Gomez M., Lowczak A., Aljumaily R., Rocha Lima C. M., 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**, 1613-1621.
- Wood D. J., Endicott J. A. (2018): Structural insights into the functional diversity of the CDK-cyclin family. *Open Biology* **8**, pii: 180112.
- Wu M., Li C., Zhu X. (2018): FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia. *Journal of Hematology & Oncology* **11**, 133.
- Xie Y., Wang A., Lin J., Wu L., Zhang H., Yang X., Wan X., Miao R., Sang X., Zhao H. (2017): Mps1/TTK: a novel target and biomarker for cancer. *Journal of Drug Targeting* **25**, 112-118.
- Xiong Y., Connolly T., Futcher B., Beach D. (1991): Human D-type cyclin. *Cell* **65**, 691–699.
- Yoshida A., Ookura M., Zokumasu K., Ueda T. (2014): Gö6976, a FLT3 kinase inhibitor, exerts potent cytotoxic activity against acute leukemia via inhibition of survivin and MCL-1. *Biochemical Pharmacology* **90**, 16-24.
- Zhang H. S., Gavin M., Dahiya A., Postigo A. A., Ma D., Luo R. X. (2000): Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* **101**, 79–89.
- Zhang T., Kwiatkowski N., Olson C. M., Dixon-Clarke S. E., Abraham B. J., Greifenberg A. K., Ficarro S. B., Elkins J. M., Liang Y., Hannett N. M., Manz T., Hao M., Bartkowiak B., Greenleaf A. L., Marto J. A., Geyer M., Bullock A. N., Young R. A., Gray N. S. (2016): Covalent targeting of remote cysteine residues to develop CDK12 and CDK13 inhibitors. *Nature Chemical Biology* **12**, 876-884.
- Zhang X., Lv H., Zhou Q., Elkholi R., Chipuk J. E., Reddy M. V., Reddy E. P., Gallo J. M. (2014): Preclinical pharmacological evaluation of a novel multiple kinase inhibitor, ON123300, in brain tumor models. *Molecular Cancer Therapeutics* **13**, 1105-1116.
- Zheng L., Chen Z., Kawakami M., Chen Y., Roszik J., Mustachio L. M., Kurie J. M., Villalobos P., Lu W., Behrens C., Mino B., Solis L. M., Silvester J., Thu K. L., Cescon D. W., Rodriguez-Canales J., Wistuba I. I., Mak T. W., Liu X., Dmitrovsky E. (2019): Tyrosine Threonine Kinase Inhibition Eliminates Lung Cancers by Augmenting Apoptosis and Polyploidy. *Molecular Cancer Therapeutics* **18**, 1775-1786.
- Zhu G., Conner S. E., Zhou X., Shih C., Li T., Anderson B. D., Brooks H. B., Campbell R. M., Considine E., Dempsey J. A., Faul M. M., Ogg C., Patel B., Schultz R. M., Spencer C. D., Teicher B., Watkins S. A. (2003): Synthesis, structure-activity relationship, and biological studies of indolocarbazoles as potent cyclin D1-CDK4 inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **46**, 2027-2030.

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AA	akrylamid
ABL	Abelsonova tyrosinkinasa
Akt	také proteinkinasa B, z anglického <i>AKR-mouse thymoma</i>
AML	akutní myeloidní leukemie
APS	peroxodisíran amonný
AR	androgenní receptor
ARK5	AMP-aktivované kinase příbuzná kinasa 5
B-ALL	B-buněčná akutní lymfoblastická leukemie
BIS	N,N'-methylenbisakrylamid
BSA	bovinní sérový albumin
BTK	Brutonova tyrosinkinasa
CAK	CDK-aktivační komplex (kinasa)
CAMK2	Ca ²⁺ /kalmodulin-dependentní proteinkinasa
CDK	cyklin-dependentní kinasa
Cip/Kip	s CDK-interagující proteiny/kinasové inhibiční proteiny
CIT	Citron-Rho interagující kinasa
CLK	Cdc (<i>cell division cycle</i>)-příbuzné kinasy
c-Myc	buněčný homolog virového onkogenu ptačí myelocytomatosy
CSF1R	receptor kolonie stimulujícího faktoru
CSNK2	kasein-kinasa 2
Cyc	cyklin
DMEM	Dulbeccem modifikované Eaglovo médium
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiotreitol
DYRK	tyrosinem regulované kinasy s dvojí specificitou
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGFR	receptor epiteliálního růstového faktoru
EGTA	kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraoctová
ER	estrogenní receptor
ERK	extracelulárním signálem regulovaná kinasa
FLT3	onkog. Feline-McDonoughova sarkomu příbuzná tyrosinkinasa 3
FS	fetální sérum (bovinní)
FYN	Src-příbuzná kinasa, z anglického <i>Src-family tyrosin kinase</i>
GAK	s cyklinem G-asociovaná kinasa

GSK3	glykogensynthasa-kinasa
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová
HER2	receptor herregulinu 2
HIPK	s homeodomény interagující proteinkinasa
INK4	inhibitory třídy CDK4
IRAK	kinasa asociovaná s receptorem pro interleukin 1
KIT	tyrosinkinasa KIT
LCK	pro lymfocyty specifická tyrosinkinasa
LYN	LCK/YES-příbuzná tyrosinkinasa
Mcl-1	protein diferenciacce buněk myeloidní leukemie
MEK	mitogenem aktivovaná proteinkinasa
Mps1/TTK	monopolární vřeténková threonin/tyrosin kinasa
NEK10	NIMA (<i>never in mitosis</i>)-příbuzná kinasa 10
PARP	poly(ADP-ribosa)polymerasa
PDB	proteinová databanka
PDGFR	receptor destičkového růstového faktoru
PIM	protoonkogenní serin/threoninová proteinkinasa
PIP4K	fosfatidylinositol-5-fosfát 4-kinasa
PIP5K	fosfatidylinositol-4-fosfát 5-kinasa
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
PRKD	proteinkinasa D
RAM	králičí protilátka proti myši protilátce (<i>rabbit anti-mouse</i>)
Rb	retinoblastomový protein
RbL	retinoblastomovému proteinu podobný protein
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>
SARS-CoV-2	koronavirus způsobujícího těžký akutní respirační syndrom 2
SDS	dodecylsírán sodný
SLK	serin/threoninové kinase 20 podobná kinasa
SNARK	SNF1-AMPK-příbuzná kinasa
STAT	signální přenašeč a aktivátor transkripce
STK16	serin/threoninová kinasa 16
SWAR	prasečí protilátka proti králičí (<i>swine anti-rabbit</i>)
T-ALL	T-buněčná akutní lymfoblastická leukemie
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
ULK	Unc-51 příbuzná, autofagii aktivující kinasa
VEGFR	receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru