

**Přírodovědecká fakulta**



**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Olomouc 2024**

**Adéla Frühaufová**



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Laboratoř růstových regulátorů**

**PROTAC konjugáty založené na struktuře  
inhibitorů cyklin-dependentních kinas 4/6**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Adéla Frühaufová</b>
Studijní program:	B0511A030017 Experimentální biologie
Studijní obor:	1501R019 Experimentální biologie
Specializace:	1501R019-01 Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Denisa Veselá, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2024

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Adéla Frühaufová
Název práce	PROTAC konjugáty založené na struktuře inhibitorů cyklin-dependentních kinas 4/6
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Denisa Veselá, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024

### Abstrakt

Narušení regulačních mechanismů buněčného cyklu je jeden z často se vyskytujících jevů u maligních buněk, který je způsoben zejména změnami vedoucími k nadměrné aktivaci signální dráhy CDK4/6. ATP-kompetitivní inhibitory CDK4/6 schválené pro terapii nádorových onemocnění vykazují významné protinádorové účinky, nicméně potlačují pouze jejich kinasovou aktivitu. V průběhu léčby také dochází k rozvoji rezistence často způsobené nadměrnou expresí CDK4 nebo CDK6 zapříčiňující relaps onemocnění. Vzhledem k těmto skutečnostem představují tzv. proteolysis targeting chimera (PROTAC) schopné cíleně degradovat CDK4/6 vhodnou strategií pro překonání tohoto typu rezistence. Kromě toho jsou schopny selektivě degradovat pouze jednu z vysoce homologních kinas a zasáhnout také jejich nekinasové funkce. V experimentální části bakalářské práce bylo testováno působení dvou PROTAC molekul, a to YX-2-107 a BSJ-03-123, které byly publikovány jako selektivní degradéry CDK6. Tato selektivita byla potvrzena v případě BSJ-03-123, nicméně látka YX-2-107 degradovala také CDK4. Jejich působení bylo navíc do značné míry ovlivněno dobou inkubace, koncentrací, ale i buněčnou linií. Ani jedna z testovaných látek navíc nedosahovala srovnatelných antiproliferačních účinků, jako jejich výchozí molekula, palbociclib. I přes nedostatečné objasnění přesných mechanismů účinku, což bylo prokázáno i v experimentální části této práce, představují PROTAC atraktivní strategií pro degradaci molekulárních cílů, které je obtížné inhibovat pomocí konvenčních inhibitorů, ale také pro studium vysoce homologních cílů nebo nekinasových funkcí CDK4/6.

Klíčová slova	Cyklin-dependentní kinasy 4 a 6, inhibitor, Proteolysis targeting chimera, selektivita
Počet stran	59
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

Autor's first name and surname	Adéla Frühaufová
Title of thesis	PROTAC conjugates based on the structure of cyclin-dependent kinase inhibitors 4/6
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Denisa Veselá, Ph.D.
The year of presentation	2024

### **Abstract**

Dysregulation of the cell cycle regulatory mechanisms is one of the frequently occurring phenomena in malignant cells, mainly caused by changes leading to the excessive activation of the CDK4/6 signaling pathway. ATP-competitive CDK4/6 inhibitors approved for the therapy of tumor diseases exhibit significant anti-tumor effects; however, they only suppress their kinase activity. During treatment, resistance often develops, mainly caused by the overexpression of CDK4 or CDK6, leading to disease relapse. Considering these facts, proteolysis targeting chimeras (PROTACs) capable of selectively degrading CDK4/6 represent a suitable strategy to overcome this type of resistance. Additionally, they are capable of selectively degrading only one of these highly homologous kinases and also can affect their non-kinase functions as well. In the experimental part of the bachelor's thesis were tested the effects of two PROTAC molecules, YX-2-107 and BSJ-03-123, which have been published as selective degraders of CDK6. This selectivity was confirmed for BSJ-03-123; however, YX-2-107 also degraded CDK4. Moreover, their effects were significantly influenced by the incubation time, concentration, but also by the cell line. Furthermore, neither of the tested compounds achieved comparable antiproliferative effects as their originating molecule, palbociclib. Despite the insufficient elucidation of the exact mechanisms of action, which was also demonstrated in the experimental part of the thesis, PROTACs represent an attractive strategy for the degradation of molecular targets that are difficult to inhibit using conventional inhibitors, as well as for studying highly homologous targets or the non-kinase functions of CDK4/6.

Keywords	Cyclin-dependent kinase 4 and 6, inhibitor, Proteolysis targeting chimera, selectivity
Number of pages	59
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucí práce a s využitím citované literatury.

V Olomouci dne 12. května 2024

Podpis .....

### Poděkování:

V první řadě bych chtěla velice poděkovat své školitelce Mgr. Denise Veselé, Ph.D. za nesmírnou ochotu, trpělivost, cenné rady a odborné vedení. Dále bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Vladimíru Kryštofovi, Ph.D. za umožnění práce na této problematice a celému kolektivu pracovníků Katedry experimentální biologie za vytvoření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu během mého bakalářského studia. Vypracování této bakalářské práce bylo podpořeno projektem Evropské unie (LX22NPO5102; Next Generation EU - Národní ústav pro výzkum rakoviny, program EXCELES).

# OBSAH

1	SEZNAM ZKRATEK.....	9
2	ÚVOD .....	12
3	CÍLE PRÁCE .....	13
4	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	14
4.1	Cyklin-dependentní kinasy .....	14
4.2	Regulace buněčného cyklu .....	16
4.3	Patofyziologie CDK4/6 .....	17
4.4	Vývoj a současný stav inhibitorů CDK4/6 .....	17
4.5	Další významné funkce CDK4/6.....	20
4.5.1	Indukce senescence prostřednictvím inhibice CDK4/6 .....	20
4.5.2	Zapojení CDK4/6 do metabolismu .....	21
4.5.3	Uplatnění CDK4/6 v protinádorové imunitní odpovědi.....	22
4.5.4	Nekinasové funkce CDK4/6.....	22
4.6	Mechanismy rozvoje rezistence na CDK4/6i .....	24
4.7	Využití proteolytických chimér (PROTAC) pro cílenou degradaci CDK4/6 .....	26
4.7.1	PROTAC degradéry založené na CDK4/6i.....	28
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	31
5.1	Materiál a vybavení .....	31
5.1.1	Přístrojové vybavení .....	31
5.1.2	Chemikálie.....	31
5.1.3	Roztoky .....	32
5.1.4	Použité protilátky .....	33
5.1.5	Použité buněčné linie .....	34
5.1.6	Testované PROTAC molekuly.....	34
5.2	Metodika .....	35
5.2.1	Kultivace, založení experimentu a ovlivnění buněčných kultur.....	35
5.2.2	Sklízení a lyzace .....	35
5.2.3	SDS-PAGE, western blotting a imunodetekce .....	36

5.2.4	Analýza buněčného cyklu průtokovou cytometrií .....	36
5.2.5	Test buněčné viability .....	37
5.2.6	Ověření mechanismu účinku PROTAC kompeticí s thalidomidem ....	37
6	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	38
6.1	Degradační účinky PROTAC na panelu buněčných linií .....	38
6.2	Degradační působení PROTAC v závislosti na čase a koncentraci .....	39
6.3	Molekulární účinky PROTAC a výchozí molekuly palbociclibu .....	41
6.4	Vliv PROTAC na buněčný cyklus v porovnání s palbociclibem .....	42
6.4.1	Stanovení buněčné viability .....	44
6.4.2	Ověření mechanismu účinku přes kompetici s thalidomidem.....	45
7	ZÁVĚR.....	47
8	CITOVANÁ LITERATURA.....	49



## 1 SEZNAM ZKRATEK

Akt1 –  $\alpha$ -serin/threonin protein kinase 1  
ALL Ph<sup>+</sup> – Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia  
AML – Acute myeloid leukemia  
APS – Ammonium persulfate  
ATP – Adenosine triphosphate  
ATRX – Alpha-thalassemia mental retardation X-linked  
AURKA – Aurora kinase A  
BSA – Bovine serum albumin  
CAK – Cyclin-activating kinase  
CAMKII $\gamma/\delta$  – Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent protein kinase II  $\delta$   
CDK – Cyclin-dependent kinase  
CDK4/6 – Cyclin-dependent kinase 4 and 6  
CDK4/6i – CDK4/6 inhibitor  
CDKi – CDK inhibitor  
cIAP – Cellular inhibitor of apoptosis protein  
Cip/Kip – CDK interacting protein/kinase inhibitor protein  
CRBN – Cereblon  
CRL4<sup>CRNB</sup> – Cullin-RING ubiquitin ligase 4  
DCAF16 – Damage-specific DNA binding protein 1 CUL4 associated factor  
DMSO – Dimethyl sulfoxide DNA Deoxyribonucleic aci  
DMSO – Dimethylsulfoxide  
DNA – Deoxyribonucleic acid  
DTT – Dithiothreitol  
ECL – Enhanced Chemiluminescence  
EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid  
EGR-1 – Early growth response protein 1  
EGTA – Ethylenglycoltetraacetic acid  
ER – Estrogen receptor  
ERBB2 – Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2  
FDA – Food and Drug administration  
FOXM1 – Forkhead box M1  
FOXO1 – Forkhead box O1  
FS – Fetal serum  
GSK3 $\alpha/\beta$  – Glycogen synthase kinase-3  $\alpha$  and  $\beta$   
HER2 – Human epidermal growth factor receptor 2  
HSC – Hematopoietic stem cell

IL2 – Interleukin 2  
IMDM – Iscove's Modified Dulbecco's Medium  
INK4 – Inhibiting CDK4  
IRS2 – Insulin receptor substrate 2  
LSC – Leukemic stem cells  
MCL – Mantle cell lymphoma  
MDM2 – Murine double minute 2  
MHC1 – Major histocompatibility complex class 1  
miRNA – microRNA  
mTOR – Mammalian target of rapamycin  
NADPH – Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate  
NFAT – Nuclear factor of activated T-cells  
Notch – Neurogenic locus homolog protein  
NSC – Neural stem cells  
PBS – Phosphate buffered saline  
PD-1 – Programmed death-1  
Pdx1 – Pancreatic and duodenal homeobox 1  
PFK1 – Phosphofructokinase-1  
PFKFB3 – 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3  
PKM2 – Pyruvate kinase M2  
PMSF – Phenylmethylsulfonyl fluoride  
PROTAC – Proteolysis targeting chimera  
RAS – Rat sarcoma virus  
Rb – Retinoblastoma protein  
RIPA – Radioimmunoprecipitation buffer  
RNA – Ribonucleic acid  
RNAPII – RNA polymerase II  
ROS – Reactive oxygen species  
Runx1 – Runt-related transcription factor 1  
SDS – Sodium dodecyl sulphate  
SDS-PAGE – Sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis  
Smad3 – Mothers against decapentaplegic homolog 3  
STAT – Signal Transducers and Activators of Transcription  
TBS – Tris-buffered saline  
TEMED – Tetramethylethylendiammin  
TGF- $\beta$  – Transforming growth factor  $\beta$   
TRIS – Tris(hydroxymethyl)aminomethane

VEGF – Vascular endothelial growth factor

VHL – von Hippel Lindau ligase

## 2 ÚVOD

Za fyziologických podmínek je buněčné dělení přísně regulováno prostřednictvím proliferčních a antiproliferačních signálů, které zajišťují správné načasování a přesné rozdělení buňky. Klíčovou roli v buněčné proliferaci zastávají zejména cyklin dependentní kinasy 4 a 6 (CDK4/6). Tyto kinasy v komplexu se svými regulačními podjednotkami, cykliny typu D, umožňují průchod G1 restrikcí bodem a progresi buněčného cyklu prostřednictvím fosforylace Rb (Retinoblastoma protein). Právě tato signální dráha je u řady typů nádorů narušena mutacemi, které způsobují nadměrnou expresi nebo aktivaci CDK4/6 a cyklinů, což vede k abnormálnímu a nekontrolovatelnému buněčnému dělení a karcinogenezi.

Z tohoto důvodu jsou CDK4/6 považovány za významné terapeutické cíle pro vývoj inhibitorů jako protinádorových léčiv, přičemž čtyři ATP-kompetitivní inhibitory byly FDA (Food and Drug Administration) již schváleny pro klinické použití. Vzhledem k velkému úspěchu těchto inhibitorů CDK4/6 zejména při terapii karcinomu prsu, jsou tyto látky dále intenzivně testovány v preklinických a klinických studiích pro terapii dalších malignit jako je rakovina prostaty, ale také melanomy, gliomy, leukémie nebo lymfomy a jsou neustále vyvíjeny nové potenciálně účinnější látky. Na základě nejnovějších studií bylo totiž dokázáno, že při dlouhodobé léčbě těmito terapeutiky dochází u rakovinných buněk často k jejich adaptaci a k rozvoji rezistence. Ta často spočívá v kompenzační aktivaci nebo nadměrné expresi CDK4/6 nebo cyklinů, což způsobuje necitlivost nádorových buněk vůči těmto inhibitorům CDK4/6 a významně limituje léčbu. Vzhledem k tomu, že se jedná o ATP-kompetitivní inhibitory, tyto látky inhibují pouze kinasovou aktivitu cílových enzymů. Ačkoli jsou CDK4/6 kinasy svou strukturou a funkcí vysoce homologické, ukazuje se, že zejména CDK6 vykazuje i na kinase nezávislé funkce, které nemohou být postihnuty těmito ATP-kompetitivními látkami. Vzhledem k těmto nekinasovým funkcím, vedlejším toxickým účinkům spojených s duální inhibicí CDK4/6 a vysoké pravděpodobnosti rezistence, jak získané, tak vrozené, by mohla být cílená degradace CDK4/6 jednou z možností terapie nádorových onemocnění a překonání rezistence. Za tímto účelem jsou vyvíjeny inovativní PROTAC molekuly jako konjugáty ligandu pro cílový protein a ligandu pro E3 ubikvitin ligasu, která zprostředkuje degradaci proteasomem. Výhodou těchto látek je také to, že umožňují z původně duálních CDK4/6 kinasových inhibitorů vytvořit vysoce selektivní degradéry, které jsou schopny cíleně degradovat pouze CDK4 nebo CDK6 i přes jejich vysokou homologii.

Experimentální část této bakalářské práce je zaměřena na testování mechanismu účinku dvou PROTAC molekul, YX-2-107 a BSJ-03-123, které byly v původních publikacích popsány jako CDK6 selektivní degradéry. Jejich působení bylo rovněž porovnáváno s jejich výchozí molekulou, palbociclibem, a to na lymfomových buněčných liniích.

### **3 CÍLE PRÁCE**

Vypracování literární rešerše shrnující aktuální vědecké poznatky z oblasti vývoje nových heterobifunkčních molekul PROTAC vycházejících ze struktury schválených inhibitorů cyklin-dependentních kinas 4/6.

Experimentální analýza mechanismu působení a účinnosti PROTAC molekul YX-2-107 (De Dominici, 2020) a BSJ-03-123 (Brand, 2019) s využitím molekulárních a biochemických metod, zejména kultivace nádorových buněčných linií, cytometrické analýzy buněčného cyklu a stanovení buněčné viability, SDS-PAGE, western blottingu a imunodetekce zájmových proteinů po působení testovaných látek.

Vyhodnocení a zpracování získaných dat a jejich porovnání v rámci různých lymfomových buněčných linií.

## 4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 4.1 Cyklin-dependentní kinasy

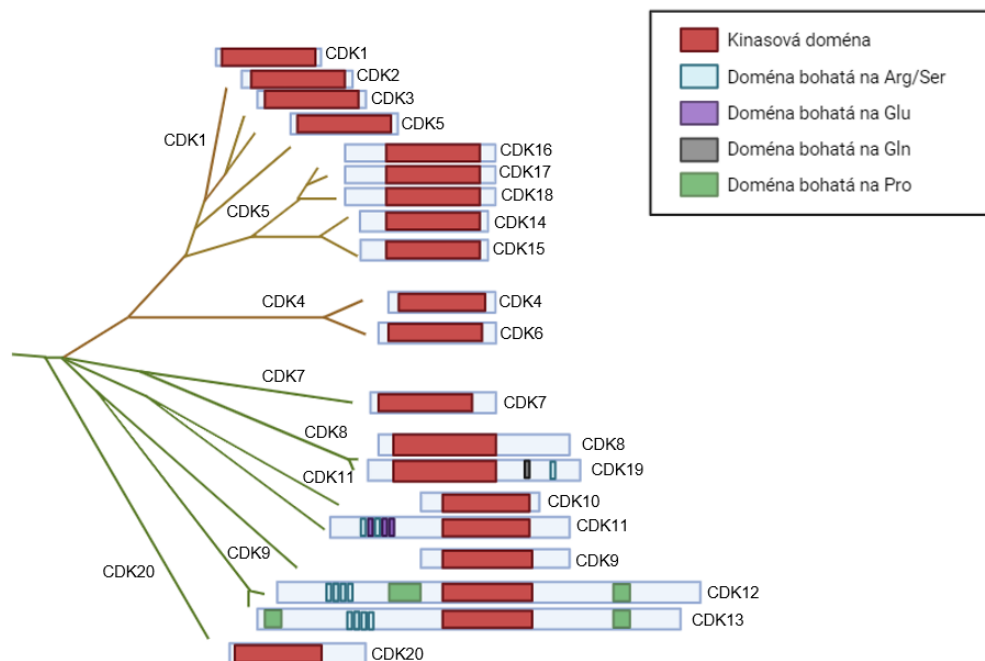
Cyklin-dependentní kinasy (CDK) patří do skupiny 518 serin/threoninových proteinových kinas, které se podílejí na regulaci klíčových buněčných pochodů prostřednictvím fosforylace svých substrátů (Manning, 2002). Za jejich objev byla v roce 2001 udělena Nobelova cena za medicínu L. H. Hartwellovi, T. R. Huntovi a P. R. Nurseovi. Lidský genom obsahuje 21 genů kódujících 20 CDK, přičemž CDK11 je kódována dvěma geny (*CDCL1* a *CDCL2*). Další 5 genů pak kóduje kinasy podobné CDK. Název CDK byl odvozen na základě jejich proteinových regulačních podjednotek, tzv. cyklinů, které se váží na CDK a zvyšují jejich proteinkinasovou aktivitu (Arellano, 1997; Lim, 2013; Malumbres, 2009; Malumbres, 2014). Tyto kinasy se kromě regulace buněčného cyklu podílejí také na řízení mechanismu genové transkripce, apoptózy nebo senescence (Anders, 2011; Park, 2009; Lim, 2013). Dále ovlivňují metabolismus glukosy (Wang, 2017; Jia, 2018), diferenciaci buněk a angiogenezi (Kollmann, 2013; Chirivella, 2017). Mohou být rovněž zapojeny do protinádorové imunitní odpovědi (Goel, 2017; Uzhachenko, 2021; Deng, 2018). Jako takové tvoří významný molekulární cíl nejen pro terapii nádorových onemocnění, ale také kardiovaskulárních nebo neurodegenerativních onemocnění (Xiao, 2021; Abouleisa, 2022; Yan, 2022; Lim, 2013).

U savců včetně člověka jsou tyto kinasy označovány jako CDK1-CDK20 a tvoří 8 samostatných podrodin rozdělených v závislosti na své funkci (**Obrázek 1**). Při regulaci buněčného cyklu se uplatňují podrodiny CDK1, CDK4 a CDK5, které umožňují průchod buňky různými fázemi buněčného cyklu a následné dělení. Zbývající podrodiny (CDK7, CDK8, CDK9, CDK11 a CDK20) jsou součástí regulačních mechanismů transkripce. Stejně jako CDK uplatňující se při řízení buněčného cyklu jsou i tyto transkripční CDK regulovány cyklinovými podjednotkami, jejichž hladina se ale v průběhu buněčného cyklu nemění. Jejich nejdůležitější funkce spočívá ve fosforylaci karboxylové terminální domény největší podjednotky RNA polymerasy II, která stimuluje elongaci vznikajícího transkriptu. Funkce obou podrodin se ale do značné míry překrývají, jelikož kinasy umožňující progresi buněčného cyklu mohou fungovat na principu fosforylace regulátorů transkripce, naopak transkripční kinasy se mohou podílet na regulaci buněčného cyklu nezávisle na své transkripční aktivitě (Malumbres, 2014; Anders, 2011).

CDK jsou tvořeny dvěma doménami, z nichž N-terminální doména je složena z  $\beta$ -listů. Její součástí je G-smyčka bohatá na glycin a aminokyselinová sekvence podobné PSTAIRE označovaná jako C-šroubovice. C-terminální doména se skládá především z  $\alpha$ -helixů. Obsahuje rezidua aminokyselin citlivá na fosforylaci, tzv. T-smyčku, která bez vazby na cyklin blokuje katalytické místo CDK a zabraňuje navázání molekuly ATP

(adenosine triphosphate). Po navázání cyklinu na C-doménu dochází na základě hydrofobních interakcí k jeho obklopení C-šroubovicí, čímž dojde ke konformačním změnám CDK. Díky tomu je uvolněno aktivní místo pro vazbu ATP a zpřístupněno katalytické místo. Poté dochází k fosforylaci Ser/Thr zbytků pomocí CDK aktivujících kinas (CAK), což stabilizuje komplex CDK/cyklin. Plně aktivovaná CDK pak následně může fosforylovat svůj substrát (Lim, 2013; Malumbres, 2014).

Cykliny se tedy podílejí na pozitivní regulaci CDK. Vytváří soubor zhruba 30 proteinů, které jsou složeny z tzv. cyklinových boxů tvořených přibližně 100 aminokyselinami uspořádaných do  $\alpha$ -helixů. N-terminální box je důležitý pro vazbu s CDK, zatímco C-terminální box je nezbytný pro správné složení cyklinu. Koncentrace těchto vazebných partnerů CDK se v buňkách mění v závislosti na fázi buněčného cyklu na rozdíl od hladiny samotných CDK, jejichž exprese zůstává po celou dobu konstantní. Syntéza a proteolytická degradace cyklinů je v buňce přísně regulovaná a deregulace jejich exprese může vést až k rozvoji nádorového bujení (Malumbres, 2014; Arellano, 1997). Na aktivaci CDK se kromě cyklinů podílejí také CAK. Aktivita CDK je ale rovněž regulována negativně, a to prostřednictvím endogenních inhibitorů CDK, které tak plní funkci nádorových supresorů. Jedná se o malé molekuly řadící se do dvou samostatných skupin. První skupinu tvoří rodina proteinů Cip/Kip (CDK interacting protein/kinase inhibitor protein), kam spadají proteiny p21, p27, p57. Druhou rodinu inhibitorů INK4 (Inhibiting CDK4) pak tvoří proteiny p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup>, p19<sup>INK4d</sup>, přičemž tyto proteiny specificky inhibují CDK4/6 (Roskoski, 2019; Lim, 2013; Malumbres, 2014).



Obrázek 1: Schematické znázornění evolučních vztahů mezi podrodinami cyklin-dependentních kinas (CDK), oranžově označena podrodina CDK související s regulací buněčného cyklu, zeleně CDK podílející se na genové transkripci; upraveno podle Malumbres, 2014

## 4.2 Regulace buněčného cyklu

CDK4 a CDK6 se vyznačují podobností svých aminokyselinových sekvencí až 70 %. Strukturou, ale i funkcí, jsou tedy vysoce homologní (Tadesse, 2015). Společně s cykliny typu D (D1, D2 a D3) jsou považovány za klíčové iniciátory vstupu buněk do buněčného cyklu. Transkripce cyklinu D je indukována mitogenními faktory, jako jsou například růstové faktory, které umožňují nárůst jeho hladiny během G1 fáze. Cyklin D se skládá z cyklinového boxu složeného z 11  $\alpha$ -helixů. Na N-koncovém motivu se nachází 2 vazebná místa pro substrát, Rb (Rb1 nebo Rb-podobné proteiny, p107, p130). Na začátku G1 fáze dochází k navázání cyklinů D na CDK4/6 a vzniklý komplex umožňuje průchod restriktivním bodem z G1 fáze do S fáze buněčného cyklu. Komplex CDK4/6 s cyklinem D je dále aktivován fosforylací prostřednictvím CAK a může iniciovat postupnou fosforylací Rb na serinu 807 a 811 (Ser807/811). Tyto fosforylace Rb zprostředkovávají přenos signálu mezi CDK a transkripčním aparátem zodpovědným za genovou expresi nezbytnou pro průchod buněčným cyklem. Takto fosforylované Rb proteiny jsou částečně inaktivovány a nejsou dále schopny vazby na transkripční faktory E2F, které jsou uvolněny. Podporují tak transkripci cílových genů, včetně genů pro cykliny typu E. Komplex CDK2/cyklin E dále hyperfosforyluje Rb v pozdní G1 fázi, což způsobí úplnou inaktivaci Rb, a je zahájena transkripce genů zodpovědných za buněčný růst, syntézu DNA a také cyklinu A. Buňka tak může pokračovat do S fáze buněčného cyklu (Malumbres, 2014; Day, 2009; Arellano, 1997; Weinberg, 1995).

V posledních letech se však ukazuje, že Rb proteiny nejsou jedinými substráty CDK4/6 a že množství fosforylačních cílů těchto kinas je obsáhlejší. Jedním z těchto cílů je transkripční faktor FOXM1 (Forkhead Box M1). Plná aktivace FOXM1 pomocí přímé vícemístné fosforylace prostřednictvím komplexu CDK4/6 s cykliny D iniciuje v prolifерujících buňkách expresi genů podílejících se na přechodu G1/S, jako je gen kódující cyklin E2, a řada dalších genů nezbytných pro replikaci DNA, regulaci opravy DNA a sestřihu mediátorové RNA (Anders, 2011). Kromě toho také potlačuje tvorbu ROS (Reactive oxygen species) a podílí se na inhibici senescence a apoptózy u rakovinných buněk a tím podporuje progresi buněčného cyklu (Park, 2009).

Neméně významným substrátem ovlivněným fosforylační aktivitou CDK G1 fáze je transkripční faktor Smad3 (Mothers against decapentaplegic homolog 3), který je schopen aktivovat faktor TGF- $\beta$  (Transforming growth factor  $\beta$ ). Tato aktivace indukuje tvorbu proteinu p15, inhibitoru CDK4/6, a spuštění drah s antiproliferačními účinky následované zastavením buněčného cyklu v G1 fázi. Smad3 tak působí jako nádorový supresor u několika typů nádorových onemocnění (Feng, 2000). Inhibice transkripční aktivity Smad3



prostřednictvím CDK4 a CDK2 dependentní fosforylace vede ke snížení hladiny proteinu p15 a naopak ke zvýšení exprese protoonkogenu c-myc, což umožňuje průchod G1/S restričním bodem (Matsuura, 2004; Hendrychová, 2021).

### 4.3 Patofyziologie CDK4/6

Maligní transformace buněk jsou velmi často doprovázeny genetickými změnami, které vedou ke zvýšení aktivity nebo exprese CDK4/6. Tyto změny následně vedou ke ztrátě kontroly nad G1/S restričním bodem buněčného cyklu. Výsledkem je abnormální, nekontrolovatelné buněčné dělení vedoucí až ke karcinogenezi (Qi, 2022; VanArsdale, 2015). Mezi tyto změny se řadí např. amplifikace genu *CCND1*, kódujícího cyklin D1 u rakoviny prsu, nebo chromozomální translokace t(11;14)(q13;q32) u lymfomů z plášťových buněk rovněž vedoucí k nadměrné expresi cyklinu D1 (VanArsdale, 2015; Marzec, 2006; Leonard, 2012).

Deregulace dráhy CDK4/cyklin D se u mnoha druhů rakovin vyskytuje mnohem častěji než změny exprese jiných CDK a cyklinů. Amplifikace genu pro CDK4 a cyklin D nebo jejich nadměrnou expresi v důsledku mutací vykazují zejména liposarkomy a mnohočetné myelomy, lze je také detekovat u karcinomů prsu nebo glioblastomů. Mutace CDK (Arg-24-Cys) vede k necitlivosti vůči inhibici nádorovým supresorovým proteinem p16 z rodiny inhibitorů INK4. Deregulace nebo hyperaktivace drah regulovaných komplexem CDK4/cyklin D v rakovinných buňkách pak pravděpodobně souvisí s jejich zvýšenou proliferací (Zhang, 2014; Cen, 2012; Day, 2009).

Nadměrná exprese CDK6 patří rovněž k onkogenním faktorům. Byla prokázána např. u leukémií, gliomů, rakoviny slinivky břišní nebo u rakoviny prostaty, kde stimuluje aktivitu androgenního receptoru nezávisle na své kinasové aktivitě. Inhibice exprese genů CDK6 má významný vliv na inhibici proliferace buněk, což ukazuje na její významnou roli v progresi nádorových onemocnění. Inhibice nejen kinasových funkcí CDK6 tak představuje významnou terapeutickou strategii pro léčbu rakoviny. (Brotherton, 1998; Tadesse, 2015).

Vzhledem k tomuto častému výskytu narušené regulace buněčného cyklu jsou CDK4/6 považovány za významné terapeutické cíle, zejména pro vývoj ATP-kompetitivních inhibitorů, z nichž se řada nachází v klinickém testování a několik je již klinicky využíváno jako protinádorová terapie (Roskoski, 2019; Qi, 2022).

### 4.4 Vývoj a současný stav inhibitorů CDK4/6

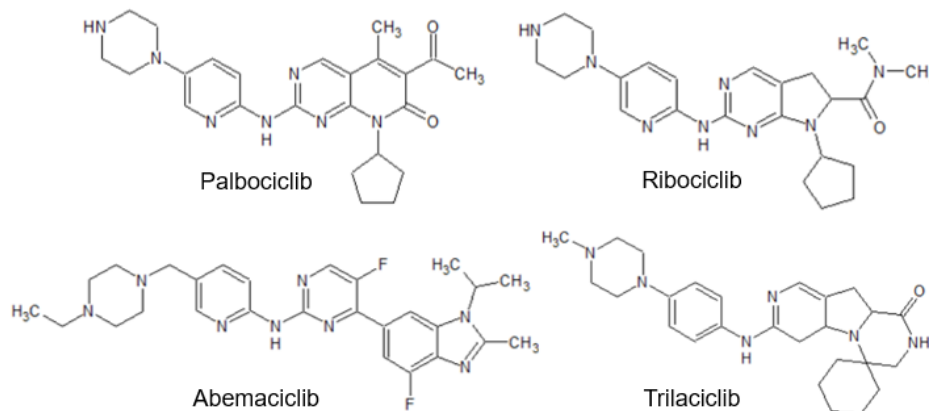
Zejména v posledních letech byl výzkum CDK terapeutik pro léčbu malignit zaměřen především na inhibitory CDK4/6 (CDK4/6i). Nicméně farmakologické CDK inhibitory (CDKi) první generace, mezi které se řadí např. flavopiridol (alvociclib) (Kaur, 1992), roskovitín (seliciclib) nebo olomoucín (Havlicek, 1997), vykazovaly vysokou cytotoxicitu a velice

nízkou specificitu, jelikož inhibovaly CDK podílející se na regulaci interfáze, ale i transkripční CDK. Za účelem vývoje selektivnějších CDKi byla vytvořena druhá generace inhibitorů. Některé z nich, jako je např. pyrazolorymidinový derivát dinaciclib (Paruch, 2010), se dostaly i do klinického testování, nicméně díky nejasnému mechanismu účinku a nízké selektivitě nebyly ani tyto CDKi schváleny pro klinické použití (Roskoski, 2019; Hendrychová, 2021).

Pro úspěšné využití CDKi v klinické praxi byla klíčová optimalizace pyrido[2,3-d]pyrimidinového skeletu (Fry, 2004). Připojením metylového substituentu do pozice C5 se výrazně zvýšila selektivita vůči CDK4/6 (VanderWel, 2005). Na základě této chemické struktury byl vytvořen první selektivní CDK4/6i, palbociclib. O více než 10 let později byl palbociclib (PD-0332991; Imbrance; Pfizer Inc.) jako první CDKi schválen FDA pro léčbu metastatického karcinomu prsu pozitivního na estrogenový receptor a negativního na receptor pro lidský epidermální růstový faktor 2 (ER<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup>) u postmenopauzálních žen v kombinaci s letrozolem (Beaver, 2015) nebo fulvestranem (Walker, 2016). O dva roky později byl následován také ribociclibem (LEE011; Kisqali; Novartis) v kombinaci s letrozolem pro tutéž indikaci. Podobně jako u palbociclibu je základní skelet ribociclibu tvořen pyridol[2,3-d]pyrimidinovým jádrem (Syed, 2017). V roce 2017 byl rovněž schválen abemaciclib (LY2835219; Verzenio; Lilly), jehož základní strukturu tvoří pyridin-pyrimidin-benzimidazolové jádro (Gelbert, 2014; Kim, 2017), pro terapii ER<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> pokročilého nebo metastazujícího karcinomu prsu v kombinaci s fulvestranem. Zároveň je jako jediný z FDA schválených CDK4/6i využíván i jako monoterapie (Dickler, 2017).

Nejnověji schváleným CDK4/6i je trilaciclib (G1T28; Cosela; G1 Therapeutics) se strukturou tricyklického laktamového skeletu (Bisi, 2016). Na rozdíl od předchozích látek je ale využíván ke zmírnění myelosuprese vyvolané chemoterapií při léčbě malobuněčného karcinomu plic v maligní fázi (Dhillon, 2021). Trilaciclib indukuje reverzibilní G1 blok buněčného cyklu proliferujících hematopoetických kmenových a progenitorových buněk v kostní dřeni. Tím je chrání před poškozením v průběhu chemoterapie karboplatinou, etoposidem nebo topotekanem, aniž by antagonizoval léčbu těmito chemoterapeutickými látkami (He, 2017; Bisi, 2016).

CDK4/6i schválené FDA (**Obrázek 2**) jsou ATP-kompetitivními inhibitory CDK4/6 s převážně cytostatickým účinkem, které inhibují jejich kinasovou aktivitu interakcí s vazebnou doménou pro ATP. Vykazují podobnou afinitu k CDK4 i CDK6 z důvodu vysoké homologie tohoto ATP vazebného místa u obou kinas. CDK4/6i zabraňují fosforylaci Rb, čímž způsobí zablokování buněčného cyklu v G1 fázi (Fry, 2004; Hendrychová, 2021; Gelbert, 2014; Hafner, 2019; Bisi, 2016).



Obrázek 2: Chemické struktury FDA schválených inhibitorů CDK4/6

Ačkoli palbociclib, ribociclib a abemaciclib byly schváleny pro léčbu stejné indikace, ukazuje se, že jejich buněčné účinky se mohou lišit. Rozdíly byly připisovány odlišné účinnosti, toxicitě a rozdílnému dávkování, nicméně nedávné studie ukázaly, že jsou dány také různou selektivitou, a tedy fyziologickou aktivitou. Abemaciclib se jakožto polyselektivní ATP-kompetitivní inhibitor odlišuje od palbociclibu a ribociclibu, jelikož kromě CDK4 a CDK6 inhibuje také další cíle jako jsou CDK1, CDK7, CDK9, GSK3 $\alpha/\beta$  (Glycogen synthase kinase-3  $\alpha$  and  $\beta$ ) a CAMKII $\gamma/\delta$  (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent protein kinase II  $\delta$ ) nebo komplex CDK2/cyklin A/E. Je tedy schopen způsobit zablokování nejen v G1, ale i v G2 fázi buněčného cyklu. Nicméně i přes nízkou selektivitu vykazuje v buňkách karcinomu prsu nejvyšší účinnost, což může být právě připisováno inhibici více cílů (Hafner, 2019; Bisi, 2017).

I přestože je léčba těmito látkami účinná, vyskytují se u těchto nádorových terapeutik, podobně jako u jiných léčiv, nežádoucí účinky vedoucí k neutropenii, leukopenii a anémii, které výrazně limitují dobu a intenzitu léčby. Další nevýhodou je častý rozvoj rezistence na tato léčiva. V důsledku toho je snahou vědců vyvinout další účinnější CDK4/6i, které by se vyznačovaly menší mírou nežádoucích účinků a omezením rizika rozvoje rezistence. Některé z nich jsou již testovány v klinických studiích, jako například lerociclib (G1T38; G1 Therapeutics), který kromě CDK4/6 inhibuje také CDK9, a nachází se ve II. klinické fázi pro léčbu ER<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> metastatického karcinomu prsu

a nemalobuněčného karcinomu plic (Bisi, 2017). Ve II. fázi se nachází také FCN-437c (Fosun Pharmaceuticals) a biroiciclib (XZP-3287, Jilin Sihuan Pharmaceutical/XuanZhu Pharma), které jsou zaměřené na terapii pokročilých solidních nádorů (Lin, 2019; Xu, 2019). Inhibitor CDK2/4/6 označovaný jako ebvaciclib (PF-06873600; Pfizer) je v I./II. klinické fázi testován pro léčbu pro ER<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> metastatického karcinomu prsu, triple-negativního karcinomu prsu a karcinomu vaječníků (Yap, 2022). Kromě toho je snahou také využít současně schválené CDK4/6i pro léčbu dalších indikací jako je rakovina tlustého střeva, jater, slinivky břišní, ale také melanomů, myelomů nebo lymfomů z pláštěvých buněk (Leonard, 2012; Roskoski, 2019; Zhang, 2014; Yoshida, 2016). Vzhledem ke schopnosti palbociclibu a abemaciclibu pronikat hematoencefalickou bariérou by CDK4/6i mohly mít potenciál i při léčbě glioblastomu (Raub, 2015; Zhang, 2023).

#### **4.5 Další významné funkce CDK4/6**

Mechanismus regulace buněčného cyklu prostřednictvím dráhy CDK4/6-Rb je znám již řadu let. V posledních letech bylo právě díky vývoji CDK4/6i a dalším podrobnějším studiím objeveno také zajímavé alternativní zapojení fyziologických funkcí CDK4/6 i do regulace senescence, imunitní protinádorové odpovědi a mnohých metabolických drah, jejichž potlačení by mohlo přispět ke zlepšení protinádorové terapie. Vzhledem k těmto významným vlivům by kombinace CDK4/6i s jinými léčivými mohla představovat ideální formu terapie nádorových onemocnění (Yoshida, 2016; Klein, 2018).

##### **4.5.1 Indukce senescence prostřednictvím inhibice CDK4/6**

Jelikož se CDK4/6 podílejí na regulaci buněčného cyklu, může jejich inhibice způsobit spuštění dormance buněk, anebo jejich senescenci. Inhibice CDK4 zabraňuje fosforylaci Rb. Buněčný cyklus se zastaví v G1 fázi a buňky přecházejí buď do reverzibilního klidového stavu tzv. quiescence, nebo do stádia senescence, přičemž senescenční buňky se nemohou vrátit zpět do mitotického cyklu, nereagují na proliferativní signály a ztrácí schopnost replikace. První možné vysvětlení indukce senescence je spojeno s akumulací ROS vyvolané supresí FOXM1, tedy přímého substrátu CDK4/6 (Klein, 2018). Druhou možností je pak zapojení dráhy spojené se změnami exprese enzymu remodelujícího chromatin ATRX (Alpha-thalassemia mental retardation X-linked) v důsledku ovlivnění aktivity CDK4/6. V reakci na inhibici CDK4 dochází v buňkách rakoviny prsu ke změnám sekrečního fenotypu spojeného se stárnutím a k degradaci MDM2 (Murine double minute 2). S inhibicí CDK4 je spojena zvýšená exprese ATRX, která je vyžadována pro degradaci MDM2, a je nezbytná k přechodu klidových buněk do ireverzibilního stádia senescence jinak označovaného jako gerokonverze (Kovatcheva, 2017; Kovatcheva, 2015). Kromě toho

však indukce senescence u buněk melanomu vyvolané dlouhodobou inhibicí CDK4/6 koreluje také s inhibicí signální dráhy serin/threoninové kinasy mTOR (Mammalian target of rapamycin complex) regulující buněčnou proliferaci a metabolismus. U buněk s deplecí Rb nedocházelo po jejich ovlivnění CDK4/6i k navození senescence. Tento fakt dokazuje, že indukce senescence v melanomových buňkách je závislá na schopnosti CDK4/6i potlačit fosforylaci Rb. Tyto studie také naznačují, že použití CDK4/6i s dalšími inhibitory těchto signálních drah by mohla rozhodnout o tom, do jakého klidového stavu buňka vstoupí. Schopnost vyvolat trvalé zastavení růstu by mohla zkrátit dobu expozice pacienta léku, což může snížit toxicitu vyvolanou inhibicí CDK4/6 a zabránit rozvoji rezistence (Yoshida, 2016; Klein, 2018).

#### **4.5.2 Zapojení CDK4/6 do metabolismu**

Aktivně se dělící buňky mají zvýšené nároky na tvorbu energie ve formě ATP, syntézu proteinů, nukleonových kyselin a jiných biomolekul esenciálních pro buněčný růst a dělení buněk. Zejména nádorové buňky vykazují vysoké nároky na optimalizaci metabolismu pro maximální podporu buněčného růstu a proliferace, aby zabránily buněčné smrti metabolickým stresem z nedostatku živin, energie nebo akumulace ROS. Progrese buněčného cyklu je tedy bezprostředně spjata s regulací metabolických drah, přičemž buněčný cyklus i energetický metabolismus jsou do značné míry ovlivněny CDK4/6 (Jones, 2009; Lopez-Mejia, 2017).

Přechody mezi metabolismem glukosy a mastných kyselin jsou jedny z klíčových pro regulaci anabolických a katabolických procesů v buňce, proto je metabolismus glukosy v dělících se buňkách neustále přizpůsobován energetickým požadavkům buňky. Komplex CDK4/cyklin D3 snižuje oxidaci mastných kyselin v mitochondriích a naopak podporuje tvorbu ATP anaerobní glykolýzou. Tento regulační mechanismus má významný vliv na progresi buněčného cyklu díky modulaci metabolických drah směrem k anabolickým procesům a to nezávisle na transkripčním faktoru E2F1 (Lopez-Mejia, 2017). Významný vliv na regulaci metabolismu glukosy má také komplex CDK6/cyklin D3, který přímou fosforylací inhibuje katalytickou aktivitu glykolytických enzymů PFK1 (Phosphofruktokinase-1) a PKM2 (Pyruvate kinase M2), jež se podílejí na regulaci glykolýzy. Snížení rychlosti glykolýzy inhibiční fosforylací PFK1 a PKM2 v nádorových buňkách exprimujících CDK6 a cyklin D3 ve vyšších hladinách vede ke spuštění pentosafosfátové a serinové dráhy. Využití meziproductů glykolýzy v těchto metabolických pochodech podporuje produkci NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) a glutathionu, které potlačují tvorbu ROS a mají antioxidační funkci. Naopak nárůst aktivity PFK1 a PKM2 inhibicí CDK6/cyklin D3 má za následek snížení hladiny NADPH

a glutathionu a zvýšení produkce ROS, což způsobí v nádorových buňkách spuštění apoptotických drah závislých na oxidačním stresu vyvolaném akumulací ROS (Wang, 2017).

### **4.5.3 Uplatnění CDK4/6 v protinádorové imunitní odpovědi**

Kinasy CDK4/6 hrají významnou roli také v protinádorové imunitní odpovědi, jelikož mají imunomodulační funkci. Inhibice dráhy CDK4/6-Rb-E2F indukuje podobně jako při napadení buňky virem hypometylaci genů, produkci interferonů III a následnou expresi proteinu  $\beta$ 2M a MHC1 (Major histocompatibility complex class 1). Zvýšené vystavení antigenu na povrchu nádorových buněk stimuluje imunitní odpověď organismu a nádorové buňky jsou lépe rozpoznávány T-lymfocyty. Inhibice CDK4/6 potlačuje proliferaci T-regulačních buněk, které za normálních podmínek potlačují protinádorovou odpověď cytotoxických T-lymfocytů (Goel, 2017). Nicméně inhibice CDK4/6 způsobuje také zvýšení aktivity rodiny nukleárních transkripčních faktorů aktivovaných T-buněk podílejících se na regulaci funkce T-lymfocytů a produkci interleukinu 2. Tato inhibice tak simultánně podporuje protinádorovou imunitní odpověď spojenou s blokadou imunitního kontrolního receptoru programované buněčné smrti-1. I přes to, že inhibice CDK4/6 má na T-lymfocyty antiproliferativní účinek, přispívá ke zvýšení protinádorové aktivity podporou aktivace efektorových T-buněk a jejich infiltrace do nádorové tkáně, přičemž T-lymfocyty, které se s nádorovými antigeny již setkaly, jsou vůči inhibici CDK4/6 více citlivé než nativní T-buňky. Zároveň je inhibice CDK4/6 spojena se zvýšenou sekrecí chemokinů nádorovými buňkami, která taktéž podporuje infiltraci T-lymfocytů do nádorového mikroprostředí, avšak tato produkce chemokinů je závislá na změnách metabolické aktivity, ke kterým dochází po inhibici CDK4/6 (Uzhachenko, 2021; Deng, 2018).

Vzhledem k významnému vlivu CDK4/6 na senescenci, metabolismus, proliferaci a imunitní protinádorovou odpověď by kombinace inhibitorů CDK4/6 s jinými léčivy mohla představovat ideální formu terapie nádorových onemocnění. Navíc schopnost vyvolat trvalé zastavení růstu by mohla zkrátit dobu expozice pacienta léku, což může snížit toxicitu vyvolanou inhibicí CDK4/6 a zabránit rozvoji rezistence (Yoshida, 2016; Klein, 2018).

### **4.5.4 Nekinasové funkce CDK4/6**

Vedle kinasových funkcí mají CDK4/6 i funkci transkripčních regulátorů a to nezávisle na jejich kinasové aktivitě. Bylo zjištěno, že kinasa CDK6, která je vysoce exprimovaná zejména v lymfoidních nádorech, je také součástí transkripčního komplexu. Společně s transkripčními faktory STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) a cykliny D se podílí na indukci transkripce nádorového supresoru p16<sup>INK4a</sup>. Společně s aktivačním

proteinem-1 může vytvářet také transkripční komplex podílející se na regulaci transkripce faktoru VEGF (Vascular endothelial growth factor). Zvýšená exprese CDK6 koreluje se zvýšenou hladinou inhibitoru p16<sup>INK4a</sup>, který se váže na monomerní CDK6 a zabraňuje tvorbě komplexů s cykliny rodiny D, čímž zabraňuje progresi buněčného cyklu a působí jako negativní zpětnovazebný regulátor CDK6. V nepřítomnosti p16<sup>INK4a</sup> v důsledku mutací, delecí nebo metylací typicky se vyskytujících u maligních buněk, CDK6 podporuje proliferaci a stimuluje angiogenezi u hematopoetických malignit. K tomu dochází prostřednictvím indukce exprese proangiogenního růstového faktoru VEGF-A podílejícího se na *de novo* tvorbě krevních cév, které nádorovou tkáň zásobují kyslíkem a živinami. Vysoká exprese CDK6 tak podporuje tumorogenezi stimulací migrace a proliferace endotelových buněk. ATP-kompetitivní inhibitory CDK6 nemají vliv na expresi p16<sup>INK4a</sup> ani VEGF-A, což potvrzuje nezávislost této transkripční funkce CDK6 na její kinasové aktivitě (Kollmann, 2013).

Regulační funkce CDK6 se uplatňuje také při vývoji HSC (Hematopoietic stem cell) a LSC (Leukemic stem cells), jejichž homeostáza závisí na transkripčním faktoru EGR-1 (Early growth response protein 1). V dormantních HSC je EGR-1 exprimován ve vysokých hladinách a u hematopoetických malignit může mít funkci nádorového supresoru. Pro iniciaci proliferace za stresových podmínek je nutné snížení hladiny EGR-1 pomocí vazby CDK6 na jeho promotor, což umožní zahájení proliferace HSC a hematopoézy. Maligní LSC hrají klíčovou roli při rozvoji leukemií, které vykazují po onkogenním stresu vysokou expresi CDK6 na rozdíl od netransformovaných buněk. Z tohoto důvodu by inhibice nejen kinasových funkcí CDK6, ale i těch nekinasových, mohla být účinným řešením pro léčbu těchto nádorových onemocnění (Scheicher, 2015). Aktivace HSC závisí také na transkripčním faktoru Runx1 (Runt-related transcription factor 1), který může rovněž podporovat progresi akutní leukémie, proliferaci, angiogenezi nebo metastazování (Lin, 2020). Aktivita CDK6 vede ke snížení exprese genů pro terminální diferenciaci a naopak podporuje proliferaci myeloidních progenitorových buněk. Nepřítomnost CDK6 u CDK6-deficientních myší naopak vede ke snížení proliferace myeloidních buněk a umožňuje terminální diferenciaci granulocytů (Fujimoto, 2007). CDK6 je také nezbytná pro proliferaci a diferenciaci multipotentních prekurzorů thymocytů z kostní dřeně závislých na receptoru Notch (Neurogenic locus homolog protein) při vstupu do brzlíku a tumorogenezi závislé na AKT1 ( $\alpha$ -serin/threonin protein kinase 1). Absence CDK6 tedy také zamezuje onkogenní transformaci při rozvoji lymfoidních malignit indukovaných signalizací Notch (Hu, 2009).

Ačkoli má CDK6 mnohem větší substrátovou specifitu než CDK4 (Anders, 2011), vyskytují se substráty, které CDK4 ovlivňuje i svou nekinasovou aktivitou. Bifunkční izoenzym PFKFB3 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3) je

exprimován ve vysoké míře v maligních tkáních, kde se podílí na regulaci glykolýzy, jelikož katalyzuje tvorbu a degradaci fruktosa-2,6-bisfosfátu. Zastává funkci také při angiogenezi, autofagii nebo inhibici proliferace. Nadměrnou expresi PFKFB3 společně se zvýšenou hladinou CDK4 vykazují buňky karcinomu prsu. Vazba CDK4 na PFKFB3 přes lysin stabilizuje CDK4 a zabraňuje její degradaci ubiquitin-proteasomovou cestou (Jia, 2018; Xiao, 2021).

Aktivita CDK4 sehrává klíčovou úlohu také při inzulínové signalizaci podléjící se na diferenciaci a proliferaci  $\beta$  buněk ostrůvků slinivky břišní v myších modelech. CDK4 inhibuje protein FOXO1 (Forkhead box O1), čímž je zabráněno supresi buněčného faktoru Pdx1 (Pancreatic and duodenal homeobox 1) a pankreatické  $\beta$  buňky se mohou diferenciovat. Naopak ztráta regulační aktivity CDK4/cyklin D2 může zapříčinit selhání  $\beta$  buněk při diabetu II. typu. Ačkoli CDK4 podporuje fosforylaci FOXO1, deprese Pdx1 zprostředkovaná CDK4 není na této fosforylaci závislá (Stamateris, 2023). Podobný vliv má CDK4 díky inzulínové stimulaci IRS2 (Insulin receptor substrate 2) a proteinkinasy B i na terminální diferenciaci a proliferaci NSC (Neural stem cells). Nicméně tato diferenciaci a následná tvorba neuronů z NSC zprostředkovaná dráhou IRS2/CDK4 je závislá na kinasové aktivitě CDK4 (Chirivella, 2017).

Právě tyto funkce CDK4/6 nezávislé na jejich kinasové aktivitě nemohou být postihnuty klasickými ATP-kompetitivními CDK4/6i, proto bude pro další vývoj protinádorových terapeutik vhodné zvolit jinou strategii. Ta by mohla spočívat například v samotné degradaci CDK4/6 (Hafner, 2019; Rana, 2019; De Dominicis, 2020).

#### **4.6 Mechanismy rozvoje rezistence na CDK4/6i**

U rakovinných buněk dochází často k rozvoji mechanismů, které jim poskytují výhodu a napomáhají k rozvoji *de novo* rezistence vůči terapii založené na CDK4/6i. Mezi tyto změny typicky patří například nadměrná exprese CDK4/6, CDK2 nebo cyklinu D nebo E (Yang, 2017; Asghar, 2017). Bylo prokázáno, že u buněčných linií odvozených z ER<sup>+</sup> rakoviny prsu dochází k rozvoji rezistence zvýšením exosomální exprese miRNA (microRNA), a to zejména miR-432-5p. Interakce této miRNA s mediátorovou RNA transkripčního faktoru TGF- $\beta$  a jeho receptoru potlačuje signalizaci zprostředkovanou touto signální dráhou. V důsledku toho není aktivována transkripce endogenních inhibitorů CDK, p15<sup>INK4B</sup> a p21<sup>Cip1</sup>, a dochází tak ke zvýšení exprese CDK6 a vzniku rezistence. Jelikož tato rezistence není způsobena mutacemi genů, ale pouze zvýšenou expresí mediátorové RNA, dochází po ukončení expozice buněk CDK4/6i k obnově citlivosti na tyto inhibitory. Nicméně fenotyp těchto buněk je podobnější rezistentním buňkám než buňkám původním (Cornell, 2019; Feng, 2000; Matsuura, 2004). Navíc v důsledku zvýšení exprese CDK6 u buněk ER<sup>+</sup>



rakoviny prsu dochází také ke snížení ER a progesteronového receptoru, což podporuje také vznik rezistence na antagonisty ER (Yang, 2017).

Naopak u některých buněčných linií glioblastomu dochází po léčbě CDK4/6i k deregulaci dráhy p16<sup>INK4</sup>-CDK4/6-Rb a nadměrné expresi CDK4, která také může vést k rezistenci. Zajímavostí je, že amplifikace CDK6 u těchto linií neovlivnila jejich citlivost vůči CDK4/6i (Cen, 2012). Zvýšenou expresi CDK4 vykazují také liposarkomy, které však po ovlivnění buněk CDK4/6i jsou schopny aktivovat kompenzační mechanismy spočívající v nadměrné expresi cyklinů D a potlačení aktivity tumor supresorového proteinu p53 (Zhang, 2014).

Další způsob, jak mohou buňky obejít restriční bod kontrolovaný aktivitou CDK4/6, závisí na postmitotické aktivitě CDK2. Buněčné linie trojitě negativního karcinomu prsu v odezvě na inhibici CDK4/6 exprimují vysoké hladiny CDK2 a cyklinu E1. Nadměrná exprese cyklinu E vyvolaná působením CDK4/6i vede ke zvýšení aktivity CDK2, díky níž jsou buňky schopny pokračovat do S fáze buněčného cyklu, navzdory inhibici CDK4/6. Vysoká aktivita CDK2/cyklin E1 tedy přispívá k rozvoji rezistence vůči CDK4/6i (Asghar, 2017).

Na základě sekvenování bylo u pacientů s HR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> rakovinou prsu prokázáno snížení exprese Rb1 a ER a patogenní amplifikace a/nebo mutace v genech pro AKT1, receptory pro ERBB2 (Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2), fibroblastový faktor 2 a onkogenů RAS (Rat sarcoma virus), AURKA (Aurora kinase A) a genu pro cyklin E2 (*CCNE2*) (Wander, 2020), přičemž tyto změny byly spojeny s rozvojem rezistence na CDK4/6i. Ztráta exprese Rb1 byla také prokázána u buněk melanomu i karcinomu prsu (Yoshida, 2016; Wander, 2020). Somatické mutace Rb1 byly u karcinomu prsu pozorovány také v cirkulující DNA, ačkoli nebylo prokázáno, že se tyto mutace přímo podílejí na rozvoji rezistence na CDK4/6i (Condorelli, 2018).

Jedním z klíčových enzymů podílejících se právě na rozvoji rezistence u rakoviny prsu a plic je zvýšená exprese AURKA kinasy v důsledku amplifikace genu *AURKA*. Nicméně na rozdíl od rakoviny plic, kde se *AURKA* exprimuje ve vyšší míře, u rakoviny prsu dochází k amplifikaci pouze u některých linií a to jen ve velmi omezeném množství. Ovšem i tento malý nárůst amplifikace *AURKA* vede k významné změně genové exprese a následnému rozvoji rezistence na CDK4/6i. V rezistentních buňkách byly také pozorovány kombinace těchto změn, jako např. amplifikace *ERBB2* a *AURKA*, ztráta ER a změny v expresi AKT1 a RAS, které podporovaly rozvoj rezistence. Rozvoj rezistence je tedy do značné míry specifický v závislosti na buněčné linii. Některé z těchto změn jako např. vysoká exprese AKT1, cyklinu E2 nebo *AURKA* vedly v některých buněčných liniích rakoviny prsu k rezistenci i na antiestrogenní léčbu, která u karcinomu prsu doprovází CDK4/6i jako standardní terapeutická kombinace (Wander, 2020).

Rozvoj klinické rezistence na CDK4/6i je prakticky nevyhnutelný. Bylo prokázáno, že dochází i ke zkřížené rezistenci mezi ribociclibem a palbociclibem a to i při vysokých dávkách. Tato rezistence ovšem nebyla pozorována u buněk karcinomu prsu ovlivněných abemaciclibem, což dokazuje odlišné působení abemaciclibu a jeho vliv i na další kinasy (Hafner, 2019). Mechanismy, na jejichž základě tato rezistence vzniká, jsou velice komplexní a do značné míry stále neznámé. Znalost těchto mechanismů může přispět k lepší prevenci nebo k vývoji léčiv, které umožní překonání získané rezistence (Wander, 2020). Jednou z možností je také kombinace CDK4/6i s inhibitory drah podílejícími se na vyvolání rezistence jako jsou např. inhibitory CDK2 (Yoshida, 2016; Wander, 2020).

Dalším inovativním přístupem, který by mohl vést ke zlepšení terapie založené na CDK4/6i je cílená degradace proteinů prostřednictvím PROTAC molekul, a to zejména v těch případech, kdy dochází k rezistenci vyvolané zvýšenou expresí CDK4 nebo CDK6, které byly v této kapitole popsány. Zejména v poslední době se ukazuje, že PROTAC molekuly jsou jednou z atraktivních terapeutických možností pro obtížně zasažitelné cíle, ale také právě pro takové cíle, při jejichž terapii vzniká rezistence (Békés, 2022). Vzhledem k vysoké pravděpodobnosti rozvoje rezistence na CDK4/6i má využití PROTAC molekul schopných účinně degradovat cílové molekuly velký terapeutický potenciál (Qi, 2022). Díky vývoji účinných PROTAC degradérů založených na CDK4/6i by navíc mohly být zasaženy také významné na kinasové aktivitě nezávislé funkce CDK4/6, které nemohou být inhibovány klasickými ATP-kompetitivními inhibitory a které se podílejí na rozvoji a progresi nádorových onemocnění, jak bylo popsáno v předchozích kapitolách (Rana, 2019; Hafner, 2019).

#### **4.7 Využití proteolytických chimér (PROTAC) pro cílenou degradaci CDK4/6**

Nově vznikající strategie farmakologické degradace molekulárních cílů, k nimž se řadí také CDK4/6, je založena na heterobifunkčních PROTAC molekulách, tvořených ligandem vázajícím se na cílový protein a ligandem interagujícím s E3 ubikvitin ligasou. Tyto dva ligandy jsou spojeny linkerem o různé délce, který umožňuje přiblížení cílového proteinu k E3 ligase a jeho následnou polyubikvitinaci a cílenou degradaci daného proteinu v proteasomu, přičemž molekula PROTAC je recyklována a může se vázat na další cílový protein (**Obrázek 3**) (Rana, 2019; Békés, 2022; Brand, 2019).

V roce 2001 byla představena první chimerická molekula PROTAC-1 zaměřená na cílenou degradaci proteinů prostřednictvím tvorby komplexu s E3 ubikvitin ligasou. Tento PROTAC degradér měl omezenou schopnost penetrace do buněk, nicméně představoval

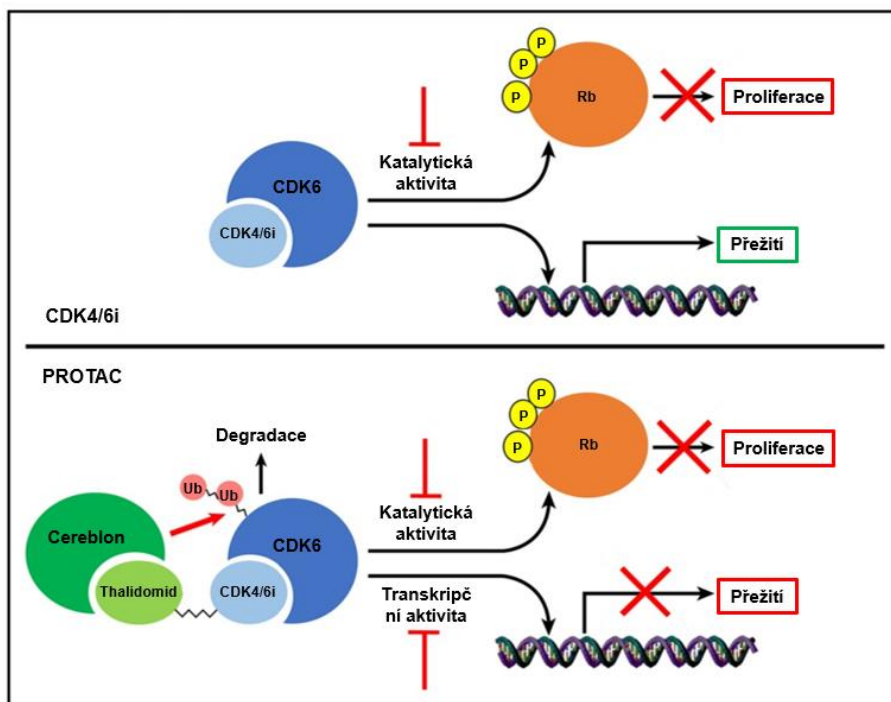
první koncept molekul, které by modulovaly fenotyp buněk právě specifickou degradací proteinů podílejících se na rozvoji onemocnění (Sakamoto, 2001).

Během necelých 20 let byly i přes počáteční neúspěchy, ať už v důsledku neúplné degradace, nebo špatné selektivity, PROTAC molekuly v roce 2019 poprvé začleněny do klinického testování. Jednalo se o látku ARV-110 (bavdeg; NCT03888612; Arvinas) degradující androgenní receptor pro léčbu metastatického kastročně rezistentního karcinomu prostaty, který je nyní v I./II. fázi testování. Dále pak o PROTAC ARV-471 (NCT05909397; VERITAC-3; Arvinas/Pfizer) degradující estrogenní receptor, který se nyní nachází ve III. fázi testování pro terapii ER<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> pokročilého nebo metastatického karcinomu prsu v kombinaci s palbociclibem. Od té doby mnoho dalších PROTAC molekul vstoupilo do klinických testů (Békés, 2022; Petrylak, 2023; Iwata, 2023).

Do klinických testů dosud ale nevstoupil žádný PROTAC, který by degradoval právě CDK4/6, přestože tyto molekuly mají velký terapeutický potenciál s cílem překonat rezistenci. Bylo prokázáno, že umlčení exprese CDK4 a CDK6 pomocí malých molekul RNA a s tím spojené snížení jejich hladiny vedlo k opětovnému zisku citlivosti na CDK4/6i u buněk karcinomu prsu (Yang, 2017; Cornell, 2019) nebo liposarkomů (Zhang, 2014). Cílená degradace CDK4/6 prostřednictvím PROTAC by ale mohla mít potenciál i u dalších nádorových onemocnění jako jsou leukémie nebo lymfomy.

Například buňky ALL Ph<sup>+</sup> (Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia) vykazují při proliferaci závislost na CDK6. Bylo prokázáno, že umlčení exprese CDK6 malými RNA vede k inhibici fosforylace Rb a exprese FOXM1, což znemožní vstup buněk do S fáze. Potlačení exprese CDK4 však nemělo u těchto buněk vliv na progresi buněčného cyklu (De Dominici, 2018). Stejně tak buněčné modely AML (Acute myeloid leukemia) jsou taktéž závislé především na kinasové aktivitě CDK6. Stejně jako v případě ALL Ph<sup>+</sup> nebyla tato závislost pozorována v případě CDK4 (Brand, 2019). Vyšší exprese CDK6 navíc u ALL podporuje na kinasové aktivitě nezávislou tvorbu antioxidantních molekul, které potlačují produkci ROS a zabraňují spuštění proapoptotických drah vyvolaných stresem (Wang, 2017). U LSC byla zjištěna nadměrná exprese CDK6, ke které může docházet při rozvoji rezistence na CDK4/6i. Zvýšení hladiny CDK6 potlačuje expresi transkripčního regulátoru EGR-1 udržujícího homeostázu LSC a HSC, v důsledku čehož dochází k indukci proliferace těchto kmenových buněk a k rozvoji leukémie (Scheicher, 2015). Buňky MCL (Mantle cell lymphoma) jsou charakteristické chromozomální translokací t(11;14)(q13;q32), která vede ke zvýšené expresi cyklinu D1. Navíc u buněk MCL dochází vedoucí k částečným nebo úplným ztrátám proteinu p16<sup>INK4a</sup>, endogenního inhibitoru CDK4/6, což rovněž podporuje patogenezí. Inhibice kinasové aktivity prostřednictvím CDK4/6i měla u buněk MCL velký úspěch a léčba byla dobře tolerována, nicméně u řady pacientů došlo k rozvoji rezistence na léčbu (Marzec, 2006; Leonard, 2012). Vzhledem

k těmto genetickým změnám by degradace CDK4/6 prostřednictvím heterobifunkčních PROTAC degradérů u těchto typů malignit mohla v budoucnu představovat vhodnou léčebnou strategii.



Obrázek 3: Porovnání mechanismu účinku CDK4/6i a PROTAC; upraveno podle De Dominicci, 2020

#### 4.7.1 PROTAC degradéry založené na CDK4/6i

Za účelem cílené degradace CDK4 a/nebo CDK6 je v současné době zkoumáno již několik PROTAC molekul, které jako výchozí ligandy k vazbě na CDK4/6 využívají CDK4/6i palbociclib, ribociclib, abemaciclib nebo jejich strukturální deriváty. Na struktuře ribociclibu jsou založeny např. rib-pom (Zhao, 2019), BSJ-01-187 nebo BSJ-04-132 (Jiang, 2019). Abemaciclib je využíván spíše zřídka, a to např. u BSJ-01-184 (Jiang, 2019). K cílené degradaci CDK4/6 pomocí PROTAC, které jako ligand k navázání na molekulární cíl využívají palbociclib, byly vytvořeno nejvíce molekul, a to např. CP-10 (Steinebach, 2020), PROTAC 6 (Rana, 2019), pal-pom (Zhao, 2019), YX-2-107 (De Dominicci, 2020) nebo BSJ-03-123 (Brand, 2019).

K vazbě CDK4/6i s oběma kinasami dochází na základě vodíkových vazeb v aktivním místě, přičemž piperazinový kruh inhibitorů se na této vazbě nepodílí a za normálních okolností je vystaven rozpouštědлу (Lu, 2006). Lze jej tedy efektivně využít k navázání linkeru PROTAC bez narušení této vazby (De Dominicci, 2020; Brand, 2019; Jiang, 2019; Rana, 2019; Su, 2019; Zhao, 2019). Na rozdíl od piperazinové skupiny

palbociclibu a abemaciclibu, které jsou orientovány směrem k N-terminálnímu  $\beta$ -listu kinas, směřuje piperazinový kruh ribociclibu spíše k C-terminálnímu  $\alpha$ -helixu CDK6. Autoři této studie přisuzují tuto odlišnost v prostorové orientaci klíčovou roli při interakci s cílovými kinasami, jelikož jimi navržené PROTAC odvozené od ribociclibu vykazovaly nižší degradační schopnost oproti degraderům založených na palbociclibu a abemaciclibu (Su, 2019). V případě abemaciclibu se při degradaci projevuje jeho afinita také k dalším cílům, jako je CDK2 nebo CDK9 (Hafner, 2019; Chen, 2016). Z těchto tří CDK4/6i se proto jeví palbociclib jako nejvhodnější ligand pro cílenou degradaci CDK4/6 (Su, 2019; Rana, 2019; De Dominicis, 2020; Brand, 2019).

Účinnost degradace rovněž závisí na vhodném výběru E3 ligasy, která může ovlivnit tkáňovou specifitu PROTAC z důvodu jejich odlišné exprese u různých buněčných typů. Tato specifita závisí také na typu ligandu interagujícího s E3 ligasou, jež zajišťuje výhodný interakční úhel mezi molekulárním cílem a ligasou pro degradaci. Mezi tyto ligandy patří např. nutlin-3b pro E3 ligasu MDM2, VH032 ligand pro vazbu na VHL (von Hippel Lindau) ligasu, bestatin jako ligand pro cIAP (cellular inhibitor of apoptosis protein) a cereblonové (CRBN) ligandy thalidomid a jeho deriváty, lenalidomid a pomalidomid, zajišťující vazbu s CRL4 (cullin-RING ubiquitin ligase 4). Molekuly založené na cIAP E3 ligase jsou schopny účinně degradovat oba homology, zatímco PROTAC založené na VHL a CRL4<sup>CRNB</sup> E3 ligase vykazující vyšší degradační selektivitu spíše vůči CDK6. Pro vývoj účinných degraderů využívajících MDM2 ligasu bude zapotřebí dalšího výzkumu, jelikož dosud navržené molekuly nejsou schopny díky své vysoké lipofilitě penetrovat do buňky a degradovat CDK4/6 (Steinebach, 2020). Ačkoli k degradaci CDK4/6 tedy lze využít tři ze zmíněných ligas, vykazují PROTAC založené na CRL4<sup>CRNB</sup> ligase, a to i přes možný rozvoj rezistence genetickou inaktivací CRBN, nejvyšší účinnost při degradaci CDK4/6 v porovnání s ostatními a představují také nejvíce zastoupenou skupinu (Su, 2019; Fischer, 2014; Steinebach, 2020). V nedávné době byla taktéž vyvinuta degradační molekula s vazebným ligandem KB02, která účinně degradovala CDK4/6 prostřednictvím DCAF16 (damage-specific DNA binding protein 1 CUL4 associated factor) E3 ligasy (Pu, 2023). Nicméně specifita degradace CDK4/6 prostřednictvím PROTAC je kromě zmíněné vazebné afinity ligandů k molekulárnímu cíli a výběru E3 ligasy ovlivněna také dalšími faktory, jako je složení a délka linkeru zajišťujícího vhodnou konformaci těchto dvou ligandů, ale také celková lipofilita PROTAC molekuly a buněčná permeabilita (Su, 2019; Rana, 2019; Steinebach, 2020; Jiang, 2019; Pu, 2023).

Například některé PROTAC na bázi CRL4<sup>CRNB</sup> využívající ribociclib (např. rib-pom) a palbociclib (např. pal-pom) byly schopny degradovat obě kinasy, přičemž u obou byla pozorována preferenční degradace CDK4. Palbociclibové PROTAC pak vykazovaly vyšší účinnost degradace než ty založené na struktuře ribociclibu (Zhao, 2019), což koresponduje

i s výsledky jiné studie (Su, 2019). Mezi účinné duální degradéry obou homologů se rovněž řadí BSJ-03-204. Jiang a kol. byli dokonce schopni zkonstruovat BSJ-01-187 a BSJ-04-132 na bázi ribociclibu, které jako jediné z dosud navržených byly schopny specificky degradovat pouze CDK4 (Jiang, 2019). Naproti tomu molekuly YX-2-107 a BSJ-03-123 založené na palbociclibu a pomalidomidu byly popsány jako selektivní degradéry CDK6 (De Dominicis, 2020; Brand, 2019). Účinek právě těchto dvou PROTAC molekul byl v rámci experimentální části této bakalářské práce testován na lymfomových buněčných liniích.

Výsledky současných studií ale dosud nepřinesly jednoznačné závěry, které by umožnily pochopit přesné zákonitosti a vliv zmiňovaných faktorů ovlivňujících specifitu. Některé výzkumy si dokonce odporují, jelikož Su a kol. pozorovali vyšší selektivitu degradace CDK6 u PROTAC molekul s kratším linkerem (Su, 2019), zatímco v jiné studii vykazoval selektivnější degradaci CDK6 PROTAC s delším linkerem (Rana, 2019). Významnou roli může mít zřejmě také endogenní exprese enzymů CDK4/6 a jejich vzájemný poměr (Su, 2019). Schopnost PROTAC specificky degradovat pouze CDK6 nikoliv CDK4 byla vysvětlena několika hypotézami. Vazba mezi thalidomidem, případně jeho deriváty, a CRL4<sup>CRNB</sup> probíhá přes karboxylovou terminální doménu CRBN pomocí vodíkových vazeb a van der Waalsových sil, přičemž všechny tři deriváty vykazují podobnou afinitu k CRBN, a podporují tak ubikvitinaci CDK4/6 CRL4<sup>CRNB</sup> E3 ligasou (Fischer, 2014). CRL4<sup>CRNB</sup> následně interaguje s lysiny CDK4/6, jejichž rozmístění se ve vazebné doméně pro ATP mezi těmito kinasami liší (Fischer, 2014; Rana, 2019). CDK6 má v této doméně o 7 lysinových zbytků více než CDK4, což zřejmě umožňuje lepší interakci s povrchovou strukturou CDK6, než je tomu v případě CDK4. Tento fakt společně s tvorbou stabilnějšího ternárního komplexu CDK6-PROTAC-CRBN než v případě s CDK4, může hrát významnou roli ve specifitě PROTAC vůči CDK6 (Su, 2019; Rana, 2019; De Dominicis, 2020; Brand, 2019). Další hypotéza vysvětlující tuto selektivitu by mohla souviset také s rychlejší deubikvitinací CDK4 oproti CDK6 (Rana, 2019).

V současné době bylo v této oblasti výzkumu dosaženo velkých úspěchů a PROTAC představují velice výhodnou strategii pro terapii nádorových onemocnění. Tento přístup je schopen z duálních CDK4/6i vytvořit selektivnější degradéry pouze jednoho z homologů. Jejich schopnost specificky degradovat pouze CDK6 společně s recyklací PROTAC molekuly po degradaci cílového proteinu by mohla snížit nežádoucí toxicitu léčby spojenou s duálními CDK4/6i a mohla by rovněž zabránit rozvoji rezistence (Békés, 2022; Brand, 2019; De Dominicis, 2020). Nicméně je zapotřebí dalších studií pro lepší pochopení zákonitostí selektivity a funkční kapacity PROTAC (Su, 2019; Rana, 2019).

## **5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **5.1 Materiál a vybavení**

#### **5.1.1 Přístrojové vybavení**

Blotovací aparatura Mini Trans-Blot cell (Bio-Rad, USA)  
Centrifuga Minispin (Eppendorf, Německo)  
CO<sub>2</sub> inkubátor (Sanyo, Japonsko)  
Chemiluminiscenční CCD kamera LAS4000 (FujiFilm, Japonsko)  
Chladnička CN 40 (Liebherr, Německo)  
Kývačka Mini Rocker-Shaker (Biosan, Litva)  
Laboratorní váha KERN 572-39 (Kern, Německo)  
Laminární box s vertikálním prouděním vzduchu (Alpina, Polsko)  
Magnetická míchačka s ohřevem (IKA-Werke, Německo)  
Napájecí zdroj PowerPac Basic Power Supply (Bio-Rad, USA)  
Průtokový cytometr BD FACS Verse™ (Becton-Dickinson Company, USA)  
Spektrofotometr UV-1800 (Shimadzu, Japonsko)  
Světelný mikroskop Nikon TMS (Nikon, Japonsko)  
Termostat blokový BMT 250 (Kleinfeld labortechnik, Německo)  
Ultrazvukový homogenizátor Sonoplus HD2200 (Bandelin, Německo)  
Vertikální elektroforetická aparatura: Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA)  
Vodní odpařovací lázeň (GLF, Německo)  
Vortex Mixer WIZARD Advancer IR Velp (Scientifica, Itálie)  
Vakuová odsávačka FTA-2i (Biosan, Lotyšsko)  
Centrifuga BR4i (Jouan, USA)

#### **5.1.2 Chemikálie**

96% etanol (Lach-Ner, ČR)  
97%2-merkaptóetanol (Serva, Německo)  
Akrylamid (Omnipure, USA)  
Aprotinin (Merck, USA)  
APS: Peroxodisíran amonný (Bio-Rad, USA)  
BSA: Bovinní sérový albumin (VWR, USA)  
Coomassie® brilliant blue (Merck, USA)  
DMSO: Dimetylsulfoxid (Merck, USA)  
DTT: Dithiothreitol (Roche, Německo)

ECL chemiluminiscenční substrát: peroxid vodíku a luminol (Thermo Fisher Scientific, USA)  
EDTA: Kyselina etylendiamintetraoctové (Thermo Fischer Scientific, USA)  
EGTA: Etylenglykol-bis(2-aminoetyler)-N,N,N',N'-tetraoctová (Merck, USA)  
FS: Fetální bovinní sérum (Biowest, Francie; Biosera, Francie)  
Glycerol (Lach-Ner, ČR)  
Glycin (EMD Chemicals, USA)  
HCl: Kyselina chlorovodíková (Penta, ČR)  
IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Gibco, Thermo Fischer Scientific, USA)  
Isobutanol (Penta, ČR)  
KCl: Chlorid draselný (Penta, ČR)  
Leupeptin (Merck, USA)  
L-glutamin (Merck, USA)  
N',N'-metylenbisakrylamid (Merck, Čína)  
Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O: Dekahydrát tetraboritanu sodného (Lachema, ČR)  
Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>: Ortovanadičnan sodný (Merck, USA)  
NaCl: Chlorid sodný (Penta, ČR)  
NaF: Fluorid sodný (Merck, USA/Lach-Ner, ČR)  
Nonidet P-40 (Fluka, Švýcarsko)  
Penicilin (Merck, USA)  
PMSF: Fenylmetylsulfonylfluorid (Merck, USA)  
Ponceau S (Serva, Německo)  
Propidium jodid 1 mg/ml (Merck, USA)  
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fischer Scientific, USA)  
Streptomycin (Thermo Fischer Scientific, USA)  
TEMED: N',N',N',N'-tetrametyletylendiamin (Bio-Rad, USA)  
TRIS: Tris(hydroxymetyl)aminometan (VWR International, USA/Serva, Německo)  
Triton X-100 (Merck, USA)  
Tween 20 (MP Biomedicals, USA)

### 5.1.3 Roztoky

1x PBS: 137 mM NaCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O; 2,7 mM KCl; 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4  
5x SDS vzorkový pufr: 0,3 M TRIS (pH 6,8); 10% SDS; 50% glycerol; 0,05%  
bromfenolová modř; 5% 2-merkaptoetanol  
Blokovací roztok: 5% BSA; 0,1% Tween 20 v TBS blotovací pufr: 25 mM TRIS; 192 mM  
glycin



Blotovací pufr: 25 mM TRIS; 192 mM glycin

Bradfordovo činidlo: 0,01% Coomassie® brilliant blue; 5% etanol; 8,5% kyselina orthofosforečná

Elektroforetický pufr: 25 mM TRIS; 192 mM glycin; 0,1% SDS (pH 8,3)

Kultivační médium 10% IMDM s 10% FS; doplněno: roztok antibiotik (100 units/ml penicilin, 0,1 mg/ml streptomycin); roztok L-glutamin (2 mM)

Lyzační RIPA pufr: 20 mM TRIS-HCl (pH 7,4); 100 mM NaCl; 5 mM EDTA; 2 mM EGTA; 0,2% Nonidet P-40 (pH 7,4); před použitím přidáno: 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 1 mM NaF; 2 µg/ml leupeptin; 0,5 µg/ml aprotinin

Ponceau S: 0,2% roztok v 1% kyselině octové

TBS pH 7,6: 137 mM NaCl; 20 mM TRIS (pH 6,8) pH upraveno koncentrovanou HCl na hodnotu 7,6

TBS s 0,1 % Tweenem 20: 137 mM NaCl; 20 mM TRIS; 0,05% Tween 20

TRIS/HCl pH 6,8: 24,23 g TRIS/ 200 ml, pH 6,8

TRIS/HCl pH 8,8: 48,46 g TRIS/ 400 ml, pH 8,8, 1 M

#### 5.1.4 Použité protilátky

V praktické části bakalářské práce byly použity primární protilátky (Tabulka 1) a sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidasou (Tabulka 2). Sekundární protilátky byly ředěny podle pokynů výrobce do 4% blokovacího roztoku BSA.

Tabulka 1: Použité primární protilátky (původ: R – králík, M – myš)

Protilátka	Původ	Katalogové číslo	Výrobce
Anti-CDK4	R	#12790	Cell Signaling Tech.
Anti-CDK6	R	#13331	Cell Signaling Tech.
Anti-cyklin A	M	#4656	Cell Signaling Tech.
Anti-cyklin E	M	#4129	Cell Signaling Tech.
Anti-PARP-1	R	#9532	Cell Signaling Tech.
Anti-Rb	M	#9309	Cell Signaling Tech.
Anti-pRb (Ser807/811)	R	#8516	Cell Signaling Tech.
Anti-β-aktin	M	#sc-47778	Santa Cruz Biotech.

Tabulka 2: Použité sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidasou

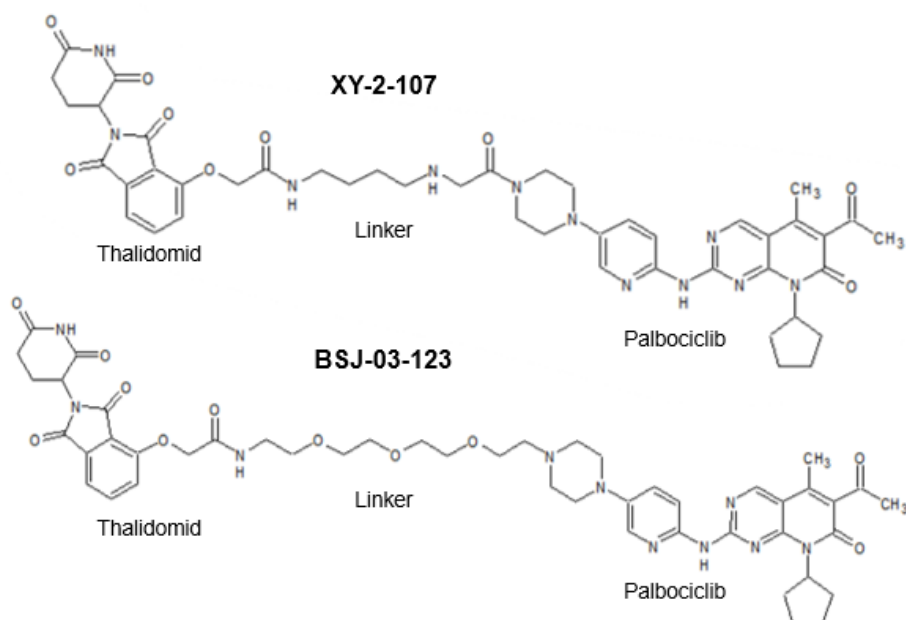
Protilátka	Katalogové číslo	Výrobce
Goat anti-rabbit	#7074	Cell Signaling Tech.
Rabbit anti-mouse	#58802	Cell Signaling Tech.

### 5.1.5 Použité buněčné linie

Pro experimenty byly využity lymfomové nádorové linie SUDHL4, DB, RAMOS a RAJI (European Collection of Authenticated Cell Cultures), které byly kultivovány v kultivačním médiu IMDM s obsahem 10% bovinního fetálního séra s přidavkem penicilinu (100 units/ml), streptomycinu (0,1 mg/ml) a L-glutaminu (2 mM). Veškeré buněčné linie byly kultivovány v inkubátoru při teplotě 37 °C v atmosféře s obsahem 5 % CO<sub>2</sub>.

### 5.1.6 Testované PROTAC molekuly

V praktické části bakalářské práce byly testovány dvě PROTAC molekuly YX-2-107 a BSJ-03-123 (MedChemExpress) a výchozí molekuly palbociclib (PD-0332991, Axon MedChem) a thalidomid, který byl poskytnut doc. RNDr. Miroslavem Souralem z Katedry organické chemie PŘF UPOL. Látky byly při experimentech ředěny do DMSO, přičemž konečná koncentrace DMSO v buněčné kultuře nepřesáhla 0,1 %.



Obrázek 4: Chemické struktury testovaných PROTAC molekul

## 5.2 Metodika

### 5.2.1 Kultivace, založení experimentu a ovlivnění buněčných kultur

Buňky byly nejprve přeneseny z kultivační nádoby do zkumavky. Po centrifugaci (5 minut, 1000 g) byl supernatant odsán a buněčný pelet byl resuspendován v kultivačním médiu. Pomocí Bürkerovy počítací komůrky byl stanoven počet buněk v suspenzi. Buněčná suspenze byla dle potřeby naředěna a buňky byly následně vysazeny na kultivační Petriho misky. Buňky byly poté kultivovány při teplotě 37 °C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub>.

Následující den byly buňky ovlivněny přidavkem testované látky naředěné do DMSO k buněčné suspenzi. Kontrolní kultivační misky byly ovlivněny stejným objemem DMSO. Kultury byly poté inkubovány po dobu 6 nebo 24 hodin v závislosti na typu experimentu.

### 5.2.2 Sklizení a lyzace

Po inkubaci byly buněčné suspenze určené pro analýzu proteinů western blottingem s imunodetekcí sklizeny do vychlazených 15ml zkumavek na ledu, kultivační misky byly opláchnuty 2 ml PBS a poté byly centrifugovány 7 minut při 1000 g a teplotě 4 °C. Následně byly buňky promyty roztokem PBS a opět centrifugovány. Pelety byly resuspendovány v 1 ml PBS a buněčné suspenze byly přeneseny do mikrozkušavky. Po centrifugaci byl supernatant odsán a buněčné pelety byly uchovány v -80 °C do druhého dne.

V závislosti na velikosti buněčných pelet byl ke vzorkům přidán odpovídající objem lyzačního RIPA pufru doplněného o inhibitory proteas a fosfatas a buňky byly lyzovány po dobu 20 minut na ledu. Po sonikaci pomocí ultrazvukového homogenizátoru (10 sekund, 3 cykly, 40% intenzita) byly lyzáty centrifugovány 30 minut při 14000 rpm a 4 °C. Supernatanty byly přeneseny do nových mikrozkušavek a celková koncentrace izolovaných proteinů byla kvantifikována spektrofotometricky dle metody Bradforda (Bradford, 1976). Koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích byly sjednoceny přidavkem RIPA pufru. Následně byl přidán vzorkovací SDS pufr (5x) a izolované proteiny byly denaturovány na termobloku 3 minuty při 95 °C. Vzorky byly poté uchovávány v mrazáku při teplotě -20 °C.

Buňky určené pro analýzu buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie byly sklizeny do 10ml vychlazených zkumavek, kultivační misky byly opláchnuty 1 ml PBS a poté byly centrifugovány 7 minut při 1000 g a 4 °C. Následně byly promyty roztokem PBS a centrifugovány. Buněčné pelety byly resuspendovány ve 100 µl PBS a buňky byly za stálého mírného míchání na vortexu zafixovány pomocí 1 ml 70% vychlazeného etanolu, který byl přidáván po kapkách. Vzorky byly uchovány při teplotě -20 °C.

### 5.2.3 SDS-PAGE, western blotting a imunodetekce

Vzorky určené pro analýzu proteinů western blottingem s imunodetekcí byly zahřáty na termobloku (3 minuty, 95 °C) a poté byly nanесeny do jamek 12,5% polyakrylamidového gelu o tloušťce 1 mm. Elektroforetická separace izolovaných proteinů nejprve probíhala za denaturujících podmínek při napětí 80 V. Po vstupu vzorků do dělicího gelu bylo napětí navýšeno na 120 V a proteiny byly separovány po dobu přibližně 90 minut. Následně byly separované proteiny elektrotransferovány na nitrocelulosovou membránu metodou western blottingu. Přenos proteinů probíhal za stálého chlazení po dobu 3 hodin při konstantním proudu 280 mA. Separované proteiny na membránách byly obarveny v roztoku Ponceau S. Z membrán byly na základě markeru molekulové hmotnosti vyřezány menší oblasti předpokládaného výskytu zájmových proteinů podle jejich molekulové hmotnosti. Ponceau S bylo poté odmyto z membrán pomocí roztoku TBS. Pro zablokování nespecifických vazeb byly membrány 1 hodinu blokovány v 4% roztoku BSA v TBS s 0,1% Tweenem. Membrány byly poté přes noc inkubovány při 4 °C s odpovídajícími primárními protilátkami (Tabulka 1), přičemž detekce β-aktinu sloužila jako kontrola rovnoměrného nanесení vzorku na gel. Druhý den byly membrány promyty v TBS a TBS s 0,1% Tweenem a poté 1 hodinu inkubovány při laboratorní teplotě s odpovídajícími sekundárními protilátkami konjugovanými s křenuvou peroxidasou (Tabulka 2). Po opětovném promytí membrán byly proteiny vizualizovány prostřednictvím chemiluminiscenčního činidla ECL a detekovány pomocí CCD kamery LAS4000 (FujiFilm, Japonsko).

### 5.2.4 Analýza buněčného cyklu průtokovou cytometrií

Vzorky byly nejprve centrifugovány 7 minut při 1000 g a 4 °C a pro odstranění fixačního roztoku a rehydrataci buněk byly promyty vychlazeným PBS a znovu centrifugovány. Buněčné pelety byly resuspendovány v 50 μl PBS pufru. Po kapkách byl za stálého míchání přidán 1 ml 2N HCl/Triton X-100. Vzorky byly po 30 minutách inkubace při laboratorní teplotě centrifugovány a kyselina byla odsáta. K buněčným peletám byl pro neutralizaci přidán 1 ml  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  a buněčné pelety byly resuspendovány. Po následné centrifugaci a promytí PBS puftrem byly buněčné pelety resuspendovány v 600 μl vychlazeného filtrovaného PBS pufru. Buněčná DNA byla obarvena přidáním propidium jodidu (ředění 100x) a po 30minutové inkubaci ve tmě za laboratorní teploty a občasného promíchání bylo zastoupení buněk v rámci buněčného cyklu stanoveno pomocí průtokového cytometru BD FACS Verse™ (Becton-Dickinson Company, USA). Stanovení procentuálního zastoupení buněk v jednotlivých fázích cyklu bylo provedeno pomocí programu ModFit.

### 5.2.5 Test buněčné viability

Pro analýzu životaschopnosti byly buňky nasazeny do 96-jamkové destičky a kultivovány při teplotě 37 °C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub> po dobu 3 hodin. Poté byly buňky ovlivněny testovanými látkami v koncentrační řadě 0,08 μM – 20 μM. Po 72hodinové inkubaci byly buňky následně obarveny interkalačním činidlem propidium jodidem, které je schopno barvit pouze DNA mrtvých buněk. Životaschopnost buněk byla následně stanovena pomocí průtokového cytometru BD FACS Verse™ (Becton-Dickinson Company, USA), který byl díky měření fluorescenčního signálu propidium jodidu schopen rozlišit počet mrtvých a živých buněk ve vzorku. Veškeré testy buněčné proliferace byly vždy provedeny v triplicátu. Procentuální buněčná viabilita byla stanovena jako poměr počtu živých buněk ovlivněných testovanou látkou vůči počtu neovlivněných kontrolních buněk. Hodnoty inhibičních koncentrací (IC<sub>50</sub>) byly následně stanoveny pomocí programu Origin 6.0.

### 5.2.6 Ověření mechanismu účinku PROTAC kompeticí s thalidomidem

Buňky byly vysazeny do Petriho misek a byly inkubovány do druhého dne při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. Buněčné kultury, které byly určeny pro ověření mechanismu účinku testovaných látek, byly nejprve ovlivněny thalidomidem o koncentraci 10 μM, který byl použit jako kompetiční látka testovaných PROTAC molekul. Po 2 hodinách byly k buňkám přidány také roztoky testovaných látek PROTAC nebo palbociclibu jako negativní kontroly. Po 24 hodinách byly buňky sklizeny a lyzovány přidavkem RIPA pufru, sonikací (10 sekund, 3 cykly, 40% intenzita) a zmražením v -80 °C stejně jako v předchozí kapitole Sklizení a lyzace. Separace izolovaných proteinů probíhala za denaturujících podmínek na 12,5% polyakrylamidovém gelu s následným přenosem na nitrocelulosovou membránu. Nespecifické vazby na membránách byly blokovány roztokem 4% BSA v TBS s 0,1% Tweenem. Hladiny proteinů byly stanoveny imunochemiluminiscenčně za použití uvedených primárních (Tabulka 1) a sekundárních protilátek konjugovaných s křenovou peroxidasou (Tabulka 2) a ECL substrátu pomocí CCD kamery LAS4000 (FujiFilm, Japonsko) obdobně jako v kapitole SDS-PAGE, western blotting a imunodetekce.

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 6.1 Degradční účinky PROTAC na panelu buněčných linií

Za účelem sledování degradačních účinků PROTAC molekul **YX-2-107** (dále označována jako **YX**) a **BSJ-03-123** (dále označována jako **BSJ**), které byly v původních publikacích popsány jako selektivní degradéry CDK6 (De Dominici, 2020; Brand, 2019), byly tyto látky nejprve testovány na panelu čtyř lymfomových buněčných liniích RAMOS, RAJI, SUDHL4 a DB. Buňky byly ošetřeny látkami **YX** a **BSJ** v koncentracích 0,1 a 1,0  $\mu\text{M}$  po dobu 24 hodin a účinnost degradace byla vyhodnocena metodou western blottingu s následnou imunodetekcí proteinů (**Obrázek 5**).

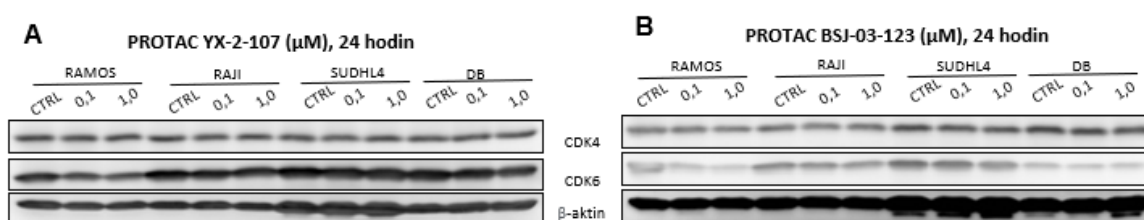
Přestože obě PROTAC molekuly **YX** i **BSJ**, vycházejí ze struktury palbociclibu, který se vyznačuje afinitou i kinasovou inhibiční aktivitou vůči CDK4 i CDK6 (Hendrychová, 2021), a z thalidomidu, tedy ligandu pro CRL4<sup>CRBN</sup> E3 ligasu (De Dominici, 2020; Brand, 2019). Obě látky v testovaných koncentracích degradovaly pouze CDK6, a to u linie RAMOS, přičemž v případě látky **BSJ** byl detekován rapidnější pokles CDK6 (**Obrázek 5; B**) oproti degradaci pomocí **YX** (**Obrázek 5; A**). Ani u jedné z testovaných linií nezpůsobilo ovlivnění buněk degradaci CDK4. Dosažené výsledky korelují s publikovanými údaji, které prezentují **YX** a **BSJ** jako selektivní a vysoce účinné degradéry CDK6, a to v buňkách ALL Ph<sup>+</sup> (De Dominici, 2020) a AML (Brand, 2019).

Bylo zjištěno, že selektivita PROTAC vůči molekulárním cílům a jejich účinnost degradace je ovlivněna několika faktory, jejichž přesný vliv dosud nebyl zcela objasněn. Mezi tyto faktory se řadí výběr ligandu pro cílovou E3 ligasu a také vlastní složení a délka linkeru, který zřejmě ovlivňuje vzájemnou prostorovou orientaci E3 ligasy a molekulárního cíle (Su, 2019; Rana, 2019; Steinebach, 2020). Jelikož se obě testované PROTAC molekuly liší pouze v linkeru, může být vyšší míra degradace CDK6 látkou **BSJ** oproti **YX** právě dána delším linkerem, jenž byl popsán jako výhodnější pro vzájemnou konformaci E3 ligasy a pro následnou účinnou degradaci cílového proteinu proteasomem (Rana, 2019). Nicméně jiná studie naopak poukazovala na vyšší degradační kapacitu molekul PROTAC s kratším linkerem (Su, 2019). Ovšem další autoři popsali, že vliv délky linkeru ve srovnání s celkovou lipofilitou molekul PROTAC je méně významný, přičemž více hydrofobní molekuly byly méně účinné při degradaci cílového proteinu (Steinebach, 2020). Na rozdílné účinnosti degradace se tedy může podílet nejen délka, ale také samotné složení linkeru a celkový charakter výsledné molekuly PROTAC.

Imunodetekcí bylo rovněž zjištěno, že testované molekuly PROTAC nemají jednotné účinky napříč všemi testovanými buněčnými liniemi, a nelze je tedy zřejmě uniformně využít u kterékoli buněčné linie, což značně komplikuje jejich využití např. v základním výzkumu pro studium funkcí kinas.

Jelikož PROTAC **YX** a **BSJ** nesou ve své struktuře thalidomid, využívají k degradaci cílových proteinů CRL4<sup>CRBN</sup> E3 ligasu přirozeně exprimovanou v buňkách (De Dominici, 2020; Brand, 2019). Možným vysvětlením rozdílné schopnosti PROTAC degradovat CDK6 v rámci různých buněčných linií může souviset s nižší endogenní genovou expresí této E3 ligasy v buňkách, které vykazovaly rezistenci vůči degradaci CDK6 (Steinebach, 2020). Samotná míra exprese CDK6 může rovněž do značné míry ovlivnit odlišnou odpověď buněčných linií na působení testovaných PROTAC (Su, 2019; Wu, 2021).

Vzhledem k získaným výsledkům byla pro podrobnější testování vlivu **YX** a **BSJ** využita citlivá linie RAMOS. Dále byla pro ověření, zda k degradaci nedochází v jiných koncentracích nebo časových intervalech, vybrána také linie SUDHL4, u které v předchozím experimentu nedošlo k degradaci CDK4 ani 6 (viz **Obrázek 5**).



Obrázek 5: Vliv PROTAC **YX-2-107** (A) a **BSJ-03-123** (B) na hladiny proteinů CDK4 a CDK6 v buněčných liniích RAMOS, RAJI, SUDHL4 a DB ovlivněných po dobu 24 hodin látkami o koncentraci 0,1 a 1,0 μM

## 6.2 Degradční působení PROTAC v závislosti na čase a koncentraci

Jelikož z dřívějších studií s jinými PROTAC molekulami je známo, že jejich účinky se mohou lišit v různých koncentracích a časech (Rana, 2019; Su, 2019; Jiang, 2019), byl rovněž hodnocen vliv použité koncentrace a doby ovlivnění buněk látkami **YX** a **BSJ**. Bylo provedeno 6 a 24hodinové ovlivnění buněk **YX** a **BSJ** v koncentracích 0,01 μM, 0,1 μM, 1,0 μM a 10 μM. U linie SUDHL4 nebyl po expozici buněk různými koncentracemi látek pozorován žádný vliv na změnu hladiny CDK4 ani CDK6, a to po 6 ani 24hodinovém působení (**Obrázek 6**). Tento výsledek tedy koreloval s imunodetekcí těchto proteinů na širším panelu linií (**Obrázek 5**).

Podle očekávání u linie Ramos došlo po ovlivnění buněk látkou **YX** po dobu 6 i 24 hodin ke snížení hladiny, tedy k degradaci CDK6. Kromě toho byla po 6 hodinách pozorována i degradace CDK4. Ke snížení hladin obou kinas došlo především v koncentracích 0,1 a 1 μM **YX**, přičemž byla pozorována preferenční degradace CDK6 oproti CDK4 (**Obrázek 6; C**). Tento výsledek neodpovídá publikovaným datům dosaženým na buněčných modelech ALL Ph<sup>+</sup>, na kterých byl tento PROTAC poprvé popisován jako selektivní vůči CDK6. V této publikaci bylo pozorováno snížení hladiny CDK4 u myších xenograftů ALL Ph<sup>+</sup> a patientských vzorků, nicméně i přesto byl PROTAC **YX** prezentován jako selektivní degradér CDK6, v rozporu s těmito výsledky (De Dominici, 2020).

Na rozdíl od **YX** způsobila látka **BSJ** podle předpokladů selektivní degradaci CDK6 po 6 i 24hodinovém ovlivnění buněk s nejvyšší účinností rovněž v koncentracích 0,1 a 1,0  $\mu\text{M}$ . Hladina CDK4 nebyla ovlivněna, což se shoduje i s publikovanou selektivní degradací CDK6 u buněčných linií AML (Brand, 2019).

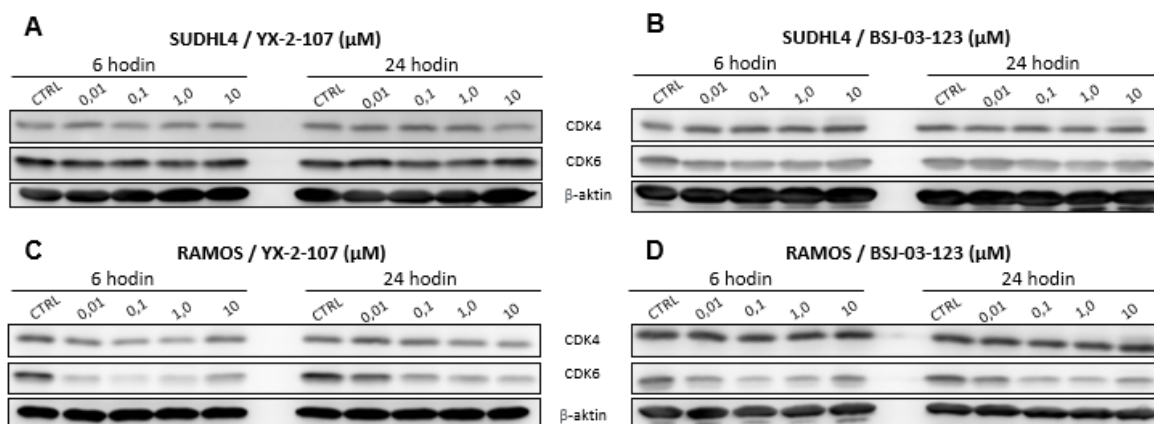
Těmito výsledky bylo potvrzeno, že PROTAC molekuly mají významnou schopnost přetvořit původně duální CDK4/6 kinasové inhibitory v selektivnější degradéry schopné degradovat obě nebo pouze jednu z vysoce homologních CDK. Odlišnosti v selektivitě jsou pak přisuzovány, podobně jako odlišná účinnost, jejich celkovému strukturnímu složení. Jelikož jsou obě látky založeny na struktuře palbociclibu a thalidomidu, jejich odlišná selektivita tedy může být vysvětlena rozdílným složením a délkou linkeru. **BSJ** nese polyetylenglykolový linker, který byl již v jiné studii spojován se selektivní degradací CDK6, zatímco PROTAC s alkylovým linkerem, který se vyskytuje také ve struktuře **YX**, účinně degradoval obě kinasy (Jiang, 2019), což koreluje s dosaženými výsledky v této práci. Alkylový linker je přítomen také ve struktuře publikovaného degradéru pal-pom (Zhao, 2019) nebo BSJ-03-204 (Jiang, 2019), které také degradují CDK4 i CDK6 se stejnou účinností. Su a kol. však vyvinuli řadu dalších na palbociclibu založených PROTAC s alkylovým linkerem, které byly schopny degradovat selektivně pouze CDK6 (Su, 2019). Ačkoli má tedy složení a délka linkeru na selektivní degradaci cílového proteinu značný vliv, působení těchto faktorů na selektivitu PROTAC vůči molekulárnímu cíli není zcela jednoznačné a pro objasnění bude zapotřebí dalších studií v této oblasti.

Další z vysvětlení selektivity **BSJ** vůči CDK6 by mohlo být založeno na tvorbě stabilního ternárního komplexu PROTAC s CRBN a CDK6, ale nikoli s CDK4. To může mít souvislost se strukturními rozdíly mezi CDK4 a 6 (Brand, 2019), jelikož rozmístění a počet lysinových zbytků v jejich ATP vazebné doméně, které jsou ubikvitinovány E3 ligasou, se u CDK4 a CDK6 liší i přes jejich jinak vysoce homologní strukturu. Jedním z faktorů majících vliv na schopnost degradace molekulárního cíle, který by mohl ovlivňovat i selektivitu vůči CDK6 oproti CDK4, by také mohl být zapříčiněn rychlejší deubikvitinací CDK4 oproti CDK6. Strukturní modifikace palbociclibu, který jakožto CDK4/6i vykazuje podobnou afinitu k CDK4 i CDK6, také vedly ke zvýšení selektivity PROTAC vůči CDK6 (Rana, 2019).

Dále bylo pozorováno, že zejména po 6hodinovém ovlivnění buněk nedošlo v nejvyšší testované koncentraci 10  $\mu\text{M}$  k tak účinné degradaci CDK6 u obou testovaných látek (**Obrázek 6; C a D**), potažmo CDK4 u **YX** (**Obrázek 6; C**), jak by se s vyšší koncentrací dalo očekávat. Tento jev, který byl pozorován také u dalších studií zabývajících se PROTAC, lze vysvětlit tzv. Hookovým efektem, kdy při vysokých koncentracích dochází k prioritní tvorbě binárních komplexů PROTAC molekul s cílovou CDK nebo s odpovídající E3 ligasou, v důsledku čehož je zabráněno tvorbě ternárních komplexů CDK s PROTAC



a E3 ligasou, které umožňují ubiquitinaci kinasy a její degradaci proteasomem (Rana, 2019).



Obrázek 6: Vliv PROTAC na hladiny proteinů CDK4 a CDK6 v buněčné linii RAMOS ovlivněné **YX-2-107** (A) a **BSJ-03-123** (B) a v linii SUDHL4 po ovlivnění **YX-2-107** (C) a **BSJ-03-123** (D) po dobu 6 a 24 hodin v koncentracích 0,01; 0,1; 1,0 a 10  $\mu\text{M}$

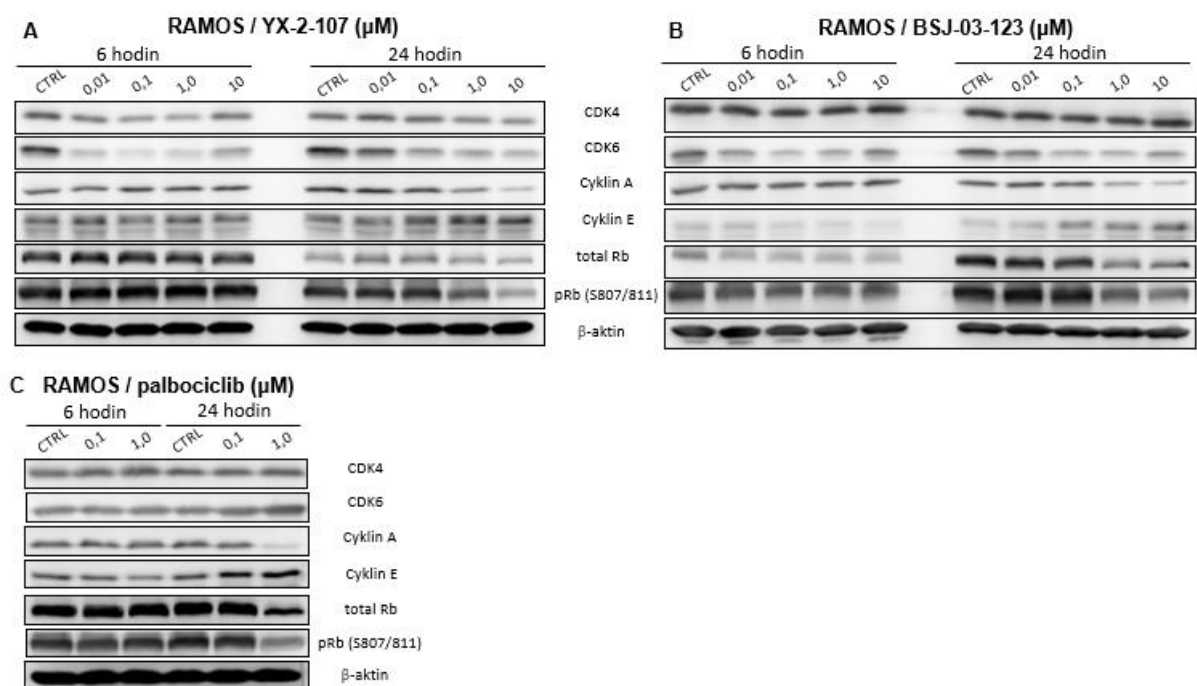
### 6.3 Molekulární účinky PROTAC a výchozí molekuly palbociclibu

V odezvě na mitogenní signály komplex CDK4/6 s cykliny rodiny D indukuje fosforylaci Rb na serinu 807 a 811 (Ser807/811), čímž dochází k uvolnění transkripční faktorů E2F, k následné expresi cyklinu E a k průchodu buňky G1 restričním bodem. V S fázi dochází k expresi cyklinu A, se kterým vytváří komplex CDK2, a společně zodpovídají za expresi genů nezbytných pro další progresi buněčného cyklu (Weinberg, 1995; Lim, 2013). Inhibice, nebo degradace CDK4/6 vede k potlačení těchto signálních drah a k zablokování buněčného cyklu v G1 fázi (Hafner, 2019; Brand, 2019; De Dominicis, 2020).

Z tohoto důvodu byly následně pozorovány změny v hladinách nebo fosforylaci těchto proteinů podílejících se na regulaci progresu buněčného cyklu, ke kterým došlo vlivem působení studovaných PROTAC molekul **YX** a **BSJ** a které byly porovnány s katalytickou inhibicí kinasové aktivity CDK4/6 palbociclibem. Linie RAMOS byla ovlivněna látkami po dobu 6 a 24 hodin a následně byly analyzovány změny metodou western blottingu s následnou imunodetekcí (**Obrázek 7**). Ovlivnění buněk palbociclibem v koncentraci 1  $\mu\text{M}$  po dobu 24 hodin účinně zabránilo fosforylaci Rb, aniž by došlo ke snížení hladiny CDK4/6 (**Obrázek 7; C**). Tento výsledek byl v souladu s očekávaným předpokladem, jelikož palbociclib potlačuje progresi buněčného cyklu v G1 fázi inhibicí kinasové aktivity CDK4/6, aniž by způsobil jejich degradaci. Zablokování buněčného cyklu v G1 fázi rovněž odpovídalo kumulaci cyklinu E a poklesu hladiny cyklinu A (Klein, 2018; Hafner, 2019).

Navíc byl po působení palbociclibu pozorován nárůst hladiny CDK6, což je jeden z popsanych mechanismů, pomocí něhož dochází k rozvoji rezistence vůči CDK4/6i (Yang, 2017; Asghar, 2017; Cornell, 2019). Tento efekt ovšem nebyl pozorován u testovaných PROTAC molekul, u kterých naopak docházelo k degradaci CDK6 (**Obrázek 7; A a B**), což

naznačuje, že degradéry by mohly představovat účinný přístup, který je schopen překonat tento negativní jev často doprovázející léčbu klasickými CDK4/6i. Nicméně srovnatelné poklesy fosforylace Rb (Ser807/811) a změny v hladinách cyklinu A a E s účinky 1 $\mu$ M palbociclibu byly pozorovány v případě PROTAC molekul až při jejich 10 $\mu$ M koncentraci (**Obrázek 7**). Tento výsledek ukazuje nižší účinnost obou PROTAC, které prostřednictvím degradace kinas nejsou schopny ve stejné koncentraci potlačit progresi buněčného cyklu v porovnání s pouhou inhibicí kinasové aktivity CDK4/6 prostřednictvím palbociclibu. Tato data jsou opět v rozporu s výsledky dosaženými u buněk ALL a AML, kde oba PROTAC konjugáty vykazovaly srovnatelnou nebo dokonce lepší účinnost při potlačení buněčné proliferace oproti palbociclibu (De Dominici, 2020; Brand, 2019).



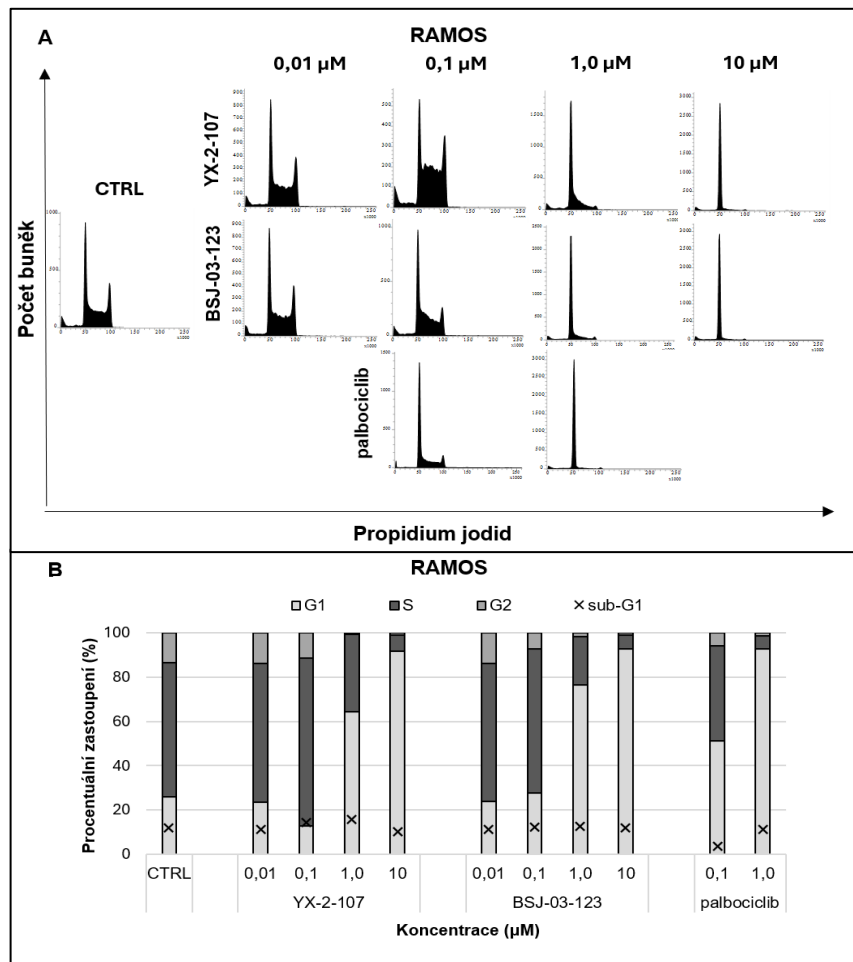
Obrázek 7: Porovnání vlivu PROTAC **YX-2-107** (A), **BSJ-03-123** (B) a palbociclibu (C) na hladiny nebo fosforylace proteinů podílejících se na regulaci progresu buněčného cyklu na linii RAMOS ovlivněné po dobu 6 a 24 hodin v koncentracích PROTAC 0,01; 0,1; 1,0 a 10  $\mu$ M a palbociclibu 0,1 a 1,0  $\mu$ M

#### 6.4 Vliv PROTAC na buněčný cyklus v porovnání s palbociclibem

Dále byl hodnocen vliv **YX** a **BSJ** na distribuci buněk linie RAMOS v rámci buněčného cyklu v porovnání s účinkem palbociclibu prostřednictvím průtokové cytometrie. Buňky byly ovlivněny látkami po dobu 24 hodin, poté zafixovány a buněčná DNA byla vizualizována barvením propidium jodidem (**Obrázek 8**). Na základě histogramů lze u buněk ovlivněných palbociclibem pozorovat postupný G1 blok již při 0,1 $\mu$ M koncentraci (**Obrázek 8; A**), což odpovídá inhibici kinasové aktivity CDK4/6 zapříčiňující neschopnost buněk postoupit do S fáze (Hafner, 2019).

U obou testovaných PROTAC molekul byla pozorována stejná míra indukce G1 bloku až při koncentraci 1,0  $\mu\text{M}$ . Tento výsledek potvrdil nižší účinnost obou PROTAC z předchozích experimentů, ve kterých **YX** i **BSJ** rovněž dosahovaly nižší účinnosti na snížení fosforylace Rb (Ser807/811) (**Obrázek 7**), ovšem nikoliv s publikovanými daty na buněčných liniích ALL a AML, kde testované PROTAC dosahovaly podobné nebo lepší účinnosti při zablokování buněčného cyklu v G1 fázi v porovnání s jejich výchozí molekulou, palbociclibem (De Dominici, 2020; Brand, 2019).

U žádné z testovaných látek nedošlo k výrazné indukci apoptózy (**Obrázek 8; B**). Tento výsledek koreluje s daty získanými na buněčných liniích MCL ovlivněných palbociclibem (Marzec, 2006) a AML ovlivněných BSJ (Brand, 2019), ale je v rozporu s výsledky dosaženými u buněk ALL, kde degradace CDK6 prostřednictvím YX vyvolala zvýšení apoptózy (De Dominici, 2020).



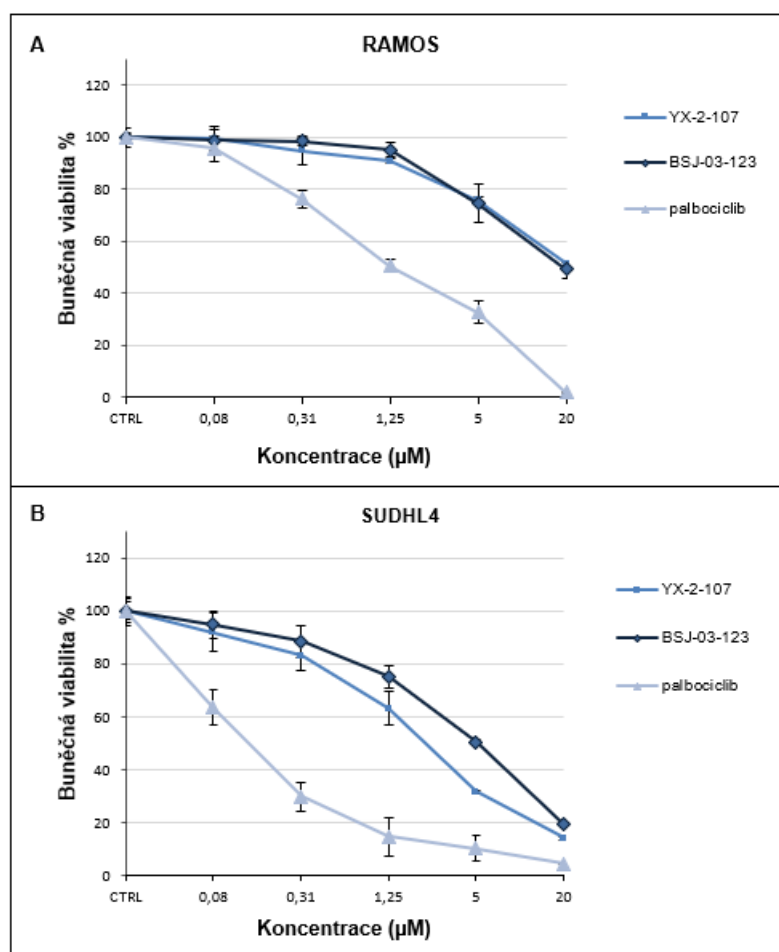
Obrázek 8: Histogramy zastoupení buněk linie RAMOS ve fázích buněčného cyklu po jejich 24hodinovém ovlivnění látkami **YX-2-107**, **BSJ-03-123** a palbociclibem (A); Grafické znázornění procentuálního zastoupení buněk získané zpracováním histogramů prostřednictvím programu ModFit LT 5.0 (B)

### 6.4.1 Stanovení buněčné viability

Pro srovnání vlivu testovaných PROTAC molekul s palbociclibem na proliferaci buněk byla linie RAMOS ovlivněna po dobu 72 hodin testovanými látkami **YX**, **BSJ** nebo palbociclibem v koncentrační řadě 0,08  $\mu\text{M}$  – 20  $\mu\text{M}$  (**Obrázek 9**). Stanovení buněčné viability bylo založeno na absolutním počítání buněk průtokovou cytometrií s využitím barvení propidium jodidem, díky kterému bylo možné odlišit živé a mrtvé buňky. Absolutní hodnoty počtu ovlivněných buněk byly normalizovány vůči počtu kontrolních buněk a byla tak stanovena procentuální viabilita ve vzorku.

Většina dosavadních studií stanovuje viabilitu buněk po jejich ovlivnění na základě metabolické aktivity zaměřené na konečný stav. V případě CDK4/6i však dochází k zastavení buněčné proliferace v G1 fázi, nicméně je zachována mitochondriální aktivita. Při analýze metodami založenými na stanovení metabolické aktivity se buňky proto jeví jako méně citlivé a to zejména u cytostaticky působících CDK4/6i. Z těchto důvodů bylo tedy vhodnější zvolit test založený na absolutní kvantifikaci buněk vykazující vyšší přesnost, jelikož nedochází ke zkreslení výsledků metabolickou aktivitou (Foy, 2024).

Na základě cytometrického stanovení viability ovlivněných buněk linií RAMOS (**Obrázek 9; A**) a SUDHL4 (**Obrázek 9; B**) byla pro testované látky stanovena inhibiční koncentrace potřebná ke snížení viability buněk na 50 % ( $\text{IC}_{50}$ ) oproti kontrole. V případě linie RAMOS dosahovaly hodnoty  $\text{IC}_{50}$  pro **YX** >20  $\mu\text{M}$  a pro **BSJ** 18,205  $\mu\text{M}$ , z čehož plyne jejich srovnatelný vliv na viabilitu, který byl pozorován i u linie SUDHL4, kde **YX** dosahoval nižší hodnoty  $\text{IC}_{50}$  (2,192  $\mu\text{M}$ ) než **BSJ** (5,190  $\mu\text{M}$ ). V porovnání s účinky palbociclibu na linii Ramos i SUDHL4 ( $\text{IC}_{50}$  = 1,660  $\mu\text{M}$  respektive 0,133  $\mu\text{M}$ ) byly oba PROTAC degradéry méně účinné. Tyto výsledky ukazují, že degradační působení PROTAC má menší vliv na viabilitu buněk než samotná kinasová inhibice CDK4/6 palbociclibem, ačkoliv v publikované studii na buňkách ALL dosahoval PROTAC **YX** méně jak poloviční hodnoty  $\text{IC}_{50}$  oproti palbociclibu a vykazoval tedy vyšší účinnost (De Dominici, 2020). Naopak účinek **BSJ** byl na základě publikovaných dat na buňkách AML slabší (Brand, 2019), což je v souladu s dosaženými výsledky průtokové cytometrie.



Obrázek 9: Buněčná viabilita linií RAMOS (A) a SUDHL4 (B) po ovlivnění **YX-2-107**, **BSJ-03-123** nebo palbociclibem (PD-0332991) po dobu 72 hodin; absolutní hodnoty počtu ovlivněných buněk byly normalizovány vůči počtu kontrolních buněk a byla stanovena procentuální viabilita

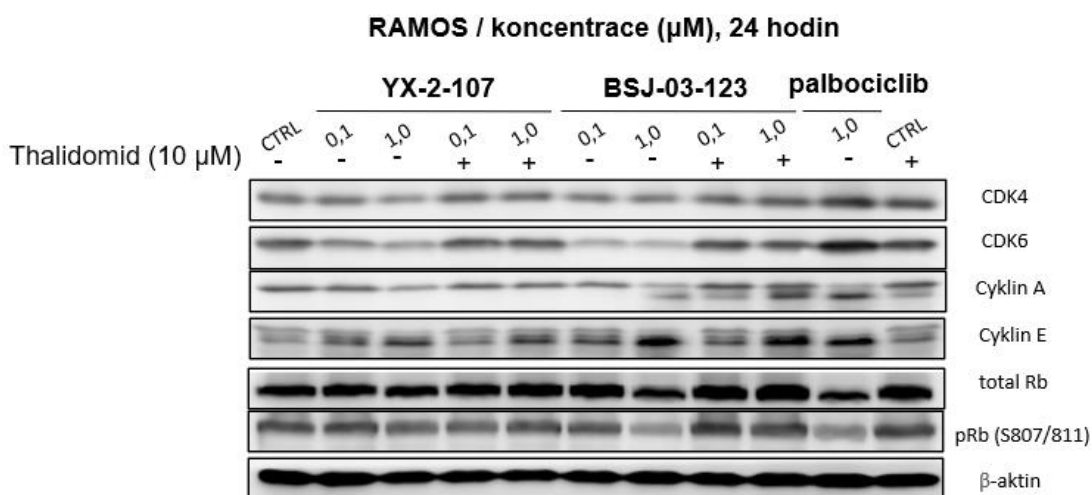
#### 6.4.2 Ověření mechanismu účinku přes kompetici s thalidomidem

Pro ověření, zda mechanismus účinku testovaných PROTAC molekul spočívá v proteasomální degradaci CDK4 a CDK6 prostřednictvím vazby na E3 ubikvitin ligasu, byly buňky linie RAMOS nejprve ošetřeny thalidomidem, který je substrátem CRL4<sup>CRBN</sup> ligasy stejně jako pomalidomid obsažený ve struktuře **YX** a **BSJ** (Fischer, 2014; De Dominicis, 2020; Brand, 2019). Po 2hodinové inkubaci s thalidomidem byly buňky ovlivněny testovanými PROTAC molekulami nebo palbociclibem a prostřednictvím imunodetekce bylo ověřeno, zda v případě kompetice látek s thalidomidem dochází k poklesu CDK4 nebo CDK6.

Na základě výsledků bylo zjištěno, že při ošetření buněk thalidomidem, byla díky kompetici thalidomidu s **YX** a **BSJ** potlačena proteasomální degradace CDK4/6, jelikož E3 ubikvitin ligasa již interagovala s thalidomidem, a tudíž nemohlo dojít k tvorbě komplexu testovaných PROTAC s touto E3 ligasou, následné polyubikvitinaci a degradaci CDK4/6 (**Obrázek 10**). Ačkoli bylo zabráněno degradaci CDK4/6, byly oba testované PROTAC

degradéry díky své výchozí molekule palbociclibu stále schopny v menší míře inhibovat kinasovou aktivitu CDK4/6, což lze pozorovat na snížení hladiny cyklinu A a zvýšení cyklinu E, které korespondují se zablokováním cyklu v G1 fázi a tudíž odpovídají působení palbociclibu. Fosforylace Rb však nebyla ovlivněna (**Obrázek 10**).

Tyto výsledky potvrzují mechanismus působení obou PROTAC molekul. Korelují také s publikovanými daty, jelikož zablokování vazby **YX** a **BSJ** na CRL4<sup>CRBN</sup> E3 ligasu kompeticí PROTAC s thalidomidem nebo lenalidomidem rovněž potlačilo schopnost PROTAC degradovat CDK6 u buněk ALL a AML (De Dominici, 2020; Brand, 2019). Obdobně pak kompetice **YX** s palbociclibem o vazbu na CDK6 taktéž zabránilo její proteasomální degradaci, což rovněž potvrdilo závislost mechanismu degradace CDK6 potažmo CDK4 na tvorbě ternárního komplexu cílový protein-PROTAC-CRL4<sup>CRBN</sup> (De Dominici, 2020).



Obrázek 10: Ověření mechanismu účinku **YX** a **BSJ** přes kompetici s thalidomidem na buněčné linii RAMOS ovlivněné 0,1 a 1,0 μM koncentracemi látek a koncentrací thalidomidu 10 μM v porovnání s působením palbociclibu

## 7 ZÁVĚR

Cílená degradace proteinů prostřednictvím heterobifunkčních PROTAC molekul je nová inovativní strategie a v současné době již bylo zkonstruováno několik takových PROTAC molekul, které jsou schopny degradovat CDK4 a/nebo CDK6. Jednou z výhod těchto molekul je, že jsou schopny z duálních inhibitorů CDK4 a CDK6 vytvořit selektivnější degradéry pouze jednoho z homologů. Vzhledem k nekinasovým funkcím zejména CDK6, které se podílejí na karcinogenitě a které nelze zacílit prostřednictvím ATP-kompetitivních CDK4/6i, ale také vzhledem k rozvoji rezistence při terapii nádorových onemocnění, se PROTAC degradéry jeví jako velice perspektivní přístup léčby rakoviny. Ovšem mechanismy, na nichž se zakládá selektivita těchto chimér, jsou zdá se vysoce komplexní, a je zapotřebí dalších studií.

V rámci experimentální části této bakalářské práce byly dvě PROTAC molekuly, YX-2-107 a BSJ-03-123, publikované jako selektivní degradéry CDK6, testovány na čtyřech lymfomových buněčných liniích. V rámci těchto linií vykazovaly PROTAC YX a BSJ rozdílnou účinnost degradace, jelikož ze čtyř testovaných linií, SUDHL4, DB, RAMOS a RAJI, byla degradace CDK6 pozorována pouze u linie RAMOS. Ačkoliv byly obě PROTAC molekuly publikovány jako účinné a selektivní CDK6 degradéry, na základě výsledků dosažených metodou western blottingu bylo zjištěno, že PROTAC YX degradoval nejen CDK6, ale také CDK4. Obě dvě testované látky také na základě dat z cytometrické analýzy nedosahovaly takových antiproliferačních účinků jako jejich výchozí molekula, palbociclib. Účinnost degradace studovaných PROTAC molekul YX a BSJ byla rovněž do značné míry ovlivněna použitou koncentrací i délkou inkubace, jelikož degradace CDK6 potažmo CDK4 ovlivnila hladiny proteinů podílejících se na regulaci buněčného cyklu až po 24hodinovém ovlivnění buněk při vyšších koncentracích testovaných PROTAC. Nicméně v nejvyšších koncentracích byl pozorován Hook efekt, který značně omezil degradaci CDK4/6 pomocí PROTAC.

Získané výsledky nekorelovaly s publikovanými daty, kde u buněk akutních forem leukémií vykazovaly obě PROTAC molekuly selektivní degradaci CDK6, která výrazně potlačovala proliferaci nádorových buněk v porovnání s inhibičním působením palbociclibu. Nicméně prostřednictvím kompetice testovaných PROTAC degradérů s thalidomidem byla potvrzena závislost mechanismu degradace CDK6 potažmo CDK4 na tvorbě ternárního komplexu PROTAC s těmito kinasami a CRL4<sup>CRBN</sup> E3 ligasou, která zajišťuje ubikvitinaci CDK4/6. Rovněž bylo dokázáno, že PROTAC díky své struktuře založené na CDK4/6i palbociclibu byly stále schopné částečně potlačovat kinasovou aktivitu CDK4/6.

Vzhledem k rozdílným účinkům v rámci testovaných linií, ale také ke koncentrační a časové závislosti degradace CDK4/6 prostřednictvím PROTAC, bude nutné zohlednit vliv

těchto faktorů v dalších biologických studiích a v klinických testech. Pro budoucí studie bude také klíčové objasnění mechanismů, které ovlivňují selektivitu, jelikož dosavadní výzkumy nejsou dostatečné anebo poskytují rozporuplné výsledky. Nicméně potenciál těchto heterobifunkčních degradérů je značný a rozšíření jejich využití nad rámec onkologických studií by mohlo mít významné využití také v základním výzkumu např. ke studiu molekulárních cílů vykazující vysokou homologii jako jsou CDK4 a CDK6. Jelikož funkce CDK4/6 nezávislé na jejich kinasové aktivitě jsou rovněž nedostatečně objasněny, mohly by PROTAC degradéry představovat možnou strategii i v tomto vědeckém odvětví.



## 8 CITOVANÁ LITERATURA

ABOULEISA, RRE, AM SALAMA, QH OU et al., 2022. Transient Cell Cycle Induction in Cardiomyocytes to Treat Subacute Ischemic Heart Failure. *CIRCULATION*. **145**(17), 1339-1355. ISSN 0009-7322. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.121.057641

ANDERS, L, N KE, P HYDBRING et al., 2011. A Systematic Screen for CDK4/6 Substrates Links FOXM1 Phosphorylation to Senescence Suppression in Cancer Cells. *CANCER CELL*. **20**(5), 620-634. ISSN 1535-6108. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2011.10.001

ARELLANO, M a S MORENO, 1997. Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY & CELL BIOLOGY*. **29**(4), 559-573. ISSN 1357-2725. Dostupné z: doi:10.1016/S1357-2725(96)00178-1

ASGHAR, US, AR BARR, R CUTTS et al., 2017. Single-Cell Dynamics Determines Response to CDK4/6 Inhibition in Triple-Negative Breast Cancer. *CLINICAL CANCER RESEARCH*. **23**(18), 5561-5572. ISSN 1078-0432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-0369

BEAVER, JA, L AMIRI-KORDESTANI, R CHARLAB et al., 2015. FDA Approval: Palbociclib for the Treatment of Postmenopausal Patients with Estrogen Receptor-Positive, HER2-Negative Metastatic Breast Cancer: Palbociclib for the Treatment of Postmenopausal Patients with Estrogen Receptor-Positive, HER2-Negative Metastatic Breast Cancer. *CLINICAL CANCER RESEARCH*. **21**(21), 4760-4766. ISSN 1078-0432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1185

BÉKÉS, M, DR LANGLEY a CM CREWS, 2022. PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue: the past is prologue. *NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY*. **21**(3), 181-200. ISSN 1474-1776. Dostupné z: doi:10.1038/s41573-021-00371-6

BISI, JE, JA SORRENTINO, JL JORDAN, DD DARR, PJ ROBERTS, FX TAVARES a JC STRUM, 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: 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**(26), 42343-42358. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.16216

BISI, JE, JA SORRENTINO, PJ ROBERTS, FX TAVARES a JC STRUM, 2016. Preclinical Characterization of G1T28: A Novel CDK4/6 Inhibitor for Reduction of Chemotherapy-Induced Myelosuppression: *MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS*. **15**(5), 783-793. ISSN 1535-7163. Dostupné z: doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-0775

BRADFORD, MM, 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*. **72**(1-2), 248-254. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1006/abio.1976.9999

BRAND, M, BS JIANG, S BAUER et al., 2019. Homolog-Selective Degradation as a Strategy to Probe the Function of CDK6 in AML. *CELL CHEMICAL BIOLOGY*. **26**(2), 300-3069. ISSN 2451-9448. Dostupné z: doi:10.1016/j.chembiol.2018.11.006

CEN, L, BL CARLSON, MA SCHROEDER et al., 2012. P16-Cdk4-Rb axis controls sensitivity to a cyclin-dependent kinase inhibitor PD0332991 in glioblastoma xenograft cells. *NEURO-ONCOLOGY*. **14**(7), 870-881. ISSN 1522-8517. Dostupné z: doi:10.1093/neuonc/nos114

CONDORELLI, R, L SPRING, J O'SHAUGHNESSY et al., 2018. Polyclonal RB1 mutations and acquired resistance to CDK 4/6 inhibitors in patients with metastatic breast cancer. *ANNALS OF ONCOLOGY*. **29**(3), 640-645. ISSN 0923-7534. Dostupné z: doi:10.1093/annonc/mdx784

CORNELL, L, SA WANDER, T VISAL, N WAGLE a GI SHAPIRO, 2019. MicroRNA-Mediated Suppression of the TGF- $\beta$  Pathway Confers Transmissible and Reversible CDK4/6 Inhibitor Resistance. *CELL REPORTS*. **26**(10), 2667-. ISSN 2211-1247. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2019.02.023

DAY, PJ, A CLEASBY, IJ TICKLE et al., 2009. Crystal structure of human CDK4 in complex with a D-type cyclin. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*. **106**(11), 4166-4170. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0809645106

DE DOMINICI, M, P PORAZZI, AR SOLIERA et al., 2018. Targeting CDK6 and BCL2 Exploits the "MYB Addiction" of PhSUP+/SUP Acute Lymphoblastic Leukemia. *CANCER*

*RESEARCH*. **78**(4), 1097-1109. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-2644

DE DOMINICI, M, P PORAZZI, YC XIAO et al., 2020. Selective inhibition of Ph-positive ALL cell growth through kinase-dependent and -independent effects by CDK6-specific PROTACs. *BLOOD*. **135**(18), 1560-1573. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood.2019003604

DENG, JH, ES WANG, RW JENKINS et al., 2018. CDK4/6 Inhibition Augments Antitumor Immunity by Enhancing T-cell Activation. *CANCER DISCOVERY*. **8**(2), 216-233. ISSN 2159-8274. Dostupné z: doi:10.1158/2159-8290.CD-17-0915

DHILLON, S, 2021. Trilaciclib: First Approval: First Approval. *DRUGS*. **81**(7), 867-874. ISSN 0012-6667. Dostupné z: doi:10.1007/s40265-021-01508-y

DICKLER, MN, SM TOLANEY, HS RUGO et al., 2017. MONARCH 1, A Phase II Study of Abemaciclib, a CDK4 and CDK6 Inhibitor, as a Single Agent, in Patients with Refractory HRSUP+/SUP/HER2SUP-/SUP Metastatic Breast Cancer. *CLINICAL CANCER RESEARCH*. **23**(17), 5218-5224. ISSN 1078-0432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-0754

FENG, XH, X LIN a R DERYNCK, 2000. Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15<sup>i</sup>INK4B/SUP/i transcription in response to TGF- $\beta$ . *EMBO JOURNAL*. **19**(19), 5178-5193. ISSN 0261-4189. Dostupné z: doi:10.1093/emboj/19.19.5178

FISCHER, ES, K BÖHM, JR LYDEARD et al., 2014. Structure of the DDB1-CRBN E3 ubiquitin ligase in complex with thalidomide. *NATURE*. **512**(7512), 49-. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature13527

FOY, R, KX LEW a AT SAURIN, 2024. The search for CDK4/6 inhibitor biomarkers has been hampered by inappropriate proliferation assays. *NPJ BREAST CANCER*. **10**(1). ISSN 2374-4677. Dostupné z: doi:10.1038/s41523-024-00624-8

FRY, DW, PJ HARVEY, PR KELLER et al., 2004. Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS*. **3**(11), 1427-1437. ISSN 1535-7163.

FUJIMOTO, T, K ANDERSON, SEW JACOBSEN, S NISHIKAWA a C NERLOV, 2007. Cdk6 blocks myeloid differentiation by interfering with Runx1 DNA binding and Runx1-C/EBP $\alpha$  interaction. *EMBO JOURNAL*. **26**(9), 2361-2370. ISSN 0261-4189. Dostupné z: doi:10.1038/sj.emboj.7601675

GELBERT, LM, SF CAI, X LIN et al., 2014. Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219: in-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine: in-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine. *INVESTIGATIONAL NEW DRUGS*. **32**(5), 825-837. ISSN 0167-6997. Dostupné z: doi:10.1007/s10637-014-0120-7

GOEL, S, MJ DECRISTO, AC WATT et al., 2017. CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity. *NATURE*. **548**(7668), 471-. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature23465

HAFNER, M, CE MILLS, K SUBRAMANIAN et al., 2019. Multiomics Profiling Establishes the Polypharmacology of FDA-Approved CDK4/6 Inhibitors and the Potential for Differential Clinical Activity. *CELL CHEMICAL BIOLOGY*. **26**(8), 1067-. ISSN 2451-9448. Dostupné z: doi:10.1016/j.chembiol.2019.05.005

HENDRYCHOVÁ, D, R JORDA a V KRYSTOF, 2021. How selective are clinical CDK4/6 inhibitors?. *MEDICINAL RESEARCH REVIEWS*. **41**(3), 1578-1598. ISSN 0198-6325. Dostupné z: doi:10.1002/med.21769

HE, SH, PJ ROBERTS, JA SORRENTINO et al., 2017. Transient CDK4/6 inhibition protects hematopoietic stem cells from chemotherapy-induced exhaustion. *SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE*. **9**(387). ISSN 1946-6234. Dostupné z: doi:10.1126/scitranslmed.aal3986

HU, MG, A DESHPANDE, M ENOS et al., 2009. A Requirement for Cyclin-Dependent Kinase 6 in Thymocyte Development and Tumorigenesis. *CANCER RESEARCH*. **69**(3), 810-818. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2473

CHEN, P, NV LEE, WY HU et al., 2016. Spectrum and Degree of CDK Drug Interactions Predicts Clinical Performance. *MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS*. **15**(10), 2273-2281. ISSN 1535-7163. Dostupné z: doi:10.1158/1535-7163.MCT-16-0300

CHIRIVELLA, L, M KIRSTEIN, SR FERRÓN et al., 2017. Cyclin-Dependent Kinase 4 Regulates Adult Neural Stem Cell Proliferation and Differentiation in Response to Insulin. *STEM CELLS*. **35**(12), 2403-2416. ISSN 1066-5099. Dostupné z: doi:10.1002/stem.2694

IWATA, H, EP HAMILTON, CX MA et al., 2023. Global phase III studies evaluating vepdegestrant in estrogen receptor (ER) plus /human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)- advanced breast cancer: VERITAC-2 and VERITAC-3: VERITAC-2 and VERITAC-3. *ANNALS OF ONCOLOGY*. **34**, 1493-1493. ISSN 0923-7534. Dostupné z: doi:10.1016/j.annonc.2023.10.207

JIANG, BS, ES WANG, KA DONOVAN, YK LIANG, ES FISCHER, TH ZHANG a NS GRAY, 2019. Development of Dual and Selective Degraders of Cyclin-Dependent Kinases 4 and 6. *ANGEWANDTE CHEMIE-INTERNATIONAL EDITION*. **58**(19), 6321-6326. ISSN 1433-7851. Dostupné z: doi:10.1002/anie.201901336

JIA, WZ, XP ZHAO, L ZHAO, H YAN, JJ LI, H YANG, G HUANG a JJ LIU, 2018. Non-canonical roles of PFKFB3 in regulation of cell cycle through binding to CDK4. *ONCOGENE*. **37**(13), 1685-1698. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/s41388-017-0072-4

JONES, RG a CB THOMPSON, 2009. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth: a recipe for cancer growth. *GENES & DEVELOPMENT*. **23**(5), 537-548. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.1756509

KAUR, G, M STETLERSTEVENSON, S SEBERS et al., 1992. GROWTH-INHIBITION WITH REVERSIBLE CELL-CYCLE ARREST OF CARCINOMA-CELLS BY FLAVONE-L86-8275. *Journal of the national cancer institute*. **84**(22), 1736-1740. ISSN 0027-8874. Dostupné z: doi:10.1093/jnci/84.22.1736

KIM, ES, 2017. Abemaciclib: First Global Approval: First Global Approval. *DRUGS*. **77**(18), 2063-2070. ISSN 0012-6667. Dostupné z: doi:10.1007/s40265-017-0840-z

KLEIN, ME, M KOVATCHEVA, LE DAVIS, WD TAP a A KOFF, 2018. CDK4/6 Inhibitors: The Mechanism of Action May Not Be as Simple as Once Thought: The Mechanism of Action May Not Be as Simple as Once Thought. *CANCER CELL*. **34**(1), 9-20. ISSN 1535-6108. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccell.2018.03.023

KOLLMANN, K, G HELLER, C SCHNECKENLEITHNER et al., 2013. A Kinase-Independent Function of CDK6 Links the Cell Cycle to Tumor Angiogenesis. *CANCER CELL*. **24**(2), 167-181. ISSN 1535-6108. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2013.07.012

KOVATCHEVA, M, W LIAO, ME KLEIN et al., 2017. ATRX is a regulator of therapy induced senescence in human cells. *NATURE COMMUNICATIONS*. **8**. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-017-00540-5

KOVATCHEVA, M, DD LIU, MA DICKSON et al., 2015. MDM2 turnover and expression of ATRX determine the choice between quiescence and senescence in response to CDK4 inhibition. *ONCOTARGET*. **6**(10), 8226-8243. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.3364

LEONARD, John P., Ann S. LACASCE, Mitchell R. SMITH et al., 2012. Selective CDK4/6 inhibition with tumor responses by PD0332991 in patients with mantle cell lymphoma. *Blood* [online]. **119**(20), 4597-4607 [cit. 2024-04-22]. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2011-10-388298

LIM, SH a P KALDIS, 2013. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation: roles beyond cell cycle regulation. *DEVELOPMENT*. **140**(15), 3079-3093. ISSN 0950-1991. Dostupné z: doi:10.1242/dev.091744

LIN, S, XD ZHAO, TS LI et al., 2019. FCN-437: A novel, potent and selective oral inhibitor of CDK4/6 for the treatment of solid tumors: A novel, potent and selective oral inhibitor of CDK4/6 for the treatment of solid tumors. *CANCER RESEARCH*. **79**(13). ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/1538-7445.AM2019-4425

LIN, TC, 2020. RUNX1 and cancer. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-REVIEWS ON CANCER*. **1877**(3). ISSN 0304-419X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbcan.2022.188715

LOPEZ-MEJIA, Isabel C., Sylviane LAGARRIGUE, Albert GIRALT et al., 2017. CDK4 Phosphorylates AMPK $\alpha$ 2 to Inhibit Its Activity and Repress Fatty Acid Oxidation. *Molecular Cell* [online]. **68**(2), 336-3496 [cit. 2024-03-10]. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2017.09.034

LU, H a U SCHULZE-GAHMEN, 2006. Toward understanding the structural basis of cyclin-dependent kinase 6 specific inhibition. *JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY*. **49**(13), 3826-3831. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm0600388

MALUMBRES, M, 2014. Cyclin-dependent kinases. *GENOME BIOLOGY*. **15**(6). ISSN 1465-6906. Dostupné z: doi:10.1186/gb4184

MALUMBRES, M, E HARLOW, T HUNT et al., 2009. Cyclin-dependent kinases: a family portrait: a family portrait. *NATURE CELL BIOLOGY*. **11**(11), 1275-1276. ISSN 1465-7392. Dostupné z: doi:10.1038/ncb1109-1275

MARZEC, M, M KASPRZYCKA, R LAI et al., 2006. Mantle cell lymphoma cells express predominantly cyclin D1a isoform and are highly sensitive to selective inhibition of CDK4 kinase activity. *BLOOD*. **108**(5), 1744-1750. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2006-04-016634

MATSUURA, I, NG DENISSOVA, GN WANG, DM HE, JY LONG a F LIU, 2004. Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *NATURE*. **430**(6996), 226-231. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature02650

PARK, HJ, JR CARR, ZB WANG et al., 2009. FoxM1, a critical regulator of oxidative stress during oncogenesis. *EMBO JOURNAL*. **28**(19), 2908-2918. ISSN 0261-4189. Dostupné z: doi:10.1038/emboj.2009.239

PETRYLAK, DP, B GARMEZY, J SHEN et al., 2023. Phase I/II study of bavdegalutamide, a PROTAC androgen receptor (AR) degrader in metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC): Radiographic progression-free survival (rPFS) in patients (pts) with AR ligand-binding domain (LBD) mutations: Radiographic progression-free survival (rPFS) in patients (pts) with AR ligand-binding domain (LBD) mutations. *ANNALS OF ONCOLOGY*. **34**, 973-974. ISSN 0923-7534. Dostupné z: doi:10.1016/j.annonc.2023.09.2751

PU, CL, YY LIU, R DENG et al., 2023. Development of PROTAC degrader probe of CDK4/6 based on DCAF16. *BIOORGANIC CHEMISTRY*. **138**. ISSN 0045-2068. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioorg.2023.106637

QI, Jiating a Zhuqing OUYANG, 2022. Targeting CDK4/6 for Anticancer Therapy. *Biomedicines* [online]. **10**(3) [cit. 2024-04-13]. ISSN 2227-9059. Dostupné z: doi:10.3390/biomedicines10030685

RANA, S, M BENDJENNAT, S KOUR, HM KING, S KIZHAKE, M ZAHID a A NATARAJAN, 2019. Selective degradation of CDK6 by a palbociclib based PROTAC. *BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS*. **29**(11), 1375-1379. ISSN 0960-894X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmcl.2019.03.035

RAUB, TJ, GN WISHART, P KULANTHAIVEL et al., 2015. Brain Exposure of Two Selective Dual CDK4 and CDK6 Inhibitors and the Antitumor Activity of CDK4 and CDK6 Inhibition in Combination with Temozolomide in an Intracranial Glioblastoma Xenograft. *DRUG METABOLISM AND DISPOSITION*. **43**(9), 1360-1371. ISSN 0090-9556. Dostupné z: doi:10.1124/dmd.114.062745

ROSKOSKI, R Jr, 2019. Cyclin-dependent protein serine/threonine kinase inhibitors as anticancer drugs. *PHARMACOLOGICAL RESEARCH*. **139**, 471-488. ISSN 1043-6618. Dostupné z: doi:10.1016/j.phrs.2018.11.035

SAKAMOTO, KM, KB KIM, A KUMAGAI, F MERCURIO, CM CREWS a RJ DESHAIES, 2001. Protacs: Chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation: Chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*. **98**(15), 8554-8559. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.141230798

SCHEICHER, R, A HOELBL-KOVACIC, F BELLUTTI et al., 2015. CDK6 as a key regulator of hematopoietic and leukemic stem cell activation. *BLOOD*. **125**(1), 90-101. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2014-06-584417

STAMATERIS, Rachel E., Huguet V. LANDA-GALVAN, Rohit B. SHARMA, Christine DARKO, David REDMOND, Sushil G. RANE a Laura C. ALONSO, 2023. Noncanonical CDK4 signaling rescues diabetes in a mouse model by promoting  $\beta$  cell differentiation. *Journal of Clinical Investigation* [online]. **133**(18), 13318 [cit. 2024-03-18]. ISSN 1558-8238. Dostupné z: doi:10.1172/JCI166490



STEINEBACH, C, YLD NG, I SOSIC et al., 2020. Systematic exploration of different E3 ubiquitin ligases: an approach towards potent and selective CDK6 degraders: an approach towards potent and selective CDK6 degraders. *CHEMICAL SCIENCE*. **11**(13), 3474-3486. ISSN 2041-6520. Dostupné z: doi:10.1039/d0sc00167h

SU, S, ZM YANG, HY GAO et al., 2019. Potent and Preferential Degradation of CDK6 via Proteolysis Targeting Chimera Degradation. *JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY*. **62**(16), 7575-7582. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jmedchem.9b00871

SYED, YY, 2017. Ribociclib: First Global Approval: First Global Approval. *DRUGS*. **77**(7), 799-807. ISSN 0012-6667. Dostupné z: doi:10.1007/s40265-017-0742-0

TADESSE, S, MF YU, M KUMARASIRI, BT LE a SD WANG, 2015. Targeting CDK6 in cancer: State of the art and new insights: State of the art and new insights. *CELL CYCLE*. **14**(20), 3220-3230. ISSN 1538-4101. Dostupné z: doi:10.1080/15384101.2015.1084445

UZHACHENKO, RV, V BHARTI, ZF OUYANG et al., 2021. Metabolic modulation by CDK4/6 inhibitor promotes chemokine-mediated recruitment of T cells into mammary tumors. *CELL REPORTS*. **35**(1). ISSN 2211-1247. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2021.108944

VANARSDALE, T, C BOSHOF, KT ARNDT a RT ABRAHAM, 2015. Molecular Pathways: Targeting the Cyclin D-CDK4/6 Axis for Cancer Treatment: Targeting the Cyclin D-CDK4/6 Axis for Cancer Treatment. *CLINICAL CANCER RESEARCH*. **21**(13), 2905-2910. ISSN 1078-0432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0816

VANDERWEL, SN, PJ HARVEY, DJ MCNAMARA et al., 2005. Pyrido[2,3-id/i]pyrimidin-7-ones as specific inhibitors of cyclin-dependent kinase 4. *JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY*. **48**(7), 2371-2387. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm049355+

WALKER, AJ, S WEDAM, L AMIRI-KORDESTANI et al., 2016. FDA Approval of Palbociclib in Combination with Fulvestrant for the Treatment of Hormone Receptor-Positive, HER2-Negative Metastatic Breast Cancer. *CLINICAL CANCER RESEARCH*. **22**(20), 4968-4972. ISSN 1078-0432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0493

WANDER, SA, O COHENT, XQ GONG et al., 2020. The Genomic Landscape of Intrinsic and Acquired Resistance to Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitors in Patients with

Hormone Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer. *CANCER DISCOVERY*. **10**(8), 1174-1193. ISSN 2159-8274. Dostupné z: doi:10.1158/2159-8290.CD-19-1390

WANG, HZ, BN NICOLAY, JM CHICK et al., 2017. The metabolic function of cyclin D3-CDK6 kinase in cancer cell survival. *NATURE*. **546**(7658), 426-. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature22797

WEINBERG, RA, 1995. The retinoblastoma protein and cell-cycle control. *CELL*. **81**(3), 323-330. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(95)90385-2

WU, XW, XB YANG, Y XIONG et al., 2021. Distinct CDK6 complexes determine tumor cell response to CDK4/6 inhibitors and degraders. *NATURE CANCER*. **2**(4), 429-. ISSN 2662-1347. Dostupné z: doi:10.1038/s43018-021-00174-z

XIAO, YN, L JIN, CL DENG et al., 2021. Inhibition of PFKFB3 induces cell death and synergistically enhances chemosensitivity in endometrial cancer. *ONCOGENE*. **40**(8), 1409-1424. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/s41388-020-01621-4

XU, B, J WANG, X LIU, J FANG, Z YAO a J WANG, 2019. A phase I study of XZP-3287, a novel oral CDK4/6 Inhibitor, administered on a continuous dosing schedule, in patients with advanced solid tumours. *ANNALS OF ONCOLOGY*. **30**, 123-123. ISSN 0923-7534.

YANG, C, Z LI, T BHATT et al., 2017. Acquired CDK6 amplification promotes breast cancer resistance to CDK4/6 inhibitors and loss of ER signaling and dependence. *ONCOGENE*. **36**(16), 2255-2264. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/onc.2016.379

YAN, JG, P ZHANG, J TAN et al., 2022. Cdk5 phosphorylation-induced SIRT2 nuclear translocation promotes the death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *NPJ PARKINSONS DISEASE*. **8**(1). ISSN 2373-8057. Dostupné z: doi:10.1038/s41531-022-00311-0

YAP, TA, C BASU, JW GOLDMAN et al., 2022. A first-in-human phase 1/2a dose escalation/expansion study of the first-in-class CDK2/4/6 inhibitor PF-06873600 alone or with endocrine therapy in patients with breast or ovarian cancer. *CANCER RESEARCH*. **82**(4). ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/1538-7445.SABCS21-P5-16-06

YOSHIDA, A, EK LEE a JA DIEHL, 2016. Induction of Therapeutic Senescence in Vemurafenib-Resistant Melanoma by Extended Inhibition of CDK4/6. *CANCER RESEARCH*. **76**(10), 2990-3002. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2931

ZHANG, X, LK NING, HS WU et al., 2023. Targeting CDK4/6 in glioblastoma ivia in situ/i injection of a cellulose-based hydrogel. *NANOSCALE*. **15**(30), 12518-12529. ISSN 2040-3364. Dostupné z: doi:10.1039/d3nr00378g

ZHANG, YX, E SICINSKA, JT CZAPLINSKI et al., 2014. Antiproliferative Effects of CDK4/6 Inhibition in iCDK4/i-Amplified Human Liposarcoma iln Vitro/i and iln Vivo/i. *MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS*. **13**(9), 2184-2193. ISSN 1535-7163. Dostupné z: doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0387

ZHAO, BS a K BURGESS, 2019. PROTACs suppression of CDK4/6, crucial kinases for cell cycle regulation in cancer. *CHEMICAL COMMUNICATIONS*. **55**(18), 2704-2707. ISSN 1359-7345. Dostupné z: doi:10.1039/c9cc00163h