

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Studium protinádorového účinku nových nízkomolekulárních inhibitorů PIKK

Monika Kulhavá

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program: Lékařská chemie a biochemie

Hradec Králové

2023

Disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního/kombinovaného studia doktorského studijního programu Lékařská chemie a biochemie na Ústavu lékařské biochemie Lékařské fakulty v Hradci Králové.

Autor: Ing. Monika Kulhavá
Ústav lékařské biochemie
Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova

Školitel: prof. MUDr. Martina Řezáčová, Ph.D.
Ústav lékařské biochemie
Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova

Oponenti: pplk. doc. MUDr. Jaroslav Pejchal, Ph.D. et Ph.D.
Katedra toxikologie a vojenské farmacie
Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany

prof. Ing. Jaromír Vinklárek, Dr.
Katedra obecné a anorganické chemie
Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR Lékařská chemie a biochemie dne v od hod.

Tato práce vznikla za podpory grantů:
GAUK 932516
Progres Q40/01
SVV-260397/2017

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové (tel. 495 816 134).

prof. MUDr. Martina Řezáčová, Ph.D.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Lékařská chemie a biochemie
Garant studijního programu

Obsah

Souhrn	4
Summary	5
Úvod do problematiky	6
Poškození molekuly DNA	6
Rodina PI3K	6
DNA-dependentní protein kinasa (DNA-PK).....	6
Cesty reparace dvouřetězcových zlomů DNA	7
Regulace buněčného cyklu	8
Apoptóza.....	9
Inhibitory DNA-PK	11
Cíle disertační práce.....	12
Materiál a metodika	13
Buněčné kultury a kultivační podmínky	13
Cytostatika	13
Stanovení cytotoxicity	13
Měření aktivity kaspas	14
Analýza buněčného cyklu	14
Elektroforéza a Western blotting	15
Hodnocení toxicity in vivo	15
Statistická analýza	15
Výsledky	16
Chinazoliny.....	16
Test buněčné viability na panelu buněčných linií.....	16
Stanovení IC50 doxorubicinu u buněk HT-29.....	18
Chemosenzitizační účinek inhibitorů	18
Aktivace kaspas a indukce apoptózy	20
Analýza buněčného cyklu.....	20
Změny v expresi proteinů.....	22
Hodnocení toxicity in vivo	23
Puriny	23
Proliferace a procentuální zastoupení živých buněk.....	23
Chemosenzitizační účinek inhibitorů	25
Diskuse.....	28
Závěr	32
Použitá literatura	33
Přehled publikační činnosti autora	37

Souhrn

Konvenční radioterapie a chemoterapie zasahují do základních funkcí dělicích se buněk a jsou velmi účinným prostředkem proti rychle proliferujícím nádorovým buňkám. Jsou stále nepostradatelným nástrojem v boji proti rakovině, ovšem jejich zásahy rovněž ovlivňují zdravé buňky a způsobují řadu nežádoucích účinků. Díky nestabilitě genomu nádorových buněk a častým mutacím může docházet ke zvýšené agresivitě a odolnosti k léčbě. Rezistence nádorů vůči léčbě je velmi závažným problémem. Mechanismů, kterými se buňky brání, existuje celá řada. Jednou ze základních příčin rezistence je přirozená schopnost všech buněk opravovat poškozenou DNA. To je na jednu stranu pro život buňky nepostradatelné, na druhou stranu tím snižují efekt chemoterapie či radioterapie, které jsou na principu způsobovat léze DNA založené. Drobné zásahy do signálních drah opravného systému buňky mohou přispět ke zvýšení účinnosti cytotoxické léčby.

DNA-PK je serin/threoninová kinasa, která je aktivována dvouřetězcovými zlomy DNA, jež jsou považovány za nejletálnější typ poškození způsobené radiací a některými chemoterapeutiky. Aktivace této kinasy spouští signální kaskády, které mohou vést k opravě DNA, zástavě buněčného cyklu nebo apoptóze. Inhibicí této kinasy můžeme docílit blokace opravného mechanismu, který byl spuštěn vlivem chemoterapeutika či radiačního záření. Nádorové buňky se vyznačují vysokou mírou proliferace a mají značnou rychlost metabolické aktivity. Tato skutečnost je pravděpodobně způsobem, kterým je inhibitor schopný zaměřit právě nádorové buňky a ne buňky zdravé.

Cílem disertační práce bylo studium cytotoxického efektu nově syntetizovaných chinazolinových a purinových derivátů *in vitro* za použití panelu nádorových buněčných linií a normálních lidských fibroblastů. Purinové deriváty byly podrobeny screeningu na deseti buněčných liniích a testovány jejich chemosezitivizační schopnosti. Cytotoxicita chinazolinových derivátů byla testována na panelu 17 buněčných linií a rovněž byla zkoumána schopnost potencovat účinky standardního chemoterapeutika doxorubicinu. Buněčná proliferace a viabilita byla sledována za pomoci WST-1 testu. Po základním screeningu byl vybrán nejúčinnější inhibitor 14d a nejvhodnější nádorová buněčná linie HT-29 pro detailnější studium molekulárních mechanismů účinku. Za pomoci sledování aktivity kaspas (-3/7, -8 a -9) bylo pozorováno zvýšení apoptotického účinku při kombinaci inhibitoru 14d s doxorubicinem. Vliv na buněčný cyklus byl stanoven průtokovou cytometrií a byla zaznamenána akumulace buněk v G2 fázi buněčného cyklu. Klíčové proteiny účastníci se zástavy růstu či indukce apoptózy byly detekovány elektroforeticky s následným Western blottingem. Cílem bylo vyloučit inhibici proteinů ATM a ATR, které se rovněž účastní opravných mechanismů. Byl sledován protein p53, Chk1 a Chk2. Protein p53, který slouží coby substrát pro ATM, byl vlivem kombinované léčby fosforylován na Ser 15. Dále jsme pozorovali fosforylaci Chk1 na Ser 345 a Chk2 na Thr 68. Jelikož jsou tyto kinasy aktivovány pomocí ATR či ATM, můžeme konstatovat, že námi testovaný inhibitor tyto dráhy neovlivňoval. Výzkumem *in vivo* na samicích outbredních myší byla stanovena maximální tolerovaná dávka. Projevila se relativně nízká toxicita studované látky. Inhibitor 14d se projevil jako velmi atraktivní sloučenina, která může sloužit jako templát pro syntézu dalších léčiv specifických pro inhibici DNA-PK.

Summary

Conventional radiotherapy and chemotherapy interfere with the basic functions of dividing cells and are very effective against rapidly proliferating tumor cells. They are still an indispensable tool in the fight against cancer, but their interventions also affect healthy cells and cause a number of side effects. Due to the instability of the genome of tumor cells and frequent mutations, increased aggressiveness and resistance to treatment can occur. Tumor resistance to treatment is a very serious problem. There are a number of mechanisms by which cells defend themselves. One of the fundamental causes of resistance is the natural ability of all cells to repair damaged DNA. On the one hand, this is indispensable for cell life. On the other hand, it reduces the effect of chemotherapy or radiotherapy, which are based on the principle of causing DNA lesions. Small interventions in the signaling pathways of the cell's repair system can contribute to increasing the effectiveness of cytotoxic treatment.

DNA-PK is serine/threonine kinase that is activated by DNA double-strand breaks which are considered the most lethal type of damage caused by radiation and some chemotherapy drugs. Activation of this kinase triggers signaling cascades that can lead to DNA repair, cell cycle arrest, or apoptosis. By inhibiting this kinase, we can block the repair mechanism that was activated by chemotherapy or radiation. Tumor cells are characterized by a high rate of proliferation and a considerable rate of metabolic activity. This fact is probably the way in which the inhibitor is able to target tumor cells and not healthy cells.

The aim of the dissertation was to study the cytotoxic effect of newly synthesized quinazoline and purine derivatives *in vitro* using a panel of tumor cell lines and normal human fibroblasts. Purine derivatives were screened on ten cell lines and tested for their chemosensitizing capabilities. Cytotoxicity of the quinazoline derivatives was tested on a panel of 17 cell lines and the ability to potentiate the effects of the standard chemotherapeutic drug doxorubicin was also investigated. Cell proliferation and viability were monitored using the WST-1 assay. After the basic screening, the most effective inhibitor 14d and the most suitable tumor cell line HT-29 were selected for a more detailed study of the molecular mechanisms of action. By monitoring the activity of caspases (-3/7, -8, -9), an increase in the apoptotic effect was observed when the inhibitor 14d was combined with doxorubicin. The effect on the cell cycle was determined by flow cytometry and the accumulation of cells in the G2 phase of the cell cycle was registered. Key proteins involved in growth arrest or induction of apoptosis were detected by electrophoresis followed by Western blotting. The aim was to exclude the inhibition of ATM and ATR proteins, which are also involved in repair mechanisms. Protein p53, Chk1 and Chk2 were monitored. The protein p53, which serves as a substrate for ATM, was phosphorylated on Ser 15 after combined treatment. Furthermore, we observed the phosphorylation of Chk1 on Ser 345 and Chk2 on Thr 68. Since these kinases are activated by ATR or ATM, we can state that the tested inhibitor did not affect these pathways. The maximum tolerated dose was determined by *in vivo* research on female outbred mice. The relatively low toxicity of the studied substance was manifested. Inhibitor 14d proved to be a very attractive compound that can serve as a template for the synthesis of other drugs specific for DNA-PK inhibition.

Úvod do problematiky

Poškození molekuly DNA

DNA eukaryotických buněk je neustále vystavena působení genotoxického stresu. Existuje mnoho typů poškození DNA, z nichž jsou pravděpodobně nejvíce nebezpečné dvouřetězcové zlomy (DNA double-strand breaks, DSBs) (Hakem 2008). Pokud není porucha správně opravena, může to mít za následek genomovou nestabilitu a buněčnou smrt. Proto je nutné, aby měly buňky opravný systém, který je schopen chybu identifikovat a účinně na ni reagovat. Existují dva základní směry odpovědi buňky na poškození dvoušroubovice DNA. Prvním je přechodná zástava buněčného cyklu v kontrolních bodech G1/S nebo G2/M, kdy má buňka čas na reparaci poškození. Druhý případ nastává, pokud jsou léze příliš rozsáhlé a dochází k odstranění poškozených buněk, především apoptózou (Hakem 2008, Kong et al. 2011, Tichy et al. 2007).

Rodina PI3K

Fosfatidylinositol-3-kinasy (PI3K) jsou rodinou příbuzných intracelulárních enzymů, které jsou zapojeny do mnohých buněčných procesů, jako je proliferace, diferenciace, metabolismus, motilita aj. Obvykle se dělí to tří tříd (I., II., III.) rozdělených podle struktury a funkce. Existuje ještě další skupina vzdáleněji příbuzných a strukturně heterogenních enzymů, které se podílejí na monitorování genomové integrity a kontrolní signalizaci za účelem regulace buněčného růstu. Tyto kinasy jsou označovány jako třída IV. (Courtney et al. 2010, Tichy et al. 2012).

V této práci se více zaměříme právě na IV. skupinu kinas, které jsou známé jako kinasy příbuzné fosfatidylinositol-3 kinase (phosphatidylinositol-3 kinase related kinases; PIKKs). Tato skupina serin/threoninových kinas zahrnuje u člověka šest členů - Ataxia-telangiectasia mutated (ATM), Ataxia-telangiectasia and Rad3-related (ATR), DNA-dependentní protein kinasa (DNA-PK), mammalian target of rapamycin (mTOR), suppressor of morphogenesis in genitalia (SMG-1) a transformation/transcription domain-associated protein (TRRAP) (Lempiäinen a Halazonetis 2009).

Na buněčné úrovni mají PIKKs mnohé biologické funkce. Do odpovědi na poškození DNA jsou zapojeny ATM, ATR a DNA-PKcs. Zatímco ATR je aktivována jednořetězcovými zlomy, ATM a DNA-PK reagují na zlomy dvouřetězcové (Tichy et al. 2012).

DNA-dependentní protein kinasa (DNA-PK)

DNA-PK se skládá z velké katalytické podjednotky DNA-PKcs a heterodimerního proteinu Ku. DNA-PKcs je jednou z největších dosud identifikovaných kinas (465 kDa) a je to enzym, jehož aktivita je absolutně závislá na vazbě k DNA (Neal a Meek 2011, Blackford a Jackson 2017).

DNA-PK je zapojena do různých procesů, od aktivace vrozené imunity po regulaci genové exprese. Ovšem její primární úlohou v buněčném metabolismu je zahájení efektivní opravy DSBs během nehomologního spojování konců - NHEJ (Meek et al. 2008). Aktivovaná DNA-PKcs fosforyluje *in vitro* řadu proteinů včetně p53, transkripčních faktorů, RNA polymerasy, Ku70/Ku80, XLF, Artemis, DNA-ligasy IV, H2AX (Tichy et al. 2012).

V místech volných konců DSBs dochází k navázání heterodimeru Ku, který poté navede katalytickou podjednotku DNA-PKcs k sobě do místa poškození a dojde ke zformování aktivní DNA-PK. DNA-PK tedy funguje jako senzor DSBs a její hlavní rolí je propagace NHEJ (Blackford a Jackson 2017).

Cesty reparace dvouřetězcových zlomů DNA

Stabilita genomu v reakci na dvouřetězcové zlomy je udržována prostřednictvím dvou evolučně konzervovaných opravných systémů, a to pomocí nehomologního spojování konců (NHEJ = non-homologous end-joining) a homologní rekombinací (HR = homologous recombination) (Kaspárek a Humphrey 2011). HR funguje v G2 a S fázi buněčného cyklu a využívá jako templát pro přesnou opravu DNA sesterské chromatidy. Naproti tomu NHEJ pracuje ve všech fázích buněčného cyklu a je primární cestou opravy DSB u buněk v G1 fázi (Hung et al. 2018).

Nehomologní spojování konců (NHEJ)

Mechanismus NHEJ je nekomplikovaný a je považován za nejpřímější proces opravy. Dochází v něm k přímému spojení konců DNA bez specifického požadavku na sekvenční homologii (Neal a Meek 2011). U savců vyžaduje klasická cesta NHEJ několik klíčových faktorů jako je DNA-PK (heterodimer Ku70/Ku80 a DNA-PKcs), Artemis, XRCC4 (the X ray cross complementing protein 4), XLF (the XRCC4-like factor), DNA ligasa IV a DNA polymerasa (Kaspárek a Humphrey 2011).

Zahajovací událostí pro NHEJ je rozpoznání a navázání volných konců DSB. Jako hlavní faktor vázající konce DNA v savčích buňkách byl biochemickými a genetickými studii identifikován komplex Ku. Dalším krokem opravného systému je interakce Ku navázaného k DNA s katalytickou podjednotkou DNA-PK (DNA-PKcs). Vznik tohoto komplexu je předpokladem pro aktivaci serin/threoninové kinasové aktivity. Dochází tak k vytvoření funkčního enzymu DNA-PK (Neal a Meek 2011, Lieber et al. 2003). Přítomnost velké molekuly DNA-PKcs brání přístupu nukleas a ligas k volným koncům DNA. Pro další postup mechanismu je proto potřeba, aby se DNA-PKcs odpojila či pozměnila. Předpokládá se, že odpojení molekuly je zprostředkováno díky její trans-autofosforylaci (Rezacova a Vavrova 2011). Tím dochází k disociaci komplexu DNA-Ku-DNA-PKcs. V této fázi může být zapojena endonukleasa Artemis, která je zodpovědná za ořezávání konců (Karagiannis a El-Osta 2004). Artemis je aktivována ATM a umožňuje, aby byly dvouřetězcové konce DNA opět připojeny pomocí NHEJ (Kao et al. 2005).

Poté, co byly konce náležitě zpracovány, musí dojít k jejich ligaci, aby byla oprava úspěšně dokončena. Faktorem, který spojuje volné konce DNA je DNA-ligasa IV tvořící komplex s XRCC4. Studie dále ukázaly roli dalšího faktoru při ligaci, a to XLF interagujícího s XRCC4 (Lieber et al. 2003, Neel a Meak 2011).

Homologní rekombinace (HR)

Homologní rekombinace je výměna genetické informace mezi alelickými sekvencemi a má zásadní roli jak v meióze, tak v mitóze (Lok a Powell 2012). Představuje klíčový systém opravující různé typy lézí DNA včetně dvouřetězcových zlomů, jednořetězcových mezer v DNA a meziretězcových křížení. Pro opravu DSBs používá přednostně nepoškozenou DNA na sesterské chromatidě, což vede k bezchybné opravě. Je aktivní pouze v S a G2 fázi buněčného cyklu, jelikož sesterské chromatidy jsou přítomny až po replikaci DNA (Helleday 2010).

Postup opravy DSBs homologní rekombinací je stručně řečeno takovýto: Po rozpoznání DSBs je HR zahájena restrikcí vlákna DNA v místě zlomu od 5' k 3' pomocí nukleas za vzniku 3' jednovláknových DNA. Na přesahující rameno se naváže RPA protein, který zajistí rozpletení sekundární struktury DNA. Po odstranění RPA vznikne nukleoproteinové vlákno tvořené proteinem Rad51 a jednořetězcovou DNA. Následuje vyhledání homologní sekvence, která slouží jako templát, a vmezeření se do ní. Invazí vlákna

do homologní sekvence se vytvoří tzv. D-smyčka a dojde k prodlužování invadujícího vlákna DNA polymerasou, která syntetizuje podle homologní sekvence nepoškozeného chromozomu. Následuje ligace konců DNA (Lok a Powell 2012, Delabaere et al. 2017).

Regulace buněčného cyklu

Buněčné dělení je přísně regulovaný proces zodpovědný za rozdělení buňky na dvě dceřiné. Sestává ze čtyř postupných fází (G1, S, G2 a M) a klidového stavu (G0 fáze). Buněčná proliferace je nezbytná pro růst, vývoj a regeneraci organismu, na druhou stranu je však zodpovědná za jednu z nejdestruktivnějších nemocí dnešní doby – rakovinu. Buněčný cyklus eukaryotních buněk je řízen řadou cyklínů a cyklín dependentních kinas (Cdk). Ty pak ve společném komplexu řídí průchod buněčného cyklu přes klíčové kontrolní body (Bai et al. 2017, Rezacova a Vavrova 2011).

Cyklín dependentní kinyasy jsou skupinou serin/threoninových kinas, které spolupracují s regulačními podjednotkami – cyklíny. Cyklíny řídí aktivitu kinas a substrátovou specifitu. Cdk jsou považovány za motor pohánějící progresi buněčného cyklu, zatímco cyklíny jsou vnímány jako rychlostní stupně, které se mění, aby se usnadnil přechod mezi jednotlivými fázemi cyklu. Cyklíny jsou syntetizovány a degradovány v průběhu buněčného cyklu tak, aby řídily aktivitu kinas v ten správný čas. Kinasová aktivita komplexu Cdk/cyklín je dále striktně regulována množstvím inhibitorů Cdk (CKI). Tyto inhibitory slouží jako brzdy k zastavení buněčného cyklu, pokud se vyskytnou nepříznivé podmínky (Lim a Kaldis 2013, Malumbres a Barbacid 2009).

Správný postup buněčným cyklem je sledován kontrolními body. Ty monitorují možné defekty během syntézy DNA a segregaci chromozomů. Aktivace kontrolních bodů způsobí zástavu buněčného cyklu a umožní buňkám chyby opravit, čímž se předejde přenosu do buněk dceřiných. Jestliže je oprava neúspěšná kvůli nadměrnému poškození DNA, vadám v opravném řízení či genetickým vadám v kontrolním bodě, buňky mohou vstoupit do senescence nebo podstoupit apoptózu. Akumulace poškození DNA však může vést k transformaci buněk a onkogenezi (Malumbres a Barbacid 2009).

Check point kinyasy 1 a 2

Checkpoint kinyasy 1 a 2 (Chk1 a Chk2) jsou serin/threoninové kinyasy. Jedná se o zásadní proteiny v odpovědi na genotoxický stres, které jsou schopny zastavit buněčný cyklus. Strukturně jsou nepříbuzné, ale jejich funkce se překrývají. Klíčovým úkolem Chk1 a Chk2 je přenos signálů zprostředkovaných ATM a ATR z kontrolních bodů (Bartek a Lukas 2003).

Kinasa Chk1 je labilní protein vyskytující se především v S a G2 fázi buněčného cyklu. V neporušeném buněčném cyklu je přítomna, ovšem v reakci na poškození DNA nebo zástavu replikace je dále aktivována. Na rozdíl od Chk2 její aktivace nevyžaduje dimerizaci a autofosforylacii. Chk1 je fosforylována především pomocí ATR, v menší míře i ATM na Ser 317 a 345. Následuje fosforylace Cdc25A/C a nakonec zástava buněčného cyklu v pozdní fázi S nebo G2 (Dai a Grant 2010, Bartek a Lukas 2003).

Kinasa Chk2 je oproti Chk1 stabilní protein exprimovaný v průběhu celého buněčného cyklu. Při absenci poškození DNA je neaktivní. Lidská Chk2 je aktivovaná v reakci na dvouřetězcové zlomy DNA fosforylací Thr 68 především pomocí ATM. Když dojde k její aktivaci (dimerizace a autofosforylace Chk2), šíří signál poškození prostřednictvím fosforylace několika cílů zapojených do progresu buněčného cyklu nebo do apoptózy. Fosforylací Cdc25A a Cdc25C indukuje Chk2 zástavu buněčného cyklu v G1/S a G2/M fázi. Pomocí fosforylace p53 pomáhá udržovat prodloužení G1 fáze, blokaci v G2/M a apoptózu. (Bartek a Lukas 2003, Buscemi et al. 2006).

Protein p53

Protein p53 je nádorový supresor označovaný též jako strážce genomu. Hraje ústřední roli při udržování genomové integrity. Reaguje na různé typy stresových signálů, které mohou způsobit onkogenní změny, jako je poškození DNA nebo stavy vznikající při vývoji nádorových buněk, například abnormální proliferace či hypoxie. Aktivace proteinu p53 způsobí inhibici růstu stresovaných buněk přechodnou nebo trvalou zástavou buněčného cyklu. Umožní tak opravu před vstupem do dalšího cyklu nebo trvalé odstranění buněk z organismu apoptózou. Tím brání šíření buněk procházejících maligní transformací (Vousden 2002, Ryan et al. 2001). Lidský p53 je kódovaný důležitým tumor supresorovým genem - TP53. U různých typů nádorových onemocnění je jedním z genů nejčastěji postižených mutacemi (Kamada et al. 2015).

V případě nevratného poškození tkání může indukovat expresi proteinů, které zprostředkovávají apoptózu vnitřní i vnější cestou. (Rezacova a Vavrova 2011, Ryan et al. 2001). To, zda buňka v reakci na aktivaci p53 projde zástavou buněčného cyklu nebo apoptózou závisí na několika faktorech. Některé z nich mohou být na p53 nezávislé. Je to například přítomnost dalších onkogenních poškození, dostupnost dalších transkripčních faktorů a kofaktorů. Funkci p53 může řídit typ a velikost buněčného stresu ovlivněním jeho úrovně nebo aktivity. Aktivace apoptózy je spojena s vyššími hladinami p53 než jaké jsou vyžadovány pro zástavu buněčného cyklu (Balint a Vousden 2001).

Apoptóza

Apoptóza je programovaný zánik buněk, který hraje klíčovou roli ve vývoji a homeostáze normálních tkání. Je nedílnou součástí různých biologických událostí, například v embryonálním vývoji, v odstranění nežádoucích či škodlivých buněk, patogenezi mnoha nemocí (Tichy et al. 2006). Nedostatečná apoptóza se může projevit jako rakovina či autoimunitní onemocnění, zatímco zrychlená buněčná smrt může mít za následek akutní a chronická onemocnění, imunodeficienci a neplodnost. Za mnoha stresových podmínek může aktivace kontrolních bodů a spuštění apoptózy sloužit k blokaci karcinogeneze. Apoptotické signály tedy pomáhají chránit genomovou integritu, zatímco defekt apoptotických drah může nejen podporovat tumorigenezi, ale rovněž zvyšovat odolnost nádorových buněk vůči léčbě (Hassan et al. 2014).

Proces apoptózy zahrnuje morfologické a biochemické změny buňky. Obvykle je zapotřebí několika hodin od zahájení procesu po finální buněčnou fragmentaci. Doba však závisí na typu buňky, stimulu a apoptotické dráze. Morfologické změny zasahují do jádra buňky, kde dochází ke kondenzaci chromatinu a nukleární fragmentaci. Buňka zmenšuje svůj objem, dochází ke ztrátě integrity membrány a modifikaci cytoplazmy, kdy se její části odškrcují jako apoptotické tělíška. Biochemické změny zahrnují tyto hlavní procesy: aktivaci kaspas, rozpad DNA a proteinů, membránové změny a rozpoznání fagocytujícími buňkami (Wong 2011). V rámci průběhu apoptózy dochází ke vzniku endogenních DSB a tím k fosforylaci H2AX. Tato fosforylace je časným znakem apoptózy a objevuje se v čase, kdy dochází k aktivaci kaspasy 3. Tento děj zprostředkovává DNA-PK (Rezacova a Vavrova 2011).

Průběh programované buněčné smrti je řízen rozmanitými signálními cestami a regulován vnějšími a vnitřními ligandy. Apoptóza může být aktivována tzv. vnější cestou přes receptory smrti a vnitřní cestou za uvolnění cytochromu c z aktivovaných mitochondrií (Wong 2011).

Kaspasy

Kaspasy představují velkou rodinu cysteinových proteas s cysteinem v aktivním místě, které hydrolyzují své substráty po specifických zbytcích kyseliny asparagové. Můžeme je rozdělit podle typu a velikosti prodomény na kaspasy iniciátorové a efektorové. Nejdříve jsou aktivovány kaspasy iniciátorové, které dále aktivují kaspasy efektorové. Iniciátorovými kaspasami jsou kaspasa-1, -2, -4, -5, -8, -9 a -10. Ve vnější cestě indukce apoptózy jsou zapojeny kaspasy-8 a -10 a jsou charakteristické přítomností rozsáhlých N-terminálních domén DED (death effector domain). Naopak ve vnitřní cestě se uplatňují kaspasy-2 a -9 obsahující domény CARD (caspase recruitment domain). Efektorové kaspasy jsou kaspasy-3, -6 a -7 mající zodpovědnost za vlastní průběh a rozvoj morfologických znaků mechanismu apoptózy (Rezacova a Vavrova 2011).

Vnitřní cesta apoptózy

Jak už název napovídá, k zahájení vnitřní cesty apoptózy dochází uvnitř buňky. Podnětem mohou být neopravitelná genetická poškození, hypoxie, extrémně vysoká hladina cytosolických Ca^{2+} iontů, silný oxidační stres a další. Bez ohledu na vyvolávající příčinu je tato cesta výsledkem zvýšené mitochondriální permeability a uvolňování pro-apoptotických molekul, jako je cytochrom-c, do cytoplazmy. Vnitřní cesta apoptózy je přísně regulována skupinou proteinů patřících do rodiny Bcl-2 (Wong 2011).

Vnitřní cesta apoptózy je zahájena fosforylací proteinu p53 a následnou aktivací pro-apoptotických členů rodiny Bcl-2. Dojde ke změně mitochondriální membrány a stimulaci k uvolnění cytochromu c. Cytochrom c vytvoří komplex (apoptosom) s Apaf-1 a prokaspasou-9, která se aktivuje na kaspasu-9. Tato iniciátorová kaspasa aktivuje efektorové kaspasy, kaspasu-3, -6 a -7. Za vlastní apoptotický proces je zodpovědná kaspasa-3 a je tak nejvýznamnější efektorovou kaspasou (Rezacova a Vavrova 2011).

Vnější cesta apoptózy

Vnější cesta indukce apoptózy je také označována jako membránová nebo receptorová. Jak již název naznačuje, ke spuštění této cesty dojde, když se ligandy smrti navážou na svůj specifický receptor smrti. Bylo popsáno několik receptorů smrti, mezi nejznámější však patří TNFR1 a CD95R. Smrtící doména má za úkol rekrutovat adaptorové proteiny jako je TRADD (TNF receptor-associated death domain) a FADD (Fas-associated death domain), stejně jako cysteinové proteasy jako je kaspasa-8. Vazba ligandu smrti ke svému receptoru vede k tvorbě vazebného místa pro adaptorový protein a dojde k vytvoření tzv. smrt vyvolávajícího signálního komplexu (DISC – death inducing signaling complex). DISC poté iniciuje aktivaci prokaspasy-8, která štěpením navazujících efektorových kaspas zahajuje samotný proces apoptózy (Wong 2011).

Poruchy mechanismů apoptózy

Apoptóza slouží jako důležitý proces pro inhibici metastatického šíření. Úspěch metastatické progresy závisí na schopnosti maligních buněk uniknout apoptóze (Su et al. 2015). Vady v mechanismech programované buněčné smrti hrají podstatnou roli v patogenezi nádoru, jelikož umožňují neoplastickým buňkám přežít delší dobu, než by tomu bylo za normálních okolností. To dává buňkám čas na akumulaci genetických změn, které vedou k deregulaci buněčné proliferace a diferenciaci, podporují angiogenezi a zvyšují invazivitu během nádorové progresy. Dysregulace apoptózy je tedy základním charakteristickým rysem biologie nádorů (Hassan et al. 2014).

Poruchy programované buněčné smrti hrají roli v rezistenci na léčbu konvenčními terapiemi jako je chemoterapie a radioterapie. Zvyšuje se práh buněčné smrti a proto je

vyžadována vyšší dávka protinádorových terapeutik. K úspěšné eradikaci rakovinných buněk nechirurgickými prostředky se v konečném důsledku přistupuje indukci apoptózy. Všechny cytotoxické protinádorové terapie, které jsou v současné době klinicky používány, indukují apoptózu maligních buněk. Proto se odborníci zabývající se přípravou léčivých přípravků pokoušejí aktivovat inaktivovaný apoptotické mechanismus nebo opravit již defektní (Hassan et al. 2014).

Inhibitory DNA-PK

Chemoterapie a radioterapie je často spojena se závažnými nežádoucími účinky. Aby došlo k zefektivnění léčby, bylo by ideální, kdyby bylo možné nádorové buňky senzibilizovat k chemoterapeutikům či ozáření. V současné době je léčba cílena na rychle se dělící buňky, tudíž se zaměřuje na rychle rostoucí rakovinné buňky (Ismail et al. 2004).

Schopnost nádorových buněk opravovat poškozenou DNA je důležitým prvkem jejich citlivosti na chemoterapii nebo radioterapii. Umění DNA-PK rozpoznávat a zahajovat opravu lézí DNA může rakovinné buňky chránit před cytotoxickými účinky terapeutik (Leahy et al. 2004). Bylo pozorováno, že zvýšená aktivita DNA-PK, která může být u rakoviny pozorována, má za následek vyšší odolnost vůči poškození DNA. Například up regulace aktivity DNA-PK u izolátů B buněk chronické lymfocytární leukemie zapříčinila narušení apoptózy indukované poškozením DNA (O'Connor et al. 2007). Další studie sledovala rezistenci na mitoxantron u buněk HL60/MX2 díky zvýšené expresi DNA-PK. Tato rezistence mohla být odvrácena inhibicí DNA-PK (Mikusova et al. 2011). Na druhé straně buněčné linie s defektní funkcí DNA-PK (buňky postrádající Ku nebo DNA-PKcs) jsou přecitlivělé na látky, které indukují DSBs. Důležité je, že bylo prokázáno, že inhibice DNA-PK zvyšuje cytotoxicitu ionizujícího záření a řady látek indukujících DSBs *in vitro*. Díky blokování opravných mechanismů mají selektivní inhibitory DNA-PK potenciál sloužit jako chemo- a radiosenzibilizátory v léčbě nádorových onemocnění (O'Connor et al. 2007, Clapham et al. 2011).

Specifické inhibitory, které jsou v současné době známy, jsou omezeny špatnou rozpustností a vysokou metabolickou labilitou *in vivo*. Výsledkem je rychlá degradace v séru a tudíž krátkodobé působení (Davidson et al. 2013). Syntéza nových léčiv vycházejících z dosud známých látek je důležitou strategií pro zlepšení účinnosti terapeutik, farmakokinetických parametrů a snížení toxicity (Zhu et al. 2015). V ideálním případě by chemo- či radiosenzitizér neměl mít žádnou vnitřní toxicitu a přednostně by měl senzibilizovat nádorové buňky vůči působení terapeutik. V současné době známé inhibitory DNA-PK mají různé stupně selektivity a mohou ovlivnit rovněž další enzymy z rodiny PI3K.

Cíle disertační práce

Cílem disertační práce bylo studium problematiky cytotoxického působení chinazolinových a purinových derivátů jako potenciálních inhibitorů DNA-PK na panelu nádorových buněčných linií. U vybraného nejúčinnějšího derivátu potom prostudování mechanismu účinku. Konkrétně se práce zabývala těmito kroky:

Chinazolinové deriváty

- Screeningové testování 17 chinazolinových derivátů na panelu 16 nádorových buněčných linií a jedné nenádorové linii lidských fibroblastů. Stanovení růstového procenta (GP) pro každý testovaný derivát.
- Určení střední inhibiční koncentrace (IC50) standardního chemoterapeutika doxorubicinu u vybraného modelu nádorové buněčné linie stanoveného na základě výsledků screeningového testování.
- Posouzení schopnosti chinazolinových derivátů potencovat účinky doxorubicinu u vybrané linie nádorových buněk a určení nejúčinnějšího derivátu pro detailní testování.
- Pomocí vhodné metody zjištění, zda dochází při kombinované terapii nejúčinnějšího derivátu s doxorubicinem k zahájení procesu programované buněčné smrti.
- Zhodnocení zastoupení ovlivněných buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu.
- Detekování exprese klíčových proteinů podílejících se na regulaci buněčného cyklu a buněčné stresové reakci po působení kombinované terapie chinazolinového derivátu s doxorubicinem.
- Testování bezpečnosti a snášenlivosti nejúčinnějšího chinazolinového derivátu u samic outbredních myší.

Purinové deriváty

- Screeningové testování 35 purinových derivátů na panelu 9 nádorových buněčných linií a jedné nenádorové linii lidských plicních fibroblastů. Stanovení růstového procenta (GP) pro každý testovaný derivát.
- Zjištění chemosenzitizačního účinku jednotlivých purinových derivátů v kombinaci se standardním chemoterapeutikem doxorubicinem na panelu nádorových buněčných linií.

Materiál a metodika

Buněčné kultury a kultivační podmínky

Vybrané lidské nádorové buněčné linie HL-60 (akutní promyelocytární leukemie), Jurkat (akutní T-buněčná leukemie), MOLT-4 (akutní lymfoblastická leukemie), A549 (adenokarcinom plic), H1299 (karcinom plic), COLO-201 (kolorektální karcinom), HT-29 (kolorektální karcinom), SW-480 (kolorektální karcinom), AGS (adenokarcinom žaludku), PANC-1 (karcinom pankreatu), A2780 (adenokarcinom vaječníků), HeLa (karcinom děložního čípku), BT-549 (triple-negativní karcinom prsu), MCF-7 (adenokarcinom prsu), MDA-MB-231 (triple-negativní karcinom prsu), SAOS-2 (osteosarkom) a MRC-5 (normální lidské plicní fibroblasty) byly zakoupeny od firmy ATCC (American Type Culture Collections – USA) či Sigma-Aldrich (USA). Buněčné linie byly nasazeny podle předem stanovené optimální hustoty ($500 - 50 \times 10^3$ buněk/jamku) do 96jamkové destičky a kultivovány v kontrolované atmosféře 5% CO₂ při 37 °C v příslušném kultivačním médiu dle metodických instrukcí. Normální lidské fibroblasty (NHDF) použité pro experimenty s chinazolinovými deriváty byly izolovány z lidské pokožky odebrané během plastické operace. Pacienti podepsali informovaný souhlas podle Etické komise Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

Buněčné linie nasazené v 96jamkové destičce byly kultivovány přes noc. Buňky byly pravidelně pasážovány po dosažení 70% konfluence pomocí trypsin-EDTA (Sigma, USA). Pro kontrolu viability a proliferace byly buňky při každé pasáži po obarvení trypanovou modří počítány v Bürkerově komůrce. Všechny experimenty byly provedeny s buňkami z časných pasáží (<12).

Cytostatika

Chinazolinové a purinové deriváty byly syntetizovány Ústavem toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové a Centrem biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Látky byly rozpuštěny v DMSO (Sigma-Aldrich, USA) na zásobní roztoky o koncentraci 10 mmol/l. Pro experimenty byl zásobní roztok ředěn vhodným kultivačním médiem tak, aby bylo dosaženo koncentrace 10 μmol/l. Buňky byly vystaveny působení inhibitorů samotných nebo v kombinaci s doxorubicinem po dobu 48 hodin.

Jako pozitivní kontrola byl použit doxorubicin (Sigma-Aldrich, USA). Zásobní roztok o koncentraci 1 mmol/l byl připraven rozpuštěním doxorubicinu ve sterilní vodě a před každým použitím byl médiem naředěn na požadovanou koncentraci. Koncentrace doxorubicinu byla zvolena stanovením hodnoty IC₅₀ sloučeniny pro každou z buněčných linií. Byl použit doxorubicin v rozmezí koncentrací od 0,05 μmol/l do 1 μmol/l. Pokud není uvedeno jinak, buňky Jurkat a A2780 byly vystaveny 0,05 μmol/l doxorubicinu; A549, AGS a HeLa 0,1 μmol/l; HT-29, SAOS-2, MCF-7 a MRC-5 0,5 μmol/l a PANC-1 koncentraci 1 μmol/l doxorubicinu.

Buňky byly rovněž vystaveny standardním inhibitorům DNA-PK (Sigma-Aldrich, USA) NU7441 (1 μmol/l) či NU7026 (10 μmol/l) a ATM inhibitoru KU55933 (Sigma-Aldrich, USA) (10 μmol/l). Maximální koncentrace DMSO v kultivačním médiu byla 0,1 %.

Stanovení cytotoxicity

Ke zjištění cytotoxického efektu cytostatik byl použit WST-1 test (Roche, Německo), díky kterému lze spektrofotometricky stanovit množství metabolicky aktivních buněk. Princip

testu spočívá ve štěpení tetrazoliové soli (WST-1 činidlo) buněčnými enzymy (mitochondriální dehydrogenasy) na nerozpustný formazan. Množství formazanu koreluje s množstvím životaschopných buněk.

Do jedné jamky 96jamkové destičky (Sigma, USA) byly nasazeny buňky (17 linií) ve 150 μ l kultivačního média a inkubovány 24 hodin (37 °C, 5 % CO₂). Po přisednutí buněk byly přidány testované látky v požadovaných koncentracích. Za 48 hodin od ovlivnění bylo do každé jamky přidáno 50 μ l WST-1 činidla. Po 3 hodinách inkubace bylo provedeno výsledné měření absorbance na spektrofotometru Tecan Infinite M200 (Tecan Group, Švýcarsko) při vlnové délce 440 nm.

Měření aktivity kaspas

K detekci aktivity kaspasy 3/7, kaspasy 8 a kaspasy 9 byl použit kit Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega, USA) dle pokynů výrobce. Metoda je založena na rozkladu specifických chemiluminiscenčních substrátů příslušnými kaspasami. Substrát se štěpí za uvolnění aminoluciferinu, jež je substrátem luciferasy. Přidání činidla Caspase-Glo® 3/7 má za následek buněčnou lýzu následovanou kaspasovým štěpením substrátu a generováním luminiscenčního signálu.

Do každé jamky 96jamkové destičky bylo nasazeno 1 x 10⁴ předem ovlivněných (48 hodin) buněk HT-29 v 50 μ l kultivačního média. Buňky byly poté inkubovány po dobu 30 minut s 50 μ l Caspase-Glo Assay reagentem. Luminiscence byla měřena za použití spektrofotometru Tecan Infinite M200 (Tecan Group, Švýcarsko) a generovaný signál byl úměrný množství aktivity kaspas.

Analýza buněčného cyklu

Ke stanovení zastoupení jednotlivých buněk v buněčném cyklu bylo využito flow-cytometrického měření obsahu DNA. Princip metody spočívá v tom, že v jednotlivých fázích buněčného cyklu obsahuje buňka ve svém jádře rozdílné množství DNA. Pro detekci množství DNA je používán propidium jodid (PI), který je schopen pronikat do buňky narušenou cytoplazmatickou membránou a tam se nespecificky vázat na strukturu DNA.

Buňky HT-29 byly ošetřeny 0,5 μ mol/l doxorubicinem, 10 μ mol/l NU7026 a 10 μ mol/l 14d samostatně či v kombinaci s doxorubicinem po dobu 24 a 48 hodin. Poté byly buňky sklizeny trypsinizací, promyty dvakrát ledovým PBS pufrem (Sigma-Aldrich, USA) a fixovány minimálně 1 hodinu při 4 °C v 70% ethanolu (Penta, ČR) pro jejich permeabilizaci. Po odstranění ethanolu centrifugací byly buňky dvakrát promyty v PBS a inkubovány 5 minut při pokojové teplotě v citrátovém pufru (192 ml 0,2 mol/l Na₂HPO₄ (Merck, ČR) + 8 ml 0,1 mol/l kyselina citrónová (Penta, ČR), pH = 7,8) pro extrakci nízkomolekulárních fragmentů DNA. Poté byly buňky obarveny propidium jodidem ve Vindelově roztoku (1ml 1 mol Tris pH=8 (Sigma-Aldrich, USA), 1 mg RNasy (Sigma-Aldrich, USA), 100 μ l Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA), 60 mg NaCl (Penta, ČR), 5 mg propidium jodidu (Sigma-Aldrich, USA) a destilovaná voda do 100 ml) při 37 °C po dobu 1 hodiny. Obsah DNA byl stanoven průtokovým cytometrem CyAn ADP (Beckam Coulter, USA). Data byla analyzována pomocí softwaru Multicycle AV (Phoenix Flow Systems, USA). K odstranění dubletů a vícenásobných multipletů při analýze DNA průtokovou cytometrií byl použit soubor opatření, které měly zamezit výskytu těchto buněčných artefaktů ve vlastním analyzovaném vzorku. Pomocí barevné vícenásobné gating analýze byly vyřazeny agregáty s vysokou šířkou pulsu a barevně označeny buňky s vysokými hodnotami FSC (forward scatter, přímý rozptyl) a SSC (side scatter, boční rozptyl). Při analýze programem Multicycle AV (Phoenix Flow Systems, USA) byl vytvořen

histogram šířky pulsu (pulse width) signálu versus jeho plocha (area) pro fluorescenční signál propidium jodidu v námi analyzovaném fluorescenčním kanálu.

Elektroforéza a Western blotting

Pro detekci specifických proteinů byly připraveny celobuněčné lyzáty z exponenciálně rostoucích buněk ošetřených 0,5 $\mu\text{mol/l}$ samotného doxorubicinu nebo doxorubicinu v kombinaci s 10 $\mu\text{mol/l}$ inhibitoru 14d či standardního inhibitoru NU7026 po dobu 4 a 24 hodin. Lyzáty pro analýzu byly připraveny za použití pufru pro buněčnou lýzu dle pokynů výrobce (Cell Signaling Technology, USA). Množství proteinu v jednom vzorku bylo kvantifikováno pomocí testu na kyselinu bicinchoninovou – BCA assay (roztok CuSO_4 :roztok bicinchoninové kyseliny – 1:50) (Sigma-Aldrich, USA). Po kvantifikaci proteinu bylo nanášeno stejné množství proteinu (20 μg) do polyakrylamidového gelu pro SDS-PAGE elektroforézu. Po elektroforetické separaci byly proteiny přeneseny na polyvinyliden fluoridovou (PVDF) membránu (Bio-Rad Laboratories s.r.o., ČR). Membrána byla poté blokována v TBS-T pufru (Tris-buffered saline, 0.1 % Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA)) s 5% mlékem (non-fat dry milk, Bio-Rad). Následně proběhla inkubace po dobu 24 hodin při 4 °C s primární protilátkou namířenou proti sledovaným proteinům: p53, p53_serine 15 (Exbio, ČR), Chk1, Chk1_serine 345, Chk2, Chk2_threonine 68 (Cell Signaling, USA), β -actin (Sigma-Aldrich, USA). Po inkubaci byly membrány promyty v TBS-T a TBS a poté byly inkubovány s vhodnou sekundární protilátkou konjugovanou s křenuvou peroxidasou (HRP) - polyklonální Goat anti-Mouse nebo Swine anti-Rabbit imunoglobuliny (DakoCytomation, ČR) v TBS-T s 5% mlékem po dobu jedné hodiny při pokojové teplotě. Navázání protilátek bylo vizualizováno pomocí chemiluminiscenčního detekčního kitu (Roche, ČR) a výsledný signál byl kvantitativně zachycen na autoradiografický film (Foma, ČR). Pro potvrzení správné nanášky proteinů byla každá membrána znovu inkubována pro stanovení β -actinu.

Hodnocení toxicity *in vivo*

Vzhledem k omezené rozpustnosti sloučeniny 14d byla tato látka podávána ve formě hydrochloridové soli za použití DMSO jako pomocného rozpouštědla (1 ml / 1 kg tělesné hmotnosti). Z tohoto důvodu byla místo intravenózního podání zvolena cesta intraperitoneální. Pro tuto studii byly použity samice outbredních myší (kmen NMRI, průměrná hmotnost 33,5 g, SD 2,0 g), které byly získány z Masarykovy univerzity (Brno, ČR). Péče o zvířata byla v souladu s doporučením Evropské unie a s Evropskou úmluvou o ochraně obratlovců používaných pro experimentální a jiné vědecké účely. Experimenty byly schváleny Etickou komisí Lékařské fakulty v Hradci Králové (Univerzita Karlova, ČR; č. MSMT-33995 / 2017-3). Pro hodnocení maximální tolerované dávky (MTD) bylo vytvořeno šest skupin po dvou nebo třech myších. Bylo jim podáno 10 ml roztoku / kg tělesné hmotnosti. Dávky byly 5, 10, 15, 20, 25 a 30 mg/kg. U zvířat byla sledována klinická skóre a úbytek hmotnosti (limit byl 10 % nebo 15 %) po dobu 5 dnů po aplikaci roztoku.

Statistická analýza

Pro statistické zpracování dat byl použit program Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft Inc., USA). Všechny statisticky hodnocené experimenty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr se standardní směrodatnou odchylkou a byly provedeny třikrát, pokud není uvedeno jinak. Ke zjištění signifikantních rozdílů mezi skupinami byl použit Studentův T-test a za statisticky významný byl považován rozdíl na hladině významnosti $P \leq 0,05$. Hodnota IC50 byla vypočtena pomocí nelineární regrese za použití statistického softwaru GraphPad Prism 9.3.1 (GraphPad Software, Inc., USA).

Výsledky

Chinazoliny

Test buněčné viability na panelu buněčných linií

Pomocí testu WST-1 byl nejdříve určen inhibiční účinek každé sloučeniny samotné 48 hodin po jejím působení. Testování proběhlo na screeningovém panelu 16 nádorových a jedné normální buněčné linii s inhibitory o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ (standardní koncentrace podle screeningové metodiky NCI-60- https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60). Jako pozitivní kontrola byl použit doxorubicin o koncentraci 1 $\mu\text{mol/l}$.

Výsledky ukázaly, že derivát 10k měl nejvyšší inhibiční účinek, přičemž buněčná proliferace u 3 ze 17 linií byla snížena pod 50 % a u 12 buněčných linií pod 75 %. Sloučeniny 10e, 10f a 14d byly dalšími inhibitory s významným antiproliferativním účinkem (Obr. 1). Na základě těchto výsledků byly vybrány nádorové buňky karcinomu tlustého střeva HT-29 jako nejvhodnější modelová linie pro další testování, jelikož žádný z testovaných inhibitorů významně neovlivňoval proliferaci této buněčné linie.

	10a	10b	10c	10d	10e	10f	10g	10h	10i	12	10k	10j	14a	14b	14c	14d	14e	DOX
HL-60	93 ± 19	95 ± 17	113 ± 10	105 ± 17	98 ± 11	108 ± 24	102 ± 30	93 ± 15	87 ± 10	92 ± 9	41 ± 11	85 ± 11	94 ± 13	87 ± 31	80 ± 11	72 ± 15	100 ± 12	8 ± 8
Jurkat	95 ± 1	87 ± 4	95 ± 2	95 ± 11	98 ± 7	90 ± 6	98 ± 3	96 ± 2	111 ± 10	114 ± 4	54 ± 6	102 ± 6	106 ± 3	98 ± 4	101 ± 3	60 ± 14	103 ± 2	4 ± 1
MOLT-4	76 ± 10	74 ± 20	85 ± 13	67 ± 4	72 ± 7	63 ± 4	89 ± 6	79 ± 8	95 ± 9	106 ± 11	60 ± 4	93 ± 16	84 ± 12	86 ± 8	79 ± 7	53 ± 5	91 ± 4	1 ± 0
A549	94 ± 8	77 ± 8	97 ± 7	86 ± 10	41 ± 14	80 ± 7	107 ± 6	90 ± 8	90 ± 5	98 ± 3	77 ± 5	115 ± 6	110 ± 11	107 ± 3	99 ± 3	99 ± 7	106 ± 5	58 ± 5
H1299	89 ± 20	86 ± 6	99 ± 26	92 ± 21	74 ± 18	86 ± 4	95 ± 6	92 ± 9	100 ± 2	89 ± 9	75 ± 8	84 ± 10	79 ± 17	68 ± 7	75 ± 10	70 ± 4	71 ± 9	38 ± 5
COLO-201	81 ± 9	74 ± 13	68 ± 7	78 ± 15	78 ± 3	60 ± 8	84 ± 8	92 ± 5	87 ± 12	111 ± 2	55 ± 2	92 ± 6	75 ± 1	73 ± 11	62 ± 1	69 ± 3	70 ± 12	72 ± 5
HT-29	94 ± 5	95 ± 6	91 ± 11	101 ± 3	85 ± 5	91 ± 3	94 ± 3	96 ± 11	76 ± 5	97 ± 5	77 ± 8	88 ± 3	100 ± 2	94 ± 3	90 ± 4	102 ± 9	91 ± 9	29 ± 3
SW-480	98 ± 28	92 ± 10	102 ± 22	93 ± 14	95 ± 12	102 ± 15	118 ± 17	119 ± 8	121 ± 22	125 ± 4	58 ± 10	100 ± 9	94 ± 7	99 ± 4	83 ± 11	89 ± 18	84 ± 14	30 ± 7
AGS	71 ± 27	73 ± 19	81 ± 35	78 ± 25	79 ± 19	85 ± 13	75 ± 19	97 ± 16	112 ± 9	111 ± 6	67 ± 4	86 ± 9	72 ± 17	70 ± 11	70 ± 1	78 ± 7	68 ± 7	18 ± 5
PANC-1	67 ± 14	56 ± 11	71 ± 14	66 ± 10	51 ± 13	85 ± 6	74 ± 14	78 ± 17	90 ± 21	84 ± 6	72 ± 7	79 ± 3	78 ± 5	60 ± 2	59 ± 10	62 ± 3	62 ± 2	76 ± 15
A2780	87 ± 9	96 ± 10	83 ± 13	90 ± 2	86 ± 14	88 ± 30	98 ± 8	87 ± 8	84 ± 7	86 ± 9	47 ± 6	75 ± 9	85 ± 6	70 ± 2	72 ± 21	82 ± 22	78 ± 22	34 ± 7
HeLa	84 ± 13	82 ± 3	82 ± 5	88 ± 31	56 ± 15	60 ± 17	80 ± 12	77 ± 9	100 ± 13	117 ± 33	48 ± 11	92 ± 23	82 ± 8	67 ± 7	68 ± 2	67 ± 5	80 ± 16	30 ± 5
BT-549	76 ± 14	68 ± 10	67 ± 11	68 ± 15	61 ± 8	52 ± 29	72 ± 8	60 ± 16	85 ± 7	94 ± 10	63 ± 19	69 ± 7	70 ± 13	60 ± 4	64 ± 1	39 ± 11	64 ± 4	12 ± 2
MCF-7	88 ± 10	86 ± 12	90 ± 11	91 ± 18	72 ± 4	82 ± 9	93 ± 11	82 ± 1	101 ± 15	102 ± 6	62 ± 13	97 ± 7	91 ± 10	68 ± 4	84 ± 21	62 ± 13	80 ± 9	56 ± 12
MDA-MB-231	71 ± 16	75 ± 14	70 ± 9	78 ± 7	59 ± 10	74 ± 6	76 ± 11	82 ± 7	83 ± 4	90 ± 10	71 ± 3	83 ± 16	70 ± 13	77 ± 11	73 ± 15	71 ± 12	64 ± 8	34 ± 4
SAOS-2	87 ± 15	65 ± 9	82 ± 7	87 ± 15	41 ± 8	32 ± 5	86 ± 3	71 ± 8	92 ± 11	103 ± 16	71 ± 6	83 ± 15	78 ± 12	84 ± 2	75 ± 8	46 ± 8	94 ± 5	38 ± 7
NHDF	89 ± 16	85 ± 16	90 ± 5	95 ± 21	106 ± 3	107 ± 2	100 ± 13	107 ± 3	114 ± 7	90 ± 3	75 ± 8	90 ± 8	76 ± 15	70 ± 2	68 ± 6	87 ± 20	81 ± 7	58 ± 15
mean GP	85	80	86	86	74	79	91	88	96	101	63	89	85	79	77	71	82	35
smoch	9,2	11,1	12,5	11,3	19,3	19,7	12,5	13,4	12,3	11,6	11	10,5	12	13,9	11,6	16,8	13,7	22,5
Range of GP	67-98	56-96	67-113	66-105	41-106	32-108	72-118	60-119	76-121	84-125	41-77	69-115	70-110	60-107	59-101	39-102	62-106	1-76

0-25

26-50

51-75

Obr. 1 Cytotoxický účinek chinazolinových derivátů na vybraných nádorových liniích. Hodnota naměřeného signálu ovlivněných buněk je vyjádřena v procentech vztažených ke kontrole (100 %). Výsledky jsou znázorněny jako aritmetický průměr ze tří nezávislých měření, ± směrodatná odchylka. Hodnoty v intervalech 0-25 %, 26-50 % a 50-75 % jsou zvýrazněny odlišnými barvami.

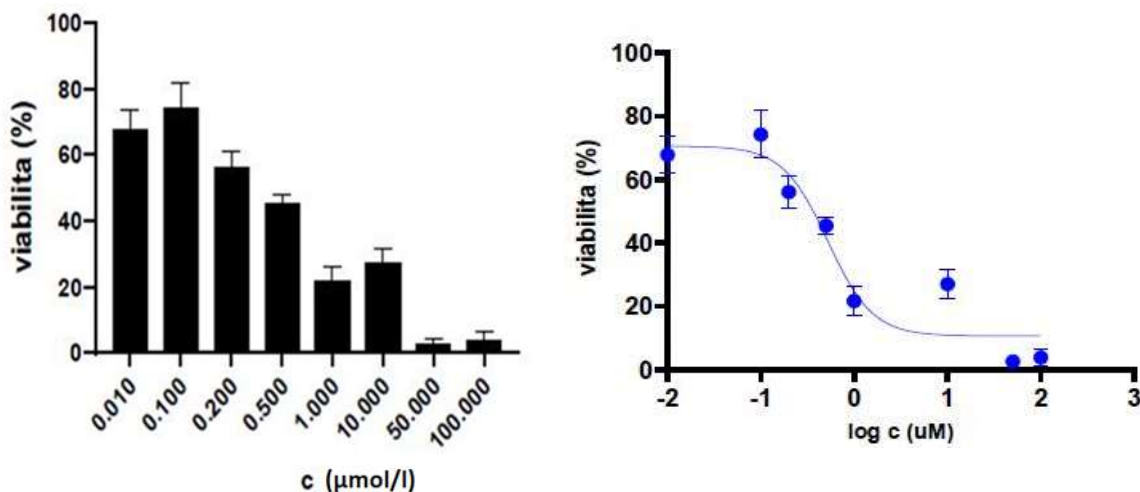
Pro každý testovaný derivát byla vypočtena hodnota procenta růstu (GP). GP představuje průměr poklesu proliferace všech buněčných linií ošetřených stejným derivátem vyjádřené v procentech.

Stanovení IC50 doxorubicinu u buněk HT-29

Dalším krokem bylo určení střední inhibiční koncentrace (IC₅₀) standardního chemoterapeutika doxorubicinu u buněk HT-29. Jelikož DNA-PK je klíčovým enzymem při opravách dvouřetězcových zlomů zprostředkovaných NHEJ, byl jako modelové činidlo vybrán právě doxorubicin. Jedná se o protinádorové léčivo inhibující topoizomerasu II, která se podílí na replikaci DNA. Jestliže dojde k její inhibici, DNA se začne rozpadat.

Buňky HT-29 byly vystaveny působení doxorubicinu po dobu 48 hodin a byl proveden WST-1 test. Hodnocení životaschopnosti buněk po ovlivnění doxorubicinem bylo stanoveno vzhledem k proliferaci neošetřených kontrolních buněk (100 %) (Obr. 2). Do grafu byly vyneseny hodnoty viability buněk (stanovené relativně k neovlivněné kontrole) a logaritmus koncentrace doxorubicinu. Pomocí softwaru GraphPad v 9.3.1 se provedla nelineární regrese. Z rovnice regrese se odečetla hodnota IC₅₀ udávající koncentraci doxorubicinu, která snížila buněčnou viabilitu na 50 % v porovnání s kontrolou. Hodnota IC₅₀ byla stanovena na 0,52 $\mu\text{mol/l}$.

Pro snazší výpočty následované ředěním látky jsme zvolili pro další experimenty koncentraci 0,5 $\mu\text{mol/l}$.



Obr. 2 Stanovení IC₅₀ doxorubicinu na buňkách HT-29 pomocí WST-1 testu 48 hodin po působení chemoterapeutika.

Hodnota naměřeného signálu ovlivněných buněk je vyjádřena v procentech vztažených ke kontrole (100 %). Výsledky jsou znázorněny jako aritmetický průměr ze tří nezávislých měření, \pm směrodatná odchylka.

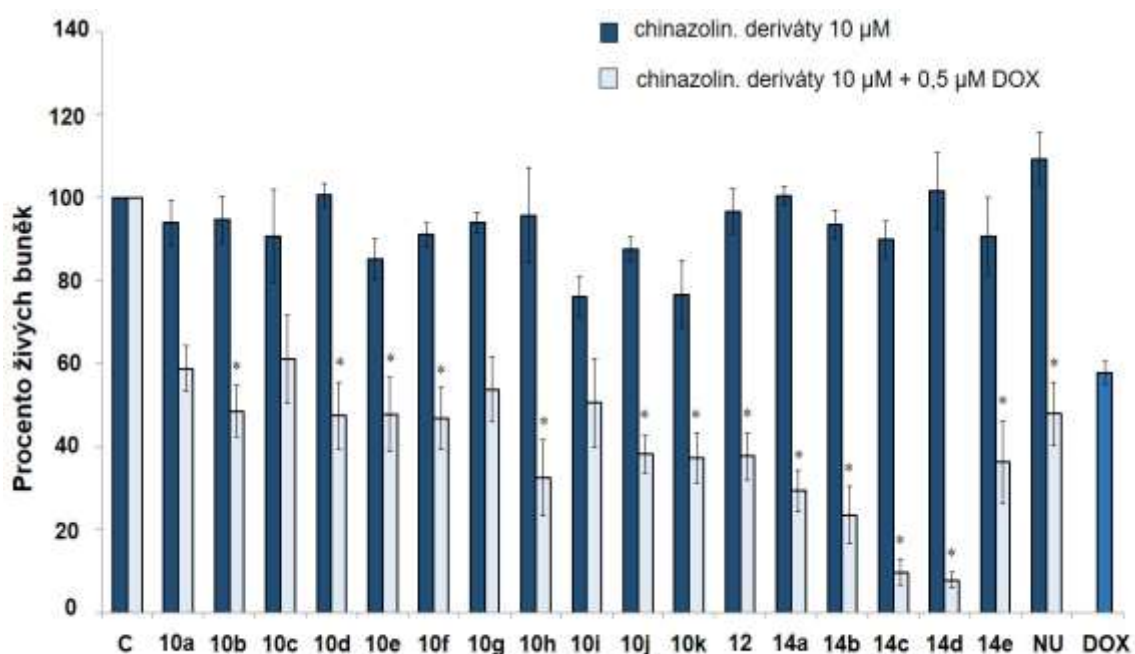
Chemosenzitizační účinek inhibitorů

Byla testována schopnost chinazolinových derivátů potencovat účinky standardního chemoterapeutika doxorubicinu. Buňky HT-29 byly po dobu 48 hodin vystaveny působení 10 $\mu\text{mol/l}$ chinazolinových derivátů v kombinaci s 0,5 $\mu\text{mol/l}$ doxorubicinu. Do experimentu byl zahrnut, jako pozitivní kontrola, standardní inhibitor DNA-PK – NU7441 o koncentraci 1 $\mu\text{mol/l}$.

Jak je znázorněné na Obr. 3, procento viabilních buněk ovlivněných samotnými inhibitory se pohybovalo v rozmezí od 76 do 114 %. Po působení samotného doxorubicinu o koncentraci 0,5 $\mu\text{mol/l}$ došlo oproti kontrole ke snížení životaschopných buněk na 58 %.

V kombinaci s inhibitory byl u buněk HT-29 pozorován signifikantní chemosenzitizační účinek u 13 ze 17 testovaných sloučenin. Nejvyšší senzitizační efekt měly deriváty 14c a 14d, jejichž působení v kombinované terapii s doxorubicinem vedlo k rychlé inhibici buněčného růstu. Procento životaschopných buněk bylo 10 % (14c + dox) a 8 % (14d + dox).

Deriváty 10a, 10c, 10g a 10i nezpůsobily v kombinaci s doxorubicinem významné snížení počtu viabilních buněk oproti samotnému doxorubicinu. I přesto, že u těchto derivátů nedošlo v kombinaci s doxorubicinem ke snížení počtu životaschopných buněk, můžeme předpokládat, že tyto inhibitory mohou působit v kombinaci s jiným typem protinádorového léčiva nebo na odlišnou nádorovou linii.

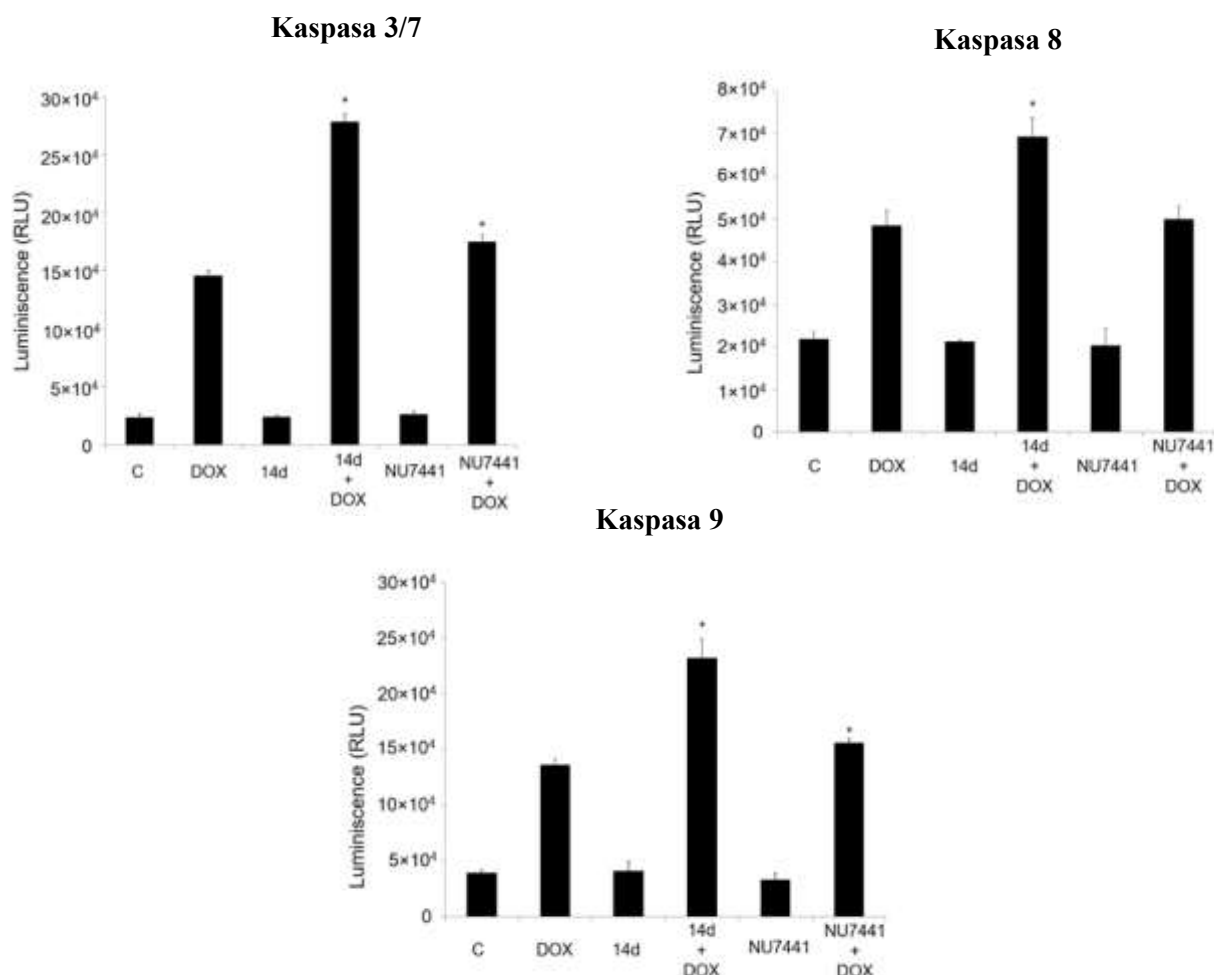


Obr. 3 Senzitizační účinek inhibitorů v kombinaci s doxorubicinem

Graf představuje procentuální zastoupení živých buněk buněčné linie HT-29 po kombinované léčbě nově syntetizovaných inhibitorů (10 μmol/l) nebo standardního inhibitoru NU7441 (NU; 1 μmol/l) s doxorubicinem (DOX; 0,5 μmol/l) po 48 hodinách inkubace. Hodnota naměřeného signálu ovlivněných buněk je vyjádřena v procentech vztažených ke kontrole (100 %). Výsledky jsou znázorněny jako aritmetický průměr ze tří nezávislých měření, ± směrodatná odchylka. Za statisticky významný byl považován rozdíl na hladině $P \leq 0,05$, který byl stanoven pomocí Studentova T-testu. * - statisticky významný rozdíl oproti působení samostatného doxorubicinu ($P \leq 0,05$)

Aktivace kaspas a indukce apoptózy

Vliv kombinované terapie inhibitorů s doxorubicinem na aktivaci kaspas 3/7, 8 a 9 byl studován 48 hodin po ovlivnění buněk HT-29. Ovlivnění samotnými inhibitory nezpůsobilo žádné signifikantní změny v aktivitě kaspas. Významné zvýšení ($P \leq 0,05$) v aktivitách kaspas 3/7 a kaspasy 9 bylo zjištěno, když byl derivát 14d nebo standardní inhibitor DNA-PK NU7441 kombinován s doxorubicinem (ve srovnání s účinkem samotného doxorubicinu). Aktivita kaspasy 8 byla významně zvýšena pouze v kombinaci inhibitoru 14d s doxorubicinem (Obr. 4).



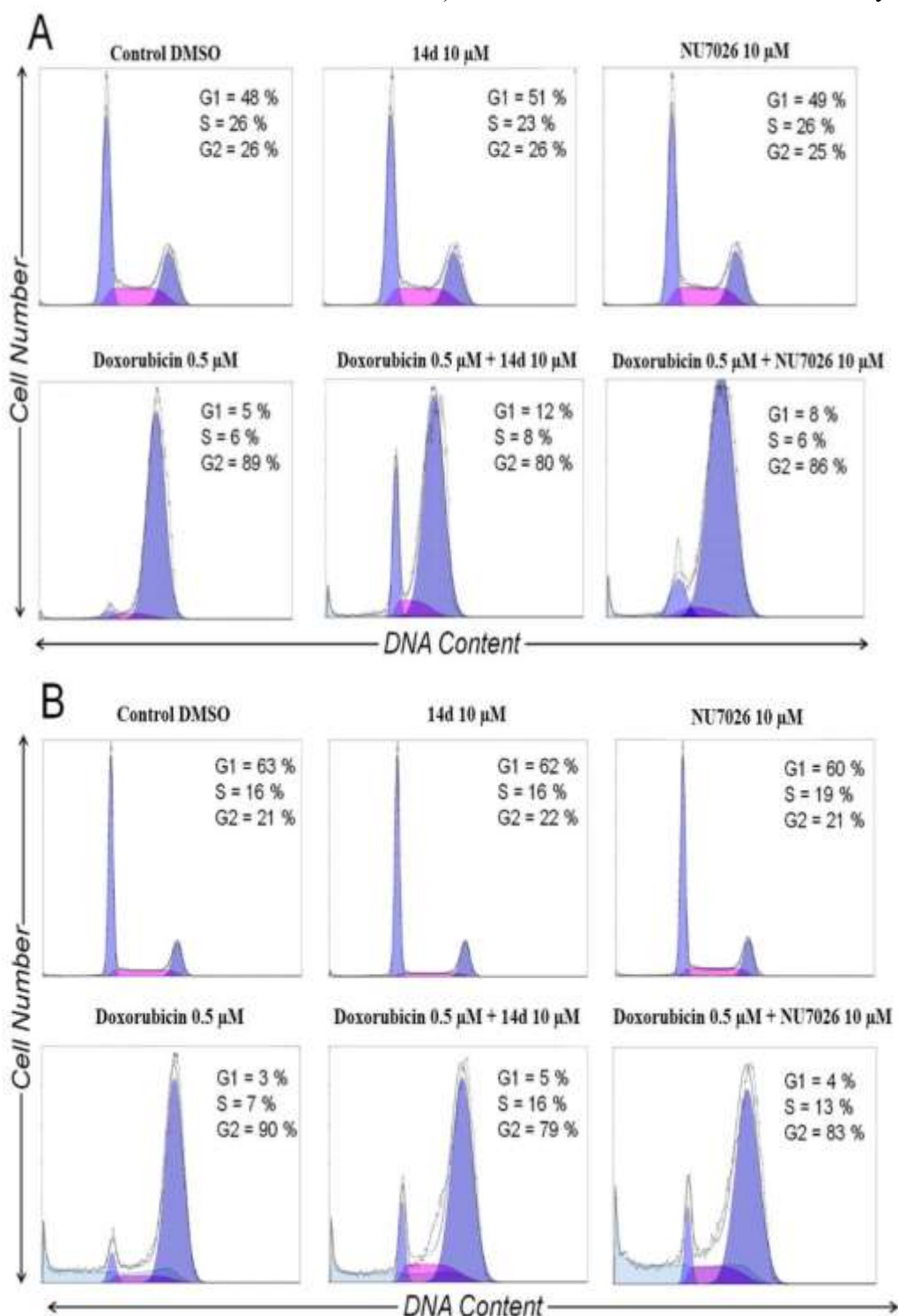
Obr. 4 Vliv testovaných sloučenin na aktivaci kaspas u buněk HT-29.

Aktivita kaspas byla stanovena 48 hodin po léčbě (doxorubicin 0,5 $\mu\text{mol/l}$, 14d 10 $\mu\text{mol/l}$, NU7441 1 $\mu\text{mol/l}$) u buněk lidského kolorektálního karcinomu HT-29. Hodnoty představují průměr ze tří nezávislých měření, \pm směrodatná odchylka. Za statisticky významný byl považován rozdíl na hladině $P \leq 0,05$, který byl stanoven pomocí Studentova T-testu. * - statisticky významný rozdíl oproti působení samostatného doxorubicinu ($P \leq 0,05$)

Analýza buněčného cyklu

K analýze buněčného cyklu buněk HT-29 byla po jejich ovlivnění doxorubicinem, 14d a NU7026 použita průtoková cytometrie. Obr. 5 zobrazuje procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu 24 a 48 hodin po léčbě. Aplikace samotných látek 14d a NU7026 nevedla k proporcionálním změnám ve srovnání s kontrolními buňkami po 24 i 48 hodinách. Ovlivnění samotným doxorubicinem vedlo k akumulaci buněk v G2 fázi

(89 % - 24 h, 90 % - 48 h) a ke snížení počtu buněk ve fázi G1 (5 % - 24 h, 3 % - 48 h). Na druhou stranu nebyly zaznamenány statisticky významné proporcionální rozdíly v akumulaci buněk v G2 fázi u buněk léčených kombinovanou terapií (14d: 80 % - 24 h, 79 % - 48 h; NU7026: 86 % - 24 h, 83 % - 48 h) ve srovnání s doxorubicinem samotným.



Obr. 5 Flow-cytometrická analýza buněčného cyklu po ovlivnění buněk HT-29 doxorubicinem, sloučeninou 14d a NU7026 samotnými či jejich kombinací.

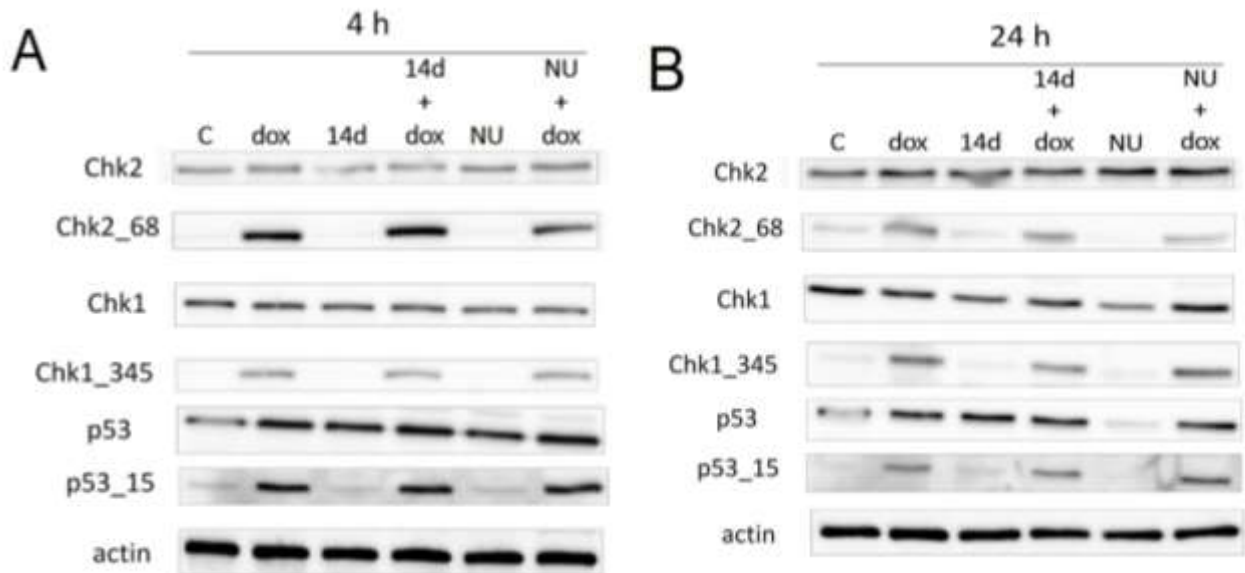
Obrázek znázorňuje procentuální zastoupení buněk HT-29 v jednotlivých fázích buněčného cyklu za 24 (A) a 48 (B) hodin od ovlivnění. Výsledky profilu buněčného cyklu vybrané z jednoho ze tří nezávislých experimentů.

Změny v expresi proteinů

Pro zhodnocení proteinové exprese byla použita SDS-PAGE elektroforéza následovaná Western blottingem. Buňky HT-29 byly vystaveny účinku doxorubicinu, 14d a NU7026 samotným a kombinaci inhibitorů s doxorubicinem. Posuzovány byly hladiny proteinů, které regulují buněčný cyklus a buněčnou stresovou reakci, konkrétně protein p53 a jeho fosforylaci na Ser 15, checkpoint kinasu 1 a její fosforylaci na Ser 345 a checkpoint kinasu 2 a její fosforylaci na Thr 68 po 4 a 24 hodinách působení látek (Obr. 6).

Samotný doxorubicin, doxorubicin v kombinaci s 14d i s NU7026 způsobily signifikantní upregulaci proteinu p53 jak po 4 hodinách, tak po 24 hodinách. Změny proteinu p53 jsou doprovázeny fosforylací na Ser 15. Zatímco samotný NU7026 způsobil pouze přechodné zvýšení množství p53, aplikace inhibitoru 14d způsobila zvýšení množství tohoto proteinu trvající po celou dobu trvání experimentu. Tato indukce nebyla doprovázena fosforylací na Ser 15.

Dalšími proteiny odpovídajícími na poškozená DNA jsou checkpoint kiny Chk1 a Chk2. Doxorubicin samotný i v kombinaci s oběma inhibitory (14d či NU7026) vyvolal fosforylaci Chk1 na Ser 345 a Chk2 na Thr 68, tudíž nebyly ovlivněny dráhy ATM a ATR. Pro kontrolu nanášky bylo na membránách stanoveno množství β -actinu.



Obr. 6 Indukce a aktivace vybraných proteinů u buněk HT-29 po ovlivnění testovanými sloučeninami.

Detekce proteinu p53 a fosforylace p53 na Ser 15 (p53_15), detekce Chk1 a fosforylace na Ser 345 (Chk1_345), detekce Chk2 a fosforylace na Thr 68 (Chk2_68) u buněk ovlivněných doxorubicinem (0,5 $\mu\text{mol/l}$), 14d (10 $\mu\text{mol/l}$) a NU7026 (10 $\mu\text{mol/l}$) samotnými a kombinací inhibitorů s doxorubicinem po 4 (A) a 24 (B) hodinách.

Pro kontrolu nanášky bylo stanoveno množství β -actinu. Jednotlivé bloty reprezentují výsledky vybrané ze tří nezávislých experimentů; (C=kontrola).

Hodnocení toxicity *in vivo*

Bezpečnost a snášenlivost sloučeniny 14d byly testovány u samic outbredních myší. Po dobu 5 dnů od intraperitoneálního podání roztoku byla sledována klinická skóre a ztráty hmotnosti zvířat.

V provedeném experimentu žádná z dávek 14d nevedla ke zjevným klinickým příznakům ani ke ztrátě hmotnosti o více než 10 % s výjimkou jedné myši, která dostávala dávku 30 mg/kg tělesné hmotnosti. Uvedená myš ztratila 15 % své hmotnosti třetí den po aplikaci léčiva a do konce experimentu se opět zotavila. Z toho lze vyvodit závěr, že 30 mg/kg odpovídá MTD (Obr. 7).

Den						
Dávka mg/kg	0	1	2	3	4	5
5	29	29	28	29	29	29
5	32	32	32	32	33	33
5	35	35	35	35	35	36
10	34	36	36	35	36	37
10	31	30	31	31	31	31
10	33	33	33	33	34	35
20	35	36	36	35	35	35
20	37	35	34	34	34	36
20	33	32	32	31	31	33
25	35	35	36	37	37	37
25	34	33	34	33	34	35
30	33	30	30	28	29	30
30	35	34	34	33	34	34

Obr. 7 Predikce maximální tolerované dávky.

Tabulka zobrazuje tělesné hmotnosti myší v gramech po dobu 5 dnů. Žádná z myší nepřekročila úbytek tělesné hmotnosti o 15 % po aplikaci sloučeniny 14d. S výjimkou jednoho zvířete ze skupiny, které byla aplikována dávka 30 mg / kg, nepřesáhl úbytek tělesné hmotnosti 10 %.

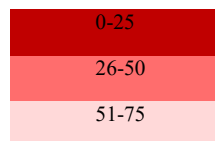
Puriny

Proliferace a procentuální zastoupení živých buněk

Všech 35 připravených sloučenin bylo hodnoceno na panelu devíti nádorových a jedné zdravé buněčné linii. V prvním kroku byl testován inhibiční účinek každé sloučeniny samotné. Výsledky ukázaly, že 33 z 35 testovaných inhibitorů nemělo antiproliferativní účinek na žádnou z deseti testovaných buněčných linií. Procento životaschopných buněk (GP) kolísalo v rozmezí 73 – 121 %, tudíž nebyla zaznamenána významná inhibice proliferace buněk (Obr. 8). Pouze dvě sloučeniny (11c a 11d) způsobily znatelné snížení životaschopnosti buněk jak nádorových, tak normálních zdravých. Inhibitor 11c vykázal největší antiproliferativní efekt, kdy snížil viabilitu buněk pod 50 % u osmi buněčných linií. U těchto linií se procento životaschopných buněk pohybovalo v rozmezí od 4 do 48 %. Vzhledem k antiproliferativním vlastnostem inhibitorů 11c a 11d i na nenádorovou buněčnou linii byly tyto sloučeniny vyloučeny z dalšího testování.

INH	4a	7a	4b	7b	4c	7c	4d	7d	4e	7e	4f	7f	4g	7g	10a	11a	10b	11b	10c
Jurkat	91	91	107	90	96	79	94	95	96	100	98	101	99	95	93	90	95	96	94
A2780	100	103	102	91	96	85	105	100	96	96	97	104	108	103	105	99	98	88	97
A549	104	103	93	107	99	103	108	110	106	93	105	104	113	99	105	111	114	108	107
HT-29	113	101	116	102	109	118	111	104	117	96	101	121	110	112	121	101	119	102	100
AGS	100	92	107	92	98	88	103	98	100	101	84	100	102	101	98	93	98	84	103
HeLa	86	90	100	87	86	85	91	97	97	77	82	102	98	99	103	97	99	103	95
SAOS-2	96	102	102	98	91	94	97	102	103	103	95	102	102	99	99	101	106	97	102
PANC-1	100	92	96	79	73	85	92	102	98	105	96	104	105	104	89	93	100	104	94
MCF-7	97	104	99	93	108	104	110	106	106	104	101	103	105	110	105	114	101	103	118
MRC-5	104	102	106	93	93	95	95	103	106	101	101	108	107	101	99	97	105	104	103
mean	99	98	103	93	95	94	101	102	103	98	96	105	105	102	102	100	104	99	101
smodch	7,130764	5,506039	6,111081	7,459949	10,00327	11,28252	7,345058	4,143986	6,100007	7,659855	7,150598	5,759457	4,658499	4,907636	8,0926	7,402014	7,294813	7,262694	6,967721

INH	11c	10d	11d	15a	15b	15c	15d	15e	15f	15g	15h	15i	18a	18b	18c	18d	NU7441	KU55933	NU7026
Jurkat	4	93	11	92	99	95	94	87	98	107	107	94	96	108	111	82	99	77	86
A2780	26	105	33	104	98	104	97	104	102	99	105	102	101	110	106	99	94	94	77
A549	29	105	83	97	107	111	105	95	89	89	94	97	97	111	116	94	103	98	79
HT-29	61	92	66	89	95	95	93	110	94	81	90	96	103	96	99	98	104	99	93
AGS	28	108	35	95	93	99	104	96	62	37	94	98	100	97	97	102	92	95	88
HeLa	12	100	23	89	97	98	94	106	44	76	93	110	90	99	91	137	105	106	95
SAOS-2	30	99	57	97	97	95	102	86	62	91	99	115	103	106	97	98	97	98	93
PANC-1	48	103	73	79	81	93	95	92	103	106	99	105	107	109	107	104	103	114	103
MCF-7	63	101	65	92	82	89	104	92	83	93	80	99	108	113	115	113	96	106	78
MRC-5	24	106	61	91	95	94	100	95	76	96	98	105	102	102	105	89	101	103	94
mean	33	101	51	93	94	97	99	96	81	88	96	102	101	105	104	102	99	99	89
smodch	18,1999	5,159998	22,30112	6,157316	7,457561	5,880171	4,568294	7,576939	18,92436	19,28013	7,306741	6,372424	5,141843	5,816719	7,92192	14,22111	4,183438	9,245203	8,233896



Obr. 8 Cytotoxický účinek purinových derivátů na vybraných nádorových liniích.

Hodnota naměřeného signálu ovlivněných buněk je vyjádřena v procentech vztažených ke kontrole (100 %). Výsledky jsou znázorněny jako aritmetický průměr ze tří nezávislých měření, ± směrodatná odchylka. Hodnoty v intervalech 0-25 %, 26-50 % a 50-75 % jsou zvýrazněny odlišnými barvami.

Pro každý testovaný derivát byla vypočtena hodnota procenta růstu (GP). GP představuje průměr poklesu proliferace všech buněčných linií ošetřených stejným derivátem vyjádřen v procentech.

Chemosenzitizační účinek inhibitorů

Screening chemosenzitizačního účinku byl proveden na panelu 10 buněčných linií s 33 inhibitory v kombinaci s příslušnými koncentracemi standardního chemoterapeutického činidla způsobujícího DSB – doxorubicinem (Obr. 9, Obr. 10). Schopnost potencovat účinek doxorubicinu byla pozorována u pěti sloučenin na sedmi různých nádorových buněčných liniích. Kombinace inhibitorů s doxorubicinem vedla ke snížení viability buněk ve srovnání s doxorubicinem samotným. Jako nejúčinnější inhibitory se projeví sloučeniny 4f, 10b, 15g, 7e a 15f s hodnotami GP 27 %, 29 %, 30 %, 37 % a 43 % (Obr. 11). Nejcitlivějšími buněčnými liniemi byly A549, HT-29, AGS, HeLa, SAOS-2, PANC-1 a MCF-7. Zajímavostí je, že nebyl pozorován žádný chemosenzitizační efekt u leukemické buněčné linie Jurkat a u buněk rakoviny vaječníků A2780. Stejně tak tomu bylo u buněk normálních lidských fibroblastů MRC-5.

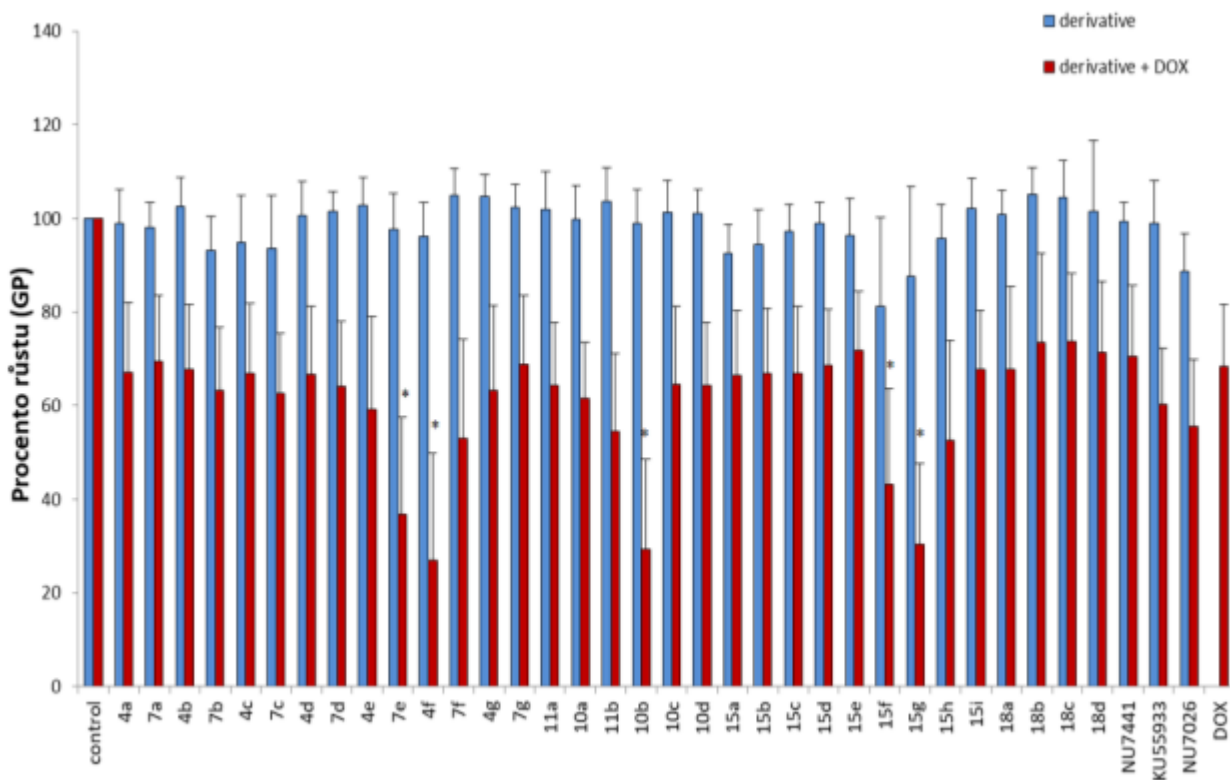
INH+DOX	4a	7a	4b	7b	4c	7c	4d	7d	4e	7e	4f	7f	4g	7g	10a	11a	10b	11b
Jurkat	71	72	80	62	69	63	72	75	74	74	57	68	70	70	62	64	61	64
A2780	48	49	49	44	47	43	47	49	54	47	39	49	52	49	43	47	43	45
A549	89	101	98	96	101	85	92	77	89	15	3	81	92	99	87	99	12	86
HT-29	54	63	55	63	57	63	64	59	43	24	27	37	54	68	59	64	20	41
AGS	62	67	70	63	71	54	49	49	65	43	3	37	41	63	58	64	10	48
HeLa	78	66	72	68	76	66	76	69	65	17	0	54	68	67	62	65	7	57
SAOS-2	72	71	61	55	59	64	67	71	58	29	24	63	70	73	65	65	25	61
PANC-1	58	61	60	59	60	56	62	59	44	30	27	40	56	55	53	58	29	45
MCF-7	48	56	59	51	53	50	52	45	18	15	16	13	36	54	50	50	14	17
MRC-5	90	86	76	71	78	84	88	89	83	72	74	86	93	90	76	69	71	81
mean	67	69	68	63	67	63	67	64	59	37	27	53	63	69	62	64	29	54
smodch	14,88328	14,17877	13,77365	13,35319	14,85101	12,69576	14,49496	13,70159	19,96519	20,88498	22,91618	21,24256	18,18414	14,92887	11,92546	13,30505	19,17262	16,71735

INH+DOX	10c	10d	15a	15b	15c	15d	15e	15f	15g	15h	15i	18a	18b	18c	18d	NU7441	KU55933	NU7026	DOX
Jurkat	71	69	83	81	83	69	98	75	66	77	71	69	77	87	54	69	58	70	78
A2780	44	56	55	54	53	49	50	44	47	54	58	50	58	51	49	55	65	44	55
A549	98	83	77	79	76	83	114	43	9	66	71	103	104	103	104	81	75	58	93
HT-29	58	49	48	63	54	68	62	25	13	30	49	53	68	66	116	64	63	66	54
AGS	66	64	71	66	71	73		51	27	53	84	80	73	72		82	85	57	76
HeLa	65	68	57	61	63	75	108	29	0	51	80	78	78	74	107	83	59	63	72
SAOS-2	69	71	66	70	73	79	80	32	30	62	75	71	81	79	74	80	56	58	75
PANC-1	55	58	60	62	62	59	51	40	34	46	57	54	65	62	50	63	37	43	58
MCF-7	37	40	54	40	49	47	29	21	14	16	27	35	49	55	29	48	37	26	43
MRC-5	82	86	94	93	85	84	55	71	63	71	107	85	83	87	60	79	68	70	79
mean	64	64	66	67	67	69	72	43	30	53	68	68	74	74	71	70	60	56	68
smodch	16,71735	13,51607	13,8784	13,8784	14,30307	11,85898	12,53379	20,5833	17,29612	21,30357	12,53379	17,74268	18,96679	14,44532	15,16562	15,16562	11,90402	14,33382	13,3273

0-25
26-50
51-75

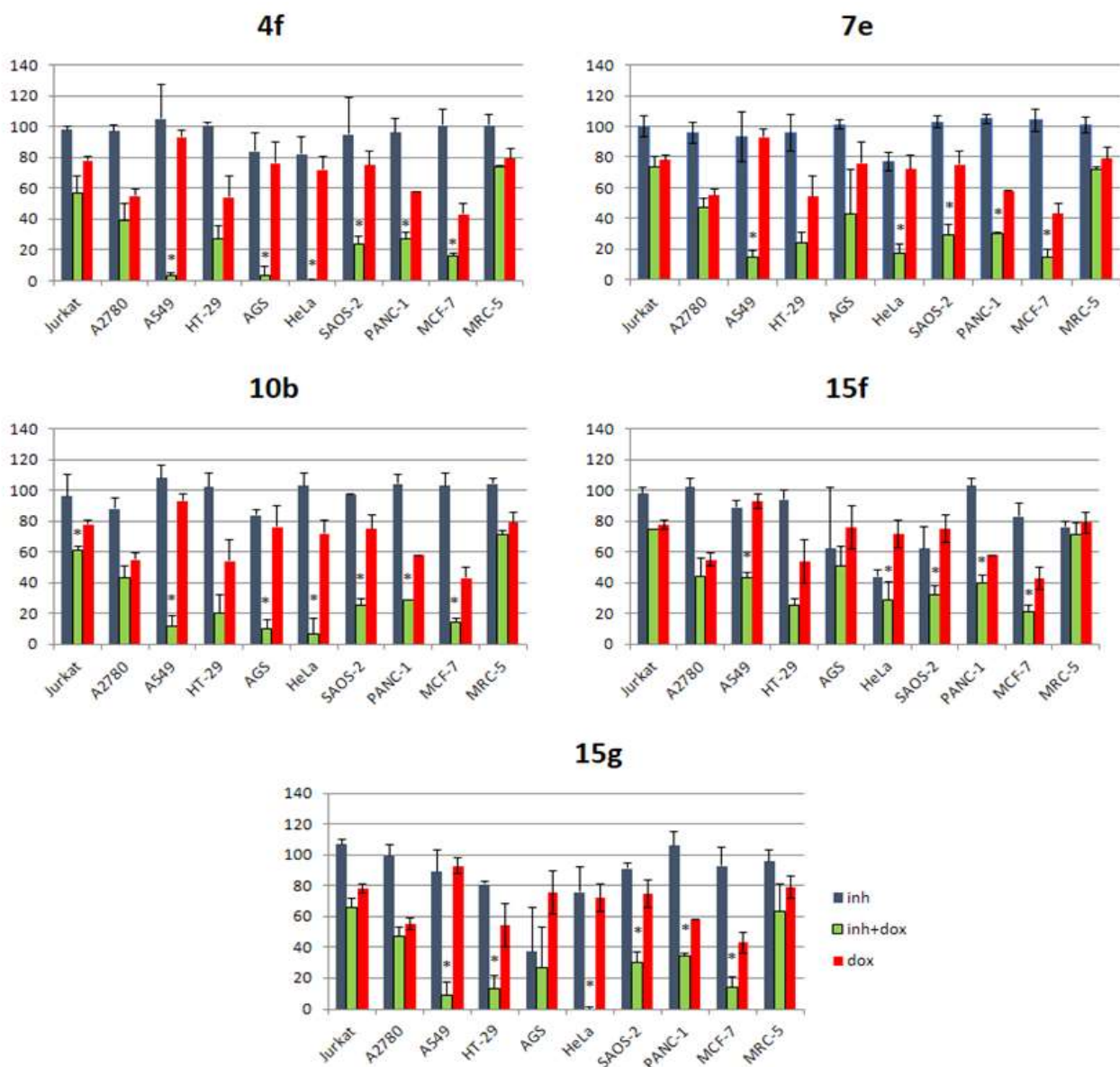
Obr. 9 Cytotoxický účinek purinových derivátů v kombinaci s doxorubicinem na vybraných nádorových liniích.

Hodnota naměřeného signálu ovlivněných buněk je vyjádřena v procentech vztažených ke kontrole (100 %). Výsledky jsou znázorněny jako aritmetický průměr ze tří nezávislých měření, ± směrodatná odchylka. Hodnoty v intervalech 0-25 %, 26-50 % a 50-75 % jsou zvýrazněny odlišnými barvami. Pro každý testovaný derivát byla vypočtena hodnota procenta růstu (GP). GP představuje průměr poklesu proliferace všech buněčných linií ošetřených stejným derivátem vyjádřen v procentech.



Obr. 10 Chemosenzitizační účinek inhibitorů v kombinaci s doxorubicinem.

Hodnota procenta růstu (GP) byla vypočtena pro každý inhibitor samotný a pro kombinaci inhibitorů s doxorubicinem. GP je průměr životaschopnosti (vyjádřeno jako procento vztažené ke kontrole) 10 buněčných linií ošetřených stejným inhibitorem samotným nebo inhibitorem v kombinaci s doxorubicinem. Za statisticky významný byl považován rozdíl na hladině $P \leq 0,05$, který byl stanoven pomocí Studentova T-testu. * - statisticky významný rozdíl oproti působení samostatného doxorubicinu ($P \leq 0,05$)



Obr. 11 Chemosenzitizační účinek pěti nejúčinnějších inhibitorů.

Každý graf představuje životaschopnost deseti buněčných linií po inkubaci s pěti vybranými nejúčinnějšími inhibitory 4f, 7e, 10b, 15f a 15g a s inhibitory v kombinaci s doxorubicinem. Koncentrace doxorubicinu byla vybrána pro každou buněčnou linii individuálně podle její citlivosti. Hodnoty naměřeného signálu ovlivněných buněk jsou vyjádřeny v procentech vztažených ke kontrole (100 %). Výsledky jsou znázorněny jako aritmetický průměr ze tří nezávislých měření, ± směrodatná odchylka. Za statisticky významný byl považován rozdíl na hladině $P \leq 0,05$, který byl stanoven pomocí Studentova T-testu. * - statisticky významný rozdíl kombinované terapie oproti působení samotného doxorubicinu ($P \leq 0,05$)

Diskuse

Každoročně je v České republice diagnostikováno více než 87 000 nových pacientů se zhoubným novotvarem. Ročně v souvislosti s tímto onemocněním umírá asi 27 000 pacientů. Hlavní protinádorové strategie jsou založeny na chemoterapii, radioterapii a chirurgické léčbě, a často jsou kombinovány s terapií biologickou. Chemoterapeutická léčba ovšem může narušit i zdravé tkáně, proto hlavním cílem při hledání nových protinádorových činidel jsou takové sloučeniny, které poškozují zdravé buňky co možná nejméně a současně působí selektivně vůči buňkám nádorovým.

Cytostatická léčiva mají na nádorové buňky rozličné účinky. Závisí na typu buněk a jejich schopnosti poškození vyvolaná cytostatiky opravovat. Hlavním cílem mnoha konvenčních protinádorových látek je molekula DNA. Buňka má dvě hlavní možnosti, jak odpovědět na poškození dvoušroubovice DNA. Může dojít k přechodné zástavě buněčného cyklu v kontrolních bodech a buňka má tak čas tyto léze opravit. Proto je inhibice opravy poškození molekuly DNA nádorových buněk vyvolaném působením ať už chemoterapeutiky či ionizujícím zářením jednou z nejslibnějších strategií v moderní terapii rakoviny. Pokud totiž nedojde k její opravě například z důvodu rozsáhlého poškození nebo zmíněnou inhibicí, nastane druhá situace, a to odstranění poškozených buněk. To se děje nejčastěji procesem apoptózy (Tavecchio et al. 2012, Hakem 2008).

Existuje velké množství regulátorů, které reagují na poškození DNA a jsou schopny zahájit její opravu. Tato práce se zaměřuje na rodinu fosfatidylinositol-3-kinasy, konkrétně na její IV. třídu označovanou jako kinasy příbuzné fosfatidylinositol-3 kinase. V odpovědi na léze DNA se uplatňují kinasy ATM, ATR a DNA-PK. Na poškození, která vedou ke vzniku jednořetězcových zlomů, reaguje kinasa ATR, na zlomy dvouřetězcové pak kinasy ATM a DNA-PK (Lempiäinen a Halazonetis 2009). Při hledání vhodného cíle bylo bráno v úvahu, že již existuje několik inhibitorů ATM a ATR se slibnými výsledky z preklinických studií, ovšem prozatím je zde nedostatek vysoce selektivních inhibitorů DNA-PK.

DNA-PK je serin/threoninová kinasa skládající se z velké katalytické podjednotky, DNA-PKcs, a DNA-vázacího heterodimeru Ku70/86. DNA-PK je zapojena do řady procesů, ovšem její hlavní význam spočívá v procesu reparace dvouřetězcových zlomů cestou nehomologního spojování konců – NHEJ (Neal a Meek 2011, Meek et al. 2008). Umění nádorových buněk reparovat poškození vyvolaná protinádorovými terapiemi je klíčové pro jejich další osud. Proto i DNA-PK je důležitým prvkem, jelikož se těchto oprav účastní. Preklinické studie naznačují, že lidské buněčné linie s defektní funkcí DNA-PK (s funkční inaktivací heterodimeru Ku či DNA-PKcs), jsou hypersenzitivní *in vitro* jak na působení ionizujícího záření tak na některá další protinádorová činidla způsobující DSBs. Dále bylo prokázáno, že zvýšená hladina DNA-PK se často vyskytuje u nádorů rezistentních k léčbě. Z toho vyplývá, že selektivní inhibitory DNA-PK jsou potenciálně využitelné jako prostředek k senzitivizaci nádorových buněk vůči chemoterapii a radioterapii (Damia 2020).

Počátky vývoje inhibitorů DNA-PK se opírají o dřívější studie, které se zabývaly syntézou malých molekul inhibitorů PI3K. Přirozeně se vyskytující bioflavonoid quercetin působil jako kompetitivní antagonist proti kinasové doméně PI3K a dalším proteinovým a lipidovým kinasám. Jeho neselektivita se projevila jako užitečná, jelikož byl následně použit jako modelová sloučenina k vývoji cílených inhibitorů (Mohiuddin a Kang 2019). Ostatně většina následných studií zabývajících se syntézou nových inhibitorů DNA-PK vychází ze struktur již existujících sloučenin. Cílem je především vylepšení jejich vlastností týkajících se nedostatečné rozpustnosti látek, selektivity a metabolické nestability *in vivo* vedoucí k velmi krátkému biologickému poločasu v séru (Davidson et al. 2013). První dva identifikované a nejvíce citované inhibitory jsou wortmannin a LY294002. Ačkoli ani jeden z nich nebyl použit jako klinické léčivo, na bázi těchto dvou sloučenin bylo vyvinuto několik nových inhibitorů PI3K, které překonaly jejich nepříznivé vlastnosti (Zhu et al. 2015). Námi

testované sloučeniny, které byly nově syntetizované Ústavem toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové a Centrem biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice v Hradci Králové, rovněž vycházely ze struktur již známých inhibitorů. U těchto nových látek došlo k modifikacím, které měly za cíl zabránit problémům s rozpustností při současném zachování afinity k DNA-PK a PI3K.

V první části práce jsme se zabývali odpovědí panelu buněčných linií na monoterapii chinazolinovými a purinovými deriváty. Ve skupině chinazolinových sloučenin, kde proběhla podrobnější studie, jsme pro další testování vybrali buněčnou linii karcinomu tlustého střeva HT-29. U této modelové linie nedošlo k významnému ovlivnění proliferace samotnými deriváty.

Dalším krokem bylo prokázat, zda jsou nové sloučeniny schopny potencovat účinek standardního chemoterapeutika doxorubicinu. Mnoho léků, zejména chemoterapeutik, interaguje s molekulou DNA buď vazbou do žlábků DNA, nebo dochází k interkalaci mezi báze. V důsledku toho jsou ovlivněny důležité funkce buňky, jako je replikace nebo exprese proteinů. Doxorubicin je interkalátor DNA, hojně používaný v klinickém prostředí k léčbě široké škály malignit. Interakcí doxorubicinu s DNA může dojít k narušení polynukleotidové struktury, což vede k inhibici replikace a transkripce v důsledku jeho interference s enzymem topoizomerasou II (Jawad et al. 2019). Jako standardní inhibitor DNA-PK byl použit NU7441 o koncentraci 1 $\mu\text{mol/l}$. Jeho selektivita byla prokázána například v práci kolektivu Hardcastle et al., kdy koncentrace inhibitoru 100 μM neovlivnila aktivitu ATM a ATR a proti PI3K a mTOR vykazovala aktivitu pouze minimální (Hardcastle et al. 2005). Bylo prokázáno, že sloučenina NU7441 potencuje účinky chemoterapeutické léčby indukující poškození DNA u rakoviny prsu (Ciszewski et al. 2014), nádoru tlustého střeva (Zhao et al. 2006), B-buněčné chronické lymfocytární leukemie (Elliott et al. 2011), nemalobuněčného karcinomu plic (Yanai et al. 2017) a nazofaryngeálního karcinomu (Dong et al. 2018). Rovněž v naší studii tento standardní inhibitor prokázal synergický efekt jak s chinazolinovými, tak purinovými deriváty v kombinaci s doxorubicinem, a to zejména u buněčných linií nádoru tlustého střeva HT-29, adenokarcinomu žaludku AGS, adenokarcinomu plic A549, karcinomu děložního čípku HeLa, osteosarkomu SAOS-2, adenokarcinomu prsu MCF-7 a karcinomu pankreatu PANC-1.

V rámci testování purinových derivátů byl v kombinaci s doxorubicinem dále použit standardní inhibitor DNA-PK NU7026 a inhibitor ATM KU55933. Oba zmíněné deriváty potencovaly účinek doxorubicinu zejména u buněk karcinomu pankreatu a prsu. Existuje mnoho studií zkoumající efekt těchto látek. Například Willmore et al. v roce 2004 zaznamenali synergický efekt NU7026 v kombinaci s cytostatiky a IR u leukemických buněk (Willmore et al. 2004) a Niazi et al. u buněk karcinomu žaludku (Niazi et al. 2014). Inhibitor ATM pak senzitivizoval buňky karcinomu prsu (Cowell et al. 2005) či radiorezistentní buňky rakoviny močového měchýře (Zhang et al. 2015).

V naší studii jsme rovněž dospěli ke zjištění, že hned 13 ze 17 nových testovaných sloučenin chinazolinových derivátů mělo signifikantní chemosenzitizační efekt na buňkách HT-29 v kombinaci s doxorubicinem. Schopnost potencovat účinek doxorubicinu byla zaznamenána i u skupiny purinových derivátů, kdy u pěti inhibitorů na sedmi buněčných liniích byl pozorován významný synergický efekt.

Je známo, že doxorubicin zabíjí rakovinné buňky indukcí apoptózy, méně často pak prostřednictvím autofagie či senescence (Meredith a Dass 2016). Pro vyhodnocení způsobu buněčné smrti indukované kombinací doxorubicinu s neúčinnějším chinazolinovým senzibilizátorem 14d jsme testovali aktivaci kaspas, které jsou typické pro apoptózu. Zjištěním významné aktivace kaspas 3/7, 8 a 9 bylo odhaleno spuštění apoptotické kaskády. Můžeme tedy konstatovat, že iniciátorové kaspasy 8 a 9 byly aktivovány dimerizací z neaktivních prokaspas. Aktivované iniciátorové kaspasy následně štěpily neaktivní dimery efektorové kaspasy 3/7. Jedna aktivovaná efektorová kaspasa je schopna štěpit a aktivovat

další efektorové kaspasy. Proces pak vede ke zrychlení zpětnovazebné smyčky aktivace kaspasy a apoptotické buněčné smrti. Tento efekt byl rovněž pozorován při ovlivnění buněk standardním inhibítorem NU7441 v kombinaci s doxorubicinem, což je v souladu například s výzkumem Alikarami et al. 2017. Ve své studii zkoumali na buňkách akutní lymfoblastické leukemie (BCP-ALL) mimo jiné apoptotické události spojené s kombinovanou terapií buněk inhibítorem NU7441 a doxorubicinem. Pozorováním aktivace kaspas 3 a 9 dospěli k závěru, že inhibice DNA-PK pomocí NU7441 významně zesiluje apoptotický účinek standardního chemoterapeutika (Alikarami et al. 2017).

Pomocí průtokové cytometrie jsme zjišťovali, zda inhibice aktivity DNA-PK ovlivňuje fáze buněčného cyklu u buněk HT-29. Akumulace buněk v G2 fázi byla pozorována jak kombinací doxorubicinu s inhibítorem 14d, tak se standardním inhibítorem NU7026. Buněčný cyklus byl zastaven z důvodu aktivace kontrolního bodu G2/M, který bezprostředně rozhoduje o vstupu buňky do mitózy. Tento fakt poukazuje na spuštění obranného mechanismu buněk vůči poškození DNA zkoumanými cytostatiky, kdy dochází ke zpomalení či úplnému zastavení buněčného cyklu (Lossaint et al. 2011). To je v souladu s pozorováním provedeným Zhao et al., kteří testovali inhibitor NU7441 v kombinaci s doxorubicinem a etoposidem na buňkách SW620 (Zhao et al. 2006). V roce 2014 si Pastwa et al. rovněž všimli zástavy buněčného cyklu v kontrolním bodě G2/M po aplikaci wortmanninu s cisplatinou a etoposidem u buněčné linie lidského glioblastomu M0529 (Pastwa et al. 2014).

Odpověď na poškození molekuly DNA je v buňkách obratlovců kontrolována třemi druhy kinas – ATM, ATR a DNA-PK. Jelikož bylo naším cílem najít selektivní inhibitor DNA-PK, zaměřili jsme další výzkum na studium exprese proteinů, kterou zmíněné kinasy ovlivňují. Protein p53 má zásadní funkci v odpovědi buňky na poškození DNA a slouží jako substrát pro ATM. Jeho funkce je regulována řadou mechanismů. Pro účinnou degradaci p53 má důležitou úlohu protein Mdm2. Jestliže jsou buňky vystaveny stresu indukujícím neopravitelné dvouřetězcové zlomy DNA, dojde za pomoci ATM k fosforylaci Mdm2 a p53 na Ser 15. Zvýšená fosforylace na Ser 15 znamená, že ATM kinasa není inhibována (Tichy et al. 2014, McKinnon 2004). V našem experimentálním postupu samotný doxorubicin, doxorubicin v kombinaci s inhibítorem 14d a standardním inhibítorem NU7026 způsobily významnou up regulaci p53. Aktivace a stabilizace p53 je spojena s řadou posttranslačních modifikací. Zde jsme pozorovali fosforylaci p53 na Ser 15 po indukci samotným doxorubicinem, stejně jako v kombinaci s inhibitory 14d a NU7026. Zajímavé je, že zatímco aplikace samotného NU7026 způsobila pouze přechodné zvýšení množství p53, samotný inhibitor 14d zvýšil množství p53 a tento stav jsme pozorovali po celou dobu trvání experimentu. Po ovlivnění samotnými inhibitory nebyla pozorována fosforylace na Ser 15.

Ústřední funkcí kinasy ATR je aktivovat protein kinasu Chk1 fosforylací na Ser 345 a Ser 317. V menší míře je Chk1 fosforylována rovněž ATM (Blackford a Jackson 2017). Naopak protein kinasa Chk2 je po indukci dvojitých zlomů v molekule DNA přímo aktivována pomocí ATM, a to fosforylací na Thr 68 (Buscemi et al. 2006). Chk1 a Chk2 mají klíčovou úlohu v odpovědi na genotoxický stres, kde slouží coby přenašeče signálů zprostředkovaných ATM a ATR z kontrolních bodů buněčného cyklu. V konečném důsledku jsou schopny buněčný cyklus zcela zastavit (Bartek a Lucas 2003). Dokázali jsme, že doxorubicin samotný a v kombinaci s oběma inhibitory 14d a NU7026 vyvolal fosforylaci Chk1 na Ser 345 a Chk2 na Thr 68, proto můžeme konstatovat, že dráhy ATM a ATR nebyly ovlivněny. K fosforylaci těchto kinas dochází v reakci na poškození DNA, kdy tyto substráty pro ATM a ATR umožňují buňkám oddálit progresi buněčného cyklu, opravit molekulu DNA či vyvolat buněčnou smrt (Ronco et al. 2017).

Závěrem našeho experimentálního postupu bylo sledování vlivu sloučeniny 14d na samicích outbredních myší po dobu 5 dnů. Látka byla aplikována intraperitoneálně ve formě hydrochloridové soli a byly sledovány dva cílové parametry – úbytek hmotnosti a klinická skóre. Klinické příznaky byly hodnoceny pozorováním aktivity, vzhledu a tělesného

stavu. Limit úbytku hmotnosti, totožně jako v práci Aston et al., byl určen na 10 % či 15 %, ovšem i 10% limit lze považovat za krok ke zdokonalení nastavení maximální tolerované dávky (Aston et al. 2017). Žádná z dávek sloučeniny 14d však nevedla ke ztrátě tělesné hmotnosti o více než 10 % s výjimkou jednoho případu, kdy myš ztratila 15 % své původní hmotnosti při podání maximální dávky (30 mg/kg) vzhledem k omezené rozpustnosti sloučeniny. Než však tato dávka může být považována za nejvyšší tolerovanou dávku v budoucí preklinické studii, je třeba brát v úvahu potenciální rozdíly mezi myšími kmeny (Festing 2010).

Pouze malý zlomek budoucích potenciálních léčiv na bázi inhibice DNA-PK došel do fáze klinického testování. Za zmínku jistě stojí první fáze klinických testů duálního inhibitoru DNA-PK a mTOR kinasy - C-115, kdy byla sledována jeho bezpečnost, farmakokinetika a farmakodynamika u pokročilých malignit. C-115 byl pacienty dobře tolerovaný s výskytem běžných vedlejších účinků jako je únava, nevolnost, snížená chuť k jídlu, trombocytopenie, hyperglykemie a další. Slibné výsledky byly pozorovány u pacientů s chronickou lymfatickou leukemií a u lymfomu z malých lymfocytů (Munster et al 2019). V roce 2021 byla vydaná studie popisující první fázi klinických testů inhibitoru DNA-PK peposertibu (M3814) u pacientů s pokročilými solidními tumory. Peposertib prokázal mírnou účinnost a byl pacienty dobře tolerovaný (Bussel et al. 2021).

Většina výzkumů inhibice DNA-PK se zaměřila na vývoj nízkomolekulárních látek. Všechny tyto studie však přinášejí slibné výsledky v buněčných systémech *in vitro* a jsou stále daleko od klinické aplikace kvůli jejich nepříznivým vlastnostem. Další možná strategie zacílení DNA-PK je její inhibice za pomoci protilátek (Damia 2020). Xiong et al. použili specifickou protilátku ScFv 18-2 konjugovanou s folátem která do buněk vstupuje pomocí endocytózy zprostředkované receptorem folátu. Výsledkem byla signifikantní radiosenzitizace u buněk rakoviny plic (Xiong et al. 2012).

Závěr

Hlavními cíli disertační práce bylo objasnit potenciální synergický účinek nově syntetizovaných chinazolinových a purinových derivátů se standardně používanými cytostatiky na vybraných lidských nádorových buněčných liniích a dále prostudovat mechanismus účinku nejúčinnější látky.

Rozsáhlým screeningem na buněčných liniích jsme získali informaci o cytotoxicitě samotných derivátů. S ohledem na zjištěné výsledky byla pro další testování vybrána buněčná linie karcinomu tlustého střeva HT-29, jelikož samotné deriváty neovlivnily viabilitu buněk. Všechny následné experimenty pak probíhaly na této buněčné linii. V dalším kroku bylo úkolem stanovit poloviční inhibiční koncentraci doxorubicinu u buněk HT-29, a tato koncentrace poté figurovala v navazujících experimentech.

Srovnáním účinku působení samotných derivátů a derivátů v kombinaci s doxorubicinem jsme zaznamenali velmi významný synergický efekt u chinazolinových sloučenin 14c a 14d. Sloučenina 14d byla na základě slibných výsledků podrobena patentovému řízení a zároveň námi vybrána pro detailní prostudování mechanismu účinku na buněčnou linii HT-29. Rovněž deriváty ze skupiny purinových inhibitorů byly podrobeny testování schopnosti potencovat účinek doxorubicinu. U pěti derivátů na sedmi buněčných liniích byl shledán signifikantní synergický efekt.

Studiem vlivu kombinované terapie standardního terapeutika a chinazolinového inhibitoru 14d na distribuci buněčné populace v jednotlivých fázích buněčného cyklu byla zaznamenána akumulace buněk v G2 fázi. Cytotoxické působení kombinací léčiv na viabilitu buněk způsobil významné zesílení apoptotického účinku standardního chemoterapeutika doxorubicinu, což bylo dokázáno zvýšenou aktivitou kaspas. Díky sledování fosforylace klíčových proteinů bylo zároveň dokázáno, že námi studovaný inhibitor neovlivňoval při odpovědi na poškození molekuly DNA dráhy kinas ATM a ATR. Testování *in vivo* na samicích outbredních myši vykazovalo relativně nízkou toxicitu a byla stanovena maximální tolerovaná dávka.

Na závěr lze říci, že všechny stanovené cíle disertační práce byly úspěšně splněny. Sloučenina 14d se projevila jako velmi slibné protinádorové činidlo, které může sloužit například jako výchozí sloučenina pro vývoj nových terapeutik založených na chemosenzitizaci s vyšší kinasovou specificitou.

Použitá literatura

Alikarami F, Safa M, Faranoush M, Hayat P, Kazemi A. Inhibition of DNA-PK enhances chemosensitivity of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells to doxorubicin. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2017; 94: 1077-1093.

Aston WJ, Hope DE, Nowak AK, Robinson BW, Lake RA, Lesterhuis WJ. A systematic investigation of the maximum tolerated dose of cytotoxic chemotherapy with and without supportive care in mice. *BMC Cancer* 2017; 17: 684-693.

Bai J, Li Y, Zhang G. Cell cycle regulation and anticancer drug discovery. *Cancer Biology and Medicine* 2017; 14: 348-362.

Balint É, Vousden KH. Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein. *British Journal of Cancer* 2001; 85: 1813-1823.

Bartek J, Lukas J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 2003; 3:421-429.

Blackford AN, Jackson SP. ATM, ATR, and DNA-PK: The trinity at the heart of the DNA damage response. *Molecular Cell* 2017; 66: 801-817.

Buscemi G, Carlessi L, Zannini L, Lisanti S, Fontanella E, Canevari S, Delia D. DNA damage-induced cell cycle regulation and function of novel Chk2 phosphoresidues. *Molecular and Cellular Biology* 2006; 26: 7832-7845.

Bussel MTJ, Awada A, de Jonge MJA, Mau-Sorensen M, Nielsen D, Schöffski P, Verheul HMW, Sarholz B, Berghoff K, Bawab SE, Kuipers M, Damstrup L, Diaz-Padilla I, Schellens JHM. A first-in-man phase I study of the DNA-dependent protein kinase inhibitor peposertib (formerly M3814) in patients with advanced solid tumours. *British Journal of Cancer* 2021; 124: 728-735.

Ciszewski WM, Tavecchio M, Dastych J, Curtin NJ. DNAPK inhibition by NU7441 sensitizes breast cancer cells to ionizing radiation and doxorubicin. *Breast Cancer Research and Treatment* 2014; 143: 47-55.

Clapham KM, Bardos J, Finlay MRV, et al. DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) inhibitors: structure-activity relationships for O-alkoxyphenylchromen-4-one probes of the ATP-binding domain. *Bioorg Med Chem Lett* 2011; 21: 966-970.

Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA. The PI3K pathway as drug target in human cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2010; 28: 1075-1083.

Cowell IG, Durkacz BW, Tilby MJ. Sensitization of breast carcinoma cells to ionizing radiation by small molecule inhibitors of DNA-dependent protein kinase and ataxia telangiectasia mutated. *Biochemical Pharmacology* 2005; 71: 13-20.

Dai Y, Grant S. New insights into Checkpoint kinase 1 in the DNA damage response signaling network. *Clinical Cancer Research* 2010; 16: 376-383.

Damia G. Targeting DNA-PK in cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2020; 821: 1-7.

Davidson D, Amrein L, Panasci L, Aloyz R. Small molecules, inhibitors of DNA-PK, targeting DNA repair, and beyond. *Frontiers of Pharmacology* 2013; 4: 5. doi: 10.3389/fphar.2013.00005.

Delabaere L, Ertl HA, Massey DJ, Hofley CM, Sohail F, Bienenstock EJ, Sebastian H, Chiolo I, LaRocque JR. Aging impairs double-strand break repair by homologous recombination in *Drosophila* germ cells. *Aging Cell* 2017; 16: 320-328.

Dong J., Ren Y., Zhang T., Wang Z., Ling C. C., Li G. C., He F., Wang Ch., Wen B. Inactivation of DNA-PK by knockdown DNA-PKcs or NU7441 impairs non-homologous end-joining of radiation-induced double strand break repair. *Oncology Reports* 2018; 39: 912-920.

Elliott S. L., Crawford C., Mulligan E., Summerfield G., Newton P., Wallis J., Mainou-Fowler T., Evans P., Bedwell C., Durkacz B. W., Willmore E. Mitoxantrone in combination with an inhibitor of DNA-dependent protein kinase: a potential therapy for high B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology* 2011; 152: 61-71.

Festing MFW. Inbred strains should replace outbred stocks in toxicology, safety testing, and drug development. *Toxicologic Pathology* 2010; 38: 681-690.

Hakem R. DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *EMBO J* 2008; 27: 589-605.

Hardcastle IR, Cockcroft X, Curtin NJ, El-Murr MD, Leahy JJJ, Stockley M, Golding BT, Rigoreau L, Richardson C, Smith GCM, Griffin RJ. Discovery of potent chromen-4-one inhibitors of the DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) using a small-molecule library approach. *Journal of Medicinal Chemistry* 2005; 48: 7829-7846.

Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed Research International* 2014; 1-23.

Helleday T. Homologous recombination in cancer development, treatment and development of drug resistance. *Carcinogenesis* 2010; 31: 955-960.

Hung PJ, Johnson B, Chen B-R, Byrum AK, Bredemeyer AL, Yewdell WT, Johnson TE, Lee BJ, Deivasigamani S, Hindi I, Amatya P, Gross ML, Paull TT, Pisapia DJ, Chaudhuri J, Petrini JJH, Mosammamparast N, Amarasinghe GK, Zha S, Tyler JK, Sleckman BP. MRI is a DNA damage response adaptor during classical non-homologous end joining. *Molecular Cell* 2018; 71: 332-342.

Ismail IH, Martensson S, Moshinsky D, et al. SU11752 inhibits the DNA-dependent protein kinase and DNA double-strand break repair resulting in ionizing radiation sensitization. *Oncogene* 2004; 23: 873-882.

Jawad B., Poudel L., Podgornik R., Steinmetz N. F., Ching W.-Y. Molecular mechanism and binding free energy of doxorubicin intercalation in DNA. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2019; 21: 3877-3893.

Kamada R, Toguchi Y, Nomura T, Imagawa T, Sakaguchi K. Tetramer formation of tumor suppressor protein p53: structure, function, and applications. *Peptide Science* 2015; 106: 598-612.

Kao J, Rosenstein BS, Peters S, Milano MT, Kron SJ. Cellular response to DNA damage. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1066: 243-258.

Karagiannis TC, El-Osta A. Double-strand breaks: signaling pathways and repair mechanisms. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 2137-2147.

Kasperek TR, Humphrey TC. DNA double-strand break repair pathways, chromosomal rearrangements and cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 2011; 22: 886-897.

Kong XM, Shen Y, Jiang N, Fei X, Mi J. Emerging roles of DNA-PK besides DNA repair. *Cell Signal* 2011; 23: 1273-1280.

Leahy JJ, Golding BT, Griffin RJ, et al. Identification of a highly potent and selective DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) inhibitor (NU7441) by screening of chromenone libraries. *Bioorg Med Chem Lett* 2004; 14: 6083-6087.

Lempiäinen H, Halazonetis TD. Emerging common themes in regulation of PIKKs and PI3Ks. *The EMBO Journal* 2009; 28: 3067-3073.

Lieber MR, Ma YM, Pannicke U, Schwarz K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 712-720.

Lim S a Kaldis P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* 2013; 140: 3079-3093.

Lok BH, Powell SN. Molecular pathways: Understanding the role of Rad52 in homologous recombination for therapeutic advancement. *Clinical Cancer Research* 2012; 18: 6400-6406.

Lossaint G, Besnard E, Fisher D, Piette J, Dulić V. Chk1 is dispensable for G2 arrest in response to sustained DNA damage when the ATM/p53/p21 pathway is functional. *Oncogene* 2011; 30: 4261-4274.

Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews: Cancer* 2009; 9: 153-166.

McKinnon PJ. ATM and ataxia telangiectasia. *EMBO reports* 2004; 5: 772-776.

Meek K, Dang V, Lees-Miller SP. DNA-PK: The means to justify the ends? *Adv Immunol* 2008; 99: 33-58.

Meredith A-M, Dass CR. Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2016; 68: 729-741.

Mikusova V, Tichy A, Rezacova M, Vavrova J. Mitoxantrone in combination with a DNA-PK inhibitor: possible therapy of promyelocytic leukaemia resistant forms. *Folia Biol* 2011; 57: 200-205.

Mohiuddin IS, Kang MH. DNA-PK as an emerging therapeutic target in cancer. *Frontiers in Oncology* 2019; 9: 1-8.

Munster P, Mita M, Mahipal A, Nemunaitis J, Massard C, Mikkelsen T, Cruz C, Paz-Ares L, Hidalgo M, Rathkopf D, Blumenschein G, Smith DC, Eichhorst B, Cloughesy T, Filvaroff EH, Li S, Raymon H, de Haan H, Hege K, Bendell JC. First-in-human phase I study of a dual mTOR kinase and DNA-PK inhibitor (C-115) in advanced Malignancy. *Cancer Management and Research* 2019; 11: 10463-10476.

Neal JA, Meek K. Choosing the right path: Does DNA-PK help make the decision? *Mutation Research* 2011; 711: 73-86.

Niazi MT, Mok G, Heravi M, Lee L, Vuong T, Aloyz R, Panasci L, Muanza T. Effects of DNA-dependent protein kinase inhibition by NU7026 on DNA repair and cell survival in irradiated gastric cancer cell line N87. *Current Oncology* 2014; 21: 91-96.

O'Connor MJ, Martin NM, Smith GC. Targeted cancer therapies based on the inhibition of DNA strand break repair. *Oncogene* 2007; 26: 7816-7824.

Pastwa E, Poplawski T, Lewandowska U, Somiari SB, Blasiak J, Somiari RI. Wortmannin potentiates the combined effect of etoposide and cisplatin in human glioma cells. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2014; 53: 423-431.

Rezacova M, Vavrova J. Molekulární mechanismy účinku ionizujícího záření. *Nukleus HK* 2011. ISBN 978-80-87009-82-6.

Ronco C, Martin AR, Damange L, Benhida R. ATM, ATR, CHK1, CHK2 and WEE1 inhibitors in cancer and cancer stem cells. *Medicinal Chemistry Communications* 2017; 8: 295-319.

Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Current Opinion in Cell Biology* 2001; 13: 332-337.

Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Molecular Cancer* 2015; 14: 1-14.

Tavecchio M, Munck JM, Cano C, Newell DR, Curtin NJ. Further characterisation of the cellular activity of the DNAPK inhibitor, NU7441, reveals potential cross-talk with homologous recombination. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2012; 69: 155-164.

Tichy A. Apoptotic machinery: The Bcl-2 family proteins in the role of inspectors and superintendents. *Acta Medica* 2006; 49: 13-18.

Tichy A, Zaskodova D, Rezacova M, Vavrova J, Vokurkova D, Pejchal J, Vilasova Z, Cerman J, Osterreich J. Gamma radiation-induced ATM-dependent signalling in human T-lymphocyte leukemic cells, MOLT-4. *Acta Biochimica Polonica* 2007; 54: 281-287.

- Tichy A, Durisova K, Novotna E, Zarybnicka L, Vavrova J, Pejchal J, Sinkorova Z. Phosphatidylinositol-3-kinase related kinases (PIKKS) in radiation-induced damage. *Military Medical Science Letters* 2012; 81: 177-187.
- Tichy A, Durisova K, Salovska B, Pejchal J, Zarybnicka L, Vavrova J, Dye NA, Sinkorova Z. Radio-sensitization of human leukaemic MOLT-4 cells by DNA-dependent protein kinase inhibitor, NU7441. *Radiation and Environmental Biophysics* 2014; 53: 83-92.
- Vousden KH. Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; 1602: 47-59.
- Willmore E, de Caux S, Sunter NJ, Tilby MJ, Jackson GH, Austin CA, Durkacz BW. A novel DNAdependent protein kinase inhibitor, NU7026, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase II poisons used in the treatment of leukemia. *Blood* 2004; 103: 4659-4665.
- Wong RSY. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 2011; 30: 1-14.
- Xiong H, Lee RJ, Haura EB, Edwards JG, Dynan WS, Li S. Intranuclear delivery of a novel antibody-derived radiosensitizer targeting the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit. *International Journal of Radiation, Oncology, Biology, Physics* 2012; 83: 1023-1030.
- Yanai M, Makino H, Ping B, Takeda K, Tanaka N, Sakamoto T, Yamaguchi K, Kodani M, Yamasaki A, Igishi T, Shimizu E. DNA-PK inhibition by NU7441 enhances chemosensitivity to topoisomerase inhibitor in non-small cell lung carcinoma cells by blocking DNA damage repair. *Yonago Acta Medica* 2017; 60: 9-15.
- Zhang T, Shen Y, Chen Y, Hsieh J-T, Kong Z. The ATM inhibitor KU55933 sensitizes radioresistant bladder cancer cells with DAB2IP gene defect. *International Journal of Radiation Biology* 2015; 91: 368-378.
- Zhao Y, Thomas HD, Batey MA, Cowell IG, Richardson CJ, Griffin RJ, Calvert AH, Newell DR, Smith GCM, Curtin NJ. Preclinical evaluation of a potent novel DNA-dependent protein kinase inhibitor NU7441. *Cancer Research* 2006; 66: 5354-5362.
- Zhu JY, Hou TJ, Mao XL. Discovery of selective phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors to treat hematological malignancies. *Drug Discov Today* 2015; 20: 988-994.

Přehled publikační činnosti autora

Původní vědecké práce v impaktovaném časopise

Pospisilova M, Andrs M, Seifrtova M, Havelek R, Jun D, Tomsik P, Prchal L, Dolezal R, Tichy A, Kucera T, Korabecny J, Rezacova M. Novel quinazolin-4-one derivatives as potentiating agents of doxorubicin cytotoxicity. *Bioorganic Chemistry* 2019; 82: 204-210. **IF2021 5,307**

Andrs M, **Pospisilova M**, Seifrtova M, Havelek R, Tichy A, Vejrychova K, Polednikova M, Gorecki L, Jun D, Korabecny J, Rezacova M. Purin-6-one and pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-one derivatives as potentiating agents of doxorubicin cytotoxicity. *Future Medicinal Chemistry* 2018; 10 (17): 229-238. **IF2021 4,767**

Koutova D, **Kulhava M**, Havelek R, Majorosova M, Kralovec K, Habartova K, Hostalkova A, Opletal L, Cahlikova L, Rezacova M. Bersavine: a novel bisbenzylisoquinoline alkaloid with cytotoxic, antiproliferative and apoptosis-inducing effects on human leukemic cells. *Molecules* 2020; 25(4), 964. **IF2021 4,927**

Ostatní práce v impaktovaném časopise

Pospisilova M, Seifrtova M, Rezacova M. Small molecule inhibitors of DNA-PK for tumor sensitization to anticancer therapy. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2017; 68: 337-344. **IF2020 3,011**

Patenty

Fakultní nemocnice Hradec Králové a Univerzita Karlova. Derivát 2-morfolino-3,4-dihydrochinazolin-4-onu s aromatickými substituenty v poloze 8-, způsob jeho přípravy a jeho použití. Česká Republika. Patentový spis 308 158 B6. 18.12.2019

Přednášky, plakátová sdělení na odborných setkáních, ostatní práce

21st World Congress on Advances in Oncology and 19th International Symposium on Molecular Medicine, Atény, Řecko, 2016

Prezentace posteru na téma: Testing of new anticancer therapeutics based on low molecular-weight inhibitors of DNA-PK

ESMO Congress, Madrid, Španělsko, 2017

Prezentace posteru na téma: New isoquinoline alkaloid bersavine as a possible anticancer agent

Kordek D, Kopeček M, Čáňová K, Habartová K, **Pospíšilová M**. The LMS Moodle and the Moodle Mobile Application in Educational Process of Biophysics. MITAV 2017, University of Defence, Brno. ISBN 978-80-7582-026-6

14th Postgraduate Medical Students Conference, Hradec Králové, 2018

Přednáška na téma: Therapeutic potential of novel quinazoline derivatives as a chemosensitizer for cancer therapy