UNIVERZITA KARLOVA

Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Monika Kulhavá **2023**

Doktorský studijní program
Lékařská chemie a biochemie

Studium protinádorového účinku nových nízkomolekulárních inhibitorů PIKK

Study of anticancer effect of new low-molecular-weight PIKK inhibitors

Ing. Monika Kulhavá

Školitel: prof. MUDr. Martina Řezáčová, Ph.D.

Hradec Králové, 2023

Prohlášení autora

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy, Praha.

Hradec Králové, 2023 **Monika Kulhavá**

Poděkování

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala všem, kteří se jakoukoli měrou podíleli na vzniku nejen této práce, ale i pomoci a pochopení v průběhu celého doktorského studia.

Mé poděkování patří především:

- Paní přednostce a mé školitelce prof. MUDr. Martině Řezáčové, Ph.D. za umožnění studia na Ústavu lékařské biochemie LFHK a poskytnutí zajímavého tématu disertační práce. Děkuji za odborné konzultace a cenné rady, velmi přátelský přístup a trpělivost při mé klikaté cestě studiem. Za ochotné vyhovění veškerým mým požadavkům a přáním, toho si velmi vážím.
- Mgr. Martině Majorošové, Ph.D. za plánování expreminetální práce a konzultace napříč tématem.
- doc. RNDr. Radimovi Havelkovi, Ph.D. za pomoc při flow-cytometrických analýzách.
- MUDr. Pavlu Tomšíkovi, Ph.D. za naplánování a zrealizování pokusů na myších modelech.
- Paní Naděžde Mazánkové a paní Boženě Janské za precizní péči o buněčné kultury a veškerou pomoc při experimentální práci.
- Ústavu toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové a Centru biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice v Hradci Králové, jmenovitě pak PharmDr. Martinovi Andršovi, Ph.D. a doc. Pharm.Dr. Janu Korábečnému, Ph.D. za syntézu a poskytnutí chinazolinových a purinových derivátů k biologickému testování a rovněž za spolupráci při vzniku odborných publikací.
- Velké poděkování patří celé mé rodině, především mému manželovi a dětem za chápavé strpení a prostor k vytvoření této práce.

Tato práce vznikla za podpory projektu GAUK 932516, programu Progres Q40/01 a SVV-260397/2017.

Obsah

Seznam použitých zkratek 7
Souhrn 10
Summary 12
1 ÚVOD DO PROBLEMATIKY 14
1.1 Poškození molekuly DNA 14
1.2 Rodina PI3K 14
1.2.1 Ataxia telangiectasia mutated kinasa (ATM) 15
1.2.2 Ataxia telangiectasia and Rad3-related kinasa (ATR) 17
1.2.3 DNA-dependentní protein kinasa (DNA-PK) 18
1.3 Cesty reparace dvouřetězcových zlomů DNA 19
1.3.1 Nehomologní spojování konců (NHEJ) 19
1.3.2 Homologní rekombinace (HR) 21
1.4 Regulace buněčného cyklu 22
1.4.1 Check point kinasy 1 a 2 23
1.4.2 Protein p53 25
1.5 Apoptóza 28
1.5.1 Kaspasy 30
1.5.2 Vnitřní cesta apoptózy 30
1.5.3 Vnější cesta apoptózy 31
1.5.4 Poruchy mechanismů apoptózy 32
1.6 Inhibitory DNA-PK 33
1.6.1 PI3K inhibitory s aktivitou proti PIKK, včetně DNA-PK 34
1.6.2 Selektivní inhibitory DNA-PK 37
1.6.3 Sloučeniny se smíšenou aktivitou zahrnující inhibici DNA-PK 40
2 CÍLE PRÁCE 42
3 MATERIÁL A METODIKY 44
3.1 Buněčné kultury a kultivační podmínky 44
3.2 Cytostatika 44
3.3 Stanovení cytotoxicity 48
3.4 Měření aktivity kaspas 48
3.5 Analýza buněčného cyklu 49
3.6 Elektroforéza a Western blotting 50
3.7 Hodnocení toxicity *in vivo* 51
3.8 Statistická analýza 52
4 VÝSLEDKY 53
4.1 Chinazoliny 53

4.1.1 Test buněčné viability na panelu buněčných linií 53
4.1.2 Stanovení IC50 doxorubicinu u buněk HT-29 55
4.1.3 Chemosenzitizační účinek inhibitorů 56
4.1.4 Aktivace kaspas a indukce apoptózy 58
4.1.5 Analýza buněčného cyklu 59
4.1.6 Změny v expresi proteinů 61
4.1.7 Hodnocení toxicity *in vivo* 63
4.2 Puriny 64
4.2.1 Proliferace a procentuální zastoupení živých buněk 64
4.2.2 Chemosenzitizační účinek inhibitorů 66
5 DISKUZE 70
6 ZÁVĚR 76
7 LITERATURA 77
8 SEZNAM PŘÍLOH 87

Seznam použitých zkratek

A-T	ataxia telangiectasia
ARF	protein vázající se na Mdm2 (ADP ribosylation factor)
ATM	ataxia telangiectasia proteinkinasa
ATP	adenosintrifosfát
ATR	ataxia telangiectasia Rad-3 related proteinkinasa
E1, E2, E3	enzym aktivující ubikvitin, enzym přenášející ubikvitin, ubikvitin ligasa
E2F1	transkripční faktor
Bax	Bcl-2-associated X protein
BCA	bicinchoninová kyselina
Bcl-2	antiapoptotický protein B-buněk leukemia/lymphoma 2
BER	bázová excizní reparace
BLM	protein Bloomova syndromu
BRCA1	protein nádoru prsu (breast cancer 1)
Cdc25	serin/threonin proteinfosfatasa
Cdk	cyklin dependentní kinasa
CDNK1A	gen kódující protein $p21^{Cip1/Waf1}$
Cip1	Cdk interagující protein 1
CKI	inhibitor Cdk
DISC	death inducing signaling complex
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNA-PK	DNA dependentní proteinkinasa
DNA-PKcs	katalytická podjednotka DNA proteinkinasy
DR	smrtící receptor (death receptor)
dsDNA	dvouvláknová DNA (double-stranded DNA)
DSBs	dvojité zlomy DNA (double strand breaks)
E2F	transkripční faktor 2
FADD	Fas-associated death domain
FSC	forward scatter, přímý rozptyl
γ-H2AX	histon fosforylovaný na Ser 139
Gadd45	protein vyvolávající zástavu buněčného cyklu

HR	homologní rekombinace
Ck1, Chk2	check-point kinasa 1, 2
IR	ionizující záření
JNK	c-Jun N-terminální kinasa
Ku70/Ku80	podjednotky DNA-PK
Lys	Lysin
Mdm2	protein vázající p53 (murine double minute protein)
MOLT-4	buňky lidské T-lymfocytární leukemie
Mre11	protein reparující dvojité zlomy
MRN	reparační komplex Mre11, Rad50, Nbs1
mTOR	mammalian target of rapamycin
mRNA	messenger RNA
Nbs1	Nijmegen breakage syndrom protein 1
NER	nukleotidová excizní oprava
NHEJ	nehomologní spojování konců
PBS	Phosphate Buffered Saline
p53AIP1	p53-regulated apoptosis-inducing protein 1
PI3K	fosfatidylinositol-3-kinasa
PIG3	p53-inducible gene 3
PIKKs	kinasy příbuzné fosfatidylinositol-3 kinase
Puma	p53-upregulated modulator of apoptosis
Rad50	DNA reparační protein
Rb	retinoblastoma protein
RPA	replikační protein A
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
Ser	serin
SSC	side scatter,boční rozptyl
ssDNA	single-stranded DNA
Thr	threonin
Tip60	histon acetyltransferasa
TopBP1	DNA Topoisomerase II Binding Protein 1
TP53	gen kódující protein p53
TRADD	TNF receptor-associated death domain

TRRAP	transformation/transcription domain-associated protein
UV	ultrafialové záření
VE-821	specifický inhibitor ATR
Waf1	wild type p53 aktivační faktor
WRN	protein Wernerova syndromu
XLF	XRCC4-like factor
XRCC4	X ray cross complementing protein 4

Souhrn

Konvenční radioterapie a chemoterapie zasahují do základních funkcí dělících 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 signalizačních 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 signalizační 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 chemosezitizační 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 pomocí 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 účastnící 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 againts 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 gemone of tumor cells and frequent mutations, increased aggressiveness and resistence to treatment can occur. Tumor resistence to treatment is a very serious problem. There are a number of mechanisms by which cells defend themselves. One of the fundamental causes of resistence 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.

1 ÚVOD DO PROBLEMATIKY

1.1 Poškození molekuly DNA

DNA eukaryotických buněk je neustále vystavena působení genotoxického stresu. Odhaduje se, že v jedné lidské buňce se každý den vyskytne více než desítky tisíc lézí. Existuje mnoho typů poškození DNA, z nichž jsou pravděpodobně nejvíce nebezpečné dvouřetězcové zlomy (DNA double-strand breaks, DSBs), jelikož patří mezi nejobtížněji opravitelné na rozdíl od ostatních typů lézí. Dvojité zlomy mohou být způsobeny exogenními (ionizující záření, UV záření, chemické látky) i endogenními příčinami (buněčné metabolické procesy, kyslíkové radikály) (Hakem 2008). Pokud není porucha správně opravena, může to mít za následek genomovou nestabilitu a buněčnou smrt. To výrazně ovlivňuje vývoj organismu a predisponuje jej k rakovině a dalším poruchám. 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).

1.2 Rodina PI3K

Fosfatidylinositol-3-kinasy (PI3K) byly objeveny před více než 30 lety. Jedná se o rodinu příbuzných intracelulárních enzymů, které katalyzují fosforylaci hydroxylové skupiny na třetí pozici inositolového kruhu fosfatidylinositolu za vzniku fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfátu. Jsou zapojené 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). Do rodiny PIKK se řadí na základě sekvenční podobnosti, ovšem nemají schopnost fosforylovat lipidy. 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 odpovědí na poškození DNA jsou zapojeny ATM, ATR a DNA-PKcs. Zatímco ATR je aktivována jednořetězcovými zlomy, ATM a DNA-PK reagují na zlomy dvouřetězcové. Kinasa mTOR řídí širokou škálu drah zapojených do buněčného metabolismu a růstu. SMG-1 je nejnovějším členem rodiny PIKK a hraje zásadní roli v systému kontroly kvality mRNA, kde defektní mRNA je degradována. Nakonec TRRAP, který jako jediný člen postrádá serin/threoninovou kinasovou aktivitu, má důležitou roli v embryonálním vývoji, progresi a kontrole buněčného cyklu (Shiloh 2003, Lempiäinen a Halazonetis 2009, Tichy et al. 2012).

1.2.1 Ataxia telangiectasia mutated kinasa (ATM)

Ataxia telangiectasia (A-T) je autosomálně recesivní neurodegenerativní onemocnění projevující se již v dětském věku. Klinicky se projevuje nekoordinovanými pohyby, které jsou spojeny s okulokutánní teleangiektázií (rozšíření drobných krevních cév). Dalšími příznaky jsou imunodeficience, růstová retardace, sterilita, radiosenzitivita a zvýšená predispozice ke vzniku rakoviny. Příčinou onemocnění je mutace v jediném genu, který kóduje tuto proteinkinasu, a tento gen byl nazván ATM (A-T, mutovaný). Lidský gen ATM je lokalizován na 11q22-23 a kóduje proteinovou kinasu o velikosti asi 350 kDa (McKinnon 2004, Sun et al. 2007, Derheimer a Kastan 2010).

Společným rysem členů rodiny PIKK je jejich asociace s proteiny či proteinovými komplexy usnadňujícími jejich aktivaci. ATM se váže na komplex MRN v místech dvouřetězcových zlomů a komplex tak umožní retenci ATM na chromatinu, aktivaci signálních drah a dokončení oprav DNA. MRN je během replikace DNA spojen s chromatinem, dokáže rozpoznat DSB a přitahovat ATM k poškozené DNA. Komplex MRN je heterotrimer složený z Mre11, Rad50 a Nbs1. Mutace v Mre11 a Nbs1 vedou k fenotypově podobným poruchám jako je A-T (Derheimer a Kastan 2010).

ATM je klíčovým regulátorem reakcí na poškození DNA. Fosforyluje mnoho proteinů nezbytných pro regulaci všech tří kontrolních bodů buněčného cyklu, apoptózy a pro zahájení oprav DNA. Mezi tyto proteiny patří např. p53, Chk2, SMC1, Nbs1, Brca1, mdm2 a další. Časnou reakcí na poškození DNA je též fosforylace histonu H2AX

na Ser 139 za vzniku γH2AX. Tento proces může být uskutečněn dvěma nezávislými proteinovými kinasami – DNA-PK a ATM. Studie ukázaly, že v nepoškozených buňkách se ATM vyskytuje v neaktivní formě, ovšem při poškození DNA dojde ke zvýšení její buněčné aktivity. Aktivace kinasové aktivity ATM je spojena se zvýšenou autofosforylací na několika místech včetně Ser 1981. Autofosforylace způsobí rozpad dimeru na aktivní monomery. Pro aktivaci ATM je dále nezbytná histon acetyltransferasa Tip60, která acetyluje ATM na Lys 3016. Její aktivita se zvyšuje poškozením DNA a ztráta Tip60 blokuje autofosforylaci a následnou aktivaci kinasové aktivity ATM (Sun et al. 2007, Tichy et al. 2010).

Jak již bylo zmíněno, ATM reguluje kontrolní body buněčného cyklu. Bylo prokázáno, že nádorový supresor p53 hraje po ozáření buněk kritickou roli v kontrolním bodě G1/S a jeho účinná indukce vyžaduje ATM. Poté co jsou vyhledána poškozená místa na molekule DNA, protein p53 spustí transkripci genu p21. Produkt tohoto genu, protein p21, je inhibitorem cyklin dependentní kinasy (Cdk). Indukce proteinu p21 vede k inhibici komplexu cyklin-E/Cdk2 a tím inhibici progrese z G1 do S fáze. Vzhledem k tomu, že protein p53 není pro zástavu cyklu v S fázi nezbytný, ale buňky s chybějícím ATM vykazují defekt v tomto kontrolním bodě, je logické, že ATM kinasa musí mít ještě jiné cíle. Dalšími cíli hrajícími roli v radiačně indukovaném kontrolním bodě a zastavení cyklu v S fázi jsou protein Nbs1, Brca1 a SMC1 (Derheimer a Kastan 2010).

Cílem kinasy ATM v kontrolním bodě S fáze je také checkpoint kinasa 2 (Chk2). Po indukci dvouřetězcových zlomů ATM přímo aktivuje Chk2 fosforylací na Thr 68. Chk2 následně fosforyluje (inhibuje) fosfatasy Cdc25A a Cdc25C zodpovědné za průchod přes G1/S a G2/M kontrolní body. Cdc25A se poté naváže na protein 14-3-3 a dojde k její degradaci. Degradovaná Cdc25A nemůže defosforylovat Cdk, která je nutná pro syntézu DNA (Falck et al. 2001, Buscemi et al. 2006). ATM rovněž reguluje procesy v kontrolním bodě G2/M, které jsou závislé na Chk1 a Chk2. Tento kontrolní bod je důležitý pro opravu poškození vzniklém ozářením buněk v G2 fázi. Aktivní formy těchto kinas mohou inhibovat aktivaci fosfatasy Cdc25C, která je nutná pro následnou aktivaci cyklinu B1 a Cdk1 a pro progresi buněčného cyklu (Tichy et al. 2010).

ATM tedy reguluje fosforylací širokou škálu cílových molekul. Buňky, které nemají funkční protein ATM, vykazují defekty v opravě DNA a ztrátu kontrolních bodů buněčného cyklu, což vede ke zvýšené citlivosti k ionizujícímu záření.

1.2.2 Ataxia telangiectasia and Rad3-related kinasa (ATR)

Další ze skupiny enzymů, který je primárně zodpovědný za signalizaci přítomnosti poškození DNA je ATR kinasa (ATM and Rad3-related). Zatímco ATM a DNA-PK reagují na dvouřetězcové zlomy, ATR je aktivována zlomy jednořetězcovými. ATR má však svou úlohu i v DSBs. Studie odhalily, že ATR je zodpovědná za fosforylaci určitých substrátů ATM v pozdních stádiích po indukci poškození. V odpovědi na DSB tedy ATM reaguje jako první a je zodpovědná za okamžitou rychlou reakci, zatímco ATR se připojí později a udržuje fosforylovaný stav specifických substrátů. Zmíněná funkce však není pro ATR hlavní úlohou (Shiloh 2003, Lempiäinen a Halazonetis 2009). Z rodiny PI3K se kinasa ATR projevuje jako nejuniverzálnější, jelikož je aktivována nejen infračerveným, ale i UV zářením, cisplatinou a replikačními inhibitory jako je například hydroxymočovina (Tichy et al. 2012). Na rozdíl od ATM a DNA-PK je ATR nezbytná v proliferujících buňkách (Blackford a Jackson 2017). ATR se aktivuje během každého buněčného cyklu, aby regulovala počátek replikace a opravila poškozené replikační vidlice (Lovejoy a Cortez 2009). Její primární funkcí je regulovat progresi buněčného cyklu do G2 fáze (Tichy et al. 2012).

Cesta odpovědi ATR na stres začíná tím, že se na jednovláknovou DNA (ssDNA) naváže replikační protein A (RPA). Základní součástí této dráhy je protein interagující s ATR, tzv. ATRIP, který se přímo váže na RPA. Protein RPA pokrývá většinu forem ssDNA a je důležitý pro vazbu komplexu ATR-ATRIP (Lovejoy a Cortez 2009, Tichy et al. 2012). Pro aktivaci ATR není tato vazba dostatečná, vyžaduje přítomnost aktivátorových proteinů. Nejlépe charakterizovaným aktivátorem ATR je TopBP1 (DNA Topoisomerase II Binding Protein 1), který obsahuje aktivační doménu stimulující aktivitu kinasy ATR (Blackford a Jackson 2017).

Klíčovou funkcí ATR je fosforylace a aktivace protein kinasy Chk1 na Ser 317 a Ser 345, čehož je využíváno pro indikaci aktivace Chk1. Aktivovaná Chk1 podporuje degradaci fosfatasy Cdc25A. Inaktivace Cdc25A v reakci na genotoxický stres zpomaluje nebo zastavuje progresi buněčného cyklu snížením aktivity Cdk. To dodává buňce více času na opravu DNA nebo, je-li poškození příliš rozsáhlé, na aktivaci apoptózy či senescence (Cimprich a Cortez 2008, Blackford a Jackson 2017). Prevo et al. ve své studii s buňkami rakoviny pankreatu sledovali účinek specifického inhibitoru ATR VE-821. Došlo k inhibici fosforylace Chk1 a zvýšení radiosensitivity díky zkrácení záchytu v G2/M fázi buněčného cyklu a inhibici homologní rekombinace (Prevo et al. 2012).

ATR aktivuje i další proteiny zapojené do rekombinace, jako je Brca1, WRN (protein Wernerova syndromu) a BLM (protein Bloomova syndromu). Většina substrátů ATR může být fosforylována i pomocí ATM. Funkce těchto dvou kinas se v řízení buněčného cyklu překrývají, ale všechny jsou nezbytné (Tichy et al. 2012).

1.2.3 DNA-dependentní protein kinasa (DNA-PK)

Tato kinasa byla poprvé objevena v roce 1985 a je hojně exprimována téměř ve všech savčích buňkách. Rané biochemické studie odhalily její preference pro fosforylaci serinového nebo threoninového zbytku následovaného glutaminem. To se později ukázalo i v případě ATM a ATR. 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).

Heterodimeru Ku má prstencovou strukturu, která zcela obklopuje DNA. U lidí je hojně zastoupen, uvádí se asi 400 000 molekul/buňku. Poprvé byl charakterizován jako autoantigen u pacientů s autoimunitním onemocněním. Název „Ku“ je pak odvozen od příjmení pacienta, u kterého byl tento komplex objeven. Skládá se z podjednotek Ku70 (73 kDa) a Ku80 (86 kDa). Má mimořádnou afinitu k volným koncům DNA. Buňky, které postrádají Ku nebo DNA-PKcs jsou radiosenzitivní a defektní při opravě dvouvláknových zlomů (Lees-Miller a Meek 2003, Meek et al. 2008).

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). Kromě toho, zjištění Kong et al. naznačují, že DNA-PK může regulovat homeostázu buněčné proliferace a má důležitou roli v regulaci genové odpovědi na stimulaci inzulinem. DNA-PK reguluje syntézu mastných kyselin modulací proteinové exprese synthasy mastných kyselin (Kong et al. 2011). 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). Podrobný průběh mechanismu bude popsán v následujících kapitolách.

1.3 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) (Kasparek 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).

Předtím než proběhne samotný mechanismus oprav poškození, musí buňka tuto lézi detekovat. Jedním z prvních dějů v buněčné odpovědi na DSB je fosforylace histonu H2AX na Ser 139 za vzniku γ-H2AX. Klíčovými kinasami pro fosforylci H2AX jsou DNA-PK, ATM i ATR. Další zpracování DSB je spojeno s charakteristickou modifikací a přemístěním proteinů účastnících se opravy do subnukleárních prostor zvaných „ložiska“. γ-H2AX je považován za marker poškození DNA, který lze detekovat imunofluorescenční mikroskopií. Počet ložisek a míra fosforylace odpovídají počtu DSB (Kinner et al. 2008, Rezacova a Vavrova 2011, Mohiuddin a Kang 2019).

Buňka čelící stresu způsobujícímu poškození DNA má na výběr mezi mechanismy opravy NHEJ a HR. Ovšem jak dochází k výběru mezi těmito dvěma cestami, není dosud zcela pochopeno. Dostupnost sesterských chromatid v S a G2 fázi buněčného cyklu činí z HR lepšího kandidáta. Musí však existovat nějaký mechanismus, který zajistí inhibici NHEJ, a to v kterékoli fázi buněčného cyklu (Modiuddin a Kang 2019). Bylo prokázáno, že buňky v přítomnosti inaktivujících mutací v Ku a DNA-PKcs přednostně využívají HR jako primární mechanismus opravy (Neal et al. 2011). Možná se volba cesty opravy DNA soustředí na to, zda je DNA-PKcs aktivována fosforylací: fosforylovaná aktivní forma DNA-PKcs upřednostňuje NHEJ, zatímco nefosforylovaná neaktivní forma upřednostňuje HR (Allen et al. 2003).

1.3.1 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. Ovšem mnoho konců DSB obsahuje neligovatelné skupiny, proto je situace často složitá. Tento proces může být zároveň náchylný k chybám a má

potenciál zavádět škodlivé mutace. Někdy jsou však takové mutace dokonce přínosné, například při rekombinaci VDJ, kde spojování segmentů náchylných k chybám přidává imunitnímu repertoáru značnou rozmanitost (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 (Kasparek a Humphrey 2011). Jestliže jeden nebo více z těchto základních faktorů chybí, dochází k aktivaci tzv. alternativního NHEJ (Chang et al., 2017).

Zahajovací událostí pro NHEJ je rozpoznání a navázání volných konců DSB. Jako hlavní faktor vázající konce DNA v savčích buňkách byl biochemickými a genetickými studiemi identifikován komplex Ku. Jeho toroidní tvar vytváří prostor pro umístění duplexní DNA. Vnitřek asymetrického prstence obsahuje pozitivně nabité aminokyseliny, které umožňují interakci se záporně nabitými fosfodiesterovými vazbami v DNA. Ku je ideální pro zahajování oprav různých typů konců poškozené DNA, jelikož se může vázat na dvouvláknové koncové struktury, jako jsou tupé konce, konce s 3´ nebo 5´ převisy či kovalentně uzavřené konce typu vlásenky (Hefferin a Tomkinson 2005, Neal a Meek 2011).

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).

1.3.2 Homologní rekombinace (HR)

Homologní rekombinace je výměna genetické informace mezi alelickými sekvencemi a má zásadní roli jak v meióze, tak v mitóze. V meióze umožňuje výměnu genetického materiálu mezi otcovskými a mateřskými alelami a koordinuje správnou segregaci párů homologních chromozomů v průběhu prvního meiotického dělení. V somatické buňce udržuje HR genomovou integritu podporou přesné opravy lézí DNA (Lok a Powell 2012). Některé formy HR však mohou vést k nežádoucímu přeskupení DNA. Proto si buňka vyvinula řadu regulačních mechanismů, které zajišťují, že HR probíhá ve správný čas na správném místě a správným způsobem (Krejci et al. 2012).

HR představuje klíčový systém opravující různé typy lézí DNA včetně dvouřetězcových zlomů, jednořetězcových mezer v DNA a meziřetězcových 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. Je však možné, že HR může pro opravu DSBs použít též homologní chromozom, když jsou buňky v G1 fázi buněčného cyklu. To by ovšem mohlo vést ke ztrátě heterozygotnosti, k translokacím či jiným přeskupením genů. Aby se těmto dějům zabránilo, není HR řízena pouze signálními cestami v odpovědi na poškození DNA, ale rovněž buněčným cyklem. Důležitá je přítomnost vysoké aktivity Cdk v S, G2 a M fázi cyklu. V mitóze je homologní rekombinace potlačena (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).

1.4 Regulace buněčného cyklu

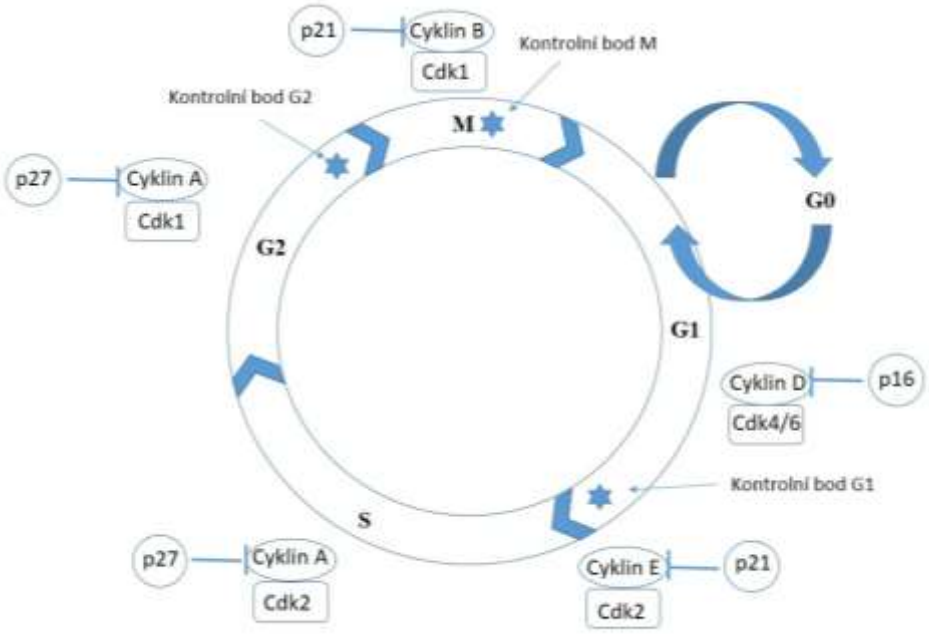
Buněčné dělení je přísně regulovaný proces zodpovědný za rozdělení buňky na dvě dceřiné. Sestává ze čtyř postupných fází (G1, S, G2 a M) a klidového stavu (G0 fáze). Buněčná proliferace je nezbytná pro růst, vývoj a regeneraci organismu, na druhou stranu je však zodpovědná za jednu z nejdestruktivnější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

Cyklin dependentní kinasy jsou skupinou serin/threoninových kinas, které spolupracují s regulačními podjednotkami – cykliny. Cykliny řídí aktivitu kinas a substrátovou specifitu. Cdk jsou považovány za motor pohánějící progresi buněčného cyklu, zatímco cykliny jsou vnímány jako rychlostní stupně, které se mění, aby se usnadnil přechod mezi jednotlivými fázemi cyklu. Cykliny jsou syntetizovány a degradovány v průběhu buněčného cyklu tak, aby řídily aktivitu kinas v ten správný čas. Kinasová aktivita komplexu Cdk/cyklin 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). Členové rodiny Cdk, cyklinů a CKI jsou zapojeny do transkripce, opravy poškození DNA, proteolytické degradace, epigenetické regulace, metabolismu, obnovy kmenových buněk, neurální funkce či spermatogenese (Lim a Kaldis 2013).

Četné biochemické analýzy v posledních desetiletích napomohly k pochopení, jak je buněčný cyklus regulován. Po dokončení cytokineze nově generované buňky buď pokračují v dělení, nebo zastaví svoji proliferaci a vstoupí do tzv. klidového stavu neboli G0 fáze. Buňky pokračující v proliferaci postupují do G1 fáze nového cyklu (Malumbres a Barbacid 2005). Restrikční bod G1 fáze je regulován komplexem Cdk4 a Cdk6 s cykliny typu D. V pozdní G1 fázi je exprimován cyklin E, a v komplexu s Cdk2 je zodpovědný za řízení přechodu mezi G1 a S fází. Zahajuje rovněž syntézu DNA. Průchod buněk S fází je kontrolován komplexem Cdk2/cyklin A. Poslední kontrolní bod představuje přechod mezi G2 a M fází buněčného cyklu. Je regulován komplexem Cdk1/cyklin A a později na počátku M fáze Cdk1/cyklin B (Rezacova a Vavrova 2011).

Správný postup buněčným cyklem je sledován uvedenými kontrolními body (Obr. 1). 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).



Obr. 1 Schématický pohled na buněčný cyklus. Každá fáze progrese buněčného cyklu je regulována cyklin-dependentními kinasami (Cdk) a jejich regulačními partnerskými proteiny – cykliny a inhibitory Cdk. (upraveno dle Boxem 2006)

1.4.1 Check point kinasy 1 a 2

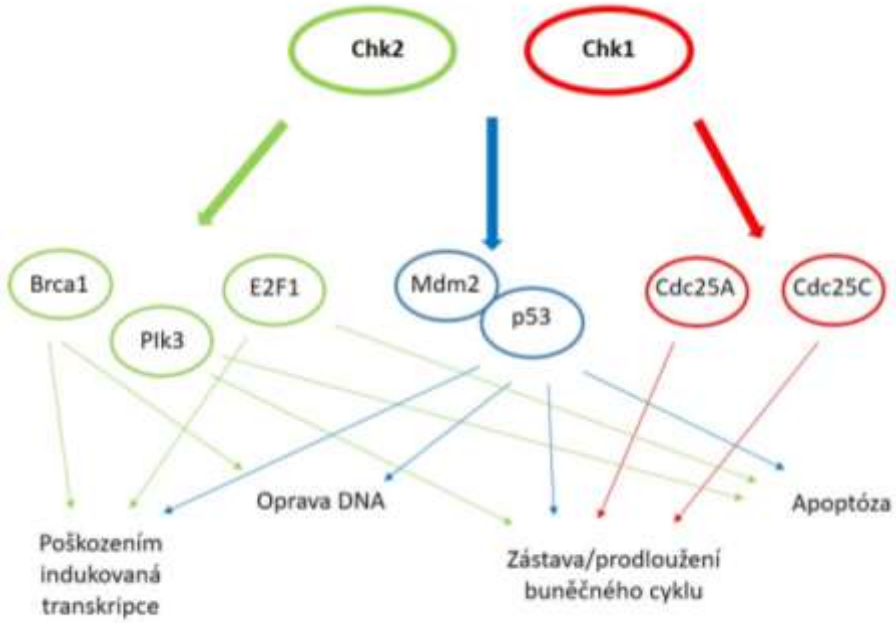
Checkpoint kinasy 1 a 2 (Chk1 a Chk2) jsou serin/threoninové kinasy. Jedná se o zásadní proteiny v odpovědi na genotoxický stres, které jsou schopny zastavit buněčný cyklus. Strukturně jsou nepříbuzné, ale jejich funkce se překrývají. Klíčovým úkolem Chk1 a Chk2 je přenos signálů zprostředkovaných ATM a ATR z kontrolních bodů (Bartek a Lukas 2003). Jak můžeme vidět na Obr. 2, mají obě kinasy celou řadu společných substrátů (Cdc25A, Cdc25C, p53, Mdm2, BRCA1, E2F1,…) ovšem mají i příslušné specifické substráty, které činí jejich buněčné funkce rozdílnými (Huang et al. 2008).

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 autofosforylaci. Chk1 je fosforylovaná 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 progrese 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. Chk2 má za cíl rovněž protein E2F1, je schopna regulovat jeho stabilitu, transkripční aktivitu a následně apoptózu (Bartek a Lukas 2003, Buscemi et al. 2006). Li a Stern (2005) mimo jiné zjistili, že Chk2 může být aktivována v reakci na poškození rovněž pomocí DNA-PK. Chk2 může tvořit proteinové komplexy s Ku70 a Ku80.

Ukázalo se, že inhibitory Chk1 a Chk2 mají schopnost potencovat terapeutickou účinnost látek poškozujících DNA. Jsou navrženy jako adjuvantní léčiva, která napomáhají v problematice rezistence nádorů na protinádorová terapeutika (Huang et al. 2008).



Obr. 2 Chk1 a Chk2 jako prostředníci signalizační sítě kontrolních bodů. Po jejich aktivaci Chk1 a Chk2 fosforylují následné efektory, které dále šíří signalizaci kontrolního bodu. (upraveno dle Bartek a Lukas 2003)

1.4.2 Protein p53

Protein p53 byl původně považovaný za onkogen, jelikož jeho hladina v normálních buňkách byla nízká, zatímco v buňkách nádorových byl hojně exprimovaný. Brzy však bylo zjištěno, že nadměrná exprese je způsobena jeho mutací. Poprvé byl identifikován v roce 1979. Lidský p53 je kódovaný důležitým tumor supresorovým genem – TP53. U různých typů nádorových onemocnění je jedním z genů nejčastěji postižených mutacemi. Protein p53 o velikosti 53 kDa se skládá z 393 aminokyselin a pěti hlavních domén (Kamada et al. 2015).

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).

Podíl na aktivaci p53 má mnoho posttranslačních modifikací vyvolaných poškozením DNA. Jsou jimi například fosforylace, defosforylace, acetylace, methylace, glykosylace a ubikvitinace. Tyto modifikace se vyskytují zejména na N- a C-koncových doménách molekuly. Důležité však je i dosažení správné konformace proteinu, kdy pouze vytvořené tetramery jsou aktivní. Tvorba tetrameru p53 je nezbytná pro specifickou vazbu DNA, posttranslační modifikace a protein-protein interakce (Kamada et al. 2015, Rezacova a Vavrova 2011). V ozářených buňkách hraje velmi významnou roli fosforylace a acetylace, jež mají za následek stabilizaci p53 a jeho akumulaci v jádře. Protein p53 může fosforylovat celá řada protein kinas, patří mezi ně především ATM, ATR, Chk1, Chk2, JNK (Jun NH_2-koncová kinasa), p38 a jiné. Mezi nejlépe prozkoumaná fosforylační místa na N-konci p53 patří Ser 15, který je v důsledku DSBs vlivem chemických činidel či ozáření fosforylován kinasami ATM a ATR. Je známo, že jedna protein kinasa může fosforylovat protein na několika místech a zároveň jedno místo může být fosforylováno více než jednou kinasou (Rezacova a Vavrova 2011).

V normálních buňkách je hladina p53 udržována na nízké úrovni. Nově syntetizovaný protein je rychle degradován proteasomem 26S. Pro tuto degradaci je nutné kovalentní připojení ubikvitinu k lysinům proteinu p53, tzv. ubikvitinace. Ubikvitinaci katalyzují postupně tři enzymy značené jako E1 (enzym aktivující ubikvitin), E2 (enzym přenášející ubikvitin) a E3 (ubikvitin ligasa) (Rezacova a Vavrova 2011). Jednou z klíčových složek regulujících stabilitu p53 je protein Mdm2 (mouse double minute 2), který funguje jako ubikvitinová ligasa. Zprostředkovává ubikvitinaci p53 a umožňuje jeho rozpoznání a degradaci proteasomem. Mdm2 se také ubikvitinuje a reguluje tak svoji vlastní stabilitu. Mdm2 je zároveň transkripčním cílem proteinu p53, tudíž zde funguje zpětnovazebná negativní regulace, ve které p53 řídí expresi vlastního regulátoru (Vousden 2002). Zdá se, že existuje mnoho drah, které umožňují stabilizaci p53 vyvolanou stresem. Například bylo prokázáno, že kinasy Chk1 a Chk2 indukované poškozením DNA fosforylují místo na N-konci p53, což znemožní interakci p53 s Mdm2 a brání tak degradaci proteinu p53. Naproti tomu stabilizace p53 v reakci na abnormální proliferaci spojenou s aktivací onkogenu nevyžaduje fosforylaci p53, ale závisí na aktivaci proteinu ARF, který se váže přímo na Mdm2 a inhibuje jej (Ryan et al. 2001).

Hlavní funkcí p53 je regulace genové exprese. Jedná se o sekvenčně specifický transkripční faktor, který může zprostředkovat mnoho účinků aktivací či represí cílových genů. Bylo identifikováno mnoho cílových genů závislých na p53. Obecně se zdá, že každá jeho reakce odráží aktivaci několika genů (Ryan et al. 2001).

Protein p53 se významně podílí na regulaci průběhu buněčného cyklu. Z nesčetného množství dosud identifikovaných cílových genů p53 vyniká gen CDNK1A kódující protein $p21^{Cip1/Waf1}$, jehož role je při zástavě buněčného cyklu klíčová. Jedná se o inhibitor Cdk a reguluje progresi buněčného cyklu v kontrolních bodech G1/S a G2/M (Cmielova et al. 2011, Balint a Vousden 2001). Jakmile dojde k interakci $p21^{Cip1/Waf1}$ s komplexem cyklin E/Cdk2 resp. cyklinA/Cdk2, dojde k jejich inaktivaci. Za tohoto stavu není schopná Cdk2 fosforylovat protein Rb. Ten následně zadržuje transkripční faktor E2F, který spouští transkripci genů nezbytných pro vstup buňky do S fáze. Výsledkem je zástava buněčného cyklu v G1/S kontrolním bodě (Rezacova a Vavrova 2011).

Další úlohou p53 je rovněž regulace průchodu buněk kontrolním bodem G2/M, čímž se podílí na kontrole vstupu buňky z fáze G2 do vlastní mitózy. Jedním z cílů p53 přispívajících k zástavě cyklu v G2 fázi je protein 14-3-3 sigma, který se váže na komplex cyklin B/Cdk1. Proteiny rodiny 14-3-3 hrají roli v signální transdukci a kontrole buněčného cyklu. Mezi další potenciální mediátory zástavy cyklu v G2 fázi patří Gadd45 (growth arrest and DNA damage 45). Gadd45 se váže na Cdk1 a brání tvorbě komplexu s cyklinem B. Tím je docíleno inhibice kinasové aktivity a blokaci cyklu (Balint a Vousden 2001, Rezacova a Vavrova 2011).

V případě nevratného poškození tkání může indukovat expresi proteinů, které zprostředkovávají apoptózu vnitřní i vnější cestou. Ve vnitřní cestě, kdy se proteiny lokalizují do mitochondrií, se jedná zejména o Bax (Bcl-2-associated X protein), Noxa, Puma (p53-upregulated modulator of apoptosis), p53AIP1 (p53-regulated apoptosis-inducing protein 1) a PIG3 (p53-inducible gene 3). Tyto proteiny mohou kontrolovat propustnost mitochondriální membrány a modulovat uvolňování cytochromu c a aktivaci kaskády Apaf-1/kaspasa-9. P53 rovněž indukuje expresi receptorů smrti a tím je aktivována apoptóza vnější cestou. Jedná se o receptory Fas/CD95 (cell-death signaling receptor), DR4/KILLER (death receptor 4), DR5/KILLER (death receptor 5). Mnoha studiemi bylo prokázáno, že inhibice exprese cílových genů proteinu p53 je spojena s poklesem výskytu na p53-závislé apoptóze (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. Kromě prevence replikace buněk s poškozením genomu se p53 rovněž podílí na opravě poškození DNA. Buňky s nefunkčním p53 vykazují dysfunkci reparačních mechanismů nukleotidové excizní opravy (NER) a opravy vystřižením báze (BER). C-konec p53 se přímo váže na poškozenou DNA (Balint a Vousden 2001).

Gen TP53 se nachází na chromozomu 17p13.1 a kóduje protein p53, přičemž je jedním z nejčastěji mutovaných genů u lidských nádorů. Somatické mutace TP53 se vyskytují téměř u každého typu rakoviny a asi u poloviny všech nádorů vaječníků, jícnu a kolorektálního karcinomu. Mutace způsobují ztrátu nebo poruchu struktury tetrameru p53 a eliminují nebo snižují jeho transkripční aktivitu. Tato skutečnost naznačuje, že přítomnost mutovaného, transkripčně neaktivního proteinu, který není schopen se vázat na své cíle, je pro rozvoj rakoviny důležitější, než pokud dojde ke ztrátě normálního proteinu p53. Germinální mutace v genu TP53 jsou základní příčinou Li-Fraumeni syndromu a syndromu podobnému Li-Fraumeni. Jedná se o dědičný syndrom náchylnosti k rakovině s časným nástupem. Mezi nejčastější typy rakovinných onemocnění v rodinách se syndromem Li-Fraumeni patří rakovina prsu, mozkové nádory, sarkomy, nádory kůry nadledvin a další (Kamada et al. 2015).

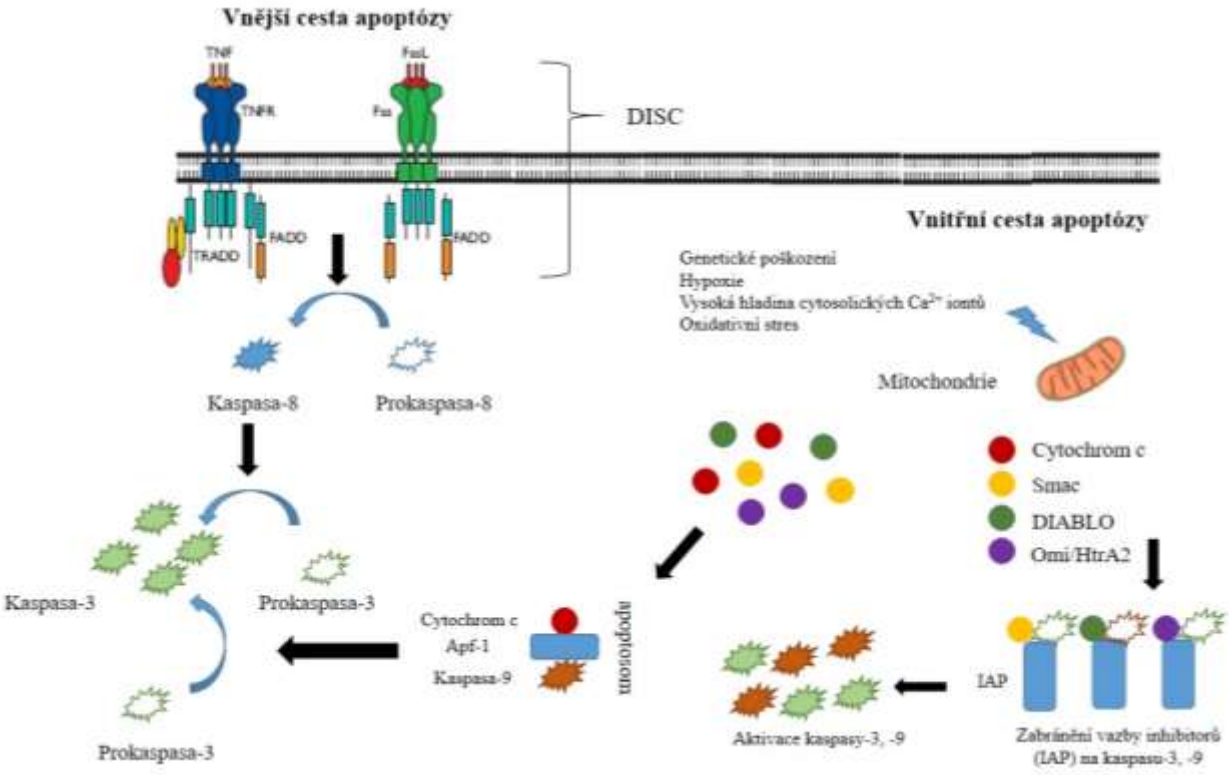
1.5 Apoptóza

Apoptóza je programovaný zánik buněk, který hraje klíčovou roli ve vývoji a homeostáze normálních tkáních. Fenomén apoptózy byl poprvé popsán v roce 1842, ovšem termín „apoptóza“ byl poprvé použit až v roce 1972 (Hongmei 2012). 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 apoptotická tělíska. 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 (Obr. 3). Apoptóza může být aktivována tzv. vnější cestou přes receptory smrti a vnitřní cestou za uvolnění cytochromu c z aktivovaných mitochondrií (Wong 2011).



Obr. 3 Popis vnitřní cesty apoptózy z aktivovaných mitochondrií a vnější cesty přes receptory smrti. (upraveno dle Wong 2011)

1.5.1 Kaspasy

Kaspasy představují velkou rodinu cysteinových proteas s cysteinem v aktivním místě, které hydrolyzují své substráty po specifických zbytcích kyseliny asparagové. Ve zdravých buňkách jsou syntetizovány jako neaktivní zymogeny (prokaspasy), které ke své funkci potřebují další enzymatickou aktivaci. Prokaspasy se skládají z N-koncové prodomény následované velkými (20 kDa) a malými podjednotkami (10 kDa) (Opdenbosch a Lamkanfi 2019, Tichy 2006). Doposud bylo identifikováno více než 10 lidských kaspas. Samy mohou být aktivovány proteolytickým štěpením na specifických aspartátových zbytcích. Štěpení probíhá tak, že dojde k odstranění prodomény a vytvoření aktivní kaspasy složené ze dvou velkých a dvou malých podjednotek. Dojde tak k vytvoření homodimeru složeného ze dvou monomerů obsahujících jednu velkou a jednu malou podjednotku. Vznikne tak i aktivní místo enzymu, které se skládá ze čtyř klíčových aminokyselin – dvou cysteinů ve větších podjednotkách a dvou histidinů v menších podjednotkách (Rezacova a Vavrova 2011).

Kaspasy můžeme 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).

1.5.2 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).

Rodina proteinů Bcl-2 zahrnuje u vyšších eukaryot až 30 homologů. Ty mohou mít na osud buňky absolutně odlišný dopad. Na základě jejich strukturních vlastností mohou apoptózu podporovat nebo inhibovat (Tichy 2006). Existují dvě hlavní skupiny proteinů Bcl-2, a to pro-apoptotické a anti-apoptotické proteiny. Mezi pro-apoptotické řadíme

proteiny Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim a Hrk. Anti-apoptotické proteiny jsou například Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, Bfl-1 a Mcl-1. Zatímco anti-apoptotické proteiny regulují apoptózu blokováním uvolňování cytochromu-c z mitochondrií, pro-apoptotické proteiny jeho uvolňování podporují. O zahájení apoptózy nerozhoduje absolutní množství těchto proteinů, ale spíše rovnováha mezi nimi (Wong 2011). Na této tzv. na kaspasách závislé cestě se dále uplatňuje řada receptorů, jako je TNF-α receptor, FasL receptor, TLR, Death receptor. Rovněž některé kanály mohou být zapojeny do apoptotické dráhy, například vápníkový kanál. Jelikož koncentrace vápníku v cytosolu hraje důležitou roli v regulaci signální transdukce, podílí se na buněčné proliferaci a buněčné smrti, může být osud buňky řízen otevíráním nebo zavíráním vápníkového kanálu (Hongmei 2012).

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).

Mezi další apoptotické faktory, které se uvolňují z mitochondriálního mezimembránového prostoru do cytoplazmy, patří AIF (apoptosis inducing factor), Smac (second mitochondria-derived activator of caspase), DIABLO (direct IAP binding protein with low pI) a Omi/HtrA2 (high temperature requirement protein A). AIF katalyzuje uvolnění dalšího cytochromu c a následuje již známá postupná kaskáda vedoucí k apoptóze. Na druhé straně Smac/DIABLO nebo Omi/HtrA2 podporují aktivaci kaspasy vazbou na inhibitor proteinů apoptózy (IAP). Tento inhibitor má za úkol inhibovat aktivované kaspasy, čemuž je vazbou apoptotických faktorů zabráněno (Wong 2011).

1.5.3 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 (Wong 2011). Receptory obsahují extracelulární domény bohaté na cystein a cytoplazmatické domény tvořené zhruba 80 aminokyselinami, které se nazývají domény smrti (Death Domains-DD) (Rezacova a Vavrova 2011). 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).

Spuštění mechanismu pomocí receptorů smrti může být rovněž zapojen do aktivace vnitřní cesty indukce apoptózy. Kaspasa-8 štěpí protein Bid (Bcl-2 inhibitory BH3-domain containing protein), čímž ho aktivuje. Aktivovaný protein napomáhá oligomerizaci pro-apoptotických členů rodiny Bcl-2 a následně je aktivována tvorba apoptosomu a aktivace kaspasy-9. Tato kaspasa v dalším kroku aktivuje efektorovou kaspasu-3 (Rezacova a Vavrova 2011).

1.5.4 Poruchy mechanismů apoptózy

Apoptóza slouží jako důležitý proces pro inhibici metastatického šíření. Úspěch metastatické progrese 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 přežívat delší dobu, než by tomu bylo za normálních okolností. To dává buňkám čas na akumulaci genetických změn, které vedou k deregulaci buněčné proliferace a diferenciace, podporují angiogenezi a zvyšují invazivitu během nádorové progrese. Dysregulace apoptózy je tedy základním charakteristickým rysem biologie nádorů (Hassan et al. 2014).

Existuje řada molekulárních mechanismů, které nádorové buňky využívají k potlačení apoptózy. Rezistenci k apoptóze mohou získat expresí anti-apoptotických proteinů, jako je Bcl-2, nebo down-regulací či mutací pro-apoptotických proteinů, například BAX. Oba proteiny jsou regulovány tumor supresorovým genem p53. Pravděpodobně prvním důkazem, že selhání apoptózy přispívá k rakovině, je zjištěná nadměrná exprese Bcl-2 u některých forem lidského B-buněčného lymfomu (Hassan et al. 2014).

Defekty apoptózy rovněž podporují odolnost buněk vůči imunitnímu systému. Musí vyvinout mechanismus, jak se vyhnout buněčné smrti v důsledku rozpoznání a destrukce cytotoxickými T lymfocyty a NK buňkami. Kromě toho musí nádorové buňky přežít v prostředí reaktivních forem kyslíku produkovaných endotelovými buňkami při přechodu přes cévní či tkáňové bariéry. Nakonec musí tolerovat hypoxické podmínky

a proliferovat v prostředí bez potřebných růstových cytokinů, aby dosáhly úspěšné kolonizace v cílových místech (Su et al. 2015, 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 indukcí 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 apoptotický mechanismus nebo opravit již defektní (Hassan et al. 2014).

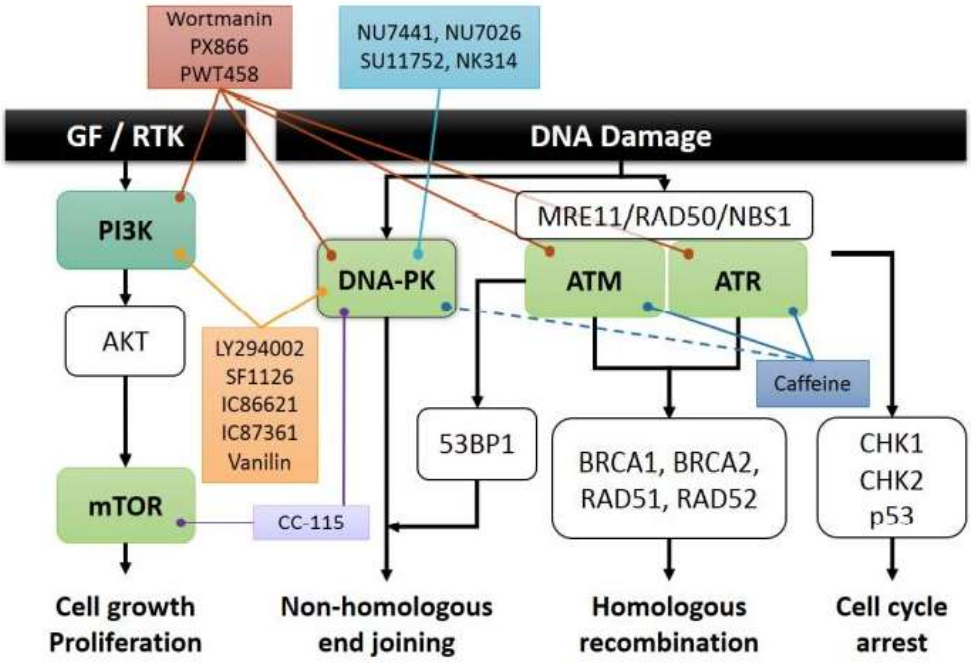
1.6 Inhibitory DNA-PK

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 (Obr.4).



Obr. 4 Schéma působení inhibitorů PI3K (převzato z: Pospisilova et al. 2017)

1.6.1 PI3K inhibitory s aktivitou proti PIKK, včetně DNA-PK

Wortmannin a jeho deriváty PX-866 a PWT-458

Jeden z prvních identifikovaných inhibitorů, wortmannin, byl izolován v roce 1957. Byl definován jako silný nekompetitivní ireverzibilní inhibitor PI3K v roce 1993, ale aktivita byla rovněž prokázána vůči členům rodiny PIKK, včetně DNA-PK (Zhu et al. 2015, Finlay et al. 2012). Jedná se o furanosteroidový metabolit houby *Penicillium funiculosum* a má IC50 v nanomolárním rozmezí (5 nM pro PI3K, včetně DNA-PK) (Davidson et al. 2013). Inhibitor způsobuje kovalentní modifikaci Lys 802 a konformační přeskupení ve vazebném místě pro ATP (Zhu et al. 2015, Wymann et al. 1996). Pastwa et al. zjistili, že necytotoxická koncentrace wortmanninu zvýšila cytotoxický účinek etoposidu trojnásobně a přibližně pětinásobně v kombinaci

s cisplatinou v lidských glioblastomových buňkách M059. Wortmannin zvýšil hladiny DSBs (závislé na koncentraci), zastavil buněčný cyklus v G2/M fázi a způsobil akumulaci buněk v S fázi. Rovněž inhiboval opravné mechanismy pro DSBs (Pastwa et al. 2014). Wortmannin se také osvědčil jako účinný radiosenzitizér, i když postrádá specifitu, vykazuje *in vivo* toxicitu, a přes svou špatnou rozpustnost ve vodných roztocích. Tyto vlastnosti značně omezily klinické použití sloučeniny (Davidson et al. 2013), a z tohoto důvodu byla připravena řada analogů wortmanninu.

Ihle et al. vyvinuli sloučeninu PX-866 otevřením furanového prstence v poloze C-20. PX-866 měl oproti wortmanninu několik zlepšení, například vyšší stabilitu a biologickou aktivitu a nižší toxicitu. Ukázalo se, že je jako samostatné léčivo aktivní proti xenograftům nádorů vaječníků (OvCar-3), tlustého střeva (HT-29) a nemalobuněčného karcinomu plic (A549) (Ihle et al 2004). Dále bylo objeveno, že potencuje *in vivo* inhibici růstu indukovanou ionizujícím zářením v xenograftech lidských nádorů OvCar-3 a rovněž zvyšuje protinádorovou aktivitu cisplatiny v xenograftech A549 nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC) (Zhu et al. 2015, Ihle et al. 2004). PX-866 měl značnou účinnost v preklinických studiích vůči xenograftům spinocelulárních buněk rakoviny hlavy a krku. Aditivní účinek byl nalezen i *in vivo* s docetaxelem na stejném myším modelu, stejně jako během druhé fáze klinického testování u lidských pacientů (Jimeno et al. 2015).

PWT-458, pegylovaný-7-hydroxywortmannin s významným vylepšením oproti samotnému wortmanninu, byl objeven Yu et al. Tato sloučenina byla aktivní vůči PTEN-negativnímu gliomu U87MG, NSCLC A549 a xenograftům karcinomu renálních buněk (RCC) A498 u myší. PWT-458 rovněž zvýšil protinádorovou účinnost paclitaxelu u gliomu a xenograftů NSCLC A549. V modelu NSCLC dosáhla kombinace PWT-458 a paclitaxelu úplného zastavení růstu nádoru, zatímco působení každého z činidel samostatně pouze omezilo jeho růst. Yu et al. odhalili také synergický účinek PWT-458 s Intronem-A u RCC A498, kde bylo dosaženo působivé regrese nádoru. Expanze tohoto nádoru u myší je doprovázena rozsáhlým růstem krevních cév v nádoru. Dalším pozorováním provedeném ve stejné studii bylo zjištěno, že kombinovaná léčba vedla ke snížení vaskularizace (Yu et al. 2005).

LY294002 a jeho proléčivo SF1126

LY294002 je morfolinový derivát rostlinného flavonoidu kvercetinu. Je to nespecifický ATP-kompetitivní inhibitor PI3K a bylo prokázáno, že vykazuje

srovnatelnou inhibiční aktivitu proti DNA-PK (Davidson et al. 2013, Harnor et al. 2017). Studie *in vitro* a *in vivo* zjistily, že má tato sloučenina řadu potenciálních účinků jako je inhibice buněčného růstu, antiangiogenní aktivita, zástava buněčného cyklu v G1 fázi a indukce radiosenzitivity (Sun et al. 2015).

Inhibitor se reverzibilně váže na kinasovou doménu DNA-PK (Andrš et al. 2015). Gupta et al. kombinovali LY294002 s radiací u lidských nádorových buněk močového měchýře T24. Zjistili, že LY294002 má významný synergický účinek vedoucí ke zvýšené redukci ozářených buněk (Gupta et al. 2003). Chemosenzitizační efekt byl dále testován v kombinaci s cisplatinou v glioblastomových buňkách (Carminati et al. 2014) a pankreatických buňkách, a to jak *in vitro*, tak *in vivo* (Fujiwara et al. 2008). Vzhledem k jeho nežádoucím vlastnostem, podobně jako u wortmanninu, a rychlé metabolické clearance však nelze posoudit jeho účinky u člověka. Nicméně se ukázal jako vhodná sloučenina fungující jako templát pro syntézu látek s příznivějšími vlastnostmi (Davidson et al. 2013).

Aby se zabránilo nežádoucím fyzikálně-chemickým vlastnostem LY294002, bylo vytvořeno proléčivo SF1126. Účelem bylo zvýšit rozpustnost a zacílit na nádory prostřednictvím vazby na specifické integriny. Prokázalo se příznivější antiangiogenní a protinádorové působení *in vivo* bez závažné toxicity, čímž se stal vhodným kandidátem pro potenciální použití v léčbě (Andrs et al. 2015). Účinnost léčiva byla testována u pacientů s pokročilými solidními nádory a malignitami B-lymfocytů. Ukázal se předběžný slibný protinádorový vliv samostatně i v kombinaci s rituximabem u jednoho pacienta s chronickou lymfocytární leukemií rezistentní na léčbu. I když je známo, že inhibice PI3K způsobuje inzulinovou rezistenci periferní tkáně zvýšenou citlivostí B-buněk pankreatu na glukózu a tím zvyšuje sekreci inzulinu jako kompenzaci, ukázalo se, že tento dočasný účinek nevede k významnému narušení glukozové homeostázy. SF1126 neměl žádný vliv na normální kožní epidermis ve srovnání s nádorovou tkání (Madahevan et al. 2012).

Avšak wortmannin a jeho deriváty PX-866 a PWT-458, stejně jako LY294002 a jeho proléčivo SF1126, jsou neselektivními inhibitory PI3K. Není proto možné protinádorové a senzibilizující účinky přiřadit pouze inhibici DNA-PK. Většina pozorovaných efektů pravděpodobně souvisí s inhibicí signálů přežití a proliferace prostřednictvím dráhy receptor-PI3K-Akt-(mTOR), což je dalším slibným cílem pro budoucí protinádorové terapie (Massacesi et al. 2016).

1.6.2 Selektivní inhibitory DNA-PK

NU7441 a NU7026

LY294002 byl použit jako výchozí bod pro syntézu účinnějšího a selektivnějšího inhibitoru DNA-PK – NU7441 (8-dibenzothiofen-4-yl-2-morfolin-4-yl-chromen-4-on; KU-57788). Tento inhibitor vykazoval vynikající selektivitu nejen napříč PIKKs, ale i nepříbuzných kinas. V buněčných liniích vykazoval silnou inhibici DNA-PK a působil jako chemosenzitizátor *in vitro* a také *in vivo* (O´Connor et al. 2007). DSBs indukované doxorubicinem a ionizujícím zářením (IR) přetrvávaly v přítomnosti NU7441 po delší dobu (Davidson et al. 2013). Zhao et al. provedli preklinické hodnocení tohoto inhibitoru na buňkách vaječníku čínského křečka. Potenciace účinku ionizujícího záření a etoposidu byla výsledkem inhibice DNA-PK. Kromě toho NU7441 zvýšila perzistenci γH2AX po poškození DNA a rovněž prodloužení G2/M fáze buněčného cyklu. Zhao et al. také zkoumali chemo- a radiosenzitizaci u lidských buněk rakoviny tlustého střeva LoVo a SW620. Zjistili, že NU7441 při nízké necytotoxické koncentraci (1 μmol/l) významně zvyšuje cytotoxicitu IR, doxorubicinu a etoposidu v obou buněčných liniích. U buněk SW620 způsobila sloučenina dvojnásobné až trojnásobné zvýšení cytotoxicity vyvolané doxorubicinem v závislosti na koncentraci cytostatika. Rovněž zesílení efektu IR v kombinaci s NU7441 byla výrazná u obou buněčných linií. LD_{90} u SW620 poklesl ze 4 Gy na 1,1 Gy a u LoVo buněk z 3 Gy na 1 Gy. Ve studii *in vivo* NU7441 zvýšila protinádorovou aktivitu etoposidu u xenograftů lidského nádoru tlustého střeva SW620 (Zhao et al. 2006). Ciszewski et al. studovali senzibilizační účinek NU7441 v kombinaci s doxorubicinem nebo ionizujícím zářením při léčbě u tří buněčných linií lidské rakoviny prsu (MCF-7, MDA-MB-231 a T47D). NU7441 významně zvýšila citlivost k doxorubicinu, a to třikrát až šestkrát, u IR čtyřikrát až dvanáctkrát. Sloučenina způsobila akumulaci buněk v G2/M fázi buněčného cyklu (Ciszewski et al. 2014). Ve srovnání s inhibitorem ATM, KU-55933, vykazoval NU7441 vyšší stupeň radiosenzitizace u buněk MCF-7. Při kombinaci těchto dvou sloučenin nedošlo k žádnému významnému účinku (Cowell et al. 2005). Tichy et al. zkoumali reakci na IR u lidské leukemické buněčné linie MOLT-4 preinkubované s NU7441. Zjistili, že kombinovaná terapie způsobila zvýšení fosforylace H2AX i indukci apoptózy. Rozdíl v procentu apoptotických buněk ve skupině pouze ozářených buněk (48 %) a buněk ovlivněných kombinovanou terapií s NU7441 (27 %) byl téměř dvojnásobný (Tichy et al. 2014). Stejná sloučenina byla testována u lidských nádorových buněk s přítomností DNA-PK (M059-Fus1) a buněk deficientních na DNA-PK (M059 J). Inhibitor byl zkombinován

s doxorubicinem či IR a způsobil chemo- a radiopotenciaci pouze u buněk M059-Fus1. Terapiemi způsobené poškození DNA bylo měřeno pomocí ložisek γ-H2AX (Tavecchio et al. 2012).

LY294002 byl rovněž použit pro vývoj sloučeniny NU7026 (2-(morfolin-4-yl)-benzo[h]chomen-4-on). Tato látka je jako inhibitor DNA-PK přibližně šestkrát účinnější než LY294002 a nejméně sedmdesátkrát selektivnější pro DNA-PK než pro jiné PI3K (Hollick et al. 2003). Jeho IC50 pro DNA-PK se pohybuje 0,19 – 0,28 μM a > 100 μM pro ATM a ATR (Harnor et al. 2017, Griffin et al. 2005). NU7026 zvýšil cytotoxicitu ionizujícího záření a cytostatik inhibující topoizomerasu II (idarubicin, daunorubicin, doxorubicin, etoposid, amsakrin a mitoxantron) u leukemických buněk K562 (Willmore et al. 2004), HL-60 a HL-60/MX2 (Mikusova et al. 2011). Radiosenzitizační účinek byl také pozorován u buněk karcinomu žaludku N87 spojený se zvýšenou úrovní poškození DNA a zástavou buněčného cyklu v G2/M fázi (Niazi et al. 2014).

Navzdory slibným studiím *in vitro*, preklinické výsledky farmakokinetiky *in vivo* prokázaly, že je léčivo rychle vylučováno z krevního oběhu (Andrs et al. 2015).

IC86621 a IC87361

Byly testovány další sloučeniny založené na struktuře LY294002, a to IC86621 (Kashishian et al. 2003) a IC87361 (Shinohara et al. 2005). IC86621, selektivní inhibitor DNA-PK, nevykazoval aktivitu vůči příbuzným protein kinasám ATM a ATR ani při koncentracích 100 μM. Významně zvýšil cytotoxicitu dvou látek indukujících DSB – bleomycinu a etoposidu. Zajímavé však je, že nedošlo k senzibilizaci buněk při použití doxorubicinu. Studie rovněž uvádí radiosenzitizační vlastnosti látky nezávislé na typu testovaných buněk (kolorektální, bronchoalveolární karcinom, karcinom vaječníků, pankreatu, leukemické buňky). Všechny testované buněčné linie vykazovaly v kombinované terapii 1,5x - 4,2x vyšší radiosenzitivitu (Kashishian et al. 2003). Shinohara et al. testovali, zda je IC87361 schopen senzibilizovat nádorové buňky v kombinaci s ionizujícím zářením. Buněčnou linii melanomu B16F0 a buňky rakoviny plic LCC ovlivnili samotným inhibitorem nebo IR o dávce 6 Gy a poté jejich kombinací. Ionizující záření mělo na obě buněčné linie mírný inhibiční účinek, ale samotný inhibitor neměl žádný významný vliv. Naproti tomu kombinovaná léčba poukázala na významné snížení přežití u buněk LCC i B16F0 (Shinohara et al. 2005).

SU11752

Ismail et al. objevili sloučeninu SU11752, která se chovala jako kompetitivní inhibitor pro místo ATP v DNA-PK. Ve srovnání s wortmanninem byla tato látka selektivnějším inhibitorem DNA-PK a neovlivňovala aktivitu ATM kinasy a dalších PI3K. SU11752 vykazoval schopnost bránit opravám dvouřetězcových zlomů DNA u buněčné linie lidského glioblastomu po expozici IR a u buněk ovlivněných kalicheamicinem. Přesto má SU11752 relativně slabou vazbu na DNA-PK. Z tohoto důvodu není pravděpodobné, že by byl vhodným kandidátem pro klinické studie. Na druhé straně Ismail et al. věří, že sloučenina může sloužit jako vynikající výchozí bod pro vývoj nových specifických inhibitorů DNA-PK, které mohou být užitečné v kombinaci s chemoterapií či radioterapií (Ismail et al. 2004, Wymann et al. 1996).

IC486241 (ICC)

Davidson et al. popisují schopnost nového specifického inhibitoru DNA-PKcs, IC486241 (ICC), synergizovat cytotoxicitu látek poškozujících DNA v různých buněčných liniích rakoviny prsu – MCF7, BT-20 a MDA-MB-436. Zjistili, že ICC významně zvyšuje cytotoxicitu doxorubicinu a cisplatiny a tato synergie byla zjištěna při netoxických koncentracích ICC (1 – 2 μM). Léčba doxorubicinem způsobila fosforylaci DNA-PKcs, přičemž reakce na poškození byla za přítomnosti ICC utlumena. Na rozdíl od samotného doxorubicinu kombinace s ICC vedla k poklesu γH2AX. To je způsobeno reverzibilním blokování ATP místa na DNA-PKcs díky ICC. Tím je zabráněno autofosforylaci a fosforylaci dalších substrátů DNA-PKcs, jako je H2AX. Davidson et al. dospěli k závěru, že zvýšená cytotoxicita byla výsledkem snížené aktivity DNA-PKcs a vyššího poškození DNA v důsledku inhibice mechanismu NHEJ (Davidson et al. 2012a). Zda je downregulace fosforylace H2AX pouze účinkem inhibice DNA-PK nebo jestli má ICC další inhibiční efekt na ATM zůstává otevřenou otázkou, jelikož nebyly zveřejněny žádné údaje o selektivitě ICC. V jiné studii Davidson et al. zkoumali účinnost ICC v kombinaci s chemoterapeutickými látkami poškozujícími DNA v buněčných liniích rakoviny tlustého střeva HCT-116 a HT-29. Když byl inhibitor použit společně s irinotekanem, cisplatinou a oxaliplatinou, byly IC50 platinových sloučenin nepatrně sníženy. Když však byl ICC kombinován se SN38 (aktivní metabolit irinotekanu), byl cytotoxický účinek vysoce synergický. Sloučenina inhibovala autofosforylaci DNA-PKcs a také mírně snížila γH2AX. Analýza buněčného cyklu

ukázala významné zastavení cyklu v G2/M fázi po 24hodinové expozici SN38 a SN38 společně s ICC (Davidson et al. 2012b).

1.6.3 Sloučeniny se smíšenou aktivitou zahrnující inhibici DNA-PK

Kofein

Block et al. prokázali účinné inhibiční vlastnosti kofeinu vůči aktivitě DNA-PK *in vitro*. DNA-PK je inhibována kofeinem prostřednictvím smíšeného nekompetitivního mechanismu. Může se vázat na komplexy DNA-PK i DNA-PK-ATP, ale s nestejnou afinitou. Zatímco kofein inhibuje fosforylaci substrátů závislých na DNA-PK, autofosforylace DNA-PK je v buňkách tkáňových kultur inhibována pouze slabě. Je však známo, že sloučenina inhibuje primárně ATM a ATR (Block et al. 2004).

Vanilin

Vanilin je známý jako přirozeně se vyskytující složka potravy a uznávané činidlo s anti-mutagenními účinky. Durant a Karran uvedli, že vanilin inhibuje opravu DNA pomocí NHEJ a působí jako selektivní inhibitor DNA-PK. Kromě toho zjistili, že významně neovlivňuje aktivitu ATM/ATR-dependentní fosforylaci Chk2 (Durant a Karran 2003). Vanilin prokázal svůj anti-metastatický potenciál *in vivo* vůči buňkám rakoviny prsu 4T1 (Lirdprapamongkol et al. 2005), buněčné linii rakoviny tlustého střeva HCT116 *in vitro* (King et al. 2007) a vykazuje zvýšené cytotoxické a cytostatické působení u buněk kolorektálního karcinomu HT-29 ve srovnání s normálními lidskými fibroblasty (Ho et al. 2009). Vanilin je schopen senzitizovat buněčnou linii karcinomu vaječníků A2780 a lymfoblasty TK6 k terapii cisplatinou. Nebyl pozorován významný účinek vanilinu coby radiosenzitizátoru (Durant a Karran 2003).

NK314

Hisatomi et al. představili NK314, syntetický alkaloid, jako inhibitor se specifitou pro topoizomerasu II alfa. Rovněž však uvádějí inhibici opravy DSBs zprostředkovanou indukcí degradace DNA-PKcs. Rovněž zkoumali účinky NK314 v reakci na poškození DNA ozařováním a byla prokázána silná protinádorová aktivita vůči T-buněčné leukemii/lymfomu dospělých. NK314 vyvolal zástavu buněčného cyklu v G2/M fázi závislou na dávce, zatímco normální buňky periferní krve byly udržovány ve fázi G0/G1 (Hisatomi et al. 2011).

CC-115

Mortensen et al. popsali preklinickou charakterizaci CC-115. Jedná se o orálně aktivní inhibitor DNA-PK a mTOR (mammalian target of rapamycin) kinase (TORK). Sloučenina vykazovala protinádorovou aktivitu a schopnost indukovat apoptózu v panelu nádorových buněčných linií. Kromě toho byla u mnoha xenograftů solidních nádorů prokázána inhibice růstu závislá na dávce (Mortensen et al. 2014). Inhibice DNA-PK způsobila narušení NHEJ, inhibici substrátů Ku80, XRCC4 a autofosforylaci DNA-PK. Tsuji et al. také zjistili potlačení dráhy HR nepřímou inhibicí ATM (Tsuji et al. 2014). Raymon et al. testovali antiproliferativní aktivitu u myších xenograftů glioblastomových buněk U87MG. CC-115 vykazoval na dávce závislou inhibici růstu nádoru a přežití myší s implantovaným glioblastomem bylo prodlouženo (Raymon et al. 2014).

2 CÍLE 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.

3 MATERIÁL A METODIKY

3.1 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 - 50x10^3 buněk/jamku) do 96jamkové destičky a kultivovány v kontrolované atmosféře 5% CO_2 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).

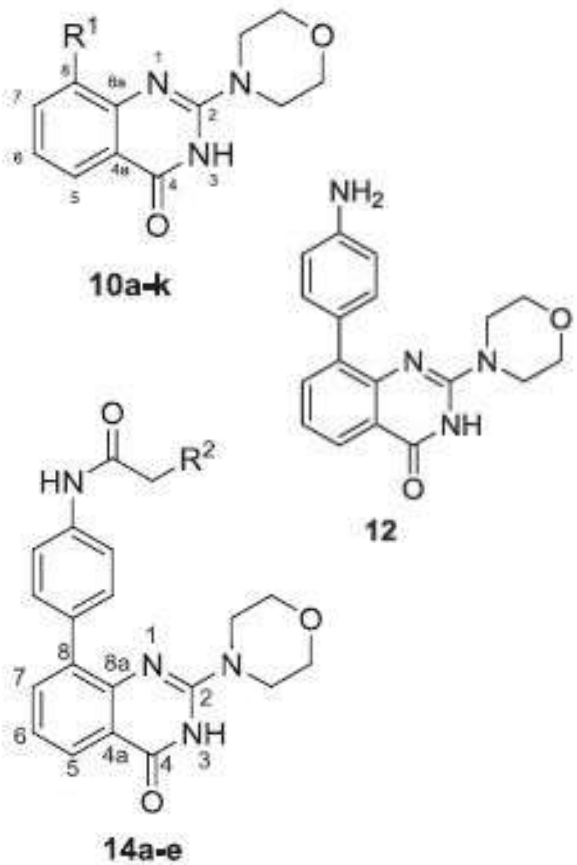
3.2 Cytostatika

Chinazolinové (Obr. 5) a purinové (Obr. 6) 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 (Sigma-Aldrich, USA) 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 (Merck, ČR) (10 µmol/l). Maximální koncentrace DMSO v kultivačním mediu byla 0,1 %.

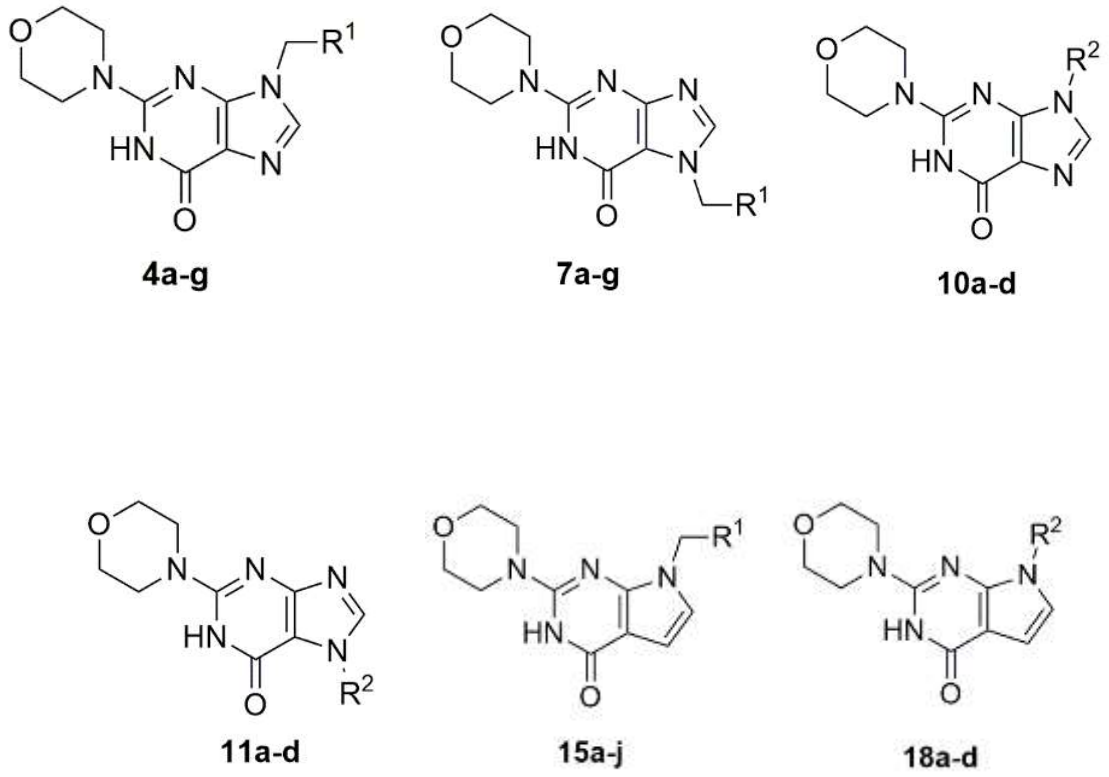
Code	R^1	R^2
10a	phenyl	–
10b	dibenzothien-4-yl	–
10c	thiophen-3-yl	–
10d	naphthalen-1-yl	–
10e	4-phenoxyphenyl	–
10f	dibenzofuran-4-yl	–
10g	4-methylphenyl	–
10h	(1,1′-biphenyl)-3-yl	–
10i	4-*tert*-butylphenyl	–
10j	7-chloroquinolin-4-yl	–
10k	5-methyl-1*H*-indol-3-yl	–
14a	–	4-methylpiperazin-1-yl
14b	–	morpholin-4-yl
14c	–	piperidin-1-yl
14d	–	diethylamino
14e	–	bis(2-hydroxyethyl) amino



Obr. 5 Nově syntetizované 3,4-dihydrochinazolinové deriváty 10a-k, 12 a 14a-e.
(převzato z: Pospisilova et al. 2019)

Code	R^1	R^2
4a	Phenyl	
4b	3,4-dichlorophenyl	
4c	Propan-2-yl	
4d	4-chlorophenyl	
4e	4-methoxyphenyl	
4f	3-methoxyphenyl	
4g	1-phenylethyl	
7a	Phenyl	
7b	3,4-dichlorophenyl	
7c	Propan-2-yl	
7d	4-chlorophenyl	
7e	4-methoxyphenyl	
7f	3-methoxyphenyl	
7g	1-phenylethyl	
10a		Phenyl
10b		Thiophen-3-yl
10c		Dibenzofuran-4-yl
10d		Dibenzothien-4-yl

11a		Phenyl
11b		Thiophen-3-yl
11c		Dibenzofuran-4-yl
11d		Dibenzothien-4-yl
15a	Phenyl	
15b	4-chlorophenyl	
15c	Propan-2-yl	
15d	3-methoxyphenyl	
15e	4-methoxyphenyl	
15f	4-nitrophenyl	
15g	3,4-dichlorophenyl	
15h	4-trifluoromethylphenyl	
15i	1-phenylethyl	
18a		Phenyl
18b		4-*tert*-butylphenyl
18c		3,4-dichlorophenyl
18d		Thiophen-3-yl



Obr. 6 Nově syntetizované série purin-6-on a pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on derivátů. (převzato z: Andrs et al. 2018)

3.3 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 µl kultivačního média a inkubovány 24 hodin (37 °C, 5 % CO_2). Po přisednutí buněk byly přidány testované látky v požadovaných koncentracích. Za 48 hodin od ovlivnění bylo do každé jamky přidáno 50 µl 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.

3.4 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 10^4 předem ovlivněných (48 hodin) buněk HT-29 v 50 µl kultivačního média. Buňky byly poté inkubovány po dobu 30 minut s 50 µl Caspase-Glo Assay reagentem. Luminiscence byla měřena za použití spektrofotometru Tecan Infinite M200 (Tecan Group, Švýcarsko) a generovaný signál byl úměrný množství aktivity kaspas.

3.5 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 µmol/l doxorubicinem, 10 µmol/l NU7026 a 10 µmol/l 14d samostatně či v kombinaci s doxorubicinem po dobu 24 a 48 hodin. Poté byly buňky sklizeny trypsinizací, promyty dvakrát ledovým PBS pufrem (Invitrogen, 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 Na_2HPO_4 (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 µl 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.

3.6 Elektroforéza a Western blotting

Elektroforéza je separační technika založená na migraci nabitých molekul v elektrickém poli. Rychlost migrace závisí na síle pole, velikosti náboje, tvaru a velikosti molekul, ale také na viskozitě a teplotě prostředí, ve kterém se molekuly pohybují. Je jednoduchá, rychlá a vysoce citlivá. Jako nosná matrice pro vzorek slouží papír, škrobový gel, agaróza nebo polyakrylamidový gel (Rybicki a Purves, 1996).

SDS-PAGE je elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS) běžně používaná pro separaci proteinů (Schägger, 2006). SDS je aniontový detergent, který v proteinech narušuje nekovalentní vazby a molekuly ztrácí svou nativní konformaci - způsobuje jejich denaturaci. Na bílkoviny se váže v poměru 1,4:1 (SDS:protein). Dodecylsíran sodný uděluje polypeptidu záporný náboj v poměru k jeho délce, což umožňuje dělení proteinů podle jejich molekulové hmotnosti. Pro separaci proteinů je používána diskontinuální elektroforéza, která je složena ze dvou gelů, a to koncentračního s většími póry a separačního s menšími póry (Rybicki a Purves, 1996).

Western blot, známý také jako imunoblot, je důležitý postup pro imunodetekci proteinů následující po elektroforéze. Western blot umožňuje přenos proteinů z SDS-PAGE na adsorpční membránu, nejčastěji nitrocelulózovou nebo polyvinylidendifluoridovou (PVDF). Na jejím povrchu následuje detekce specifickými protilátkami. Blotované proteiny tvoří přesnou repliku gelu, která se ukázala jako vhodný výchozí krok pro řadu experimentů (Kurien a Scofield, 2006).

Provedení

Pro detekci specifických proteinů byly připraveny celobuněčné lyzáty z exponenciálně rostoucích buněk ošetřených 0,5 μmol/l samotného doxorubicinu nebo doxorubicinu v kombinaci s 10 μmol/l inhibitoru 14d či standardního inhibitoru

NU7026 a samotnými inhibitory 14d a 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 naneseno stejné množství proteinu (20 μg) do polyakrylamidového gelu pro SDS-PAGE elektroforézu. Po elektroforetické separaci byly proteiny přeneseny na 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 křenovou 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.

3.7 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. MSMT33995 / 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.

3.8 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).

4 VÝSLEDKY

4.1 Chinazoliny

4.1.1 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 µmol/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 µmol/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. 7). 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	6 ± 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 v 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	13 ± 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 v3	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
smodch	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. 7 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.

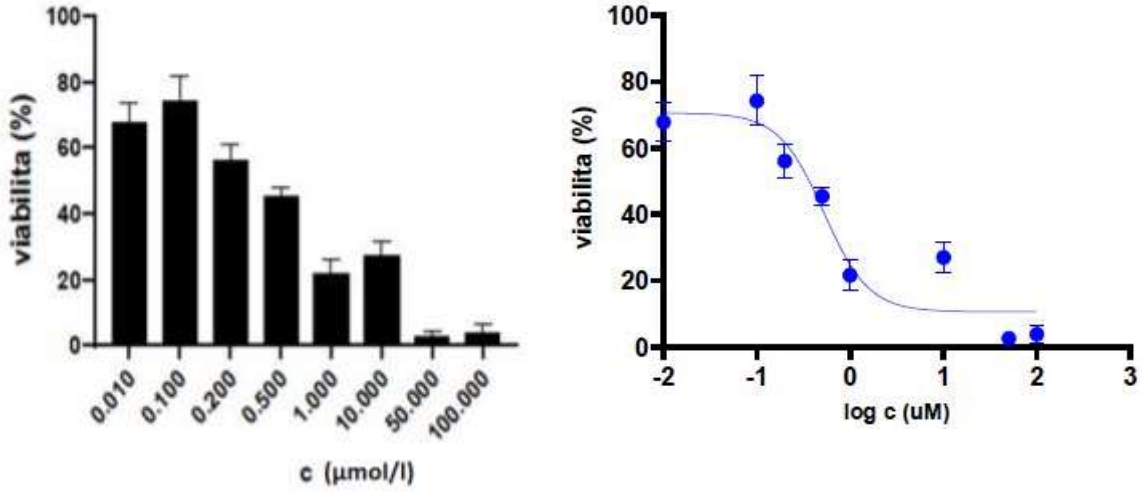
Pro každý testovaný derivát byla vypočtena hodnota procenta růstu (GP). GP představuje průměr poklesu proliferace všech buněčných linií ošetřených stejným derivátem vyjádřené v procentech.

4.1.2 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, začnou vznikat DSBs.

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 %). 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 µmol/l (Obr. 8).

Pro snazší výpočty následované ředěním látky jsme zvolili pro další experimenty koncentraci 0,5 µmol/l.



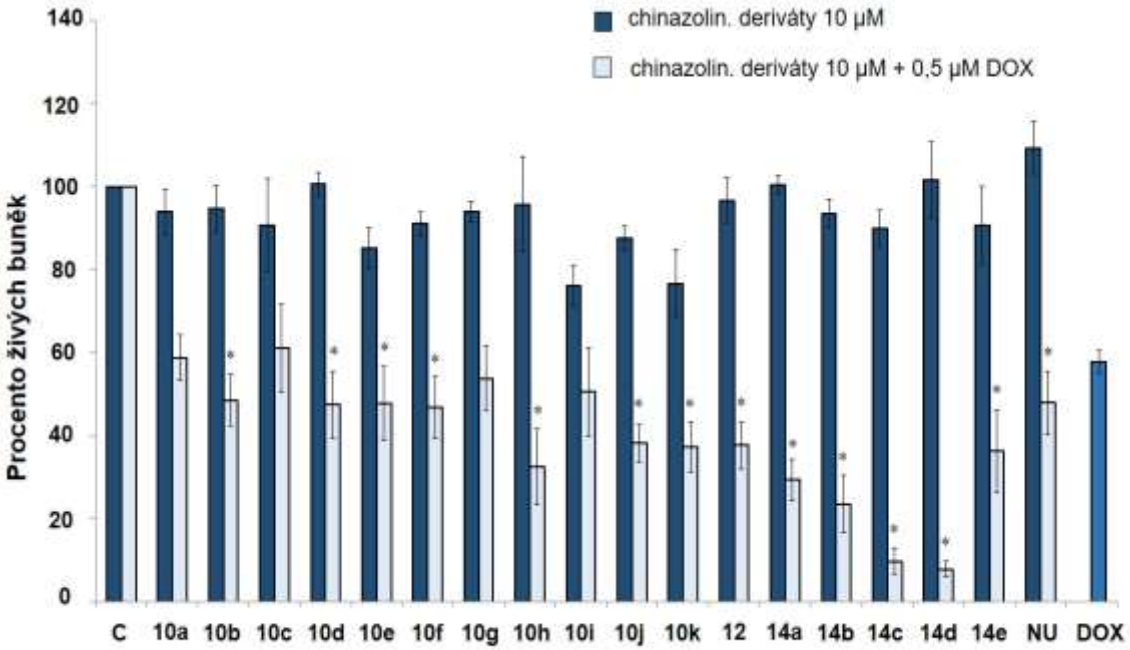
Obr. 8 Stanovení IC50 doxorubicinu na buňkách HT-29 pomocí WST-1 testu 48 hodin po působení chemoterapeutika.
Hodnota naměřeného signálu ovlivněných buněk je vyjádřena v procentech vztažených ke kontrole (100 %). Výsledky jsou znázorněny jako aritmetický průměr ze tří nezávislých měření, ± směrodatná odchylka.

4.1.3 Chemosenzitizační účinek inhibitorů

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

Jak je znázorněné na Obr. 9, procento viabilních buněk ovlivněných samotnými inhibitory se pohybovalo v rozmezí od 76 do 114 %. Po působení samotného doxorubicinu o koncentraci 0,5 μmol/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).

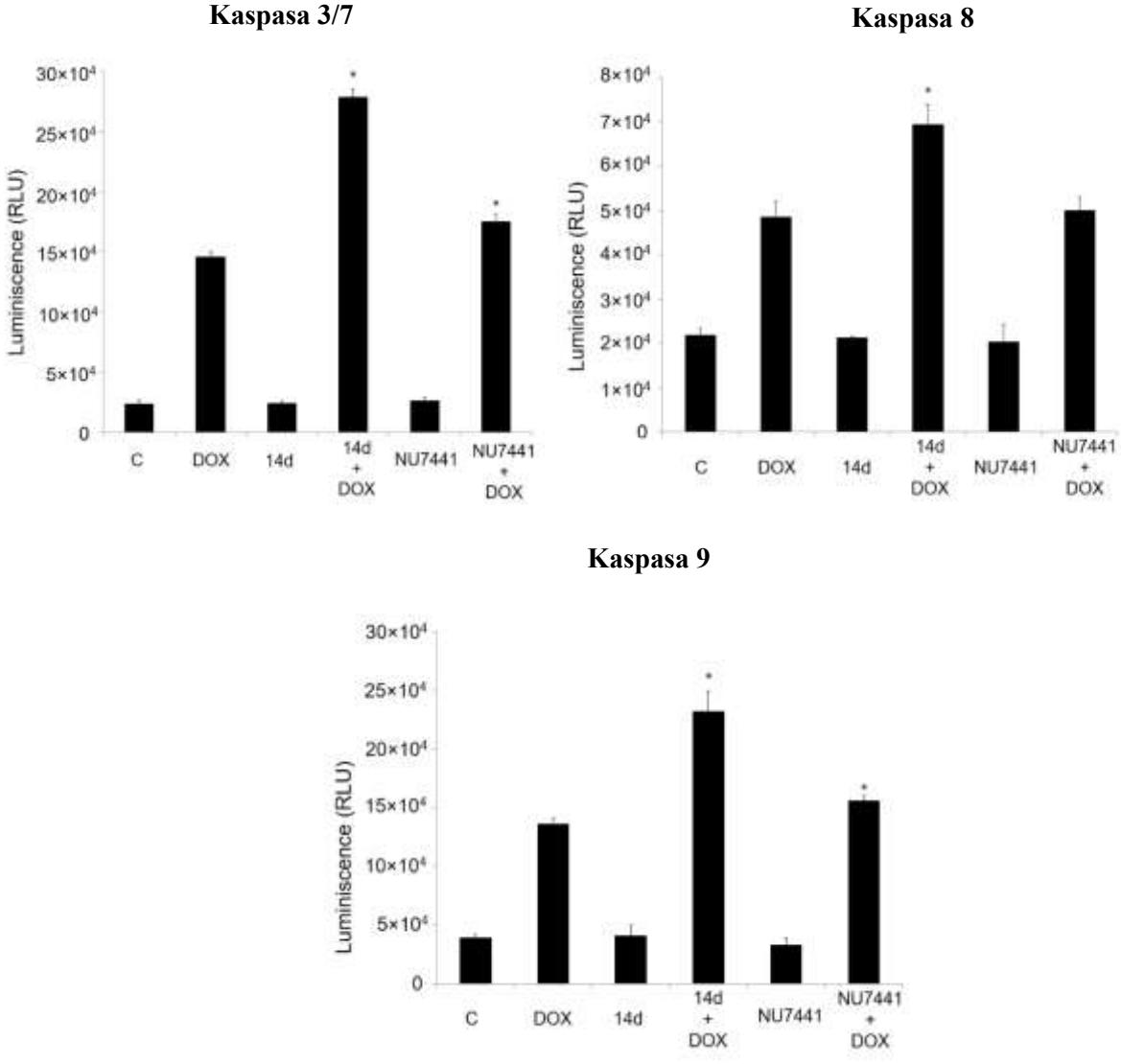
Deriváty 10a, 10c, 10g a 10i nezpůsobily v kombinaci s doxorubicinem významné snížení počtu viabilních buněk oproti samotnému doxorubicinu. I přesto, že u těchto derivátů nedošlo v kombinaci s doxorubicinem ke snížení počtu životaschopných buněk, můžeme předpokládat, že tyto inhibitory mohou působit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



Obr. 9 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 samotného doxorubicinu ($P \leq 0.05$)

4.1.4 Aktivace kaspas a indukce apoptózy

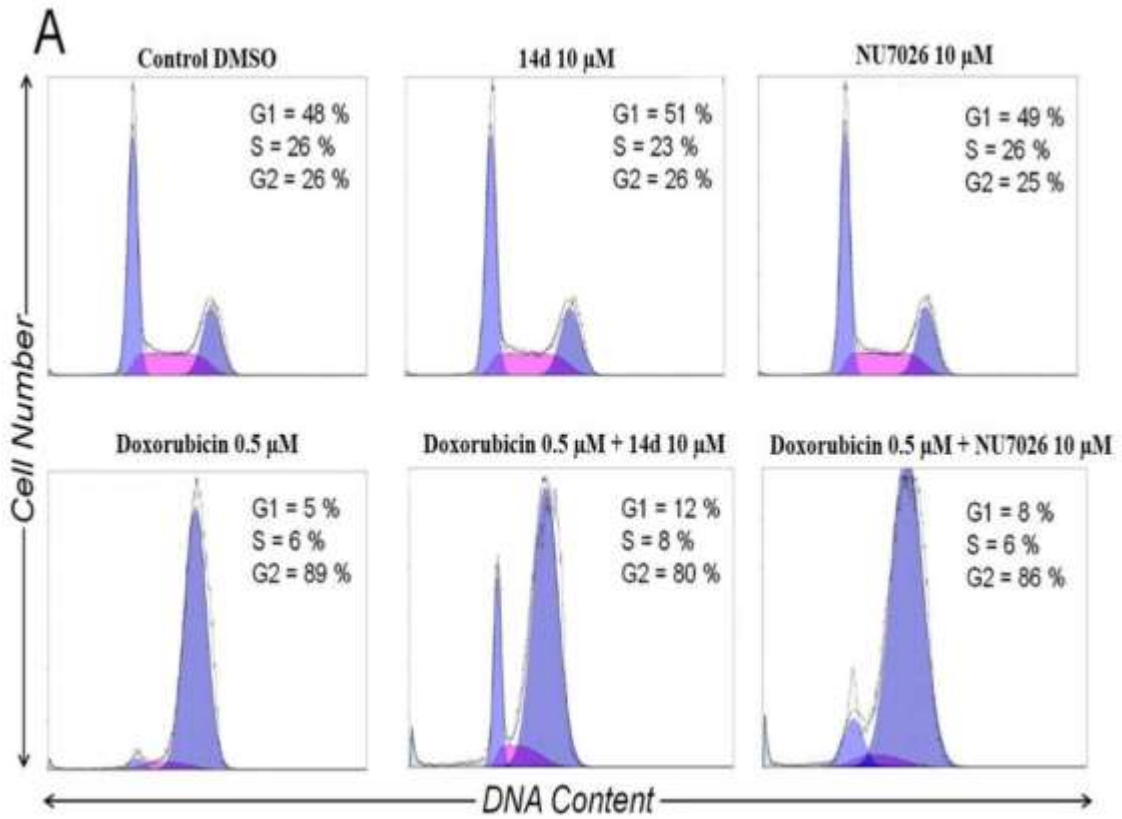
Vliv kombinované terapie inhibitorů s doxorubicinem na aktivaci kaspas 3/7, 8 a 9 byl studován 48 hodin po ovlivnění buněk HT-29. Ovlivnění samotnými inhibitory nezpůsobilo žádné signifikantní změny v aktivitě kaspas. Významné zvýšení ($P \leq 0,05$) v aktivitách kaspas 3/7 a kaspasy 9 bylo zjištěno, 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. 10).

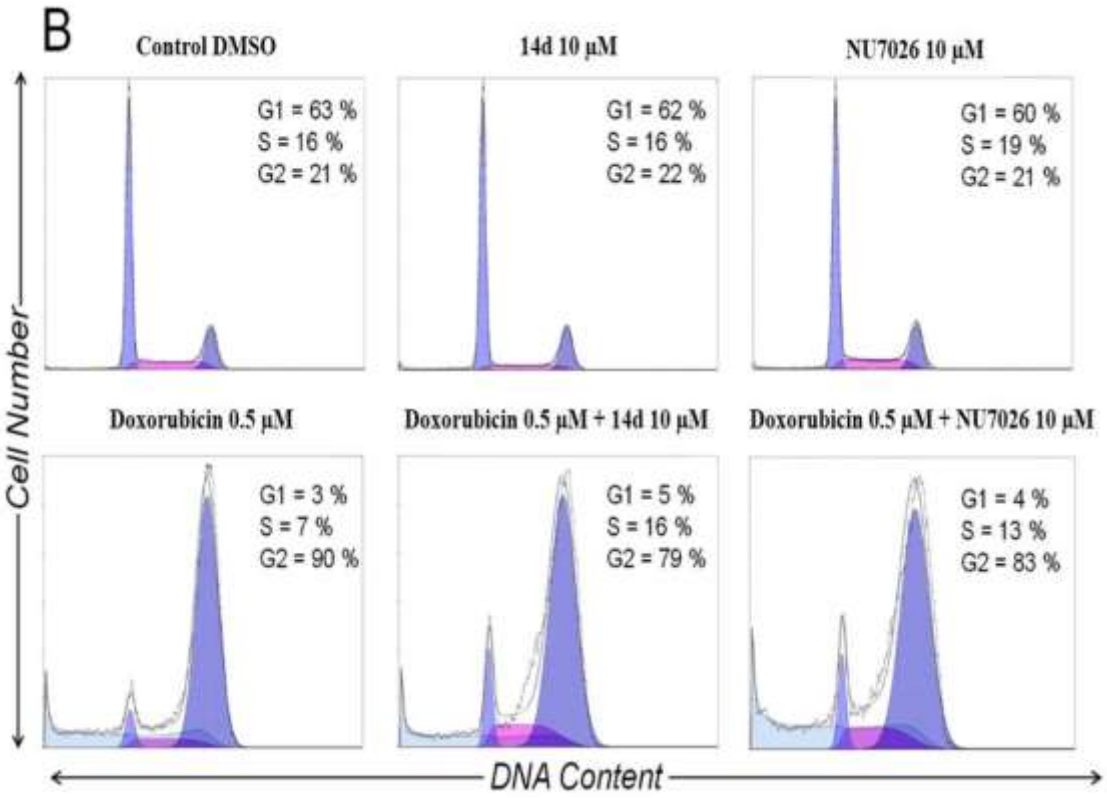


Obr. 10 Vliv testovaných sloučenin na aktivaci kaspas u buněk HT-29.
Aktivita kaspas byla stanovena 48 hodin po léčbě (doxorubicin 0,5 µmol/l, 14d 10 µmol/l, NU7441 1 µmol/l) u buněk lidského kolorektálního karcinomu HT-29. Hodnoty představují průměr ze tří nezávislých měření, ± směrodatná odchylka. Za statisticky významný byl považován rozdíl na hladině $P \leq 0,05$, který byl stanoven pomocí Studentova T-testu. * - statisticky významný rozdíl oproti působení samotného doxorubicinu ($P \leq 0.05$)

4.1.5 Analýza buněčného cyklu

K analýze buněčného cyklu buněk HT-29 byla po jejich ovlivnění doxorubicinem, 14d a NU7026 použita průtoková cytometrie. Obr. 11 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.





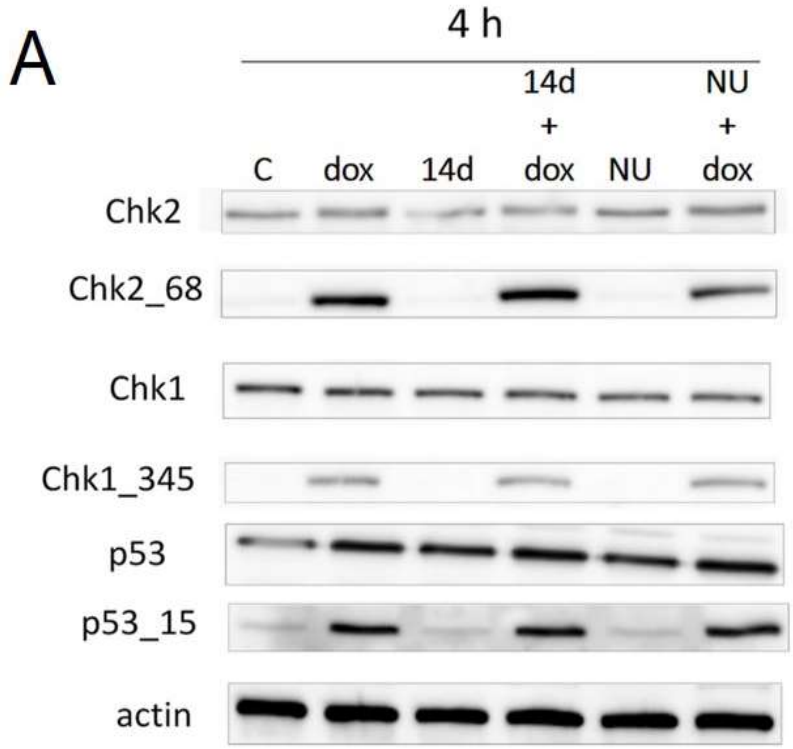
Obr. 11 Flow-cytometrická analýza buněčného cyklu po ovlivnění buněk HT-29 doxorubicinem, sloučeninou 14d a NU7026 samotnými či jejich kombinací.
Obrázek znázorňuje procentuální zastoupení buněk HT-29 v jednotlivých fázích buněčného cyklu za 24 (A) a 48 (B) hodin od ovlivnění. Výsledky profilu buněčného cyklu vybrané z jednoho ze tří nezávislých experimentů.

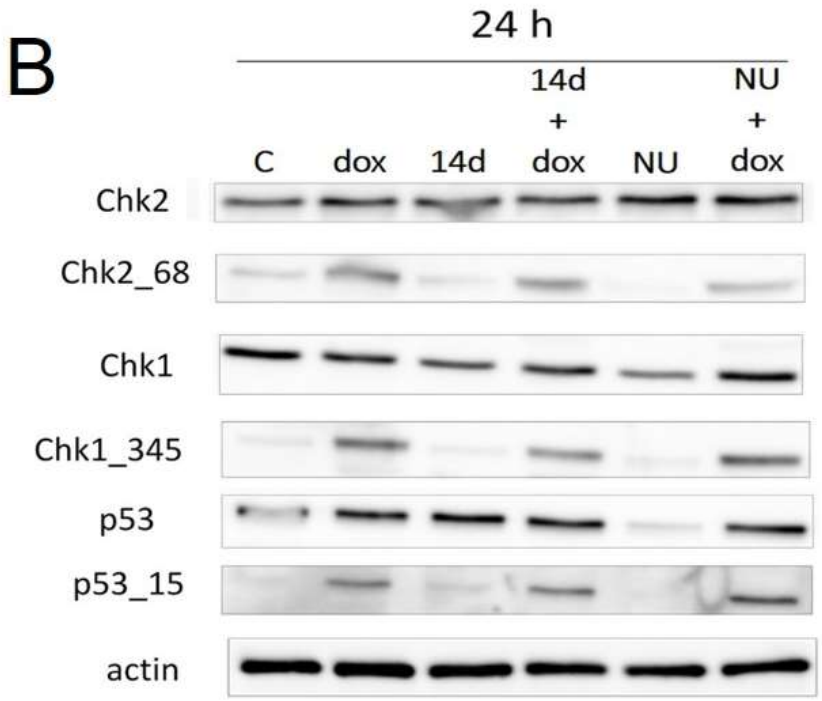
4.1.6 Změny v expresi proteinů

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. 12).

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 kinasy 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. 12 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 μmol/l), 14d (10 μmol/l) a NU7026 (10 μmol/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).

4.1.7 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. 13).

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. 13 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 %.

4.2 Puriny

4.2.1 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. 14). 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

0-25

26-50

51-75

Obr. 14 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 vyjádřené v procentech.

4.2.2 Chemosenzitizační účinek inhibitorů

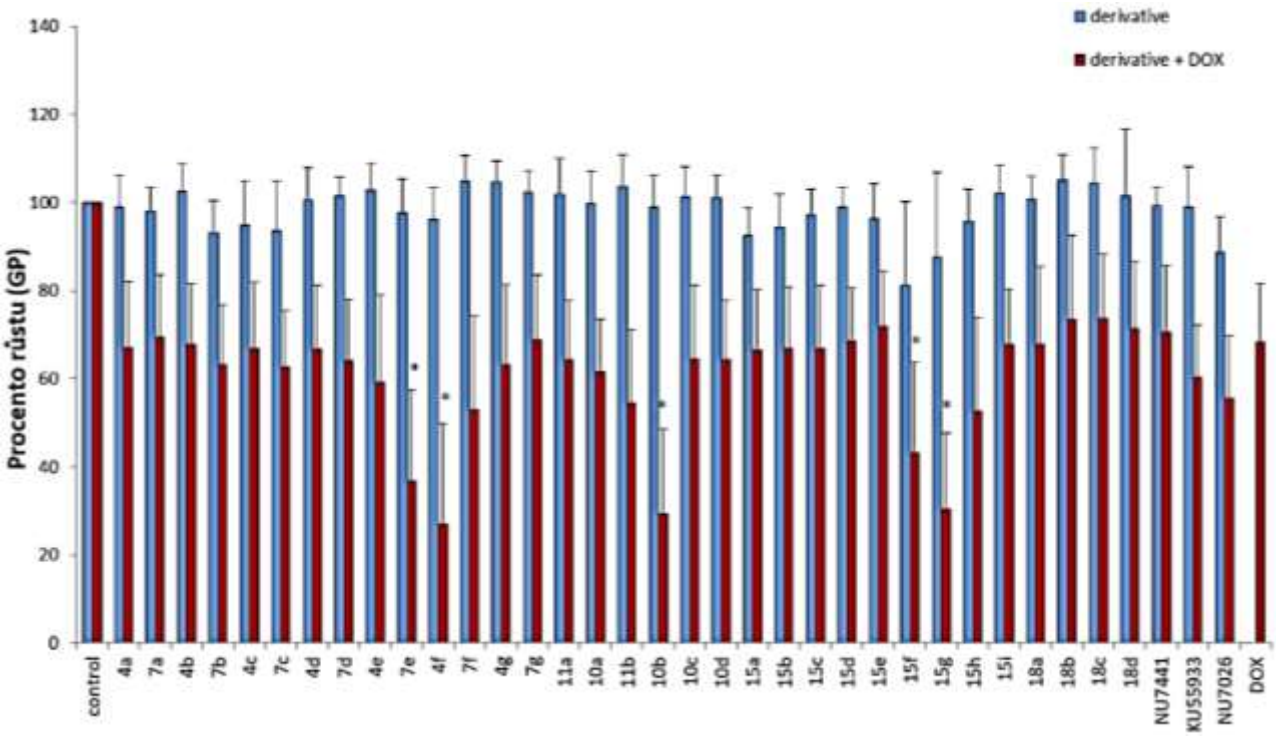
Screening chemosenzitizačního účinku byl proveden na panelu 10 buněčných linií s 33 inhibitory v kombinaci s příslušnými koncentracemi standardního chemoterapeutického činidla způsobujícího DSB – doxorubicinem (Obr. 15, Obr. 16). Schopnost potencovat účinek doxorubicinu byla pozorována u pěti sloučenin na sedmi různých nádorových buněčných liniích. Kombinace inhibitorů s doxorubicinem vedla ke snížení viability buněk ve srovnání s doxorubicinem samotným. Jako nejúčinnější inhibitory se projevily sloučeniny 4f, 10b, 15g, 7e a 15f s hodnotami GP 27 %, 29 %, 30 %, 37 % a 43 % (Obr. 17). Nejcitlivějšími buněčnými liniemi byly A549, HT-29, AGS, HeLa, SAOS-2, PANC-1 a MCF-7. Zajímavostí je, že nebyl pozorován žádný chemosezitizační 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

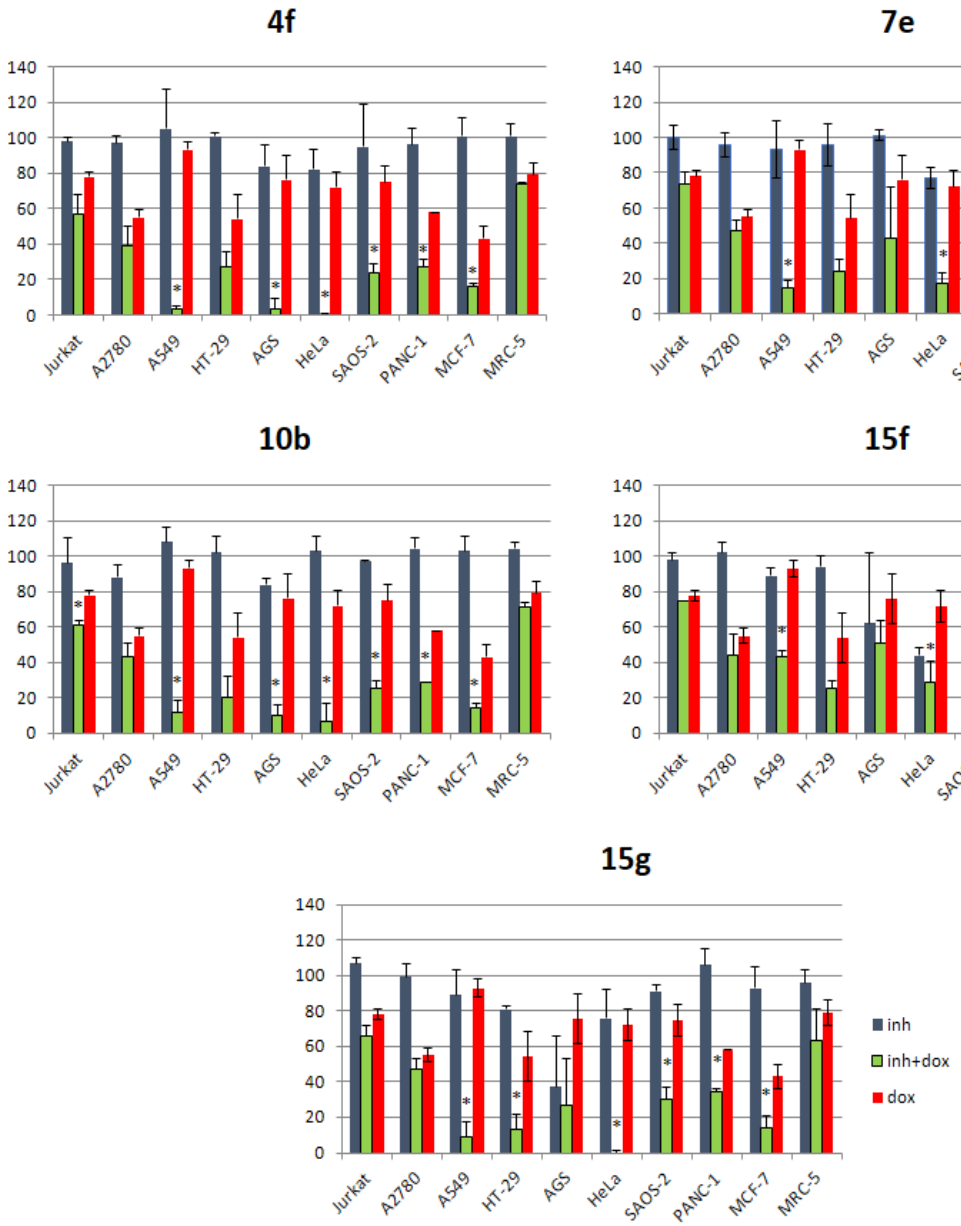
INH+DOX	10c	10d	15a	15b	15c	15d	15e	15f	15g	15h	15i	18a	18b	18c	18d	NU7441	KU55933	NU7026	DOX
Jurkat	71	69	83	81	83	69	98	75	66	77	71	69	77	87	54	69	58	70	78
A2780	44	56	55	54	53	49	50	44	47	54	58	50	58	51	49	55	65	44	55
A549	98	83	77	79	76	83	114	43	9	66	71	103	104	103	104	81	75	58	93
HT-29	58	49	48	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. 15 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 vyjádřené v procentech.



Obr. 16 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 samotného doxorubicinu ($P \leq 0.05$)



Obr. 17 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 ($P \leq 0.05$)

5 DISKUZE

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-vázajícího 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 senzitizaci 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 antagonista 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 zabývající 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 žlábku 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 μmol/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 senzitizoval 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 nejúčinnějším

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 inhibitorem 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 inhibitorem 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 inhibitorem 14d, tak se standardním inhibitorem 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 indukujícímu 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 kombinace s inhibitorem 14d a standardním inhibitorem 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).

6 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 myší vykázalo relativně nízkou toxicitu a byla stanovena maximální tolerovaná dávka.

Na závěr lze říci, že všechny stanovené cíle disertační práce byly úspěšně splněny a výsledky byly publikovány v impaktovaných časopisech (viz příloha č. 1 a č. 2). 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.

7 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.

Allen C, Halbrook J, Nickoloff JA. Interactive competition between homologous recombination and non-homologous end joining. Mol Cancer Res. 2003; 1: 913-920.

Andrs M, Korabecny J, Jun D, Hodny Z, Bartek J, Kuca K. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase (PIKK) inhibitors: importance of the morpholine ring. Journal of Medicinal Chemistry 2015; 58: 41-71.

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.

Block WD, Merkle D, Meek K, Lees-Miller SP. Selective inhibition of the DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) by the radiosensitizing agent caffeine. Nucleic Acids Research 2004; 32: 1967-1972.

Boxem M. Cyclin-dependent kinases in *C. elegans*. Cell Division 2006; 1: 1-12.

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.

Carminati PO, Donaires FS, Marques MM, Donadi EA, Passos GA, Sakamoto-Hojo ET. Cisplatin associated with LY294002 increases cytotoxicity and induces changes in transcript profiles of glioblastoma cells. Molecular Biology Reports 2014; 41: 165-177.

Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2017; 18: 495-506.

Cimprich KA, Cortez D. ATR: an essential regulator of genome integrity. Nature Reviews/Molecular Cell Biology 2008; 9: 616-627.

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.

Cmielova J, Havelek R, Jiroutova A, Kohlerova R, Seifertova M, Muthna D, Vavrova J, Rezacova M. DNA damage caused by ionizing radiation in embryonic diploid fibroblasts WI-38 induces both apoptosis and senescence. Physiological Research 2011; 60: 667-677.

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, Grenier J, Martinez-Marignac V, Amrein L, Shawi M, Tokars M, Aloyz R, Panasci L. Effects of the novel DNA dependent protein kinase inhibitor, IC486241, on the DNA damage response to doxorubicin and cisplatin in breast cancer cells. Investigational New Drug 2012a; 30: 1736-1742.

Davidson D, Coulombe Y, Martinez-Marignac VL, Amrein L, Grenier J, Hodkinson K, Masson J-Y, Aloyz R, Panasci L. Irinotecan and DNA-PKcs inhibitors synergize in killing of colon cancer cells. Investigational New Drug 2012b; 30: 1248-1256.

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.

Derheimer FA, Kastan MB. Multiple roles of ATM in monitoring and maintaining DNA integrity. FEBS Letters 2010; 584: 3675-3681.

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.

Durant S, Karran P. Vanillins-a novel family of DNA-PK inhibitors. Nucleic Acids Research 2003; 31: 5501-5512.

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.

Falck J, Mailand N, Syljuasen RG, Bartek J, Lukas J. The ATM-Chk2- Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. Nature 2001; 410: 842-847.

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

Finlay MRV, Griffin RJ. Modulation of DNA repair by pharmacological inhibitors of the PIKK protein kinase family. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 2012; 22: 5352-5359.

Fujiwara M, Izuishi K, Sano T, Hossain MA, Kimura S, Masaki T, Suzuki Y. Modulating effect of the PI3-kinase inhibitor LY294002 on cisplatin in human pancreatic cancer cells. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research 2008; 27: 76. doi:10.1186/1756-9966-27-76.

Gupta AK, Cerniglia GJ, Mick R, Bakanauskas VJ, Muschel RJ, McKenna WG. Radiation sensitization of human cancer cells in vivo by inhibiting the activity of PI3K using LY294002. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics 2003; 56: 846-853.

Griffin RJ, Fontana G, Golding BT, Guiard S, Hardcastle IR, Leahy JJJ, Martin N, Richardson C, Rigoreau L, Stockley M, Smith GCM. Selective benzopyranone and pyrimido[2,1-a]isoquinolin-4-one inhibitors of DNA-dependent protein kinase: synthesis, structure-activity studies, and radiosensitization of a human tumor cell line in vitro. Journal of Medicinal Chemistry 2005; 48: 569-585.

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.

Harnor SJ, Brennan A, Cano C. Targeting DNA-dependent protein kinase for cancer therapy. ChemMedChem 2017; 12: 895-900.

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

Hefferin ML, Tomkinson AE. Mechanism of DNA double-srand break reapir by non-homologous end joining. DNA Repair 2005; 4: 639-648.

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

Hisatomi T, Sueoka-Aragane N, Sato A, Tomimasu R, Ide M, Kurimasa A, Okumoto K, Kimura S, Sueoka E. NK314 potentiates antitumor activity with adult T-cell leukemialymphoma cells by inhibition of dual targets on topoisomerase II alpha and DNA-dependent protein kinase. Blood 2011; 117: 3575-3584.

Ho KL, Yazan LS, Ismail N, Ismail M. Apoptosis and cell cycle arrest of human colorectal cancer cell line HT-29 induced by vanillin. Cancer Epidemiology 2009; 33: 155-160.

Hollick JJ, Golding BT, Hardcastle IR, Martin N, Richardson C, Rigoreau LJN, Smith GC, Griffin RJ. 2,6- disubstituted pyran-4-one and thiopyran-4-one inhibitors of DNA-dependent protein kinase (DNA-PK). Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 2003; 13: 3083-3086.

Hongmei Z. Extrinsic and intrinsic apoptosis signal pathway review. Apoptosis and Medicine 2012. InTechOpen

Huang M, Miao Z-H, Zhu H, Cai Y-J, Lu W, Ding J. Chk1 and Chk2 are differentially involved in homologous recombination repair and cell cycle arrest in response to DNA double-strand breaks induced by camptothecins. Molecular Cancer Therapeutics 2008; 7: 1440-1449.

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, Mosammaparast 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.

Ihle NT, Williams R, Chow S, Chew W, Berggren MI, Paine-Murrieta G, Minion DJ, Halter RJ, Wipf P, Abraham R, Kirkpatrick L, Powis G. Molecular pharmacology and antitumor activity of PX-866, a novel inhibitor of phosphoinositide-3-kinase signaling. Molecular Cancer Therapeutics 2004; 3: 763-772.

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.

Jimeno A, Bauman JE, Weissman Ch, Adkins D, Schnadig I, Beauregard P, Bowles DW, Spira A, Levy B, Seetharamu N, Hausman D, Walker L, Rudin CM, Shirai K. A randomized, phase 2 trial of docetaxel with or without PX-866, an irreversible oral phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, in patients with relapsed or metastatic head and neck squamous cell cancer. Oral Oncology 2015; 51: 383-388.

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.

Kashishian A, Douangpanya H, Clark D, Schlachter ST, Eary CT, Schiro JG, Huang H, Burgess LE, Kesicki EA, Halbrook J. DNAdependent protein kinase inhibitors as drug candidates for the treatment of cancer. Molecular Cancer Therapeutics 2003; 2: 1257-1264.

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

Kinner A, Wu WQ, Staudt C, Iliakis G. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. Nucleic Acids Res 2008; 36: 5678-5694.

King AA, Shaughnessy DT, Mure K, Leszczynska J, Ward WO, Umbach DM, Xu Z, Ducharme D, Taylor JA, DeMarini DM, Klein CB. Antimutagenicity of cinnamaldehyde and vanillin in human cells: global gene expression and possible role of DNA damage and repair. Mutation Research 2007; 616: 60-69.

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

Krejci L, Altmanova V, Spirek M, Zhao X. Homologous recombination and its regulation. Nucleic Acids Research 2012; 40: 5795-5818.

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.

Lees-Miller SP, Meek K. Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. Biochimie 2003; 85: 1161-1173.

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

Li J, Stern DF. Regulation of Chk2 by DNA-dependent protein kinase. Journal of Biological Chemistry 2005; 280: 12041-12050.

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.

Lirdprapamongkol K, Sakurai H, Kawasaki N, Choo M-K, Saitoh Y, Aozuka Y, Singhirunnusorn P, Ruchirawat S, Svasti J, Saiki I. Vanillin suppresses in vitro invasion and in vivo metastasis of mouse breast cancer cells. European Journal of Pharmaceutical Sciences 2005; 25: 57-65.

Lok BH, Powell SN. Molecular pathways: Undrestanding 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.

Lovejoy CA, Cortez D. Common mechanism of PIKK regulation. DNA Repair 2009; 8: 1004-1008.

Mahadevan D, Chiorean EG, Harris WB, Von Hoff DD, Stejskal-Barnett A, Qi W, Anthony SP, Younger AE, Rensvold DM, Cordova F, Shelton CF, Becker MD, Garlich JR, Durden DL, Ramanathan RK. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the panPI3K/mTORC vascular targeted pro-drug SF1126 in patients with advanced solid tumours and B-cell malignancies. European Journal of Cancer 2012; 48: 3319-3327.

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

Massacesi C, Di Tomaso E, Urban P, Germa C, Quadt C, Trandafir L, Aimone P, Fretault N, Dharan B, Tavorath R, Hirawat S. PI3K inhibitors as new cancer therapeutics: implications for clonical trial design. OncoTargets and Therapy 2016; 9:203-210.

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.

Mortensen DS, Fultz KE, Xu W, Tsuji T, Hickman M, Abbasian M, Khambatta G, Cathers B, Worland P, Moghaddam MF, Apuy J, Richardson S, Elsner J, Shevlin G, Perrin-Ninkovic S, Canan S, Raymon HK, Narla RK, Peng S, Sankar S. Preclinical characterization of CC-115, a novel inhibitor of DNA-PK and mTOR kinase currently under clinical investigation. European Journal of Cancer 2014; 50: 150.

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.

NCI-60: https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/

Neal JA, Dang V, Douglas P, Wold MS, Lees-Miller SP, Meek K. Inhibition of homologous recombination by DNA-dependent protein kinase requires kinase activity, is titratable, and is modulated by autophosphorylation. Mol Cell Biol. 2011; 31:1719-1733.

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.

Opdenbosch NV, Lamkanfi M. Caspases in cell death, inflammation, and disease. Immunity review 2019; 50: 1352-1364.

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.

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.

Prevo R, Fokas E, Reaper PM, Charlton PA, Pollard JR, McKenna WG, Muschel RJ, Brunner TB. The novel ATR inhibitor VE-821 increases sensitivity of pancreatic cancer cells to radiation and chemotherapy. Cancer Biology and Therapy 2012; 13: 1072-1081.

Raymon H, Peng S, Katz J, Zhao C, Phan C, Moghaddam MF, Fultz KE, Sankar S, Mortensen DS, Narla RK. Antitumor activity of mTOR kinase and DNA-PK inhibitor CC-115 in a mouse model of glioblastoma. European Journal of Cancer 2014; 50 (Suppl. 6): 170.

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.

Shinohara ET, Geng L, Tan J, Chen H, Shir Y, Edwards E, Halbrook J, Kesicki EA, Kashishian A, Hallahan DE. DNA-dependent protein kinase is a molecular target for the development of noncytotoxic radiation-sensitizing drugs. Cancer Research 2005; 65: 4987-4992.

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

Sun Y, Xu Y, Roy K. Price BD. DNA damage-induced acetylation of lysine 3016 of ATM activates ATM kinase activity. Molecular and Cellular Biology 2007; 27: 8502-8509.

Sun YY, Su XH, Jin JY, Zhou ZQ, Sun SS, Wen JF, Kang DG, Lee HS, Cho KW, Jin SN. Rumex acetosa L. induces vasorelaxation in rat aorta via activation of PI3-kinase/Aktand Ca2+-eNOS-NO signaling in endothelial cells. Journal of Physiology and Pharmacology 2015; 66: 907-915.

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. Gammaradiation-induced ATM-dependent signalling in human

T-lymphocyte leukemic cells, MOLT-4. Acta Biochimica Polonica, 2007, vol. 54, no. 2, 281-7.

Tichy A, Vavrova J, Pejchal J, Rezacova M. Ataxia-telangiectasia mutated kinase /ATM) as a cetral regulator of radiation-induced DNA damage response. ACTA MEDICA 2010; 53: 13-17.

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.

Tsuji T, Sapinoso L, Sankar S, Mortensen DS, Xu S. CC-115 inhibits DNA damage and repair pathways in vitro. European Journal of Cancer 2014; 50: 100.

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.

Wymann MP, Bulgarelli-Leva G, Zvelebil MJ, Pirola L, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD, Panayotou G. Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. Molecular and Cellular Biology 1996; 16: 1722-1733.

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.

Yu K, Lucas J, Zhu T, Zask A, Gaydos C, Barza-Toral L, Gu J, Li F, Chaudhary I, Cai P, Lotvin J, Petersen R, Ruppen M, Fawzi M, Ayral-Kaloustian S, Skotnicki J, Mansour T, Frost P, Gibbons J. PWT-458, a novel pegylated17-hydroxywortmannin, inhibits phosphatidylinositol 3- 343 kinase signaling and suppresses growth of solid tumors. Cancer Biology and Therapy 2005; 4: 538-545.

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 Rsesearch 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.

8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1: Novel quinazolin-4-one derivatives as potentiating agents of doxorubicin cytotoxicity.

Příloha č. 2: Purin-6-one and pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-one derivatives as potentiating agents of doxorubicin cytotoxicity.

Příloha č. 1: Novel quinazolin-4-one derivatives as potentiating agents of doxorubicin cytotoxicity.

Bioorganic Chemistry 82 (2019) 204–210

Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bioorg

Novel quinazolin-4-one derivatives as potentiating agents of doxorubicin cytotoxicity

Monika Pospisilova[a,1], Martin Andrs[b,c,1], Martina Seifrtova[a], Radim Havelek[a], Daniel Jun[b,c], Pavel Tomsik[a], Lukas Prchal[b], Rafael Dolezal[b], Ales Tichy[d], Tomas Kucera[c], Jan Korabecny[b,c,*], Martina Rezacova[a,*]

[a] Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Simkova 870, 500 03 Hradec Kralove, Czech Republic
[b] Biomedical Research Center, University Hospital Hradec Kralove, Sokolska 81, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic
[c] Department of Toxicology and Military Pharmacy, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic
[d] Department of Radiobiology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:
DNA-dependent protein kinase
Poly(ADP-ribose) polymerase-1
Phosphatidylinositol 3-kinase
NU7441
Cancer
Chemosensitization

ABSTRACT

We report the design, synthesis and biological evaluation of 17 novel 8-aryl-2-morpholino-3,4-dihydroquinazoline derivatives based on the standard model of DNA-PK and PI3K inhibitors. Novel compounds are sub-divided into two series where the second series of five derivatives was designed to have a better solubility profile over the first one. A combination of *in vitro* and *in silico* techniques suggested a plausible synergistic effect with doxorubicin of the most potent compound **14d** on cell proliferation via DNA-PK and poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibition, while alone having a negligible effect on cell proliferation.

1. Introduction

DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) is a member of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) related protein kinase family (PIKK). With two other members of this group, ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR), they take care of DNA maintenance and manage DNA damage response (DDR) [1]. DNA-PK is the major regulator of the cellular answers to DNA double strand breaks (DSBs), where both strands of the DNA helix are severed. DSBs, often caused by ionizing radiation (IR) or chemotherapeutic drugs, are the most lethal type of DNA lesion and if unrepaired, they can lead to cell death or to genome rearrangements with subsequent malignant transformation. DNA-PK helps the cells to deal with DSBs through activation of non-homologous end joining (NHEJ) [2–4]. NHEJ is a type of DSB repair which does not require a homologue template; it mediates direct ligation of the broken strands, and it is therefore not limited by the cell cycle.

DDR is a highly studied area of current cancer research. Modulation of these complex signaling pathways brings promise as radio- or chemopotentiating agents (IR, chemotherapeutic drugs) and for selective killing of cancer cells through 'synthetic lethality' [5,6]. Inhibitors of PIKK are still at an early stage of their developement; recently two ATR inhibitors (VX-970, AZD6738) and two DNA-PK inhibitors (CC-122 and MSC2490484A) have entered into phase I clinical trials [7–10]. A significant element of the DNA-PK and PI3K inhibitors originates from the chromone compound LY294002 (**1**; Fig. 1) [11]. This non-selective inhibitor of PI3K and PIKK members served as a versatile template in the development of a range of selective and potent inhibitors. Basic modifications aimed at increasing the selectivity towards DNA-PK were carried out at the 8-position of the basic chromone scaffold and included aryl/heteroaryl substitution. Introduction of bulky non-polar aromatic substituents in NU7441 (**2**) and KU-0060648 (**3**) was associated with a remarkable increase in DNA-PK inhibition potency

Abbreviations: ATM, ataxia telangiectasia mutated; ATR, ataxia telangiectasia and Rad3-related; DCM, dichloromethane; DDR, DNA-damage response; DNA-PK, DNA-dependent protein kinase; DOX, doxorubicin; DSB, double strand break; GP, growth percentage; IR, ionizing radiation; NHEJ, non-homologous end joining; MTD, maximum tolerated dose; PARP-1, poly(ADP-ribose) polymerase-1; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PIKK, phosphatidylinositol 3-kinase related protein kinase; SSB, single-strand break; THF, tetrahydrofuran; Xphos, 2-dicyclohexylphosphino-2′,4′,6′-triisopropylbiphenyl

* Corresponding authors at: Biomedical Research Center, University Hospital Hradec Kralove, Sokolska 81, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic (J. Korabecny); Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Simkova 870, 500 03 Hradec Kralove, Czech Republic (M. Rezacova).
E-mail addresses: jan.korabecny@fnhk.cz (J. Korabecny), rezacovaM@lfhk.cuni.cz (M. Rezacova).
[1] M.P. and M.A. contributed equally.

https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.10.001
Received 1 August 2018; Received in revised form 1 October 2018; Accepted 2 October 2018
Available online 06 October 2018
0045-2068/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

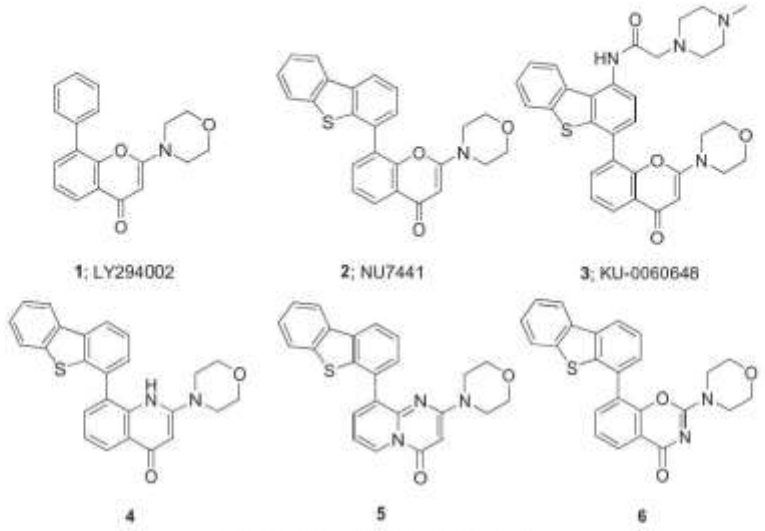


Fig. 1. Structures of known DNA-PK inhibitors.

[12,13]. Core scaffold modification was another extensively pursued possibility to obtain novel lead compounds. Accordingly, quinolinones (**4**), pyrido[1,2–*a*]pyrimidinones (**5**) and 1,3-benzoxazinones (**6**) have been reported. These isosteric compounds proved that the different electronic structures retain their binding activity but display modified selectivity profiles [14–17].

Against this background we discovered a novel series of 3,4-dihydroquinazolinones (**10a-k** and **14a-e**) which could exhibit a new selectivity pattern and activity profile for DNA-PK and PI3K. We present two 2-morpholin-4-yl-3,4-dihydroquinazolin-4-one families, one with a modified aryl moiety at the 8-position of the core heterocycle. A second series was developed through the introduction of polar heads on the attached phenyl to avoid solubility issues which were limiting further biological evaluation [13]. Morpholine represents an essential building block to preserve affinity for DNA-PK and PI3K [14]. *N*-{4-[2-(Morpholin-4-yl)-4-oxo-3,4-dihydroquinazoline-8-yl]phenyl}-2-(piperidin-1-yl)acetamide (**14d**), a compound from the second subset, showed a potent synergic effect with doxorubicin (DOX) in colorectal carcinoma cells HT-29. *In vivo* experiments were carried out in order to assess the maximum tolerated dose (MTD) as well as to reveal the therapeutic relevance of **14d** in female mice. In this article, we present the basic characteristics for the two novel series building on 2-morpholin-4-yl-3,4-dihydroquinazolin-4-one with potential applicability in cancer treatment.

2. Results and discussion

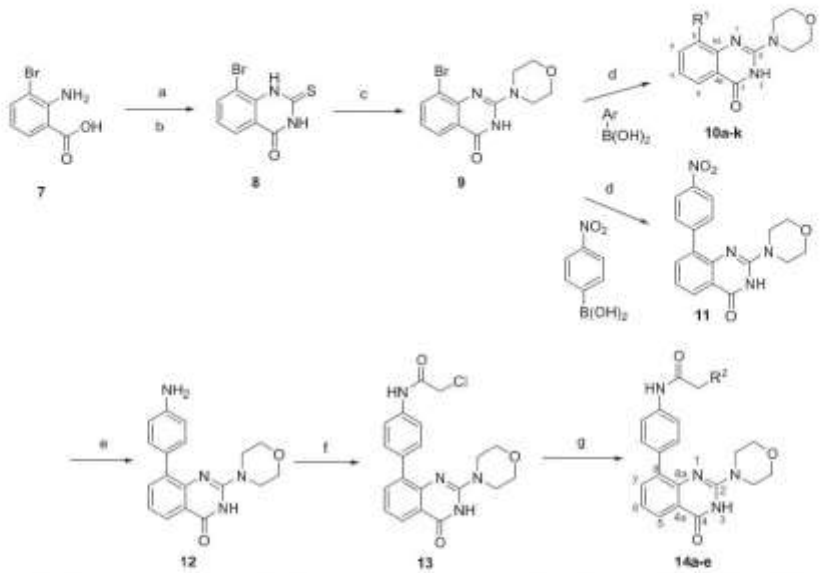
2.1. Chemistry

The compounds were synthesized as outlined in Scheme 1. Chlorination of 2-amino-3-bromobenzoic acid (**7**) with thionyl chloride and subsequent reaction with ammonium thiocyanate gave 8-bromo-2–sulfanyliden-1,2,3,4-tetrahydroquinazolin-4-one (**8**) in moderate yield 62% [18]. This compound was then refluxed for three days with an excess of morpholine in dioxane. Evaporation of dioxane and addition of dichloromethane (DCM) resulted in precipitation of 8-bromo-2-morpholin-4-yl-3,4-dihydroquinazolin-4-one (**9**) which was collected by filtration in satisfactory yield (66%). Introduction of aryl/heteroaryl moieties (R^1) using aryl/heteroaryl boronic acids through Suzuki-Miyaura coupling with $Pd(OAc)_2$, 2-dicyclohexylphosphino-2′,4′,6′-triisopropylbiphenyl (XPhos), CsOH in combination with *n*-BuOH and H_2O as solvents afforded the first class of inhibitors (**10a-10 k**) in low to moderate yields, presumably ascribed to issues with purification (30–69%) [19]. Introduction of the polar heads started from 8-(4-nitrophenyl)-2-(morpholin-4-yl)-3,4-dihydroquinazolin-4-one (**11**). The nitro group of **11** was quantitatively reduced by zinc in acetic acid to the corresponding amino derivative (**12**), which was subsequently acylated with chloroacetyl chloride. The chloroamide product was collected by filtration and used without further purification in the next step, where the appropriate 6-membered saturated secondary amines or dialkylamines were attached enabling formation of the second family (**14a-e**) [13]. All of the 3,4-dihydroquinazolinones (**10a-k** and **14a-e**) displayed analytical and spectroscopic data in good agreement with their structures. Structural characterization involved melting points, NMR spectroscopy, and LC–mass spectrometry. Uncalibrated purity was ascertained by LC-UV using a reverse phase C18 chromatographic column. All the biologically tested compounds exhibited purity higher than 95% at different wavelengths. Detailed analyses for all the compounds are provided in the Supporting information.

2.2. Biological evaluation

Initially, the inhibitory effect of each compound alone was determined by WST-1 test after 48 h treatment. Single dose testing of growth inhibition on the screening panel of 16 human cancer and one healthy cell lines was performed with inhibitors at a concentration of 10 μmol/L. As a positive control, DOX was used at a concentration of 1 μmol/L. The results showed that derivative **10k** had the highest inhibitory effect, with proliferation in three out of the 17 cell lines reduced below 50%, and in 12 cell lines below 75%. **10e** and **10f** were other inhibitors with a significant antiproliferative effect (Table 1). In the light of these results, the colorectal adenocarcinoma cell line HT-29 was chosen as the most suitable model for further evaluation, as none of the tested inhibitors significantly affected proliferation of this cell line. Detailed results are provided in the Supporting information.

In the next step, the ability to potentiate the effects of the standard



Scheme 1. Synthesis of 3,4-dihydroquinazolinone derivatives **10a-k** and **14a-e**. Reagents and conditions: (a) $SOCl_2$, reflux, 2 h; (b) NH_4SCN, acetone, rt, 45 min, yield: 62%; (c) morpholine, dioxane, reflux, 72 h, yield: 66%; (d) Aryl boronic acids (R^1), $Pd(OAc)_2$, XPhos, CsOH, n-BuOH/H_2O 4:1, 50 °C, 2–24 h, yields: 30–69%; (e) Zinc, AcOH, rt, 12 h, yield: 95%; (f) $CH_2ClCOCl$, 0–25 °C, 12 h; (g) secondary amines (R^2), THF, 50 °C, 12 h, yields: 42–56%.

Table 1
Growth percentage in quinazolin-4-one series.

Code	R^1	R^2	GP[a] alone	GP[b] with DOX in HT-29 cells
10a	phenyl	–	85	59
10b	dibenzothien-4-yl	–	80	57
10c	thiophen-3-yl	–	86	61
10d	naphthalen-1-yl	–	86	48
10e	4-phenoxyphenyl	–	84	48
10f	dibenzofuran-4-yl	–	79	47
10g	4-methylphenyl	–	91	54
10h	(1,1'-biphenyl)-3-yl	–	88	33
10i	4-tert-butylphenyl	–	96	51
10j	7-chloroquinolin-4-yl	–	101	38
10k	5-methyl-1*H*-indol-3-yl	–	63	37
14a	–	4-methylpiperazin-1-yl	89	29
14b	–	morpholin-4-yl	85	24
14c	–	piperidin-1-yl	79	10
14d	–	diethylamino	77	8
14e	–	bis(2-hydroxyethyl) amino	71	36

[a] Growth percentage – the percentage of viable cells in all cell lines compared to untreated cells (100%). Data are the mean of three independent experiments.

[b] Growth percentage – the percentage of viable cells from HT-29 cell line compared to untreated cells (DOX alone GP = 58). Data are the mean of three independent experiments.

chemotherapeutic agent DOX was tested. Since DNA-PK is a key enzyme in DSBs repair mediated by NHEJ, DOX, a topoisomerase II-stabilizing drug that induces DNA DSBs was chosen as a model chemotherapeutic agent in this study. HT-29 cells were exposed to 10 μmol/L (standard concentration according to NCI-60 Screening Methodology) of the quinazoline derivatives in combination with 0.5 μmol/L DOX for 48 h (Fig. 2, Table 1). This concentration of DOX was determined by viability assessment: 0.5 μmol/L caused a decrease in cell viability to 58% relative to the proliferation of untreated control cells (100%). The standard DNA-PK inhibitor NU7441 at a concentration of 1 μmol/L was included in the screening as a positive control. In 2006, Zhao and colleagues studied chemosensitization by the specific DNA-PK inhibitor NU7441 (1 μmol/L) in human colon cancer cells LoVo and SW620. It was found that NU7441 markedly enhances the cytotoxicity of DOX and etoposide in both cell lines in a dose-dependent manner [20]. In 2014 Ciszewski et al. reported the synergic effect of NU7441 with DOX in breast cancer cell lines [21]. Within our work, a significant chemosensitizing effect in HT-29 cells by 13 out of 17 tested compounds (10 μmol/L) in combination with DOX (0.5 μmol/L) was also observed, highlighted by **14c** and **14d** which both led to rapid cellular inhibition. This finding was confirmed by the trypan blue exclusion technique.

The first subset, structurally mimicking NU7441, was expected to possess pronounced inhibition potency compared to others, especially those derivatives containing bulky moieties such as dibenzothiophene (**10b**) and dibenzofuran (**10f**) in the aromatic region. Instead, the most favorable substitutions improving chemosensitizing properties were noticed in biphen-3-yl-(**10h**), 7-chloroquinolin-4-yl-(**10j**) and 5-methyl-1*H*-indol-3-yl-containing (**10k**) analogues. Small aromatic substituents were not tolerated since the derivatives having phenyl (**10a**), thiophen-3-yl (**10c**), methylphenyl-4-yl (**10g**) or *tert*-butylphenyl-4-yl (**10i**) were almost ineffective. In contrast, the second family of derivatives exhibited significantly increased chemosensitizing properties on cells, which was not associated with stronger DNA-PK inhibition. Accordingly, the best secondary amines in terms of the highest antiproliferative action were piperidin-1-yl-(**14c**) and diethylamino-(**14d**) substituted derivatives. These two derivatives significantly surpassed other three derivatives in this series containing *N*-methylpiperidine-1-yl, morpholine-4-yl and (2-bishydroxyethyl)amine. From these results, we can suggest that only aliphatic or possibly other non-polar

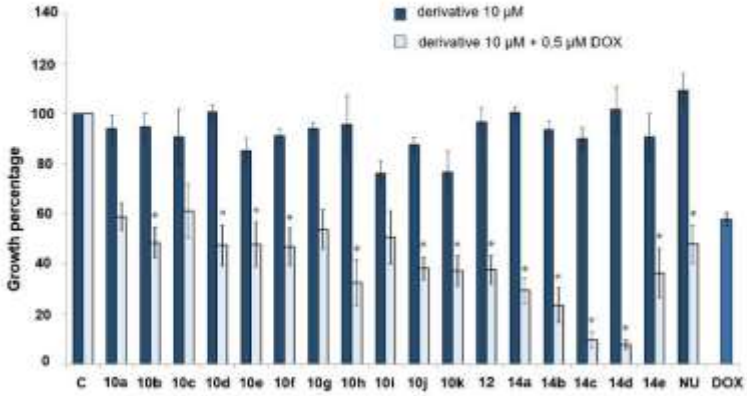


Fig. 2. Viability representation of HT-29 cell line after treatment of newly synthesized inhibitors (**10a-k** and **14a-e**; 10 μmol/L) or standard inhibitor NU7441 (NU; 1 μmol/L) with DOX (0.5 μmol/L) after 48 h of incubation. To calculate the cell viability, the value of the signal from the treated culture well was expressed as a percentage of that of the control well. Data are the mean of three independent experiments ± standard deviation. * $P \leq 0.05$, versus DOX alone.

substitutions are well-tolerated on amine at position 2- of acetamide linker.

DOX is known to kill cancer cells through induction of apoptosis, or more rarely through autophagy or senescence [22]. To evaluate the mode of cell death induced by a combination of DOX with the most efficient sensitizer **14d**, we evaluated the activation of caspases, which are typical for apoptosis. Application of the inhibitor in combination with DOX caused induction of apoptosis that was revealed by Caspase-Glo Assay 48 h after the treatment. A significant increase was found ($P \leq 0.05$) in the activities of caspase 3/7 and caspase 9 when **14d** or the standard DNA-PK inhibitor NU7441 was combined with DOX (in comparison with the effect of DOX alone). The activity of caspase 8 was significantly increased only in the combination of inhibitor **14d** with DOX (Fig. 3). We may conclude that initiator caspases-8 and -9 were activated by dimerization from inactive procaspase monomers after combination therapy. Activated initiator caspases then cleaved inactive procaspase dimers of executioner caspases-3/7. Once activated, a single executioner caspase can cleave and activate other executioner caspases. This process lead to an accelerated feedback loop of caspase activation and apoptotic cell death [23].

In addition, we used flow cytometry analysis to inspect whether inhibition of DNA-PK activity affects the cell cycle phases in HT-29 cells. We found that the effect of the cytotoxic agents alone as well as in combination with **14d** caused an accumulation in G2 phase (Fig. 4), similarly as in combination with the standard DNA-PK inhibitor NU7026 at the same concentration. The cell cycle is arrested due to activation of the G2/M checkpoint which prevents or delays mitosis in the presence of DNA lesions [24]. This is consistent with the

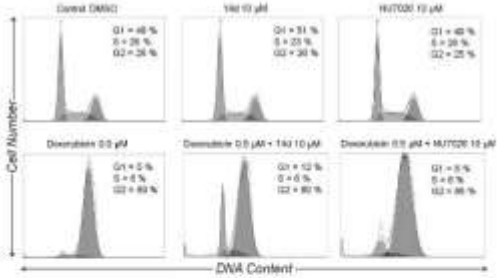


Fig. 4. Effect of chemical agents on the cell cycle after 24 h. The numbers in the histograms represent the percentage of cell cycling through phases G1, S, and G2 of the cycle. The cell cycle profiles are from a single representative experiment.

observation made by Zhao et al. who tested DNA-PK inhibitor NU7441 combined with DOX and etoposide in SW620 cells [20]. In 2014, Pastwa et al. also noticed G2/M arrest after application of wortmannin and cisplatin/etoposide in human glioblastoma cell line M059 [25]. On the other hand, there were no statistically significant differences in the cells affected by combination therapy in comparison with DOX administered alone.

Protein p53 has an essential function in the cellular response to DNA damage, serving as ATM substrate. The function of protein p53 is regulated by a number of mechanisms. One such is the important role of

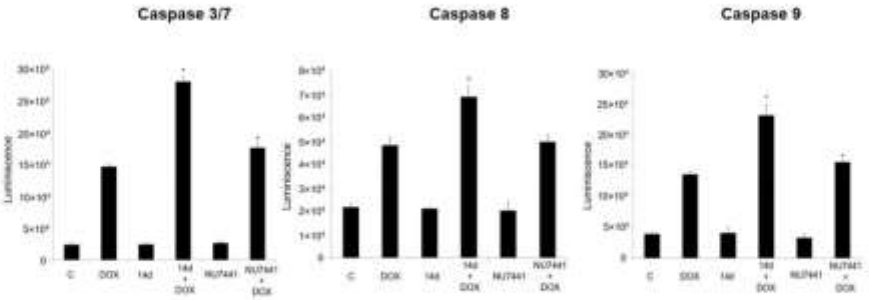


Fig. 3. Activity of caspases 3/7, 8 and 9 was determined 48 h after treatment (DOX 0.5 μmol/L, **14d** 10 μmol/L, NU7441 1 μmol/L) in human colorectal adenocarcinoma cells HT-29. Results are shown as mean ± standard deviation from three measurements. * $P \leq 0.05$, versus DOX alone.

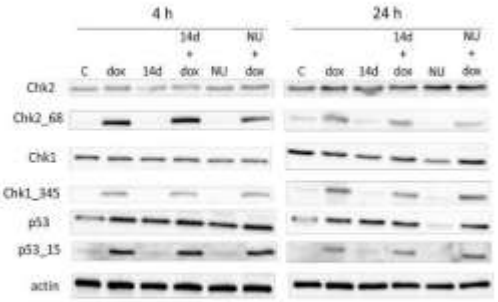


Fig. 5. Induction and activation of proteins in cells treated with DOX (0.5 μmol/L), inhibitors **14d** and NU7026 (10 μmol/L), and combinations in human colorectal adenocarcinoma cell line HT-29 after 4 and 24 h. To confirm equal protein loading, membranes were incubated with β-actin. Data are representative for one of three independent experiments.

Mdm2 protein for effective p53 degradation. When cells are exposed to DSB-inducing stress that cannot be repaired, ATM causes phosphorylation of Mdm2 and p53 on Ser15. Increasing the phosphorylation on Ser15 means that ATM kinase is not inhibited [26,27]. In our experimental procedure, DOX alone, DOX in combination with **14d**, and DOX with NU7026 all caused a significant up-regulation in p53 (Fig. 5). Activation and stabilization of p53 is connected with a series of post-translational modifications. Here we observed phosphorylation of p53 at Ser15 after the treatment with DOX alone, as well as in combination with inhibitors **14d** and NU7026. Interestingly, while NU7026 alone caused only transient increase in p53 amount, application of inhibitor **14d** caused an increase in p53 amount lasting for the whole duration of the experiment. This induction was not accompanied by phosphorylation on serine 15.

DOX alone and in combination with both inhibitors (**14d** or NU7026) provoked phosphorylation of Chk2 on Thr68 and Chk1 on Ser345, and therefore ATM and ATR pathways were not affected. These phosphorylated checkpoint kinases are elevated in response to DNA damage, where ATR and ATM kinase substrates Chk1 and Chk2 respectively allow cells to delay progression through the cell cycle, repair the DNA, and possibly induce cell death [28]. Chk1 is known to be activated by ATM/ATR kinase-mediated phosphorylation at Ser345, which in turn phosphorylates Cdc25A/C and finally causes cell arrest in the late S or G2 phase. The activation of Chk2 in checkpoint signaling is initiated by phosphorylation at Thr68 in ATM/ATR-dependent manner. In addition to the canonical role of Chk1 and Chk2 in cell cycle checkpoint regulation, recent discoveries have underlined the roles of both kinases in controlling DNA repair and apoptosis [29]. Inhibition of checkpoint kinase activation abrogates cell cycle arrest, forcing cells to enter mitosis prior to completion of DNA damage repair [30,31].

The most promising compounds **14c**, **14d** and NU7441 analog **10b** were chosen for advanced biological assays to screen inhibitory potency against DNA-PK, ATM, ATR and various isoforms of PI3K by Eurofins Pharma Discovery Services UK Limited. The derivative **10b** is not very active as a chemosensitizer to DOX; however, it possesses structural features resembling DNA-PK inhibitor NU7441. It was therefore chosen for the determination of its inhibition potency to confirm whether its low activity is a consequence of weak DNA-PK inhibition or is caused by cell-associated issues (permeability, efflux from cells). The results confirmed that **10b** does not affect ATM or ATR, but does however possess DNA-PK affinity in the micromolar range. Indeed, **10b** had IC_{50} value of 6.0 μmol/L and **14d** 12.4 μmol/L, while the activity of **14c** was not even determined at concentration of 30 μmol/L. PI3K isoforms were also not affected by these selected compounds (Table 2, Supplementary Information, Table S3).

Table 2
Results of Eurofins IC_{50} Profiler™ study of derivatives **10b** and **14d**.

Compound	Target kinase	IC_{50} (μmol/L)
10b	ATM	> 30
	ATR	29.6
	DNA-PK	6.0
	PI3Kα	> 30
	PI3Kβ	> 30
14d	ATM	> 30
	ATR	> 30
	DNA-PK	12.4
	PI3Kα	> 30
	PI3Kβ	> 30

These results were unexpected. Positive potentiation of DOX toxicity was assumed to be ascribed to inhibition of DNA-PK, but instead it seems that several off-targets are responsible for their high DOX potentiation. With respect to these results, we submitted compound **14d** for evaluation on a broad oncology panel containing 104 different protein kinases in order to reveal its novel targets. However, only DNA-PK, Aurora-A, Pim-1, Flt4, and cKit (V560G) proteins were inhibited below 50% at 10 μmol/L of **14d**. Under these conditions, DNA-PK activity was suppressed to 36%, suggesting that the IC_{50} value could be even lower than the initially established value of 12.4 μmol/L. Nevertheless, the inhibition activity towards DNA-PK is still considered as relatively weak. In order to elucidate the specific target for **14d**, we have applied an *in silico* off-target screening approach (see Supplementary Information, Table S4). This technique can help to identify a completely diverse group of target proteins responsible for the effect observed *in vitro* [32]. Briefly, Protein Data Bank (PDB) receptors from 2013 were utilized to uncover plausible off-targets of **14d**. Initially, ligand was docked to all ~9000 proteins. After that, the 40 top-scored hits were selected for detailed calculations [33]. From the molecular modeling study, poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) has emerged as the potential target of **14d**. PARP-1 is one of the proteins from an 18-membered superfamily implicated primarily in the DNA repair mechanism, specifically in base excision repair and repair of DNA single-strand breaks (SSBs) [34,35]. In the recent study by Park and co-workers, combined use of the PARP-1 inhibitor olaparib (an FDA-approved anti-cancer agent for the treatment of BRCA1/BRCA2-deficient carcinomas) and DOX synergistically inhibited proliferation of various types of osteosarcoma cells [36,37]. Similarly, another PARP inhibitor, namely NU1025, enhanced the cytotoxicity of bleomycin or DNA-methylating agent MTIC [38]. The structurally similarity of NU1025 to novel quinazolin-4-one derivatives goes hand in hand with the findings from *in silico*. Accordingly, the high *in vitro* efficacy of **14d** with DOX allowed us to hypothesized that its effect is mediated via DNA-PK and PARP-1 inhibition. PARP-1 is also known to target p53. PARylation of p53 inhibits export of p53 from the nucleus [39], contributing to its accumulation and also supporting the transactivation role of p53 [40]. This could explain prolonged accumulation of p53 without phosphorylation of serine 15, which was induced by **14d**.

From the results of the chemosensitization study, it is evident that the mode of action of the compounds is not exclusively attributed to blockade of DNA-PK. Thus, the action of 3,4-dihydroquinazolin-4-one derivatives as chemosensitizing agents is corroborated via multiple, not disclosed targeting. Surprisingly, the intended solubility improvement by polarizing the aromatic end of the molecule led to highly potent agent. With this respect, the activity of **14d** in combination with DOX is remarkable. The crucial part of our work in the future will be devoted to evaluating the molecular targets of **14d**.

The safety and tolerability of **14d** were established in female mice. The animals were observed for clinical score and weight loss (the limits were 10% or 15%, respectively) over 5 days after i.p. injection of a solution of the compound. Some authors such as Aston and colleagues

use a level of 15%, but 10% can be seen as a step towards refinement of the MTD [41].

In our experimental protocol, the doses were 5, 10, 15, 20, 25, and 30 mg/kg (the highest dose available due to the limited solubility of the compound). None of the doses of **14d** gave rise to any apparent clinical symptoms nor to body loss of more than 10%, except in the case of one mouse given 30 mg/kg. The said mouse lost 15% of its weight by day 3, but recovered until the end of the experiment. It can be concluded that 30 mg/kg corresponds to MTD (Table S2). Before this dose can be considered as the highest tolerated dose in a future preclinical study, potential differences between mouse strains have to be taken into account [42].

3. Conclusion

In this paper, we described the design and synthesis of novel quinazolin-4-one derivatives with potential chemosensitizing activity to DOX cytotoxicity on different cancer cell lines. Biological assessment showed a chemosensitizing effect of compound **14d** with the standard anticancer agent DOX, with a strong effect on the proliferation of human colorectal carcinoma HT-29 cells. This effect was caused by caspase-dependent apoptosis. We confirmed that this process was not initiated by the ATM/ATR pathway. The chemosensitizing effect of **14d** seems to be the synergistic action of DNA-PK inhibition, proved *in vitro*, with plausible PARP-1 inhibition, indicated *in silico*. In monotherapy, most of the compounds did not significantly affect the cell growth of 16 human cancer cell lines, including non-carcinoma human dermal fibroblasts. The lead compound **14d** exerted a relatively low toxicity *in vivo* (MTD = 30 mg/kg) when administered to female mice. Taken together, this work will also aid the design of further chemosensitizing ligands with increased kinase specificity and selectivity, and help to determine their true therapeutic utility.

Conflict of interest

The authors declare no competing interests.

Funding

This work was supported by Charles University project GAUK 932516 and programs Progres Q40/01 and SVV-260397/2017; by University of Defence specific research project SV/FVZ201402 and Long Term Development plan of Faculty of Military Health Sciences; by MH CZ – DRO (University Hospital Hradec Kralove, No. 00179906); by Technology Agency of the Czech Republic project no. TG02010020. Computational resources were provided by the CESNET LM2015042 and the CERIT Scientific Cloud LM2015085, provided under the program Projects of Large Research, Development, and Innovations Infrastructures.

Acknowledgment

The authors are grateful to Ian McColl MD, PhD for assistance with the manuscript.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.10.001.

References

[1] Y. Shiloh, ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity, Nat. Rev. Cancer 3 (2003) 155–168, https://doi.org/10.1038/nrc1011.
[2] K.K. Khanna, S.P. Jackson, DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection, Nat. Genet. 27 (2001) 247–254, https://doi.org/10.1038/85798.
[3] A.A. Goodarzi, P.A. Jeggo, The repair and signaling responses to DNA double-strand breaks, Adv. Genet. 82 (2013) 1–45, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407676-1.00001-9.
[4] A.J. Davis, B.P.C. Chen, D.J. Chen, DNA-PK: a dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway, DNA Repair 17 (2014) 21–29, https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.02.020.
[5] S.P. Jackson, J. Bartek, The DNA-damage response in human biology and disease, Nature 461 (2009) 1071–1078, https://doi.org/10.1038/nature08467.
[6] W.G. Kaelin, The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy, Nat. Rev. Cancer. 5 (2005) 689–698, https://doi.org/10.1038/nrc1691.
[7] E.R. Plummer, E.J. Dean, T.R.J. Evans, A. Greystoke, K. Herbschleb, M. Hanson, J. Brown, Y. Zhang, S. Karan, J. Pollard, M.S. Penney, M. Asmal, S.Z. Fields, M.R. Middleton, Phase I trial of first-in-class ATR inhibitor VX-970 in combination with gemcitabine (Gem) in advanced solid tumors (NCT02157792), 2513–2513, J. Clin. Oncol. 34 (2016), https://doi.org/10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.2513.
[8] F.P. Vendetti, A. Lau, S. Schamus, T.P. Conrads, M.J. O'Connor, C.J. Bakkenist, The orally active and bioavailable ATR kinase inhibitor AZD6738 potentiates the anti-tumor effects of cisplatin to resolve ATM-deficient non-small cell lung cancer in vivo, Oncotarget 6 (2015) 44289–44305.
[9] C. Cubillos-Zapata, R. Cordoba, J. Avendaño-Ortiz, C. Arribas-Jiménez, E. Hernández-Jiménez, V. Toledano, T. Villaescusa, V. Moreno, E. López-Collazo, CC-122 immunomodulatory effects in refractory patients with diffuse large B-cell lymphoma, Oncoimmunology 5 (2016) e1231290, https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1231290.
[10] M. Glorieux, R. Dok, S. Nuyts, Novel DNA targeted therapies for head and neck cancers: clinical potential and biomarkers, Oncotarget 8 (2017) 81662–81678, https://doi.org/10.18632/oncotarget.20953.
[11] C.J. Vlahos, W.F. Matter, K.Y. Hui, R.F. Brown, A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002), J. Biol. Chem. 269 (1994) 5241–5248.
[12] J.J.J. Leahy, B.T. Golding, R.J. Griffin, I.R. Hardcastle, C. Richardson, L. Rigoreau, G.C.M. Smith, Identification of a highly potent and selective DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) inhibitor (NU7441) by screening of chromenone libraries, Bioorg. Med. Chem. Lett. 14 (2004) 6083–6087, https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.09.060.
[13] C. Cano, K. Saravanan, C. Bailey, J. Bardos, N.J. Curtin, M. Frigerio, B.T. Golding, I.R. Hardcastle, M.G. Hummersone, K.A. Menear, D.R. Newell, C.J. Richardson, K. Shen, G.C.M. Smith, P. Thommes, A. Ting, R.J. Griffin, 1-substituted (Dibenzo[b,d]thiophen-4-yl)-2-morpholino-4H-chromen-4-ones endowed with dual DNA-PK/PI3-K inhibitory activity, J. Med. Chem. 56 (2013) 6386–6401, https://doi.org/10.1021/jm400915j.
[14] M. Andrs, J. Korabecny, D. Jun, Z. Hodny, J. Bartek, K. Kuca, Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) and phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase (PIKK) inhibitors: importance of the morpholine ring, J. Med. Chem. 58 (2015) 41–71, https://doi.org/10.1021/jm501626x.
[15] O.B. Barbeau, C. Cano-Soumillac, R.J. Griffin, I.R. Hardcastle, G.C.M. Smith, C. Richardson, W. Clegg, R.W. Harrington, B.T. Golding, Quinolinone and pyridopyrimidinone inhibitors of DNA-dependent protein kinase, Org. Biomol. Chem. 5 (2007) 2670–2677.
[16] K.M. Pritchard, J. Al-Rawi, C. Bradley, Synthesis, identification and antiplatelet evaluation of 2-morpholino substituted benzoxazines, Eur. J. Med. Chem. 42 (2007) 1200–1210, https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.01.021.
[17] R. Morrison, J.M.A. Al-Rawi, I.G. Jennings, P.E. Thompson, M.J. Angove, Synthesis, structure elucidation, DNA-PK and PI3K and anti-cancer activity of 8- and 6-aryl-substituted-1-3-benzoxazines, Eur. J. Med. Chem. 110 (2016) 326–339, https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.01.042.
[18] M.H.P. Verheij, A.J. Thompson, J.E. van Muijlwijk-Koezen, S.C.R. Lummis, R. Leurs, I.J.P. de Esch, Design, synthesis, and structure-activity relationships of highly potent 5-HT3 receptor ligands, J. Med. Chem. 55 (2012) 8603–8614, https://doi.org/10.1021/jm300801u.
[19] J. Yang, S. Liu, J.-F. Zheng, J. (Steve) Zhou, Room-Temperature Suzuki–Miyaura Coupling of Heteroaryl Chlorides and Tosylates, Eur. J. Org. Chem. 2012 (n.d.) 6248–6259. http://doi.org/10.1002/ejoc.201200918.
[20] Y. Zhao, H.D. Thomas, M.A. Batey, I.G. Cowell, C.J. Richardson, R.J. Griffin, A.H. Calvert, D.R. Newell, G.C.M. Smith, N.J. Curtin, Preclinical evaluation of a potent novel DNA-dependent protein kinase inhibitor NU7441, Cancer Res. 66 (2006) 5354–5362, https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4275.
[21] W.M. Ciszewski, M. Tavecchio, J. Dastych, N.J. Curtin, DNA-PK inhibition by NU7441 sensitizes breast cancer cells to ionizing radiation and doxorubicin, Breast Cancer Res. Treat. 143 (2014) 47–55, https://doi.org/10.1007/s10549-013-2785-6.
[22] A.-M. Meredith, C.R. Dass, Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism, J. Pharm. Pharmacol. 68 (2016) 729–741, https://doi.org/10.1111/jphp.12539.
[23] D.R. McIlwain, T. Berger, T.W. Mak, Caspase functions in cell death and disease, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 5 (2013) a008656, https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656.
[24] G. Lossaint, E. Besnard, D. Fisher, J. Piette, V. Dulić, Chk1 is dispensable for G2 arrest in response to sustained DNA damage when the ATM/p53/p21 pathway is functional, Oncogene 30 (2011) 4261–4274, https://doi.org/10.1038/onc.2011.135.
[25] E. Pastwa, T. Poplawski, U. Lewandowska, S.B. Somiari, J. Blasiak, R.J. Somiari, Wortmannin potentiates the combined effect of etoposide and cisplatin in human glioma cells, Int. J. Biochem. Cell Biol. 53 (2014) 423–431, https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.06.007.

[26] A. Tichy, K. Durisova, B. Salovska, J. Pejchal, L. Zarybnicka, J. Vavrova, N.A. Dye, Z. Sinkorova, Radio-sensitization of human leukaemic MOLT-4 cells by DNA-dependent protein kinase inhibitor, NU7441, Radiat. Environ. Biophys. 53 (2014) 83–92, https://doi.org/10.1007/s00411-013-0494-5.
[27] P.J. McKinnon, ATM and ataxia telangiectasia, EMBO Rep. 5 (2004) 772–776, https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400210.
[28] C. Ronco, A.R. Martin, L. Demange, R. Benhida, ATM, ATR, CHK1, CHK2 and WEE1 inhibitors in cancer and cancer stem cells, MedChemComm 8 (2017) 295–319, https://doi.org/10.1039/C6MD00439C.
[29] L. Huang, H. Miao, Y. Sun, F. Meng, X. Li, Discovery of indanone derivatives as multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease, Eur. J. Med. Chem. 87 (2014) 429–439, https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.09.081.
[30] M.D. Garrett, I. Collins, Anticancer therapy with checkpoint inhibitors: what, where and when? Trends Pharmacol. Sci. 32 (2011) 308–316, https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.02.014.
[31] M. Isono, M.J. Hoffmann, M. Pinkerneil, A. Sato, M. Michaelis, J. Cinatl, G. Niegisch, W.A. Schulz, Checkpoint kinase inhibitor AZD7762 strongly sensitises urothelial carcinoma cells to gemcitabine, J. Exp. Clin. Cancer Res. 36 (2017) 1, https://doi.org/10.1186/s13046-016-0473-1.
[32] F. Schmidt, H. Matter, G. Hessler, A. Czich, Predictive in silico off-target profiling in drug discovery, Future Med. Chem. 6 (2014) 295–317, https://doi.org/10.4155/fmc.13.202.
[33] M.M. Mysinger, M. Carchia, J.J. Irwin, B.K. Shoichet, Directory of useful decoys, enhanced (DUD-E): better ligands and decoys for better benchmarking, J. Med. Chem. 55 (2012) 6582–6594, https://doi.org/10.1021/jm300687e.
[34] D.V. Ferraris, Evolution of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors. From concept to clinic, J. Med. Chem. 53 (2010) 4561–4584, https://doi.org/10.1021/jm1003123m.
[35] S. Eustermann, W.-F. Wu, M.-F. Langelier, J.-C. Yang, L.E. Easton, A.A. Riccio, J.M. Pascal, D. Neuhaus, Structural basis of detection and signaling of DNA single-strand breaks by human PARP-1, Mol. Cell 60 (2015) 742–754, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.032.
[36] H.J. Park, J.S. Itae, K.M. Kim, Y.J. Moon, S.-H. Park, S.H. Ita, U.K. Hussein, Z. Zhang, H.S. Park, B.-H. Park, W.S. Moon, J.R. Kim, K.Y. Jang, The PARP inhibitor olaparib potentiates the effect of the DNA damaging agent doxorubicin in osteosarcoma, J. Exp. Clin. Cancer Res. CR. 37 (2018) 107, https://doi.org/10.1186/s13046-018-0772-9.
[37] H.E. Bryant, N. Schultz, H.D. Thomas, K.M. Parker, D. Flower, E. Lopez, S. Kyle, M. Meuth, N.J. Curtin, T. Helleday, Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase, Nature 434 (2005) 913–917, https://doi.org/10.1038/nature03443.
[38] E.J. Bowman, A. White, R.T. Golding, R.J. Griffin, N.J. Curtin, Potentiation of anti-cancer agent cytotoxicity by the potent poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors NU1025 and NU1064, Br. J. Cancer. 78 (1998) 1269–1277.
[39] M. Kanai, K. Hanashiro, S.-H. Kim, S. Hanai, A.H. Boulares, M. Miwa, K. Fukasawa, Inhibition of Crm1-p53 interaction and nuclear export of p53 by poly(ADP-ribosyl)ation, Nat. Cell Biol. 9 (2007) 1175–1183, https://doi.org/10.1038/ncb1638.
[40] M.-H. Lee, H. Na, E.-J. Kim, H.-W. Lee, M.-O. Lee, Poly(ADP-ribosyl)ation of p53 induces gene-specific transcriptional repression of MTA1, Oncogene 31 (2012) 5099–5107, https://doi.org/10.1038/onc.2012.2.
[41] W.J. Aston, D.E. Hope, A.K. Nowak, B.W. Robinson, B.A. Lake, W.J. Lesterhuis, A systematic investigation of the maximum tolerated dose of cytotoxic chemotherapy with and without supportive care in mice, BMC Cancer 17 (2017), https://doi.org/10.1186/s12885-017-3677-7.
[42] M.F.W. Festing, Inbred strains should replace outbred stocks in toxicology, safety testing, and drug development, Toxicol. Pathol. 38 (2010) 681–690, https://doi.org/10.1177/0192623310373776.

Příloha č. 2: Purin-6-one and pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-one derivatives as potentiating agents of doxorubicin cytotoxicity.

Short Communication

For reprint orders, please contact: reprints@future-science.com

Future Medicinal Chemistry

Purin-6-one and pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-one derivatives as potentiating agents of doxorubicin cytotoxicity

Martin Andrs[1,†,2], Monika Pospisilova[2,3], Martina Seifrtova[3], Radim Havelek[3], Ales Tichy[4], Katerina Vejrychova[5], Michaela Polednikova[5], Lukas Gorecki[1,2], Daniel Jun[1,2], Jan Korabecny*[,1,2] & Martina Rezacova**[,3]

[1]Department of Toxicology and Military Pharmacy, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Trebeska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic

[2]Biomedical Research Center, University Hospital Hradec Kralove, Sokolska 581, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

[3]Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Simkova 870, 500 03 Hradec Kralove, Czech Republic

[4]Department of Radiobiology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Trebeska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic

[5]Department of Pharmaceutical Chemistry & Drug Control, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Heyrovskeho 1203, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

*Author for correspondence: korabecny.jan@gmail.com

**Author for correspondence: rezacovam@lfhk.cuni.cz

†Authors contributed equally

Aim: DNA damage response plays an eminent role in patients' response to conventional chemotherapy and radiotherapy. Its inhibition is of great interest as it can overcome cancer cell resistance and reduce the effective doses of DNA damaging agents. **Results & methodology:** We have focused our research on phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases and prepared 35 novel compounds through a scaffold hopping approach. The newly synthesized inhibitors were tested on a panel of nine cancer and one healthy cell lines alone and in combination with appropriate doses of doxorubicin. **Conclusion:** Five novel compounds **4f**, **10b**, **15g**, **7e** and **15f** in combination with doxorubicin showed significant antiproliferative effect on seven cancer cell lines while not affecting the cell growth alone.

First draft submitted: 20 March 2018; Accepted for publication: 25 June 2018; Published online: 1 August 2018

Keywords: ATM kinase • cancer cells chemosensitization • DNA damage response • DNA-PK • doxorubicin • LY294002

Radiation and genotoxic drugs are still the cornerstones of cancer treatment after more than 70 years since their discovery. However, these types of therapies often suffer not only from severe adverse effects but also from tumor resistance development, frequently caused by pathological DNA repair mechanisms. The basic feature of cancer cells is genome instability, leading to various mutations and upregulated or otherwise dysfunctional DNA repair, making the cancer cells vulnerable to additional interference with the DNA damage response mechanisms [1,2]. This is the fundamental principle behind DNA damage response-targeted therapy, which has been thoroughly studied for almost two decades. The main goal of this therapy is an improvement in the efficacy of DNA-damaging treatments leading to both lower dosing and decreased adverse effects while concomitantly ensuring selective targeting of defective cancer cells and overcoming their resistance [3,4]. Research in this area has significantly flourished in the last few years with introduction of the first compound, PARP inhibitor olaparib, into therapy and several others into clinical trials [5].

newlands press

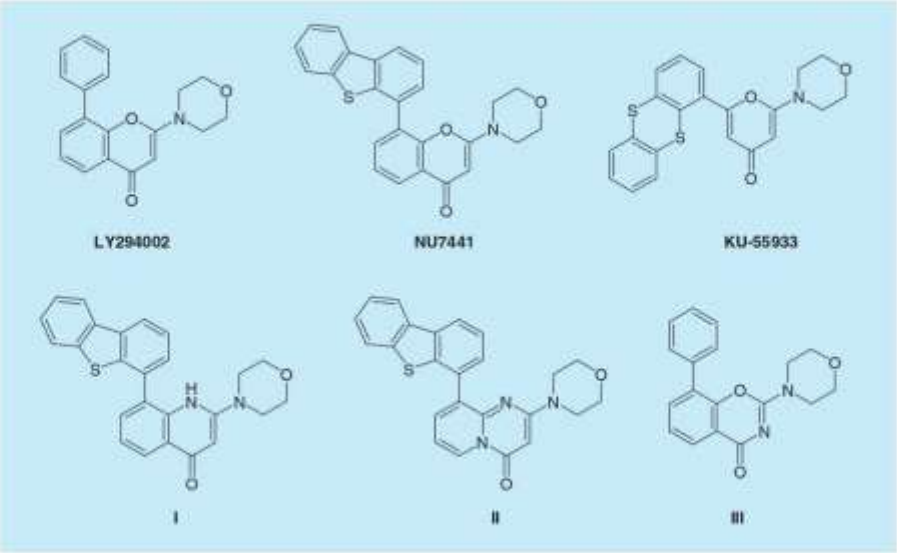


Figure 1. Structures of known ataxia-telangiectasia mutated and DNA-dependent protein kinase inhibitors.

We have focused our research on scaffold modifications of known inhibitors of ataxia-telangiectasia mutated (ATM; KU55933) and DNA-dependent protein kinase (DNA-PK; NU7441) (Figure 1). ATM and DNA-PK are members of the phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase (PIKK) family and play a major role in the response and repair of DNA double strand breaks (DSB) [6–8]. DNA-PK inhibition has been demonstrated to enhance the antiproliferative effect of a number of DSB-inducing agents *in vitro*. However, most of the currently known molecules which selectively inhibit DNA-PK have poor pharmacokinetic properties [9–11]. Recently, two selective DNA-PK inhibitors, MSC2490484A and CC-122, entered clinical trials with radiotherapy [12]. However, only two compounds in Phase I of clinical trials is still a poor achievement, considering the potential of DNA-PK inhibition. As for ATM, no significant advancement has been made in recent years.

Materials & methods

Synthesis

All commercial reagents used were of the highest available purity from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). Solvents for synthesis were obtained from Penta Chemicals Co. (Prague, Czech Republic). Acetonitrile, phosphate-buffered saline (PBS) pellets and formic acid for LC–MS analyses were purchased from Sigma-Aldrich in LC–MS grade purity. Ultrapure water of ASTM I type for LC–MS analyses were prepared with Barnstead SmartPure 3 UV/UF apparatus (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany). The reactions were monitored by TLC (Merck silica gel 60 F254 analytical plates; detection UV 254). Purity of all products was tested by determination of their uncorrected melting points (Melting Point Apparatus – Stuart SMP30). The ^{1}H NMR and ^{13}C NMR spectra of new compounds were recorded in $CDCl_3$ or DMSO-d_6 solution at ambient temperature on a Varian S500 spectrometer (499.87 MHz for ^{1}H and 125.71 MHz for ^{13}C) and Varian Mercury VX BB 300 (300 MHz for ^{1}H and 75 MHz for ^{13}C). For ^{1}H, δ is given in p.p.m. relative to $CDCl_3$ (δ = 7.26) or DMSO-d_6 (δ = 2.50), and for ^{13}C, relative to $CDCl_3$ (δ = 77.16) or DMSO-d_6 (δ = 39.52). The coupling constants (J) are expressed in Hertz.

High-resolution mass spectra (HRMS) and uncalibrated purity of the compounds were measured by Dionex UltiMate 3000 analytical LC–MS system coupled with a Q Exactive Plus hybrid quadrupole-orbitrap spectrometer (both produced by Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). The LC–MS system consisted of a binary pump HPG-3400RS connected to a vacuum degasser, a heated column compartment TCC-3000, an autosampler

WTS-3000 equipped with a 100 µl loop and a VWD-3000 ultraviolet detector. A Waters Atlantis dC18 (100Å, 2.1 × 100 mm, 3 µm) column was used as the stationary phase. Acetonitrile and water used in the analyses were acidified with 0.1% (v) of formic acid. Ions for MS were generated by heated electrospray ionization working in positive mode, with the following settings: sheath gas flow rate 40, aux gas flow rate 10, sweep gas flow rate 2, spray voltage 3.2 kV, capillary temperature 350°C, aux gas temperature 300°C and S-lens RF level 50. The full-scan MS analyses monitored ions within m/z range 100–1500, operating on a resolution level of 70,000. All compounds were dissolved in methanol and injected into the LC–MS system in volume of 1 µl. First elution was carried out by a linear gradient method mixing acetonitrile (with 0.1% [v/v] of formic acid) and water (with 0.1% [v/v] of formic acid): 0–1 min: 10% acetonitrile, 1–4 min: 10–100% acetonitrile, 4–5 min: 100% acetonitrile, 5–7.5 min: 10% acetonitrile. The flow rate in the gradient elution was set to 0.4 ml/min. The chromatograms and mass spectra were processed on Chromeleon 6.80 and Xcalibur 3.0.63 software, respectively. For prediction of compounds' partitioning, a chromatographic column with Immobilized Artificial Membrane (IAM) – Rexchrom IAM.PC.DD.2 (150 × 4.6 mm, 12 µm, 300 Å) was used. Elution was carried out isocratically by PBS (10 mM, ph = 7.4) and acetonitrile (4:1). The flow rate was 1.1 ml/min and detection performed by UV-detector operating at 210 nm.

Cell culture

Selected ten human cell lines – Jurkat (acute T-cell leukemia), A2780 (ovarian carcinoma), A549 (lung carcinoma), HT-29 (colorectal adenocarcinoma), AGS (gastric adenocarcinoma), PANC-1 (pancreas epithelioid carcinoma), HeLa (cervix adenocarcinoma), MCF-7 (breast adenocarcinoma), SAOS-2 (osteosarcoma) and MRC-5 (lung fibroblast) – were purchased from Sigma-Aldrich (MO, USA) and cultivated according to provider's culture method guidelines. Starting experiments, each cell line was seeded at previously established optimal density (500 to 30×10^3 cells per well) in a 96-well plate and the cells were allowed to settle overnight. The derivatives to be tested were dissolved in DMSO to stock solutions (10 mmol/l). For the experiments, the stock solution was diluted with the appropriate complete culture medium to reach final concentrations of 10 µmol/l.

Cell treatment

Cells were exposed to 10 µmol/l inhibitors alone or in combination with doxorubicin for 48 h. Concentration of doxorubicin (Sigma-Aldrich) was chosen by determining the IC_{50} value of the compound for each of the cell lines and then selecting the closest dose among 0.05; 0.1; 0.5 or 1 µmol/l doxorubicin. Jurkat, A2780 were exposed to 0.05 µmol/l doxorubicin, A549, AGS, HeLa to 0.1 µmol/l, HT-29, SAOS-2, MCF-7, MRC-5 to 0.5 µmol/l and PANC-1 to 1 µmol/l doxorubicin. Cells were also exposed to standard DNA-PK inhibitors NU7441 or NU7026 in concentration 1 and 10 µmol/l, respectively, and to standard ATM inhibitor KU55933 in concentration 10 µmol/l. The maximal concentration of DMSO in cultivation media was 0.1%.

Cell proliferation assay & growth percent calculation

The WST-1 (Roche, Mannheim, Germany) reagent was used to determine the antiproliferative effect of tested compounds. At the end of cultivation period, WST-1 test was performed according to manufacturer's protocol. The absorbance was measured using Tecan Infinite M200 spectrometer (Tecan Group, Männedorf, Switzerland). Each value is the mean of three independent experiments and represents the percentage of proliferation of control, nontreated cells (100%). The growth percent (GP) value was calculated for each inhibitor tested. GP represents the mean of viability decrease in percentage of all the ten cell lines treated with the same inhibitor.

Results & discussion

Within our research, we sought new scaffolds for DNA-PK or ATM inhibitors, which could be then used to develop novel selective and potent inhibitors. The nonselective inhibitor of PI3K and related kinases LY294002 (Figure 1) and the work of the laboratory in Newcastle upon Tyne with KuDOS Pharmaceuticals Ltd (now part of AstraZeneca) provided a reasonable starting point for our research [13–15]. The structure of LY294002 consists of three regions worthy of further modifications: the morpholine ring, chromone core and aromatic substituent. The importance of the morpholine ring lies in formation of a hydrogen bond with the backbone of a valine residue in the hinge region of the kinase active site. This site is highly conserved in PI3K and PIKK and any morpholine ring alterations in the inhibitors are mostly associated with activity drop [13,16]. Methylation in the 3-position or bridging of the morpholine could be beneficial for some members of the PIKK family [17]. The aromatic moiety in the 8-

position of the chromone core is responsible for π–π interaction in the kinase active site and imposes the selectivity profile of the inhibitor – NU7441 is a selective DNA-PK inhibitor [16]. Several publications also investigated the different core heterocycles; among them quinoline (**I**), pyrido[1,2-*a*]pyrimidine (**II**) or 1,3-benzoxazine (**III**) are the most frequently occurring (Figure 1) [15,18]. In general, these heterocycles resulted in similar activities as the chromone core analogs; nevertheless, some aspects of core modifications still remain to be elucidated.

In this work, we introduced two novel scaffolds, namely purin-6-one and pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine. These two heterocycles contain extra nitrogen in their structure increasing the possibility of forming additional interaction within the kinase active site. The five-membered ring in the purin-6-one family possesses variable positioning of the aromatic substituent via a methylene linker attachment while occupying similar space as the original chromone template. Since this was the initial study, we intended to achieve the highest possible variability among the aromatic substituents to find a hit to follow. Therefore, substituents were attached via a methylene linker or directly at positions 7 and 9 of the purin-6-one scaffold and analogously at the 7-position of pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine. Methylene bridging was favored over direct attachment in the majority of the ligands because it conferred more conformational freedom. Substituents on the benzylic moieties (R^1) covered a range of basic functional groups (i.e., halogens, methoxy groups and aliphatic) (Figure 2). R^2 substitution was dictated according to the most active LY294002 derivatives and contained basic phenyl, thiophen-3-yl, dibenzothien-4-yl and dibenzofuran-4-yl (Figure 2).

The general synthetic pathways for purin-6-one and pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-one subsets are displayed in Figure 2. The synthetic routes form a multinodal web given the fact that these final compounds are structurally very similar, although each subset had to be synthesized by a slightly different approach. The starting compound for the purin-6-one family was 2,6-dichloro-9*H*-purine (**1**). After benzylation in the presence of potassium carbonate in DMF, individual isomers (**2a–g** and **5a–g**) were separated via column chromatography. The *N*-9 substituted derivatives (**2a–g**) were the major products possessing higher retention (R_f) than the *N*-7 products. The heterocyclic cores were then hydrolyzed by 1 M NaOH solution to yield **3a–g** and **6a–g**. Last, the morpholine ring was attached under microwave irradiation to give the final derivatives **4a–g** and **7a–g**. The attachment of aromatic rings to the *N*-7 and/or *N*-9 of 6,9-dihydro-1*H*-purin-6-one core turned out to be particularly complicated. The most convenient procedure was a reaction employing arylboronic acids, CuI and TMEDA in dry MeOH in an oxygen-saturated atmosphere [19]. This reaction afforded primarily *N*-7 substituted derivatives (**11a–d**). The *N*-9 substituted derivatives (**10a–d**) were minor products. Preparation of the pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-one series was more easily achieved and started from the commercially available 2,4-dichloro-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine (**12**). The benzylated derivatives (**15a–i**) were prepared in a similar way as for the purin-6-one analogs. However, the order of steps had to be changed, because 2-(morpholin-4-yl)-3*H*,4*H*,7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-one was probably unstable in the presence of the copper catalyst which was required for C-N coupling with arylboronic acids. The latter step was optimized employing copper(II) acetate ($Cu(OAc)_2$) and activated molecular sieves (4 Å) in dichloroethane (DCE) yielding (**16a–d**) [20]. The rest of the reactions were carried out in the same order as outlined above for **6a-6g** (hydrolysis) and **7a-7g** (morpholine ring attachment).

All 35 prepared compounds were evaluated on a panel of nine cancer and one healthy cell line. At first, the inhibitory effect of each compound alone was tested. The results have shown that 33 of 35 tested inhibitors had no antiproliferative effect on the pool of all ten cell lines. These inhibitors did not show any significant inhibition of proliferation, the percentage of viable cells (GP) varied varying from 73 to 121%. Only two of the inhibitors – **11c** and **11d** – caused a noticeable decrease in cell viability in both cancer and normal cell lines. Inhibitor **11c** had the greatest antiproliferative effect reducing the viability below 50% in eight tested cell lines; the percentage of viable cells ranged from 4 to 48%. Due to the remarkable antiproliferative profile of **11c** and **11d**, these two compounds were excluded from further testing. One-dose data of all the screened compounds for each cell line are presented in Supplementary Table 1.

Additionally, the chemosensitizing effect of the inhibitors was tested. The screening on a panel of 10 human cell lines was performed with 33 inhibitors in combination with appropriate doses of doxorubicin (Supplementary Table 2), a standard chemotherapy agent causing DSBs followed by DNA-PK and ATM activation [21]. A chemosensitizing effect was observed in five of the compounds on seven different cancer cell lines. The inhibitor combination with doxorubicin led to a decrease in cell viability in comparison to doxorubicin alone. The most efficient inhibitors were **4f**, **10b**, **15g**, **7e** and **15f** with GP values of 27, 29, 30, 37 and 43%, respectively (Table 1 & Supplementary Figure 1). The most sensitive cell lines were A549, HT-29, AGS, HeLa, SAOS-2, PANC-1 and MCF-7. Of interest, no

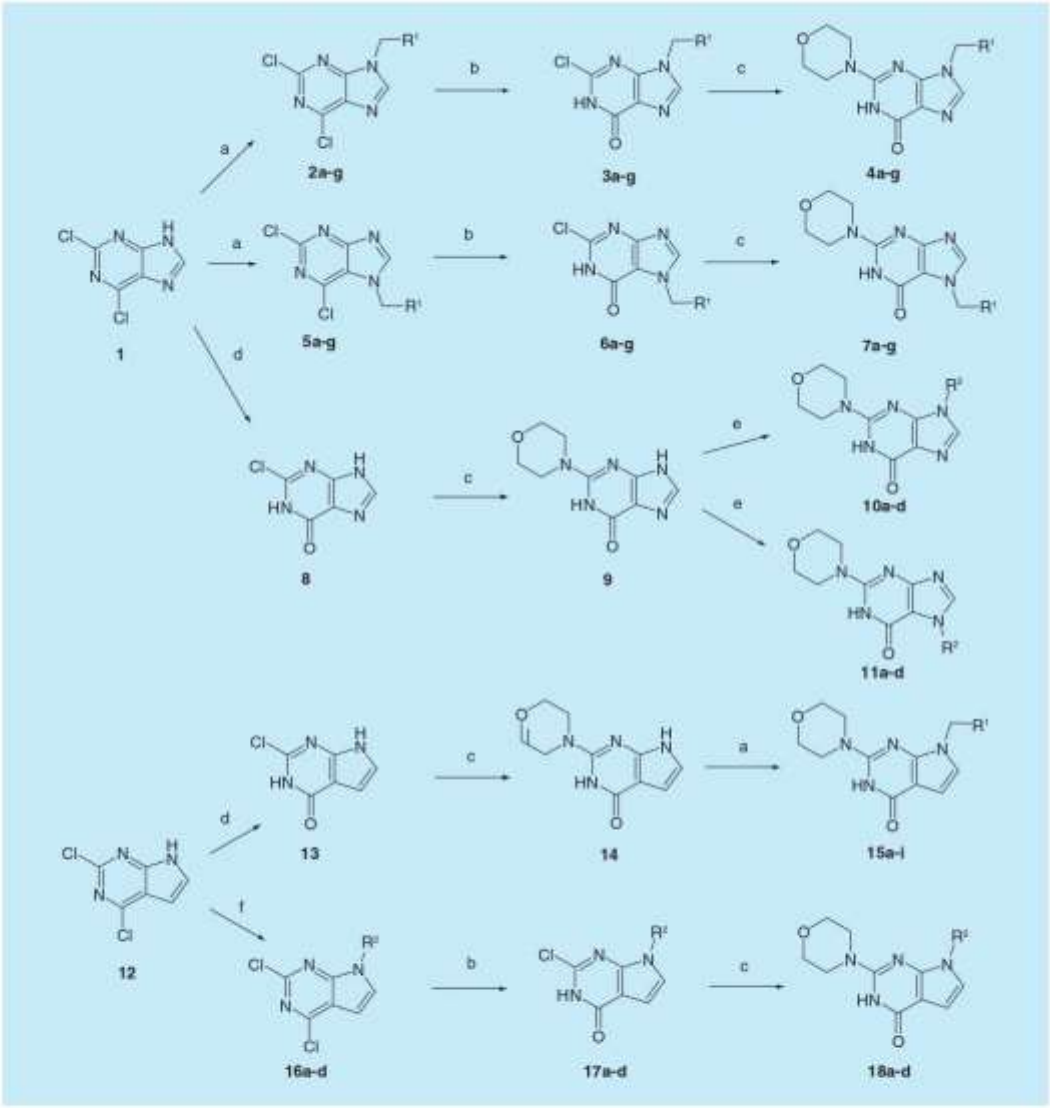


Figure 2. Synthesis of purin-6-one and pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-one series. Reagents and conditions: **(a)** benzyl bromides or (1-bromoethyl)benzene, K_2CO_3, DMF, 24 h; **(b)** 1 M NaOH, 100°C, 24 h; **(c)** morpholine, *t*-BuOH, microwave irradiation, 110°C, 200 W, 300 psi, 1 h; **(d)** 1 M NaOH, 100°C, 48 h; **(e)** appropriate arylboronic acid, CuI, TMEDA, anhydrous MeOH, O_2, 48 h; **(f)** appropriate arylboronic acid, $Cu(OAc)_2$, pyridine, molecular sieves 4Å, DCE, 24 h. R^1 and R^2 represent aromatic substituents.

10.4155/fmc-2018-0086

Table 1. Aromatic substitutions and growth percentage in purin-6-one and pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-one families.

Code	R^1	R^2	GP[2]
4a	Phenyl		67
4b	3,4-dichlorophenyl		68
4c	Propan-2-yl		67
4d	4-chlorophenyl		67
4e	4-methoxyphenyl		59
4f	3-methoxyphenyl		27
4g	1-phenylethyl		63
7a	Phenyl		69
7b	3,4-dichlorophenyl		63
7c	Propan-2-yl		63
7d	4-chlorophenyl		64
7e	4-methoxyphenyl		37
7f	3-methoxyphenyl		53
7g	1-phenylethyl		69
10a		Phenyl	62
10b		Thiophen-3-yl	29
10c		Dibenzofuran-4-yl	64
10d		Dibenzothien-4-yl	64
11a		Phenyl	64
11b		Thiophen-3-yl	54
11c		Dibenzofuran-4-yl	n.t.[3]
11d		Dibenzothien-4-yl	n.t.[3]
15a	Phenyl		66
15b	4-chlorophenyl		67
15c	Propan-2-yl		67
15d	3-methoxyphenyl		69
15e	4-methoxyphenyl		72
15f	4-nitrophenyl		43
15g	3,4-dichlorophenyl		30
15h	4-trifluoromethylphenyl		53
15i	1-phenylethyl		68
18a		Phenyl	68
18b		4-*tert*-butylphenyl	74
18c		3,4-dichlorophenyl	74
18d		Thiophen-3-yl	71

[1]Overall GP in combination with doxorubicin in all cell lines (doxorubicin alone GP = 68).
[2]Compound was not tested with doxorubicin.
GP: Growth percent.

chemosensitizing effect was observed in Jurkat leukemic cell lines, ovarian cancer cells A2780, or in normal human fibroblasts MRC-5 (Figure 3).

From a structural point of view, general structure–activity relationships (SARs) cannot be unequivocally drawn since no apparent differences in core substitution between purin-6-one and pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-one subsets can be found. The most active compounds in both families prefer different aromatic substituents: for the purin-6-one core methoxy groups are favored (**4f**, **7e**), whereas for the pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-one, core 4-nitro- (**15f**) and 3,4-dichloro- substitution (**15g**) are highlighted. Any further observations between these two basic cores are hard to establish. Presumably the different cores enable a slightly modified lodging in the kinase active site. The activity of **7e** with a substitution at position *N*-7 of purin-6-one was also unforeseen from the structural point of view compared with previously reported studies. This is very unusual when we take into account the standard model of DNA-PK inhibitors. Substitutions at positions 5- or 6- of the chromone and 1,3-benzoxazine

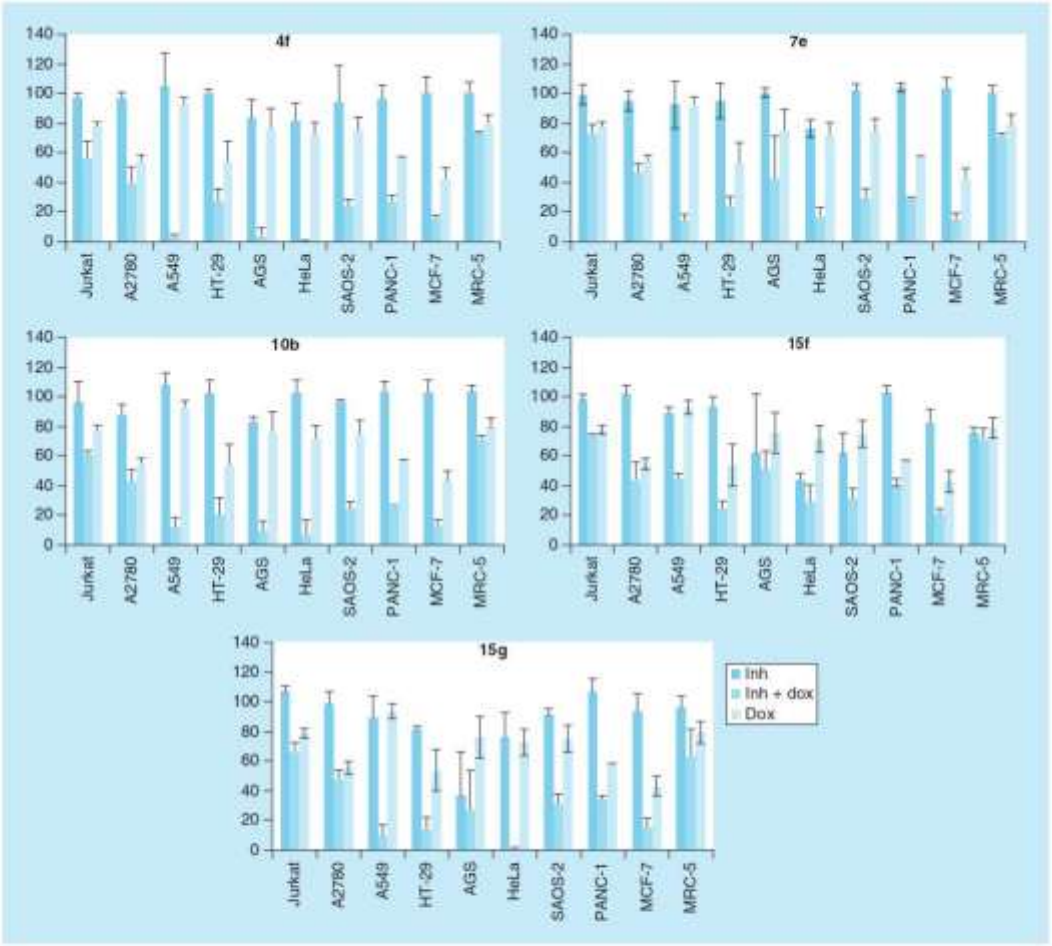


Figure 3. Chemo-sensitising effect of the five most efficient inhibitors. Each graph represents viability of ten cell lines after incubation with selected five most efficient inhibitors **4f**, **7e**, **10b**, **15f**, **15g** and in combination with doxorubicin. The concentration of doxorubicin was chosen individually for each cell line according to its sensitivity. Values were calculated as a mean of three independent experiments and are expressed as a percentage of viability of untreated control cells (100%). Error bars indicate ± SD.

derivatives, occupying the similar space as **7e**, were usually associated with almost no effects against either DNA-PK or PI3Ks [13,18]. The methoxy substitution in **7e** may be the key player responsible for the activity of this derivative, since the other methoxy-containing derivatives, **4e** and **7f**, also displayed activities above average with doxorubicin in several cell lines, especially MCF-7 (Supplementary Table 2).

The second top-ranked compound according to GP is the representative bearing a thiophen-3-yl group attached directly to the core (**10b**). It is of interest that this compound contains the small thiophenyl group, whereas bulky substituents, such as dibenzothiophene in nonactive compound **10d**, are usually considered beneficial for DNA-PK inhibition [14]. Its *N*-7 positioned analogs were not effective in combination with doxorubicin; however, compounds **11c** and **11d** exhibited pronounced antiproliferative effects in most of the cell lines. Both these compounds are structurally very similar bearing a large tricyclic aromatic substituent at position 7- of purin-6-one. It is possible that

10.4155/fmc-2018-0086

these two compounds target a different protein, possibly outside the protein kinase families. Another explanation may be a nonspecific interaction with cellular structures due to their large and mostly planar shape.

In many studies, specific ATM and DNA-PK inhibitors have shown synergistic efficacy with chemotherapy *in vitro*. One of the first promising inhibitors of DNA-PK, LY294002, has been shown to be an effective chemo- and radio-sensitizer. The combination of LY294002 with cisplatin showed a chemo-sensitizing effect in glioblastoma cells [22] and pancreatic tumor cell [23], both *in vitro* and *in vivo*. However, the clinical application of this compound was limited by its rapid metabolic clearance. Nevertheless, more potent and selective DNA-PK inhibitors, NU7441 and NU7026 (2-(morpholin-4-yl)-benzo[*h*]chromen-4-one), have been produced through chemical modification of LY294002 [24]. DNA-PK inhibition by NU7441 led to potentiation of ionizing radiation (IR) and chemotherapeutics *in vitro*. For example, NU7441 significantly enhanced the cytotoxicity of IR, doxorubicin and etoposide in human colon cancer cells LoVo and SW620 [25]. The sensitizing effect of NU7441 in combination with doxorubicin or IR was proved also in human breast cancer cell lines MCF-7, MDA-MB-231, T47D [25], and in human cancer cells M059-Fus1 proficient in DNA-PK [26]. The potentiating effect of NU7026 in combination with IR and topoisomerase II poisons (idarubicin, daunorubicin, doxorubicin, etoposide, amsacrine and mitoxantrone) was observed in K562 leukemia cells [27], HL-60, and also mitoxantrone-resistant HL-60/MX2 leukemia cells [28]. NU7026 increased the cytotoxicity of IR in N87 gastric cancer cells [29] and the chemo-sensitizing effect of NU7026 was observed also in combination with etoposide in M059K and ATL cells [30]. Despite the promising *in vitro* studies, poor pharmacokinetic properties limit the clinical application of these compounds.

Conclusion

Our results clearly showed that the newly synthesized inhibitors **4f**, **10b**, **15g**, **7e** and **15f** potentiate the effect of doxorubicin in seven human tumor cell lines A549, HT-29, AGS, HeLa, SAOS-2, PANC-1 and MCF-7 whereas not sensitizing normal human fibroblasts MRC-5. However, the differences between the observed activities of our derivatives and the previous knowledge gained from structure–activity relationship studies of the standard DNA-PK and other PIKK inhibitors must be kept in mind. The inhibition potencies of presented compounds against PIKK members have not been evaluated. Taken together, we believe that the promising activity of compounds in our survey may also result from the inhibition of additional off-targets. The precise mechanism of action of these analogs, however, remains to be elucidated.

Future perspective

The efficacy of anticancer drugs as well as radiation is limited as both cancer and normal cells are sensitive to their killing effect. In the last decade, it is broadly discussed that DNA damaging effect of anticancer drugs might be amplified in cancer cells via combined approach with specific inhibitors of DNA-repair mechanisms. These substances represent promising strategy how to overcome the resistance of standard anticancer therapies. With this respect, DNA-PK, ATM, ATR and other kinases are largely cited to improve the effectiveness of classic anticancer therapy. The early inhibitors of DNA-PK, ATM and ATR kinases had usually poor selectivity profiles or suffered from low aqueous solubility. Nevertheless, the last few years of intensive research has witnessed the production of first DNA-PK, ATM and ATR inhibitors entering Phase I of clinical trials for cancer treatment. Their safety and efficacy still remain to be elucidated, but it is clear that this kind of compounds possess a great potential, and their number in clinical trials should be higher to increase the chance that some inhibitors will reach therapy. With this view, it is necessary to develop new scaffolds to build on. We believe that scaffolds presented in this publication will serve as the basis for the further research to increase the pool of inhibitors in the clinical trials in the future.

Executive summary

- Thirty-five new compounds were obtained by chemical modification of known inhibitors KU55933 and NU7441.
- The inhibitory effect of each compound alone was tested on the pool of ten cell lines – 33 of the tested inhibitors themselves had no cytotoxic effect.
- The chemosensitizing effect of 33 compounds was established on a panel of nine cancer and one normal human cell lines.
- Five inhibitors in combination with doxorubicin caused a decrease in cell viability on seven different cancer cell lines in comparison to doxorubicin alone.
- No chemosensitizing effect was observed in normal human fibroblasts MRC-5.

Supplementary data

To view the supplementary data that accompany this paper please visit the journal website at: www.future-science/doi/suppl/10.4155/fmc-2018-0086

Financial & competing interests disclosure

This work was supported by the specific research (SV/FVZ201402), by Long Term Development plan (Faculty of Military Health Sciences), by MH CZ - DRO (University Hospital Hradec Kralove, Number 00179906), by GAUK project number 932516, by Technology Agency of the Czech Republic project no. TG02010020 Centre for Transfer of Biomedical Technologies – PoC and by the Progres Q40/01 program initiated by Charles University in Prague. The authors are grateful to I McColl for assistance with the manuscript.

No other writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

References

1. Bartkova J, Horejsi Z, Koed K *et al.* DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 434(7035), 864–870 (2005).
2. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461(7267), 1071–1078 (2009).
3. Brown JS, O'Carrigan B, Jackson SP, Yap TA. Targeting DNA repair in cancer: beyond PARP inhibitors. *Cancer Discov.* 7(1), 20–37 (2017).
4. Furgason JM, Bahassi EM. Targeting DNA repair mechanisms in cancer. *Pharmacol. Ther.* 137(3), 298–308 (2013).
5. Kaufman B, Shapira-Frommer R, Schmutzler RK *et al.* Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation. *J. Clin. Oncol.* 33(3), 244–250 (2015).
6. Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat. Rev. Cancer* 3(3), 155–168 (2003).
7. Andrs M, Korabecny J, Nepovimova E *et al.* The development of ataxia telangiectasia mutated kinase inhibitors. *Mini Rev. Med. Chem.* 14(10), 805–811 (2014).
8. Andrs M, Korabecny J, Jun D, Hodny Z, Bartek J, Kuca K. Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) and phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase (PIKK) inhibitors: importance of the morpholine ring. *J. Med. Chem.* 58(1), 41–71 (2015).
9. O'Connor MJ, Martin NMB, Smith GCM. Targeted cancer therapies based on the inhibition of DNA strand break repair. *Oncogene* 26(56), 7816–7824 (2007).
10. 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.* 21(3), 966–970 (2011).
11. Pospisilova M, Seifrtova M, Rezacova M. Small molecule inhibitors of DNA-PK for tumor sensitization to anticancer therapy. *J. Physiol. Pharmacol.* 68(3), 337–344 (2017).
12. Gavande NS, VanderVere-Carozza PS, Hinshaw HD *et al.* DNA repair targeted therapy: the past or future of cancer treatment? *Pharmacol. Ther.* 160, 65–83 (2016).
13. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* 269(7), 5241–5248 (1994).
14. Leahy JJJ, 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.* 14(24), 6083–6087 (2004).
15. Barbeau OR, Cano-Soumillac C, Griffin RJ *et al.* Quinolinone and pyridopyrimidinone inhibitors of DNA-dependent protein kinase. *Org. Biomol. Chem.* 5(16), 2670–2677 (2007).
16. Walker EH, Pacold ME, Perisic O *et al.* Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Mol. Cell.* 6(4), 909–919 (2000).
17. Zask A, Verheijen JC, Richard DJ *et al.* Discovery of 2-ureidophenyltriazines bearing bridged morpholines as potent and selective ATP-competitive mTOR inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20(8), 2644–2647 (2010).
18. Morrison R, Al-Rawi JMA, Jennings IG, Thompson PE, Angove MJ. Synthesis, structure elucidation, DNA-PK and PI3K and anti-cancer activity of 8- and 6-aryl-substituted-1-3-benzoxazines. *Eur. J. Med. Chem.* 110, 326–339 (2016).
19. Wentzel MT, Hewgley JB, Kamble RM, Wall PD, Kozlowski MC. Copper-catalyzed N-arylation of hindered substrates under mild conditions. *Adv. Synth. Catal.* 351(6), 931–937 (2009).
20. Ding S, Gray NS, Ding Q, Schultz PG. Expanding the diversity of purine libraries. *Tetrahedron Lett.* 42(50), 8751–8755 (2001).
21. Ciszewski WM, Tavecchio M, Dastych J, Curtin NJ. DNA-PK inhibition by NU7441 sensitizes breast cancer cells to ionizing radiation and doxorubicin. *Breast Cancer Res. Treat.* 143(1), 47–55 (2014).
22. Carminati PO, Donaires FS, Marques MM, Donadi EA, Passos GAS, Sakamoto-Hojo ET. Cisplatin associated with LY294002 increases cytotoxicity and induces changes in transcript profiles of glioblastoma cells. *Mol. Biol. Rep.* 41(1), 165–177 (2014).

23. Fujiwara M, Izuishi K, Sano T *et al.* Modulating effect of the PI3-kinase inhibitor LY294002 on cisplatin in human pancreatic cancer cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 27, 76 (2008).
24. Davidson D, Amrein L, Panasci L, Aloyz R. Small molecules, inhibitors of DNA-PK, targeting DNA repair, and beyond. *Front. Pharmacol.* 4, 5 (2013).
25. Zhao Y, Thomas HD, Batey MA *et al.* Preclinical evaluation of a potent novel DNA-dependent protein kinase inhibitor NU7441. *Cancer Res.* 66(10), 5354–5362 (2006).
26. Tavecchio M, Munck JM, Cano C, Newell DR, Curtin NJ. Further characterisation of the cellular activity of the DNA-PK inhibitor, NU7441, reveals potential cross-talk with homologous recombination. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 69(1), 155–164 (2012).
27. Willmore E, de Caux S, Sunter NJ *et al.* A novel DNA-dependent protein kinase inhibitor, NU7026, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase II poisons used in the treatment of leukemia. *Blood* 103(12), 4659–4665 (2004).
28. Mikusová V, Tichý A, Rezáčová M, Vávrová J. Mitoxantrone in combination with a DNA-PK inhibitor: possible therapy of promyelocytic leukaemia resistant forms. *Folia Biol. (Praha)* 57(5), 200–205 (2011).
29. Nian MT, Mok G, Heravi M *et al.* Effects of DNA-dependent protein kinase inhibition by NU7026 on DNA repair and cell survival in irradiated gastric cancer cell line N87. *Curr. Oncol.* 21(2), 91–96 (2014).
30. Hisatomi T, Sueoka-Aragane N, Sato A *et al.* NK314 potentiates antitumor activity with adult T-cell leukemia-lymphoma cells by inhibition of dual targets on topoisomerase II{alpha} and DNA-dependent protein kinase. *Blood* 117(13), 3575–3584 (2011).