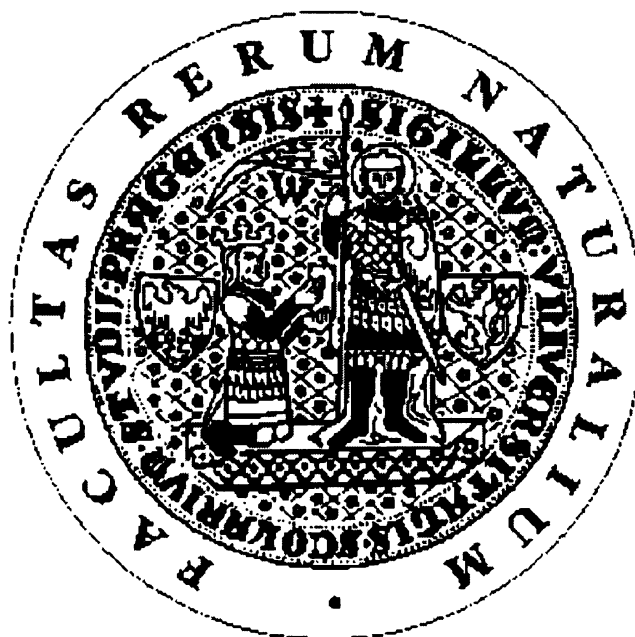


KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra Biochemie



Inhibice proteinkinasy ERK2 v protinádorové terapii

Bakalářská práce

Biochemie

Michaela Nejedlá

Školitel: Mgr. Helena Kaiserová, PhD.

Praha 2008

UNIVERZITA KARLOVA v Praze
Přirodovědecká fakulta
Oborová knihovna chemie
Albertov 6, 128 43 Praha 2
IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208
UK 22

*pr.č.: 107b/ O 8 stud
(bioch.)*

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky Mgr. Heleny Kaiserové, PhD. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

V Praze dne 6. 6. 2008

Podpis: *mejeola'*

Poděkování

Děkuji své školitelce Mgr. Heleně Kaiserové, PhD. nejen za odborné vedení a trpělivost, ale také za celkovou podporu, ochotu a motivaci k práci. Za cenné připomínky a přínosné rady také děkuji RNDr. Ivanu Votrubovi, DrSc.

V neposlední řadě také děkuji svým rodičům za všestrannou podporu při studiu.

OBSAH

1.	ÚVOD	4
1.1.	Buněčná signalizace.....	4
1.2.	MAP-kinasy	6
1.3.	Význam MAP-kinasové signalizace v protinádorové terapii	9
1.4.	Inhibice proteinkinasy.....	10
1.5.	Acyklické nukleosidfosfonáty (ANP).....	11
1.6.	Strategie hledání nových inhibitorů ERK-kinasy	13
2.	CÍLE PRÁCE	15
3.	MATERIÁL A METODY	16
3.1.	Použité přístroje a pomůcky	16
3.2.	Chemikálie	16
3.3.	Metody	17
4.	VÝSLEDKY	20
4.1.	Optimalizace reakčních podmínek pro radiometrické stanovení proteinkinasy ERK2 (vliv teploty, časový průběh)	20
4.2.	Stanovení vlivu rozpouštědla (DMSO) na aktivitu proteinkinasy ERK2	22
4.3.	Vliv acyklických nukleosidfosfonátů (ANP) na aktivitu proteinkinasy ERK2	25
5.	DISKUSE	27
6.	ZÁVĚR	29
7.	SEZNAM ZKRATEK.....	30
8.	LITERATURA.....	32

1. ÚVOD

1.1. Buněčná signalizace

Buňky v mnohobuněčných organismech spolu komunikují pomocí mnoha chemických extracelulárních signálů. Mimobuněčné signální molekuly, působící jako ligandy, jsou uvolňovány signálními buňkami a následně předávány cílové buňce prostřednictvím receptorového proteinu. Navážou se na příslušný receptor, způsobí tím konformační změny jeho cytosolických nebo receptorových domén a vyvolají tak specifickou buněčnou odpověď. Chování buňky je řízeno převodem extracelulárního signálu na intracelulární signály v cílové buňce. Proces, který převádí signály na buněčné odpovědi, se nazývá buněčná transdukce.

Signály působí na dlouhou nebo krátkou vzdálenost a existují čtyři základní způsoby komunikace. Signálními molekulami endokrinní signalizace jsou hormony, které se uvolňují z endokrinních buněk a z nich působí na cílové buňky. Je to komunikace na dlouhou vzdálenost. Při parakrinní signalizaci signální molekuly difundují lokálně extracelulární matrix a působí v blízkosti buněk, které je vylučují. Třetím způsobem komunikace je neuronová signalizace. Zprávy jsou předávány na velké vzdálenosti a velmi rychle pomocí axonů. Nejdokonalejší způsob přenosu signálu na krátkou vzdálenost nevyžaduje uvolnění vylučované molekuly. Jedná se o přímý kontakt prostřednictvím signálních molekul v plazmatických membránách buněk.

Signální molekuly nejsou schopny přecházet přes plazmatickou membránu do cílové buňky. Receptorové proteiny jsou z tohoto důvodu umístěny v plazmatické membráně, zachycují signály z vnějšku a předávají upravenou zprávu přes membránu do buňky. Receptory můžeme rozdělit do tří hlavních tříd: receptory spojené s iontovými kanály, receptory spojené s G-proteiny a receptory spojené s enzymovou aktivitou.

1.1.1. Receptory spojené s enzymovou aktivitou

Receptory spojené s enzymovou aktivitou mají významnou úlohu při odpovědích buňky na růstové faktory. Růstové faktory jsou extracelulární signální proteiny, které řídí růst, proliferaci, diferenciaci a přežití buněk v živočišných tkáních. Tyto receptory jsou transmembránové tj. na vnější straně plazmatické membrány mají extracelulární doménu, která váže ligand, zatímco intracelulární část je nositelem vlastní enzymové aktivity. K aktivaci dochází po konformační změně proteinu navázáním ligandu. Největší skupinou těchto receptorů jsou receptorové tyrosinkinasy (*RTK*), jejichž cytoplazmatická doména fosforyluje tyrosinové postranní řetězce vybraných intracelulárních proteinů. Navázání ligandu na receptor způsobí dimerizaci receptoru a kinasovou aktivitu, což umožní *RTK* sam vzájemnou fosforylací několika tyrosinů postranního řetězce [1]. Fosforylované tyrosiny slouží jako vazebné místo pro příslušný intracelulární protein, který přebírá signál a přenáší ho dále do nitra buňky. K defosforylaci, tedy k ukončení aktivace receptoru, slouží proteintyrosinfosfatasy (*PTP*).

Některé z intracelulárních signálních proteinů, které se vážou na aktivované *RTK*asy, fungují jako fyzikální proteinové adaptéry [2]. Jsou to malé bílkoviny, které obsahují domény vázající se k fosfotyrosinovým zbytkům *RTK*as, např. *GRB2* (guanine nucleotide-exchange factor). Obecně tyto domény připojují receptory k jiným proteinům. Vytvoří se komplex, který se naváže na další proteiny, tím se aktivují a předávají signál dále. Tato cesta vede k aktivaci *RTK*as a k aktivaci malého intracelulárního signálního proteinu *RAS*. Jde o *GTP*asu, která je v aktivním stavu s navázaným *GTP* a následně interaguje s proteinovými efektory, což vede k aktivaci fosforylační kaskády. Postupně se fosforyluje řada proteinkinás, přičemž jako poslední fosforylují regulační proteiny určitých genů a mění se schopnost regulovat jejich přepis. Hydrolyza *GTP* na *GDP* uvede *G*-protein do neaktivního stavu. Proteiny *RAS* jsou produkovány v cytoplazmatických prekursorech a na jedné své podjednotce vážou *GTP*. Fungují jako molekulární přepínače, které přenášejí signál z receptoru do cytoplazmatické *MAP*-kinasové kaskády [3].

1.2. MAP-kinasy

1.2.1. Rozdělení a funkce

Rodina mitogeny-aktivovaných proteinkinas (MAPK) zahrnuje kaskádovitě uspořádanou síť serin-threoninproteinkinas, které se účastní signálních transdukci a zprostředkovávají tak odpověď buňky na řadu stimulů (růstové faktory, chemický či osmotický stres, infekce aj.). Úloha MAP-kinasové signalizace byla poprvé popsána u jednobuněčných eukaryot *Saccharomyces cerevisiae* (pivní kvasinka) [4]. MAP-kinasy hrají zásadní roli v regulaci buněčné proliferace a diferenciaci. Dosud byly charakterizovány tři hlavní skupiny MAP-kinas: p38MAP-kinasová rodina, ERK (extracellular signal-regulated) a JNK-kinasová (c-Jun NH₂-terminal kinase) rodina [5]. MAP-kinasová rodina p38 se skládá ze čtyř různých isoform p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ , které sdílejí důležité strukturní homology. Je aktivována stresovými podněty a rovněž spojením cytokinů s jejich ligandy. Funkce spočívá v regulaci apoptosy a buněčného cyklu a v přerušení buněčné diferenciaci. JNK-kinasová skupina zahrnuje tři členy JNK1, JNK2 a JNK3 a je také aktivována stresovými podněty a růstovými faktory. Funkce je podobná jako u kinasové rodiny p38. ERK rodina zahrnuje kinasy ERK1 a ERK2, které si jsou strukturně velmi podobné. Dalšími členy ERK rodiny strukturně homologické s klasickou třídou (ERK1 a ERK2), avšak funkčně odlišné jsou ERK3, ERK5/BMK1 a ERK7. Obecně je tedy MAP-kinasová signální cesta aktivována pomocí cytokinů a růstových faktorů, které zprostředkovávají tvorbu specifických biologických odpovědí.

1.2.2. ERK-kinasová signální cesta

Nejlépe prostudovanou, tzv. klasickou“ MAP-kinasovou dráhou je ERK.¹ Fosforylační ERK-kinasovou kaskádu lze zjednodušeně zapsat: RTK → RAS → RAF → MEK → ERK. Začíná aktivací receptorové tyrosinkinasy vazbou epidermálního růstového faktoru (EGF) k jeho receptoru (EGFR). EGFR obsahuje ve svých cytoplazmatických doménách přinejmenším devět tyrosinových zbytků schopných fosforylace, přičemž sedm

¹ Z historických důvodů je dodnes v literatuře poměrně běžné, že se setkáváme s označením této dráhy jako MAP-kinasové, MAP-kinasou se pak často míní ERK. Aby se předešlo nedorozuměním, není pro účely této práce označení „MAP-kinasa“ používáno pro označení ERK, ale výhradně ve svém obecnějším smyslu.

z nich slouží jako autofosforylační místa. Cytosolický protein, fungující jako molekulový adapter pro EGFR, obsahuje SH2 domény, které se vážou na fosfotyrosin aktivovaného receptoru. Dále také obsahuje dvě SH3 domény, které vážou receptory k druhému cytosolickému proteinu - SOS (Son of sevenless) [6]. Tím se SOS aktivuje a přemístí se z cytosolu do membrány, kde aktivuje některého z členů rodiny RAS : N-RAS (neuroblastoma RAS viral oncogene homolog), H-RAS (Harvey RAS viral oncogene homolog) nebo K-RAS (Kirsten RAS viral oncogene homolog). Deregulace RAS proteinů je velmi často pozorována u nádorově transformovaných buněk, vystupují tedy jako protoonkogeny. Jelikož RAS je typická GTPasa, při jeho aktivaci dojde k uvolnění GDP a navázání GTP. RAS-GTP se pak přímo váže na RAF-kinasu, kterou dále aktivuje.

RAF-kinasa (Ser-Thr-kinasa) existuje ve třech různých isoformách. RAF-1 (C-RAF), A-RAF a B-RAF. Enzym se nachází ~~se~~ v cytosolu, za normálních okolností v neaktivním stavu v důsledku vazby inhibičního proteinu 14-3-3. Tento protein váže fosfoserinové zbytky nejen v RAF, ale i v mnoha dalších důležitých signálních proteinech. Aktivované RAS-GTP se připojí k N-terminálním regulačním doménám RAF, zruší se inhibice její aktivity, dojde ke konformační změně v RAF a přeruší se spojení s proteinem 14-3-3. Jeden z fosfoserinů je defosforylován a další fosfoserinové a fosfotyrosinové zbytky jsou fosforylovány kinasou. Tyto změny vyvolají vzrůst RAF-kinasové aktivity.

RAF fosforyluje a aktivuje dvojici specifických proteinkinás MEK1 a MEK2 [7]. K aktivaci dochází díky fosforylaci dvou serinových zbytků v aktivním místě. Každá z isoform RAF aktivuje MEK1 a MEK2 jiným způsobem. A-RAF je slabý aktivátor, B-RAF upřednostňuje aktivaci MEK1, RAF-1 aktivuje efektivně obě kinasy MEK. Odhaduje se, že MEK1 resp. MEK2 je přítomna ve vyšší koncentraci než RAF, čímž zesiluje signál směrem k ERK. MEK1 a MEK2 fosforylují dvě místa, jde o tyrosinové a threoninové zbytky kinasy ERK1 resp. ERK2.

Katalytické místo ERK-kinasy zůstává díky rozložení aminokyselin v neaktivním stavu. Vazbou MEK k ERK se tato konformace destabilizuje a dochází k fosforylaci tyrosinu a následně sousedního threoninu, přičemž oba tyto fosforylované zbytky intereagují s dalšími aminokyselinami. Způsobí tím změnu konformace na rozhraní dvou domén ERK-kinasy a umožní tak vazbu ATP do katalytického místa. Prostřednictvím

fosfotyrosinového zbytku se připojuje specifický substrátový protein. Fosforylace podporuje nejen katalytickou aktivitu ERK-kinasy, ale také její dimerizaci. V této formě pak může být přemístěna do jádra, kde fosforyluje transkripční faktory regulující genovou expresi cílové bílkoviny. Inaktivace vysoké aktivity ERK-kinasy nastane odstraněním fosfátu z tyrosinového a threoninového zbytku účinkem fosfatas [8]. MKP (MAP kinase phosphatases) je skupina duálních fosfatas spojených s tyrosinfosfatasovou rodinou [9]. Tyto enzymy tedy defosforylují oba zbytky, avšak fosfotyrosin je upřednostňován.

1.2.3. ERK2-kinasa a její mutace

Pomocí trojrozměrné (krystalické) struktury nefosforylované ERK2 lze popsat stav, kdy má ERK2 nízkou aktivitu. Enzym obsahuje malé N-terminální a velké C-terminální domény, které jsou navzájem spojené [10]. ATP se váže hluboko v katalytické mezeře mezi těmito doménami (aktivační místo). Zde se také váže proteinový substrát. Přístup k aktivačnímu místu blokují substrátu dvě aminokyseliny Tyr-185 a Thr-183. Tato blokáce je způsobena převážně Tyr-185, který svým skrytým řetězcem obsazuje aktivační místo. Duální fosforylace těchto aminokyselin podmíní konformační lokální změny N- a C-terminálních domén a přemístění Tyr-185. Uvolní se tak prostor kolem aktivačního místa pro navázání substrátu.

Bylo charakterizováno několik mutací ERK2, což napomohlo porozumění jednotlivým fosforylačním místům a aktivaci enzymů v této mutované formě. Mutace struktury ERK2 na Tyr-185 způsobí lokální změny konformace po aktivaci ERK2. Dále také mutace způsobí změnu v pořadí patnácti zbytků aminokyselin aktivačního místa od Asp-173 po Ala-187, což vyvolá změny ve struktuře a zároveň se sníží aktivita enzymu. Struktura aktivačního místa je pak nestabilní a stačí malé množství energie k vyvolání konformačních změn [11]. Fosforylační místo pak musí získat jinou konformaci, aby bylo fosforylováno kinasou MEK (MAP kinase kinase, MAPKK). Tyr-185 je ukryt v konformaci ERK2, kde je nízká aktivita. Připojující se energie poskytována interakcí ERK2 s MEK může být dostačující k uvolnění Tyr-185 ze skryté pozice, a tak dovolí přístup k aktivnímu místu MEK.

1.3. Význam MAP-kinasové signalizace v protinádorové terapii

Nádorové bujení je výsledkem nejrůznějších alterací genů mutacemi, přičemž dochází ke ztrátě kontroly proliferace, diferenciaci a zániku buněk. Následkem je neomezený růst nádorových buněk, který může být podporován nebo potlačován signály zprostředkované MAP-kinasovou cestou (RAS-RAF-RAF-ERK). Tato kaskáda reguluje mnoho buněčných funkcí, jednou z nich je právě buněčná proliferace a přežívání buněk. Proto se tato signální dráha stala cílovým místem terapeutického zásahu proti nádorovému bujení. Tento přístup reprezentuje nové směry vývoje léčiv proti rakovině navržených tak, aby přesně zasáhly cíl a byly méně toxické než běžná chemoterapeutika.

MAP-kinasová cesta je velmi často aktivována u různých typů nádorů [12]. Mezi přispívající faktory patří např. genové mutace klíčových kinas a nedostatek endogenních inhibitorů, které by jinak tlumily aktivitu signální cesty. Genetické studie identifikovaly mutace B-RAF nebo N-RAS ve většině kožních melanomů. Aktivovaná mutace v N-RAS fungující jako onkogen v neuroblastomech, se nachází především v melanomech, jímž chybí B-RAF mutace. K aktivaci MAP-kinas v melanomech přispívají nemutované RAS a RAF [13]. Mutace B-RAF nebo N-RAS není jediný způsob, jak buňka melanomu zajistí trvalou MAP-kinasovou aktivaci. Genetické změny způsobí, že melanomy chybují při expresi genů kódující proteiny, které negativně regulují ERK fosforylaci. Např. množství inhibitoru RAF-1 kinasy je u melanomů viditelně sníženo [14].

MAP-kinasová cesta se podílí na regulaci buněčného přežití a dá se do ní efektivně zasáhnout pomocí farmakologických inhibitorů. Existují například studie, které ukazují na apoptotickou buněčnou smrt vyvolanou MEK inhibitory v melanomových buněčných kulturách [15], což napovídá, že MAP-kinasová inhibice může být důležitou součástí mechanismu, při němž zasažení specifického B-RAF vyvolá apoptosu.

Další studie popsaly příspěvek autokrinních růstových faktorů (hepatocytární a fibroblastový růstový faktor) k aktivaci MAP-kinasy v melanomu. Jiné studie naznačují, že endoteliální buňky jsou primárním cílem RAF inhibitorů *in vivo* a že protinádorové účinky těchto chemických látek vysokou měrou přispívají k inhibici angiogeneze. MAP-kinasová kaskáda je klíčový efektor RAS-GTPas, které jsou nejfrekventovanějšími onkogeny v lidských neoplasiích.

1.4. Inhibice proteinkinas

Existuje několik cest, jak zasáhnout cílové enzymy. Např. protilátkami nebo malými molekulami, které blokují interakci mezi substrátem a kinasou (inhibitory). Klasické inhibitory proteinkinas blokují jejich aktivitu interakcí v aktivním místě (nejčastěji ve vazebném místě pro ATP). Některé inhibitory však mohou působit i nekompetitivním mechanismem v tzv. alosterickém místě enzymu.

Lepší pochopení příčin nádorového bujení na molekulární úrovni vedlo k rozvoji inhibitorů proteinkinas pro klinické využití. Inhibitory jsou důležitým základem pro výzkum protizánětlivých, protinádorových a dalších terapeutik. Velký úspěch v onkologii získal tyrosinkinasový inhibitor imatinib, používaný pro léčbu chronické myeloidní leukémie (CML), erlotinib či gefitinib jsou zase účinné například proti rakovině plic. Mezi další již schválené inhibitory proteinkinasové signalizace patří např. trastuzumab, používaný k léčbě rakoviny prsu, bevacizumab, účinný proti metastatickým formám karcinomu tlustého střeva a rekta. Trastuzumab a bevacizumab jsou příkladem protilátkového přístupu k blokádě určité signální dráhy, nikoli enzymové inhibice v pravém slova smyslu. Mnoho dalších potenciálních inhibitorů je stále ve fázi výzkumu, kdy se zjišťují vedlejší účinky a toxicita v preklinických a posléze v klinických studiích [16].

Imatinibmesylát, prodáváný pod názvem Gleevec (kód STI-571), je derivátem 2-fenylaminopyrimidinu a používá se pro léčbu chronické myeloidní leukémie, gastrointestinálních stromálních nádorů (GIST) a některých dalších maligních nádorů. Patří mezi první členy nové třídy účinných agens, které inhibují přímo tyrosinkinasy (TK). Chronická myeloidní leukémie je charakteristická specifickou chromosomální abnormalitou označovanou jako filadelfský chromosom. Ten je výsledkem translokace částí chromosomů 9 a 22, přičemž dochází k nepřirozenému kontaktu genu pro BCR (Breakpoint Cluster Region) s genem pro Abl (Abelson protooncogene) za vzniku fúzního genu BCR-Abl. Jeho transkript je konstitučně aktivní tj. nevyžaduje aktivaci dalšími buněčnými proteiny. BCR-Abl protein aktivuje řadu proteinů regulujících buněčný cyklus a zrychluje tak buněčné dělení. Imatinib je poměrně selektivním inhibitorem TK domény BCR-Abl. Kromě něj inhibuje dále c-kit a PDGF-R (platelet-derived growth factor receptor), ale nikoli další tyrosinkinasy. Gefitinib je specifickým inhibitorem TK domény

receptoru pro epidermální růstový faktor (EGF). V roce 2003 úspěšně prošel gefitinib v USA všemi třemi fázemi klinických testů [17] a v současnosti se používá výlučně pro terapii nemalobuněčných plicních karcinomů (NSCLS).

HER rodina transmembránových tyrosinových receptorů zahrnuje čtyři členy (HER1-4). Trastuzumab je protilátka zaměřená proti HER2 tyrosinkinasovému receptoru a je používána pro léčbu nádorů prsu, u nichž je HER2 amplifikován nebo nadměrně exprimován [18]. Trastuzumab inhibuje signální cestu (RAS-RAF-MAP-kinasy) zprostředkávající buněčnou proliferaci.

Dalším způsobem léčby nádorového bujení jsou terapeutika, které modifikují translaci a sdružování enzymů. Byly nalezeny proteiny, které udržují stabilitu kinas a dalších proteinů. Hsp90 je jedním ze šaperonů regulující skládání, stabilitu a funkci mnoha onkoproteinů. Velmi účinný Hsp90 inhibitor imituje ATP blokující hlavní ATPasovou aktivitu šaperonů. Vede to k degradaci kinas a proteinů, které interagují s Hsp90. Mezi takové inhibitory patří geldanamycin zastavující růst buněk ovariálního karcinomu [17].

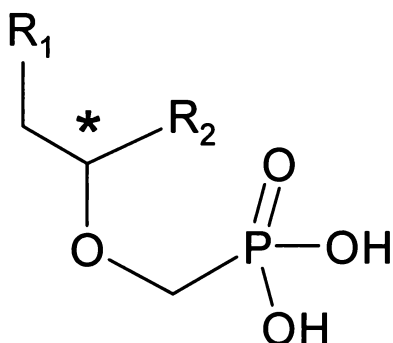
Je mnoho mechanismů, pomocí kterých je nádorová buňka schopna předejít závislosti na specifické signální cestě a stát se tak odolnou vůči terapeutikům. Arteagova skupina zjistila, že nejefektivnější cestou pro cílenou léčbu rakoviny je kombinace několika proteinkinasových inhibitorů [17].

1.5. Acyklické nukleosidfosfonáty (ANP)

Acyklické nukleosidfosfonáty (ANP) jsou významnou skupinou biologicky aktivních nukleotidových analogů, vyvinutých Prof. Holým v Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky (ÚOCHB AV ČR). Charakteristickým strukturním prvkem ANP je přítomnost fosfonometoxyskupiny, která je připojena éterovou vazbou přes alifatický řetězec k purinovému nebo pyrimidinovému kruhu (obr. 1). Tato vazba nepodléhá katabolismu, a proto jsou ANP v porovnání s klasickými nukleosidy stabilnější.

Mnoho ANP má velmi dobrou protivirovou účinnost proti širokému spektru DNA virů a retrovirů, některé vykazují též výraznou protinádorovou aktivitu [19,20]. V poslední

době jsou intenzivně studovány i v souvislosti s jejich imunomodulačními a antiparazitárními účinky [21]. Spektrum biologické aktivity se odvíjí od struktury konkrétních ANP, a to jak od struktury baze, tak postranního řetězce. Důležitý je rovněž fakt, že aby mohly ANP vykazovat své biologické účinky, musejí být napřed po vstupu do buňky postupně fosforylovány na difosfáty (odpovídající 5'-trifosfátům klasických nukleosidů). Mnohé ANP mají ve své struktuře asymetrický uhlík (obr. 1), vyskytují se tedy ve dvou stereoizomerních formách. Aktivita je obvykle striktně vázána pouze na jeden z těchto dvou stereoizomerů. Proto je potřeba absolutní konfiguraci látek důsledně rozlišovat (symboly *R*- a *S*- v názvu).



Obr. 1. Obecný strukturní základ ANP látek. Hvězdička označuje asymetrický uhlík. *R*₁ – adenin, guanin, cytosin, diaminopurin; *R*₂ – CH₃ (PMP série), CH₂OH (HPMP série), H (PME série)

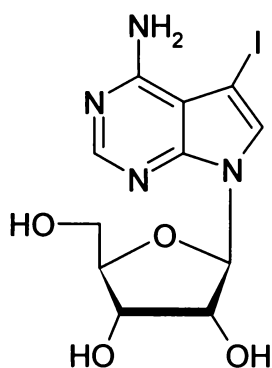
PMEA {9-[2-(fosfonomethoxy) ethyl]adenin} (adefovir, Hepsera®) je klinicky používán pro léčbu chronické hepatitidy B (HBV) [19]. (*R*)-PMPA {(*R*)-9-[2-(fosfonomethoxy) propyl]adenin} (tenofovir, Viread®) je úspěšné antivirotikum proti HIV a nyní se klinicky zkouší i jeho použití proti HBV [22]. Látka PMEG {9-[2-(fosfonomethoxy)ethyl]guanin} byla studována pro působení proti Shope papillomavirus (CRPV), což je infekční onemocnění králíků (keratinové karcinomy na hlavě) [23]. V neposlední řadě je ovšem tato látka významná svými protinádorovými účinky a její dvojité proléčivo (GS-9219) je ve fázi klinických zkoušek pro terapii lymfomu [24]. PMEDAP {2,6-diamino-9-[2-(fosfonomethoxy)ethyl]purin} působí proti MSV (Moloney murine sarcoma virus) a Friendově leukemii (FLV) [25] a podobně jako PMEG má i zvýrazněné antiproliferační účinky. (*S*)-HPMPA {(*S*)-9-[(3-hydroxy-2-fosfonomethoxy)

propyl]adenin} je účinný proti prvokům *Trypanosoma brucei rhodesiense* a *T. gambiense* způsobující spavou nemoc [21], (S)-HPMPDAP {(S)-9(3-hydroxy-2-fosfonomethoxypropyl)2,6-diaminopurin} zase inhibuje růst *Trypanosoma brucei brucei* [26]. (S)-HPMPG {(S)-9-(3-hydroxy-2-fosfonomethoxypropyl)guanin} je účinný proti viru *Herpes simplex* (HSV) [27], (R)-PMPG {(R)-9-[2-(fosfonomethoxy)propyl]guanin} byl testován *in vitro* proti imunodeficitní aktivitě viru HIV [28], stejně tak (R)-PMPDAP {(R)-9-(2-fosfonomethoxy-propyl)-2,6-diaminopurin} [29].

1.6. Strategie hledání nových inhibitorů ERK-kinasy

Jak bylo dříve uvedeno, mnohé proteinkinasy inhibitory působí ve vazebném místě pro ATP enzymu, jde tedy o klasickou kompetici s jedním ze substrátů kinasové reakce. Lze předpokládat, že látky nukleosidové/nukleotidové povahy obecně mohou kompetovat s ATP o vazebné místo v aktivním centru kinasy a působit tak jako její inhibitory. Tímto současným výzkumným zájmem je identifikace nových a účinných inhibitorů ERK-kinasy, která je ústředním bodem ERK-kinasové signální dráhy a potenciálním místem zásahu selektivních protinádorových léčiv. Inhibitory ERK by mohly velmi vhodně a cíleně doplňovat chemoterapii onkologických pacientů, u nichž je ERK-signální cesta aktivována.

Z literatury je známa minimálně jedna látka nukleosidového typu, která je účinným inhibitorem proteinkinasy ERK2 – 5-iodotubercidin (obr. 2). Tato látka je zároveň inhibitorem adenosinkinasy, enzymu zodpovědného za fosforylaci adenosinu na AMP [30].



Obr. 2. Struktura 5-iodotubercidinu (ERK2 inhibitor, $K_i \sim 0,5 \mu\text{mol}^{-1}\text{l}^1$)

Vzhledem k tomu, že ANP jsou potenciální protinádorová léčiva, bude bezesporu zajímavé i jejich hodnocení z hlediska inhibičního účinku na ERK kinasu. ANP, které jsou předmětem studia této bakalářské práce, zahrnují jak analogy s prokázanou antiproliferační aktivitou (PMEG, PMEDAP), tak analogy, které tuto aktivitu nemají. Bude zajímavé sledovat i to, zda existuje korelace mezi protinádorovým účinkem těchto látek a inhibicí ERK tj. pokusit se odpovědět na otázku, zda se inhibice ERK na antiproliferační aktivitě ANP podílí.

2. CÍLE PRÁCE

- Optimalizace reakčních podmínek pro radiometrické stanovení proteinkinasy ERK2 (vliv teploty, časový průběh)
- Stanovení vlivu rozpouštědla (DMSO) na aktivitu proteinkinasy ERK2
- Screening acyklických nukleosidfosfonátů na inhibiční účinky vůči proteinkinase ERK2

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Použité přístroje a pomůcky

Přístroje:

- TRI-CARB 2900TR, Perkin Elmer
- pH metr PHM 240, MeterLab
- analytické váhy Sartorius
- vortex
- centrifuga

Pomůcky:

Automatické pipety, skleněné pipety, odměrné válce, kádinky, mikrozkušavky, pinzeta, ultrafiltr (0,45 μm x 47 mm), Büchnerova nálevka, fofocelulózové disky (Whatman P-81, průměr 2,5 cm)

3.2. Chemikálie

- TRIS (2-amino-2-hydroxymetylpropan-1,3-diol): SERVA, Německo
- EGTA (etylenglykol-bis(2-aminoetyleter)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina): SIGMA
- DTT (1,4-dithiothreitol): SIGMA
- ATP (adenosin-5'-trifosfát): SIGMA
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: SERVA
- DMSO (dimethylsulfoxid): SIGMA
- 5 – Iodotubercidin: CALBIOCHEM
- MAP Kinase 2: CALBIOCHEM, U.S a Kanada
- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$: MP BIOMEDICALS, USA
- MBP (Myelin basic protein): MP BIOMEDICALS, USA
- H_3PO_4 (85 %): PENTA, ČR

- Aceton: PENTA, ČR
- HPLC voda (ultrafiltrovaná)
- Acyklické nukleosidfosfonáty (ANP): PMEA, PMPA, PMEG, PMEDAP, (*S*)-HPMPA, (*S*)-HPMPG, (*S*)-HPMPDAP, (*R*)-PMPG, (*R*)-PMPDAP

3.3. Metody

3.3.1. Radiometrické stanovení aktivity proteinkinasy ERK2 *in vitro*

Princip stanovení:

Proteinkinasy katalyzují přenos γ -fosfátu z ATP na hydroxylovou skupinu serinu, threoninu nebo tyrosinu substrátu (proteinu). Průběh fosforylace lze sledovat pomocí značeného [γ - 32 P]-ATP, stanovením radioaktivity inkorporované do peptidového substrátu pomocí kapalné scintilace. V tomto případě sledujeme fosforylaci substrátu MBP (myelin basic protein) rekombinantním enzymem MAPK2 (ERK2).

Příprava roztoků:

Zásobní TRIS-HCl kinasový pufr (5x konc., 80 mmol.l⁻¹; pH 7,5) byl připraven rozpuštěním 485 mg TRIS, 38 mg EGTA a 310 mg DDT ve 40 ml HPLC vody, pH upraveno pomocí 1M HCl na 7,5 a objem doplněn vodou do 50 ml. Příprava zásobního roztoku ATP + MgCl₂ (5x) spočívala v rozpuštění 1,31 mg ATP a 4,8 mg MgCl₂ v 4,75 ml HPLC vody. Zásobní roztok substrátu (MBP, 5x) byl připraven rozpuštěním 1 mg MBP v 500 μ l HPLC vody. Všechny zásobní roztoky byly rozpipetovány do alikvotů a zamrazeny na -20 °C. Oplachovací roztok 0,5% kyseliny fosforečné byl připraven zředěním 2,94 ml 85 % fosforečné kyseliny v 500 ml HPLC vody. Roztok byl uchováván při 4 °C.

Postup stanovení:

Termostat byl nastaven na 30 °C, zásobní roztoky rozmrazeny a uchovány na ledu. Následně byly připraveny 5x koncentrované zásobní roztoky inhibitorů (testované látky, 5-iodotubercidin, DMSO). Roztok ATP s MgCl₂ byl těsně před použitím smíchán [γ - 32 P]-ATP (3,75 μ Ci/75 μ l) a uchováván na ledu. Veškerá manipulace s radioaktivním materiálem probíhala v digestoři za ochranným štítem a za neustálé kontroly kontaminace

Geiger-Müllerovým počítačem. Enzym (ERK2-kinasa) byl těsně před použitím naředěn na pracovní koncentraci 100 ng/6 μ l 1x kinasovým pufrům.

Do popsaných mikrozkušavek bylo pipetováno 6 μ l reagensů v tomto pořadí: pufr, inhibitor (resp. DMSO, H₂O), substrát, enzym. Tento premix byl důkladně promíchán na vortexu, krátce centrifugován a preinkubován 5 min při 30 °C. Reakce byla startována přidávkem 6 μ l značeného ATP a lehce promíchána. Inkubace probíhala 30 min při 30 °C, není-li uvedeno jinak. V mezidobí byly připraveny tři promývací lázně s 0,5% kyselinou fosforečnou a poslední s čistým acetonem. Na každý oplach jednoho vzorku bylo počítáno 5 ml jednotlivých roztoků.

Po uplynutí doby inkubace byla reakce zastavena nanesením 2 μ l reakční směsi na předem označený fosfocelulózový disk, který byl po vsáknutí (30 s) vhozen do první promývací lázně. Disky byly postupně promývány na míchačce 3 x 5 min v 0,5% kyselině fosforečné (odstranění neinkorporované radioaktivity), poslední oplach byl v acetonu. Dále byly disky rozloženy na polystyren potažený alobalem, důkladně vysušeny pod IČ lampou a vloženy do označených scintilačních vialek. Po přidávku 5 ml toluenového scintilačního koktejlu byla stanovena radioaktivita kapalnou scintilací. Finální koncentrace složek reakční směsi jsou uvedeny v tab. 1.

Tab. 1 Složení reakční směsi

	Objem (μ l)	Finální koncentrace
Kinasový pufr (4x)	6	20 mM TRIS; 0,5 mM EGTA; 10 mM DDT
Inhibitor/DMSO/voda (5x)	6	variabilní
MBP (5x)	6	0,4 mg/ml
ERK kinasa (5x)	6	100 ng
ATP+MgCl ₂ + [γ - ³² P]ATP (5x)	6	100 μ M ATP; 10 mM MgCl ₂ ; 0,3 Ci

Výpočet reakční rychlosti v :

$$v (\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}) = \frac{CPM_{\text{inkorp}}}{CPM_{\text{total}}} \cdot \frac{CPM_{\text{MBP}} (\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}) \cdot V(\text{l})}{t (\text{s}) \cdot m_{\text{enz}} (\text{mg})}$$

$v = \text{konv. } 4136 \text{ nmol/min/mg}$

$v = \text{reakční rychlost}$

$CPM = \text{counts per minute}$; množství impulsů ^{32}P zaznamenaných kapalným scintilátorem

$CPM_{\text{inkorp}} = \text{inkorporované CPM na jeden filtr}$

$CPM_{\text{total}} = 100\% \text{ konverze } ^{32}\text{P} \text{ do proteinu} = 44000 \text{ CPM}$

$CPM_{\text{MBP}} = \text{koncentrace Myelin basic proteinu}$

$V = \text{objem vzorku na jeden filtr} = 2 \cdot 10^{-6} \text{ l}$

$t = \text{doba inkubace} = 30 \text{ min.}$

$m_{\text{enz}} = \text{hmotnost enzymu} = 6,67 \text{ ng na jeden filtr}$

$$\text{konv} = \frac{CPM_{\text{inkorp}}}{CPM_{\text{total}}}$$

4. VÝSLEDKY

4.1. Optimalizace reakčních podmínek pro radiometrické stanovení proteinkinasy ERK2 (vliv teploty, časový průběh)

Většina biologických enzymových reakcí má teplotní optimum kolem 37 °C, což je také nejčastější teplota obecně používaná pro biochemické reakce *in vitro*. Řada autorů však ve svých pracích popisuje standardní provádění proteinkinasy reakcí při teplotě 30 °C [31], výjimečně i 25 °C [32]. Proto bylo nejprve ověřeno, která reakční teplota je optimální pro stanovení proteinkinasy ERK2 v podmínkách této laboratoře. Experiment byl prováděn při teplotách 30 °C (tab. 2) a 37 °C (tab. 3). Pro obě teploty byla provedena inkubace v časových intervalech 10, 20 a 30 minut za účelem nalezení oblasti lineární reakční rychlosti, a tedy i optimální délky inkubace pro další experimenty. Výsledky jsou přehledně shrnuty na obr. 3.

Tab. 2 Časová závislost aktivity proteinkinasy ERK2 při reakční teplotě 30 °C

<i>t</i> (min)	CPM	produkt (μM)	<i>v</i> (nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	<i>v</i> _{prům} (nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)
10	311	2,9	28,96	24,00 ± 3,82
	252	2,35	23,46	
	211	1,97	19,65	
	257	2,39	23,93	
20	512	4,77	47,67	45,72 ± 4,82
	512	4,77	47,67	
	414	3,86	38,55	
	526	4,9	48,97	
30	858	7,99	79,89	67,53 ± 10,16
	708	6,6	65,92	
	593	5,52	55,21	
	742	6,91	69,09	

CPM – counts per minute; množství impulsů ^{32}P zaznamenaných kapalným scintilátorem

v – reakční rychlost

$v_{\text{prům}}$ – průměrná reakční rychlost ze 4 paralelních měření \pm směrodatná odchylka

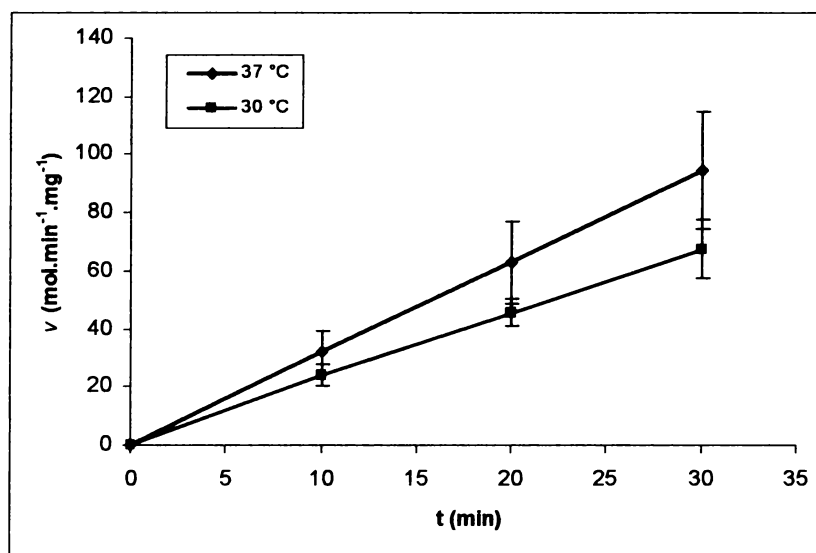
Tab. 3 Časová závislost aktivity proteinkinasy ERK2 při reakční teplotě 37 °C

t (min.)	<i>CPM</i>	produkt (μM)	v ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$v_{\text{prům}}$ ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)
10	388	3,61	36,13	32,12 \pm 7,29
	290	2,70	27,00	
	433	4,03	40,32	
	269	2,51	25,05	
20	693	6,46	64,52	62,78 \pm 14,23
	600	5,59	55,86	
	879	8,19	81,84	
	525	4,89	48,88	
30	1078	10,04	100,37	94,62 \pm 19,90
	898	8,37	83,61	
	1277	11,90	118,90	
	812	7,56	75,60	

CPM – counts per minute; množství impulsů ^{32}P zaznamenaných kapalným scintilátorem

v – reakční rychlost

$v_{\text{prům}}$ – průměrná reakční rychlost ze 4 paralelních měření \pm směrodatná odchylka



Obr. 3 Časový průběh reakce katalyzované proteinkinásou ERK2 při 30 °C a 37 °C

4.2. Stanovení vlivu rozpouštědla (DMSO) na aktivitu proteinkinasy ERK2

Nukleotidové analogy, které jsou testovány na inhibiční vlastnosti vůči proteinkinase ERK2 v následujícím pokusu, jsou převážně látky dobře rozpustné ve vodě. 5-iodotubercidin, který byl použit v těchto experimentech jako pozitivní kontrola, stejně tak jako mnohé další látky, které se v budoucnu budou testovat na inhibici ERK2 kiny, jsou ve vodě mnohem hůře rozpustné. Nejběžnějším rozpouštědlem lipofilních látek pro *in vitro* provedení biochemických reakcí je dimetylsulfoxid (DMSO). Bylo proto zjišťováno, zda DMSO samotné ovlivňuje průběh kinasové reakce (tab. 4, obr. 4). V těchto podmínkách nepřipadají do úvahy koncentrace DMSO vyšší než 0,4% v reakci. Proto byla testována pouze tato jedna koncentrace a pro hodnocení případné koncentrační závislosti ještě koncentrace dvakrát nižší (0,2%). Funkčnost testu byla ověřena použitím známého inhibitoru ERK2 – 5-iodotubercidinu.

Tab. 4 Vliv DMSO na aktivitu proteinkinasy ERK2

	CPM	produkt (μM)	v ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$v_{\text{prům}}$ ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	% kontroly
kontrola	1305	12,20	121,50	$127,10 \pm 4,10$	100
	1411	13,14	131,37		
	1378	12,84	128,30		
0,2% DMSO	2912	27,13	271,13	$110,15 \pm 7,91$	87
	1098	10,23	102,23		
	1268	11,81	118,06		
0,4% DMSO	1281	11,93	119,27	$122,34 \pm 12,32$	96
	1490	13,88	138,73		
	1171	10,91	109,03		
5-Idtub	305	2,84	28,40	$28,15 \pm 1,26$	22
	332	3,09	30,91		
	270	2,52	25,14		

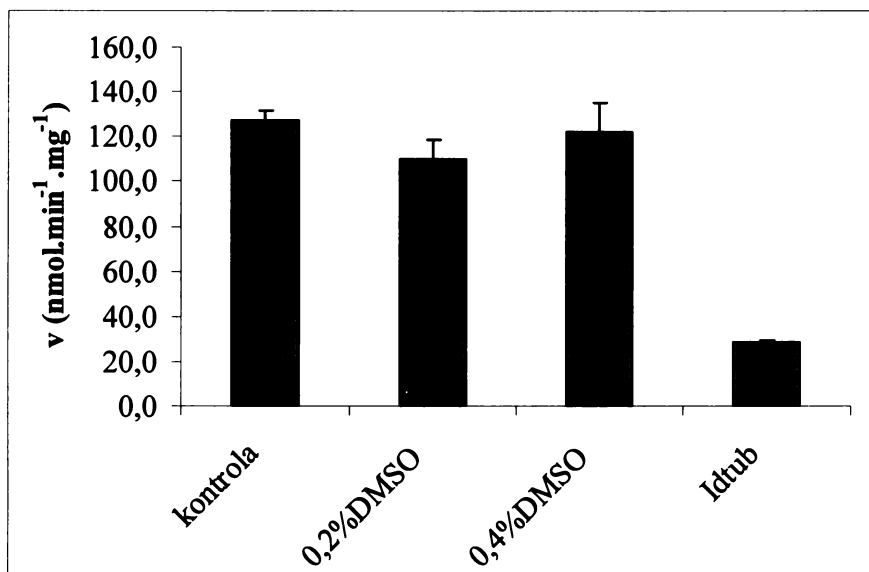
CPM – counts per minute; množství impulsů ^{32}P zaznamenaných kapalným scintilátorem

DMSO – dimethylsulfoxid

v – reakční rychlost

$v_{\text{prům}}$ – průměrná reakční rychlost ze 3 paralelních měření \pm směrodatná odchylka

5-Idtub – 5-iodotubercidin



Obr. 4 Vliv DMSO a 5-iodotubercidinu na aktivitu proteinkinasy ERK2

4.3. Vliv acyklických nukleosidfosfonátů (ANP) na aktivitu proteinkinasy ERK2

V tomto experimentu bylo testováno devět acyklických nukleosidfosfonátů (ANP) na inhibiční účinky vůči proteinkinase ERK2 (tab. 5, obr. 5). Jako pozitivní kontrola byl opět použit 5-iodotubercidin.

Tab. 5 Aktivita proteinkinasy ERK2 po přidavku ANP, 5-iodotubercidinu

	CPM	produkt (μM)	v ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$v_{\text{prům}}$ ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	% kontroly
kontrola	3030	28,23	282,11	$256,83 \pm 35,75$	100
	2487	23,17	231,56		
PMEA	2861	26,65	266,38	$277,78 \pm 16,13$	108
	3106	28,93	289,19		
PMEG	2518	23,46	234,44	$265,26 \pm 43,58$	103
	3180	29,62	296,08		
PMEDAP	3059	28,50	284,81	$270,61 \pm 20,08$	105
	2754	25,65	256,42		
(S)-HPMPA	3215	29,95	299,34	$281,83 \pm 24,75$	110
	2839	26,45	264,33		
(S)-HPMPG	2668	24,85	248,41	$261,44 \pm 18,43$	102
	2948	27,46	274,48		
(S)-HPMPDAP	3291	30,66	306,41	$294,08 \pm 17,45$	115
	3026	28,19	281,74		
(R)-PMPA	2615	24,36	243,47	$252,37 \pm 12,57$	98
	2806	26,14	261,26		
(R)-PMPG	2645	24,64	246,27	$262,33 \pm 22,71$	102
	2990	27,85	278,39		
(R)-PMPDAP	2772	25,82	258,09	$265,91 \pm 11,06$	103
	2940	27,39	273,73		
5-Idtub	671	6,25	62,47	$56,89 \pm 7,90$	22
	551	5,13	51,30		

PMEA - 9-[2-(fosfonomethoxy) ethyl]adenin

(R)-PMPA - (R)-9-[2-(fosfonomethoxy) propyl]adenin

PMEG - 9-[2-(fosfonomethoxy)ethyl]guanin

PMEDAP - 2,6-diamino-9-[2-(fosfonomethoxy)ethyl]purin

(S)-HPMPA - (S)-9-[(3-hydroxy-2-fosfonomethoxypropyl]adenin

(S)-HPMPDAP - (S)-9(3-hydroxy-2-fosfonylmethoxypropyl)2,6-diaminopurin

(S)-HPMPG - (S)-9-(3-hydroxy-2-fosfonomethoxypropyl)guanin

(R)-PMPG - (R)-9-[2-(fosfonomethoxy)propyl]guanin

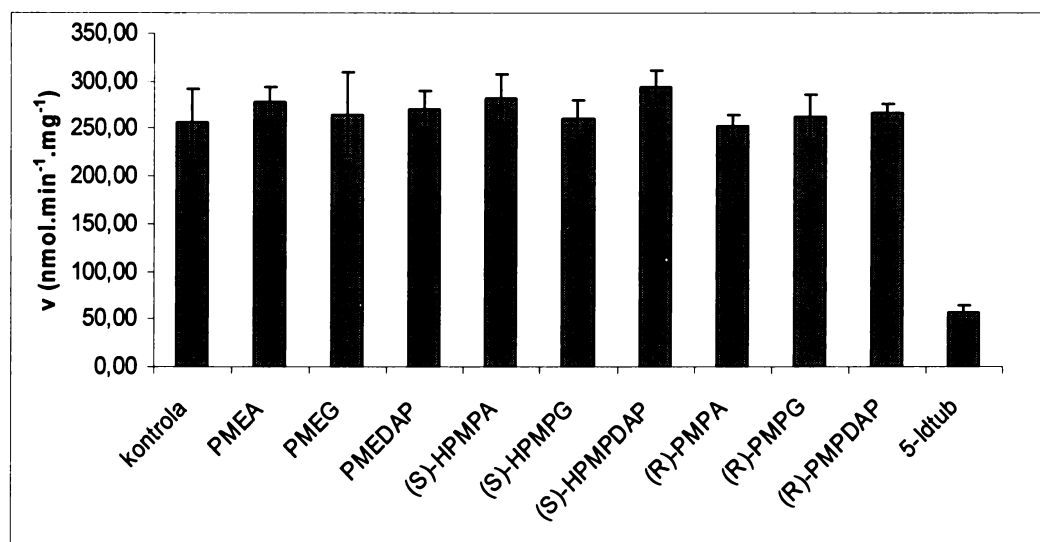
(R)-PMPDAP - (R)-9-(2-fosfonylmethoxypropyl)-2,6-diaminopurin

CPM – counts per minute; množství impulsů ^{32}P zaznamenaných kapalným scintilátorem

v – reakční rychlost

$v_{\text{prům}}$ – průměrná reakční rychlost ze 3 paralelních měření \pm směrodatná odchylka

5-Idtub – 5-iodotubercidin



Obr. 5 Porovnání ERK2-inhibiční účinnosti acyklických nukleosidfosfonátů (ANP)

5. DISKUSE

Proteinkinasa (MAP-kinasa) ERK je součástí buněčné signalizační kaskády RAS-RAF-MEK-ERK, jejíž aktivace vede k potlačení apoptotické buněčné smrti a která je velmi často aktivována v nádorových buňkách. Proto je tato dráha atraktivním cílem farmakologického zásahu při terapii nádorových onemocnění.

Na pracovištích ÚOCHB AV ČR jsou vyvíjeny látky s potenciálním protinádorovým a protivirovým účinkem strukturně odvozené od nukleosidů/nukleotidů. Rešerší v literatuře bylo zjištěno, že je popsán inhibiční účinek purinového analogu, 5-iodotubercidinu, na ERK-kinasu. Pro určitou strukturní podobnost acyklických nukleosidfosfonátů (ANP) syntetizovanými na ÚOCHB s 5-iodotubercidinem, potažmo s ATP, bylo cílem této práce zjistit, zda mohou také ANP inhibovat ERK-kinasu. V této laboratoři byla zavedena radiometrická metoda pro *in vitro* stanovení aktivity ERK-kinasy, optimalizace reakčních podmínek byla pak jedním z cílů této práce. ERK kinasa existuje ve dvou isoformách ERK1 a ERK2, které se vyznačují vysokým stupněm homologie (88% sekvenční identita) a pro účely strukturně-aktivitních studií prakticky nezáleží na tom, která z isoform je použita (v tomto případě ERK2).

V prvním kroce bylo provedeno stanovení závislosti aktivity enzymu na teplotě. K tomu bylo vedeno zjištění, že většina publikací v oboru uvádí reakční teplotu, při které byly prováděny proteinkinasové reakce 30 °C, zatímco v biochemii je obecně běžnější teplota 37 °C. Stanovení aktivity ERK2 bylo proto provedeno při obou teplotách. Zároveň byl sledován průběh reakce v čase, protože bylo nutné ověřit, zda je přírůstek produktu ve zvoleném časovém intervalu lineární. Jak ukazuje obr. 3, výsledkem pokusu byly dvě přímky. Byla tedy prokázána linearita reakce v celém sledovaném průběhu (do 30 min). Dále lze z grafu vyčíst, že reakční rychlost byla při teplotě 37 °C vyšší, ale směrodatné odchylky od průměru byly nižší při teplotě 30 °C. Na základě těchto výsledků bylo rozhodnuto, že vzhledem k vyšší přesnosti stanovení budou další reakce prováděny standardně při 30°C a inkubační doba bude 30 min.

Druhým cílem práce bylo zjistit, zda může být průběh kinasové reakce ovlivněn samotným rozpouštědlem (DMSO), které může sloužit jako nosič pro potenciální inhibitory lipofilnějšího charakteru. DMSO v nízkých koncentracích zpravidla průběh biochemických *in vitro* reakcí neovlivňuje, nicméně je potřeba to prokázat v každém

jednotlivém případě. Byly testovány koncentrace DMSO 0,2% a 0,4%, což jsou aktuální koncentrace přítomné v reakci po přidání roztoku inhibitorů připravených jako 10 mM a 5 mM zásobní roztoky. Jak ukazuje sloupcový graf (obr. 4), je možno říci, že DMSO v použitých koncentracích nemá vliv na aktivitu proteinkinasy ERK2 a nemůže tedy negativně ovlivnit interpretaci inhibičních účinků testovaných inhibitorů.

Hlavním cílem práce bylo konečné otestování série acyklických nukleosidfosfonátů na inhibiční účinky vůči proteinkinase ERK2. Tyto látky byly syntetizovány na Ústavu organické chemie a biochemie v laboratoři prof. Holého. Výsledky inhibiční aktivity byly zpracovány formou sloupcového grafu (obr. 5) a porovnány s účinkem pozitivní kontroly, 5-iodotubercidinu. Žádný ze sledovaných ANP bohužel ERK2-kinasu neinhiboval, včetně derivátů se známým antiproliferačním účinkem (PMEG, PMEDAP). Tyto negativní výsledky mohou být vysvětleny v zásadě dvojím způsobem. Pokud bude připuštěno, že ANP ERK-kinasu opravdu neinhibují, může být řečeno, že antiproliferační účinky analogů PMEG a PMEDAP jsou na inhibici ERK-kinasy nezávislé. Druhou z uvažovaných možností však je ta, že aby se ANP staly účinnými inhibitory, musejí být napřed fosforylovány. Tuto teorii by podporoval fakt, že samotné ATP, se kterým látky kompetují, je ve formě trifosfátu. Naproti tomu stojí fakt, že látka 5-iodotubercidin má inhibiční aktivitu, přestože jde o nukleosid, takže není jisté, nakolik je přítomnost fosfátů pro inhibici ERK-kinasy zásadní. V budoucnu by proto bylo vhodné otestovat též difosfáty ANP, aby se předešlo falešně negativním závěrům.

V hledání inhibitorů ERK se bude nadále pokračovat a hledat závislosti mezi strukturou a aktivitou. Vycházet se přitom bude hlavně z drobnějších strukturních obměn 5-iodotubercidinu.

6. ZÁVĚR

Vyhodnocením výsledků se dospělo k následujícím závěrům:

- Optimální teplota pro stanovení proteinkinasy ERK2 je 30 °C a optimální délka inkubace je 30 minut.
- Vehikulum (DMSO) nemá vliv na aktivitu proteinkinasy ERK2.
- Inhibiční účinky na proteinkinasu ERK2 neměla ani jedna z testovaných ANP látek.

7. SEZNAM ZKRATEK

- RTK – receptorové tyrosinkinasy
- PTP – protein-tyrosin fosfatasy
- GRB2 – guanine nucleotide-exchange factor
- MAP- kinasa – mitogen-activated protein-kinase
- ERK-kinasa – extracellular signal-regulated kinase
- JNK-kinasa – c-JUN NH₂-terminal kinase
- ATP – adenosin-5'-trifosfát
- GTP – guanosin-5'-trifosfát
- GDP – guanosin-5'-difosfát
- EGF – epidermální růstový faktor
- EGFR – receptor epidermálního růstového faktoru
- GEF – guanine nucleotide-exchange protein
- SOS – Son of senvenless
- N-RAS – neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
- H-RAS – Harvey RAS viral oncogene homolog
- K-RAS – Kirsten RAS viral oncogene homolog
- MKP – MAP-kinase phosphatase
- CML – chronická myeloidní leukémie
- GIST – gastrointestinální stromální tumor
- TK – tyrosin kinasa
- BCR – brakpoint cluster region
- Abl doména – Abelson protooncogene
- PDGF-R – platetet-derived growth factor receptor

- NSCLS – nemalobuněčný plicní karcinom
- AMP – adenosin-5'-monofosfát
- ANP – acyklický nukleosidfosfonát
- PMEPA - 9-[2-(fosfonomethoxy) ethyl]adenin
- (R)-PMPA - (R)-9-[2-(fosfonomethoxy) propyl]adenin
- PMEG - 9-[2-(fosfonomethoxy)ethyl]guanin
- PMEDAP - 2,6-diamino-9-[2-(fosfonomethoxy)ethyl]purin
- (S)-HPMPA - (S)-9-[(3-hydroxy-2-fosfonomethoxypropyl)]adenin
- (S)-HPMPDAP - (S)-9-(3-hydroxy-2-fosfonomethoxypropyl)2,6-diamino-purin
- (S)-HPMPG - (S)-9-(3-hydroxy-2-fosfonomethoxypropyl)guanin
- (R)-PMPG - (R)-9-[2-(fosfonomethoxy)propyl]guanin
- (R)-PMPDAP - (R)-9-(2-fosfonylmethoxypropyl)-2,6-diaminopurin
- TRIS - 2-amino-2-hydroxymetylpropan-1,3-diol
- EGTA - etylenglykol-bis(2-aminoetyleter)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina
- DTT - 1,4-dithiothreitol
- MBP – myelin basic protein
- MAPKK - mitogen-activated protein kinase kinase

8. LITERATURA

1. S. Q. Zhang, W. G. Tsiras, T. Araki et. al: Receptor-Specific Regulation of Phosphatidylinositol 3'-Kinase Activation by the Protein Tyrosine Phosphatase Shp2., *Molecular and cellular biology* 22(12), 4062-4072, (2002)
2. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis et al.: Komunikace mezi buňkami, v knize *Základy buněčné biologie (Úvod do molekulární biologie buňky)*, 504-511, (1998)
3. Ch. W. M. Reuter, M. A. Morgan, L. Bergmann: Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies?, *Blood* 96(5), 1655-1669, (2000)
4. R. E. Chen a J. Thorner: Function and Regulation in MAPK Signaling Pathways: Lessons Learned from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochimica Biophysica Acta* 1773(8), 1311-1340, (2007)
5. C. Leonidas, Plataniotis: Map kinase signaling and hematologic malignancies, *Blood* 101(12), 4667-4679, (2003)
6. T. Pawson, J. D. Scott: Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins, *Science* 278 (5346), 2075–2080, (1997)
7. N. G. Ahn, R. Seger, R. L. Bratlien et al.: Multiple components in an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade: in vitro activation of a myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinase., *Journal of Biological Chemistry* 266(7), 4220–4227, (1991)
8. A. Theodosiou, A. Ashworth: Map kinase phosphatase, *Genome Biology* 3(7), 3009, (2002)
9. K. L. Guan, J. E. Dixon: Bacterial and viral protein tyrosine phosphatases, *Cell Biology* 4(6), 389–396, (1993)
10. M. H. Coob, E. J. Goldsmith: How MAP Kinase Are Regulated, *The Journal of Biological Chemistry* 270 (25), 14843-14846, (1995)
11. J. Zhang, F. Zhang, D. Ebert et al.: Activity of the MAP kinase ERK2 is controlled by a flexible surface loop, *Structure* 3(3), 299-307, (1995)
12. K. S. Smalley: A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma?, *International Journal of Cancer* 104(5), 527- 532, (2003)

13. D. J. Panka, M. B. Atkins, J. W. Mier: Targeting the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in the Treatment of Malignant Melanoma, *Clinical Cancer Research* 12(7), 2371-2375, (2006)
14. M. M. Schuierer, F. Bataille, S. Hagan et al.: Reduction in Raf kinase inhibitor protein expression is associated with increased Ras-extracellular signal-regulated kinase signaling in melanoma cell lines, *Cancer Research* 64(15), 5186-5192, (2004)
15. Y. F. Wang, C. C. Jiang, K. A. Kiejda et al.: Apoptosis Induction in Human Melanoma Cells by Inhibition of MEK is Caspase-Independent and Mediated by the Bcl-2 Family Members PUMA, Bim, and Mcl-1, *Clinical Cancer Research* 13(16), 4934-42, (2007)
16. K. Novak: Highlights of the Keystone Symposium on Protein Kinases and Cancer, *Medscape General Medicine* 6(2), 25, (2004)
17. G. Giaccone, R. S. Herbst, C. Manegold, et al.: Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial INTACT 1, *Journal of Clinical Oncology* 22(5), 777-784, (2004)
18. B. S. Hendriks, L. K. Opresko, H. S. Wiley, et al.: Coregulation of epidermal growth factor receptor/human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) levels and locations: quantitative analysis of HER2 overexpression effects, *Cancer Research*, 63(5), 1130-1137, (2003)
19. M. Hájek, N. Matulová, I. Votruba et al.: Inhibition of human telomerase by diphosphates of acyclic nucleoside phosphonates, *Biochemical Pharmacology* 70, 894-900, (2005)
20. A. Holý: Phosphonmethoxyalkyl analogs of nucleotides, *Current Pharmaceutical Design* 9(31), 2567-2592, (2003)
21. R. Kaminsky, C. Schmid, Y. Grether: (*S*)-9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)adenine[(*S*)-H PM PA]: a purine analogue with trypanocidal activity *in vitro* and *in vivo*, *Tropical Medicine and International Health* 1(2), 255-263, (1996)
22. M. A. Wainberg, M. D. Miller, Y. Quan et al.: In vitro selection and characterization of HIV-1 with reduced susceptibility to PMPA, *Antiviral Therapy* 4(2), 87-94, (1999)

23. J. W. Kreider, K. Balogh, R. O. Olson, J. C. Martin: Treatment of latent rabbit and human papillomavirus infections with 9-(2-phosphonylmethoxy)ethylguanine (PMEG), *Antiviral Research* 14(1), 51-58, (1990)
24. H. Reiser, J. Wang, L. Chong et al.: GS-9219-A Novel Acyclic Nucleotide Analogue with Potent Antineoplastic Activity in Dogs with Spontaneous Non-Hodgkin's Lymphoma, *Clinical Cancer Research* 14(9), 2824-2832, (2008)
25. L. Naesens, J. Neyts, J. Balzarini et al.: Efficacy of oral 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)-2,6-diaminopurine (PMEDAP) in the treatment of retrovirus and cytomegalovirus infections in mice, *Journal of Medical Virology* 39(2), 167-172, (1993)
26. T. W. Vahlenkamp, A. de Ronde, J. Balzarini: (*R*)-9-(2-Phosphonylmethoxypropyl)-2,6-Diaminopurine Is a Potent Inhibitor of Feline Immunodeficiency Virus Infection, *Antimicrobial agents and chemotherapy* 39(3), 746-749, (1995)
27. R. Kaminsky, E. Zweygarth, E. De Clercq: Antitrypanosomal Activity of Phosphonylmethoxyalkylpurines, *American Society of Parasitologists* 80(6), 1026-1030, (1994)
28. P. Franchetti, G. A. Sheikha, Cappellacci et al.: Synthesis and antiviral activity of 8-aza analogs of chiral [2-(phosphonomethoxy) propyl]guanines, *Journal of Medical Chemistry* 38(20), 4007-40013, (1995)
29. B. J. Terry, K. E. Mazina, A. V. Tuomari et al.: Broad-spectrum antiviral activity of the acyclic guanosine phosphonate (R,S)-HPMPG: *Antiviral Research* 10(4-5), 235-251, (1998)
30. F. Vincent, M. F. Van den Berghe, G.: Mechanisms of elevation of adenosine levels in anoxic hepatocytes, *Biochemical Journal* 290, 671-677, (1993)
31. A. Klippel, W. M. Kavanaugh, D. Pot: A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain, *Molecular and Cellular Biology* 17(1), 338-344, (1999)
32. K. Ueki, P. Algenstaedt, Mauvais-Jarvis: Positive and negative regulation of phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathways by three different gene products of the p85alpha regulatory subunit, *Molecular and Cellular Biology* 20(21), 8035-8046, (2000)

8. LITERATURA

1. S. Q. Zhang, W. G. Tsiaras, T. Araki, G. Wen, L. Minichiello, R. Klein, B. G. Neel: Receptor-Specific Regulation of Phosphatidylinositol 3'-Kinase Activation by the Protein Tyrosine Phosphatase Shp2., *Molecular and cellular biology* 22(12), 4062-4072, (2002)
2. B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter.: Komunikace mezi buňkami, v knize *Základy buněčné biologie (Úvod do molekulární biologie buňky)*, 504-511, (1998)
3. Ch. W. M. Reuter, M. A. Morgan, L. Bergmann: Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies?, *Blood* 96(5), 1655-1669, (2000)
4. R. E. Chen a J. Thorner: Function and Regulation in MAPK Signaling Pathways: Lessons Learned from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemica Biophysica Acta* 1773(8), 1311-1340, (2007)
5. C. L. Platanius: Map kinase signaling and hematologic malignancies, *Blood* 101(12), 4667-4679, (2003)
6. T. Pawson, J. D. Scott: Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins, *Science* 278 (5346), 2075–2080, (1997)
7. N. G. Ahn, R. Seger, R. L. Bratlien, C. D. Diltz, N. K. Tonks, E. G. Krebs: Multiple components in an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade: in vitro activation of a myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinase., *Journal of Biological Chemistry* 266(7), 4220–4227, (1991)
8. A. Theodosiou, A. Ashworth: Map kinase phosphatase, *Genome Biology* 3(7), 3009, (2002)
9. K. L. Guan, J. E. Dixon: Bacterial and viral protein tyrosine phosphatases, *Cell Biology* 4(6), 389–396, (1993)
10. M. H. Coob, E. J. Goldshmith: How MAP Kinase Are Regulated, *The Journal of Biological Chemistry* 270 (25), 14843-14846, (1995)

11. J. Zhang, F. Zhang, D. Ebert, M. H. Cobb, E. J. Goldsmith.: Activity of the MAP kinase ERK2 is controlled by a flexible surface loop, *Structure* 3(3), 299-307, (1995)
12. K. S. Smalley: A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma?, *International Journal of Cancer* 104(5), 527- 532, (2003)
13. D. J. Panka, M. B. Atkins, J. W. Mier: Targeting the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in the Treatment of Malignant Melanoma, *Clinical Cancer Research* 12(7), 2371-2375, (2006)
14. M. M. Schuierer, F. Bataille, S. Hagan, W. Kolch, A. K. Bosserhoff: Reduction in Raf kinase inhibitor protein expression is associated with increased Ras-extracellular signal-regulated kinase signaling in melanoma cell lines, *Clinical Cancer Research* 64(15), 5186-5192, (2004)
15. Y. F. Wang, C. C. Jiang, K. A. Kiejda, S. Gillespie, X. D. Zhang , P. Hersey: Apoptosis Induction in Human Melanoma Cells by Inhibition of MEK is Caspase-Independent and Mediated by the Bcl-2 Family Members PUMA, Bim, and Mcl-1, *Clinical Cancer Research* 13(16), 4934-42, (2007)
16. K. Novak: Highlights of the Keystone Symposium on Protein Kinases and Cancer, *Medscape General Medicine* 6(2), 25, (2004)
17. G. Giaccone, R. S. Herbst, C. Manegold, et al.: Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial INTACT 1, *Journal of Clinical Oncology* 22(5), 777-784, (2004)
18. B. S. Hendriks, L. K. Opresko, H. S. Wiley, H. S. Wiley, D. Lauffenburger.: Coregulation of epidermal growth factor receptor/human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) levels and locations: quantitative analysis of HER2 overexpression effects, *Clinical Cancer Research*, 63(5), 1130-1137, (2003)
19. M. Hájek, N. Matulová, I. Votruba, A. Holý, E. Tloušťová: Inhibition of human telomerase by diphosphates of acyclic nucleoside phosphonates, *Biochemical Pharmacology* 70, 894-900, (2005)
20. A. Holý: Phosphonomethoxyalkyl analogs of nucleotides, *Current Pharmaceutical Design* 9(31), 2567-2592, (2003)

21. R. Kaminsky, C. Schmid, Y. Grether: (*S*)-9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)adenine[(*S*)-H PM PA]: a purine analogue with trypanocidal activity *in vitro* and *in vivo*, *Tropical Medicine and International Health* 1(2), 255-263, (1996)
22. M. A. Wainberg, M. D. Miller, Y. Quan, H. Salomon, A. S. Mulato, P. D. Lamy, N. A. Margot, K. E. Anton, J. M. Cherrington: In vitro selection and characterization of HIV-1 with reduced susceptibility to PMPA, *Antiviral Therapy* 4(2), 87-94, (1999)
23. J. W. Kreider, K. Balogh, R. O. Olson, J. C. Martin: Treatment of latent rabbit and human papillomavirus infections with 9-(2-phosphonylmethoxy)ethylguanine (PMEG), *Antiviral Research* 14(1), 51-58, (1990)
24. H. Reiser, J. Wang, L. Chong et al.: GS-9219-A Novel Acyclic Nucleotide Analogue with Potent Antineoplastic Activity in Dogs with Spontaneous Non-Hodgkin's Lymphoma, *Clinical Cancer Research* 14(9), 2824-2832, (2008)
25. L. Naesens, J. Neyts, J. Balzarini, A. Holy, I. Rosenberg, E. De Clercq.: Efficacy of oral 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)-2,6-diaminopurine (PMEDAP) in the treatment of retrovirus and cytomegalovirus infections in mice, *Journal of Medical Virology* 39(2), 167-172, (1993)
26. T. W. Vahlenkamp, A. de Ronde, J. Balzarini: (*R*)-9-(2-Phosphonylmethoxypropyl)-2,6-Diaminopurine Is a Potent Inhibitor of Feline Immunodeficiency Virus Infection, *Antimicrobial agents and chemotherapy* 39(3), 746-749, (1995)
27. R. Kaminsky, E. Zwegarth, E. De Clercq: Antitrypanosomal Activity of Phosphonylmethoxyalkylpurines, *American Society of Parasitologists* 80(6), 1026-1030, (1994)
28. P. Franchetti, G. A. Sheikha, C. M. Grifantini, A. De Montis, G. Piras, G. Loi, P. La Colla: Synthesis and antiviral activity of 8-aza analogs of chiral [2-(phosphonomethoxy) propyl]guanines, *Journal of Medical Chemistry* 38(20), 4007-40013, (1995)
29. B. J. Terry, K. E. Mazina, A. V. Tuomari, M. L. Haffey, M. Hagen, A. Feldman, W. A. Slusarchyk, M. G. Young, R. Zahler, A. K. Field: Broad-spectrum antiviral activity of the acyclic guanosine phosphonate (R,S)-HPMPG: *Antiviral Research* 10(4-5), 235-251, (1998)

, M. F. Van den Berghe, G.: Mechanisms of elevation of adenosine levels in hepatocytes, *Biochemical Journal* 290, 671-677, (1993)

el, W. M. Kavanaugh, D. Pot: A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain, *Molecular and Cellular Biology* 17(1), 338-344, (1997)

, P. Algenstaedt, Mauvais-Jarvis: Positive and negative regulation of phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signaling pathways by three different genes of the p85alpha regulatory subunit, *Molecular and Cellular Biology* 20(15), 8035-8046, (2000)