

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

OVLIVNĚNÍ KINAS UPLATŇUJÍCÍ SE V PATOGENEZI
ALZHEIMEROVY CHOROBY

Vedoucí diplomové práce:

PharmDr. Jakub Chlebek, Ph.D.

Vedoucí katedry:

Doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, 2016

Bc. Iveta Polzerová

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE

FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRALOVE

DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY
AND ECOLOGY

DIPLOMA THESIS

USE OF KINASE MODULATION IN THE ALZHEIMER'S DISEASE
PATHOGENESIS

Supervisor: PharmDr. Jakub Chlebek, Ph.D.

Head of Department: Doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, 2016

Bc. Iveta Polzerová

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat PharmDr. Jakobovi Chlebkovi, PhD. za odborné vedení, poskytnuté rady a cenné připomínky při vypracování mé diplomové práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, duben 2016

.....

podpis

Obsah

1	Úvod	10
2	Alzheimerova choroba.....	12
2.1	Charakteristika	12
2.2	Etiopatogeneze	12
2.3	Rizikové faktory.....	13
2.4	Současná léčba	13
2.4.1	Inhibitory cholinesteras.....	14
2.4.2	Inhibitory NMDA receptorů.....	14
3	Kinasy jako potenciální terapeutický zásah u AD.....	15
3.1	Glykogensynthasa kinasa-3.....	15
3.1.1	GSK-3 α	17
3.1.2	GSK-3 β	18
3.1.2.1	Regulace enzymové aktivity GSK-3 β	18
3.1.2.2	Dysregulace a patofyziologické vlastnosti GSK-3 β	20
3.2	Kaseinkinasa-1	27
3.2.1	CK-1 δ	29
3.2.1.1	Fyziologické funkce CK-1 δ	30
3.2.1.2	Patofyziologické funkce CK-1 δ	31
3.3	Cyklin-dependentní kinasa-5	32
3.4	C-Jun N-terminální kinasa	33
3.5	Apoptózou regulovaná kinasa-1	34
3.6	Extracelulárními signály regulovaná kinasa	36
3.7	p38 MAPK	36
3.8	cAMP-dependentní proteinkinasa.....	37
3.9	Fyn.....	38
3.10	Duálně specifická fosforylací tyrosinu regulovaná kinasa.....	39
3.11	Adenosinmonofosfátem aktivovaná proteinkinasa	40
3.12	Mikrotubulární afinitu-regulující kinasa	41
4	Inhibice GSK-3 β , CK-1 δ	43
4.1	Metody pro stanovení inhibice enzymů <i>in vitro</i>	46
4.1.1	Kapalinová scintilační spektrometrie.....	46

4.1.2	Hmotnostní spektrometrie.....	48
4.1.3	NMR spektroskopie	48
4.1.4	Luminiscenční metody.....	49
4.1.5	Multiplexní kapilární elektroforéza	50
4.1.6	Imunochemické metody.....	50
4.1.6.1	Western blot	51
4.1.6.2	Imunoprecipitace.....	52
4.1.6.3	ELISA	53
4.1.7	Molekulárně genetické metody.....	53
4.1.7.1	qPCR	53
4.2	Výzkum inhibice kinas <i>in silico</i>	54
4.3	Syntetické inhibitory	55
4.3.1	Syntetické ATP-kompetitivní inhibitory	55
4.3.1.1	Aminopyrimidiny	55
4.3.1.2	Maleimidy	56
4.3.1.3	Aminothiazoly.....	57
4.3.1.4	Paullonové sloučeniny	58
4.3.2	Syntetické ATP-nekompetitivní inhibitory.....	59
4.3.2.1	Thiazolidiny	59
4.3.2.2	Halomethylketonové deriváty	60
4.4	Přírodní inhibitory.....	61
4.4.1	Přírodní ATP-kompetitivní inhibitory	62
4.4.1.1	Meridianiny	62
4.4.1.2	Indirubiny	64
4.4.1.3	Hymenialdisiny	66
4.4.1.4	Hydantoiny	67
4.4.2	Přírodní ATP-nekompetitivní inhibitory	68
4.4.2.1	Furanoseskviterpeny	68
4.4.2.2	Manzaminy.....	70
5	Závěr.....	72
6	Použitá literatura.....	75
7	Abstrakt	90
8	Abstract.....	91

Seznam použitých zkratek a vysvětlivek

A β	β -amyloid
AD	Alzheimerova choroba
ADAM	komplex α -disintegrin a metaloproteinasy
ADME	absorpce-distribuce-metabolismus-exkrece
ACH	acetylcholin
ACHE	acetylcholinesterasa
Akt	proteinkinasa B
AMPK	adenosinmonofosfátem aktivovaná proteinkinasa
APP	amyloidový prekurzorový protein
ASK-1	apoptózou regulovaná kinasa-1
ATP	adenosintrifosfát
BCHE	butyrylcholinesterasa
Cdk-5	cyklin-dependentní kinasa-5
Cdks	cyklin-dependentní kinasy
CK-1 δ	kaseinkinasa-1 δ
CNS	centrální nervový systém
DYRK-1A	duálně specifická fosforylační tyrosinu regulovaná kinasa-1A
EKR	extracelulárními signály regulovaná kinasa
GSK-3 α	glykogensynthasa kinasa-3 α
GSK-3 β	glykogensynthasa kinasa-3 β
HEB	hematoencefalická bariéra

IC ₅₀	poloviční hodnota maximální inhibiční koncentrace
JNK	c-Jun N-terminální kinasa
MARK	mikrotubulární afinitu-regulující kinasa
NFTs	neurofibrilární klubka
NMDA	<i>N</i> -methyl D-aspartát
p38 MAPK	p38 mitogenem aktivovaná kinasa
PI-3	fosfoinositid-3
PKA	cAMP-dependentní proteinkinasa
PKC	proteinkinasa C
PS-1	prenilin-1
ROS	reaktivní kyslíkové sloučeniny
Ser	serin
TDZD	thiazolidiny
Thr	threonin
TNF	tumor nekrotizující faktor
Tyr	tyrosin
WNT	Wingless/Int-1

Přehled obrázků, tabulek, grafů

Přehled obrázků

Obrázek 1: Rozdíly ve struktuře GSK-3 α a GSK-3 β	17
Obrázek 2: Neurodegenerativní změny v mozku u AD.....	22
Obrázek 3: Mechanismy spojující AD a diabetes.....	25
Obrázek 4: GSK-3 β a patologický zánět	26
Obrázek 5: Struktura CK-1 δ	30
Obrázek 6: ATP-vazebná místa v molekule GSK-3 β	45
Obrázek 7: CHIR-98014.....	56
Obrázek 8: SB-216763 a SB-415286.....	57
Obrázek 9: AR-A014418	58
Obrázek 10: Paullonové sloučeniny	59
Obrázek 11: TDZD-8.....	60
Obrázek 12: Reverzibilní a ireverzibilní inhibitor.....	61
Obrázek 13: A – <i>Hexaplex trunculus</i> , B – „Tyrian purple“, C – 6BIO.....	66
Obrázek 14: A – <i>Axinella sp.</i> , B – Dibromokantharellin.....	67
Obrázek 15: <i>Hemimyscale arabica</i>	68
Obrázek 16: A – <i>Ircinia sp.</i> , B – Palinurin a trikantin.....	69
Obrázek 17: A – <i>Acanthostrongylophora igens</i> , B – Manzamin A.....	71

Přehled tabulek

Tabulka 1: Přehled syntetických analogů meridianinů vhodných pro potenciální terapii rakoviny a AD.....	64
---	----

1 Úvod

Alzheimerova choroba (AD) je chronické, progresivní, neurodegenerativní onemocnění mozku, při kterém postupně dochází k ireverzibilní poruše kognitivních a behaviorálních funkcí [1, 2]. Klinicky se projevuje syndromem demence [3]. V současné době je AD považována za její nejčastější příčinu, neboť se podílí na 70 % všech demencí u starších lidí [4]. AD objevil v roce 1906 německý lékař Alois Alzheimer poté, co si všiml změny mozkové tkáně u ženy, která zemřela na neobvyklou duševní vadu [1]. AD obvykle začíná nenápadně, v konečné fázi nemoci již pacient není schopen vykonávat běžné každodenní činnosti a stává se zcela závislým na pomoci svého okolí. První symptomy se vyskytují u lidí starších 60 let [1]. AD končí letálně, nejčastěji následkem úrazů nebo pacient umírá na infekci [3, 5]. Patří mezi nejčastější primární příčinu smrti [3]. Prodleva AD od objevení prvních symptomů do úmrtí nemocného je přibližně 8 až 10 let [5].

Počet nemocných s AD stále narůstá z důvodu celosvětového stárnutí populace [6]. V České republice se v současné době vyskytuje přibližně 70 tisíc nemocných [3]. V roce 2012 bylo evidováno ve světě 36 milionů lidí trpících AD, předpokládá se, že v roce 2030 se tento počet zdvojnásobí a v roce 2050 počet nemocných vzroste na 115 milionů [4]. AD představuje významný zdravotnický, ale i ekonomický a sociální problém. Tato choroba způsobuje ničivý emocionální dopad nejen na samotné pacienty, ale také na jejich rodinu a ošetřovatele [2]. Postihuje jedince ve všech zemích světa [4].

Současná léčba této choroby je pouze symptomatická, jejímž cílem je zmírnit příznaky nemoci, zpomalit nástup progresu a co nejvíce oddálit těžká stádia [3]. Dělí se na terapii kognitivní, jejímž úkolem je zlepšit kognitivní funkce pacienta, a terapii nekognitivní, která se zaměřuje na poruchy behaviorální [2, 3]. Mezi léky používající se v kognitivní terapii patří inhibitory cholinesteras a inhibitory *N*-methyl *D*-aspartátových (NMDA) receptorů. Jejich účinky jsou však omezené. Do nekognitivní léčby spadají běžné psychotropní látky, jako jsou například antidepresiva, lithium, antiepileptika, atypická antipsychotika druhé generace a další. Uplatňuje se i nefarmakologická léčba, jejíž nevýhodou je, že nemá vliv na oddálení neurodegenerativní progresu, neboť se zaměřuje pouze na zmírnění symptomů [2].

Kauzální terapie je ve věci výzkumu. Stěžejním předmětem bádání je najít způsob, jak zastavit produkci nerozpustného amyloidu β ($A\beta$), a tím snížit jeho depozici v mozku. Možným řešením je například inhibice β -sekretasy spolu s γ -sekretasou [2]. Dalším, dnes nadějným způsobem, je hledání inhibitorů mnoha kinas podílejících se na patogenezi AD. Zásadní kinasou je především glykogensynthasa kinasa-3 β (GSK-3 β), enzym způsobující hyperfosforylaci τ -proteinu [7]. Výzkum je zaměřen na vývoj syntetických inhibitorů GSK-3 β , ale i na vyhledávání biologicky aktivních látek v přírodních zdrojích. Cílovou skupinou jsou například alkaloidy v mořských houbách a bezobratlých [8, 9].

Tato rešeršní diplomová práce je zaměřena na ovlivnění kinas uplatňující se v patogenezi AD. Krátce pojednává o charakteristice a etiopatogenezi AD, popisuje fyziologické a patofyziologické funkce zejména GSK-3 β a kaseinkinasy-1 δ (CK-1 δ) v organismu, zmiňuje se o dalších kinasach podílejících se na patogenezi AD, zabývá se metodami testování aktivity a inhibice kinas *in vitro* a *in silico*, uvádí příklady syntetických inhibitorů. Cílem této diplomové práce je vytvořit přehled dosud prozkoumaných přírodních látek (z mořských organismů) s inhibiční kinasovou aktivitou, které by mohly mít přínos a využití jako potenciální cíl v terapii AD. Diplomová práce čerpá především ze zahraniční odborné literatury.

2 Alzheimerova choroba

2.1 Charakteristika

AD je nejčastějším typem demence u lidí středního a především vyššího věku [5]. Symptomy se poprvé objevují zpravidla u lidí starších 60 let [1]. Představuje velmi závažné, chronické, progresivní, neurodegenerativní onemocnění mozku. Progrese je u každého jedince velmi individuální [1]. Prodleva od objevení prvních symptomů do úmrtí nemocného činí přibližně 8 až 10 let [5]. Typický pro AD je pozvolný a nenápadný nástup. Postupně dochází k poruchám kognitivních (poznávacích) funkcí, které jsou ireverzibilní. Rozvíjí se deficit v procesu myšlení a uvažování, pozornosti, paměti a vzpomínání. V pokročilejší fázi se objevuje neschopnost učit se nové informace a mohou se vyskytnout problémy s prováděním všedních úkolů, které zahrnují více kroků (například oblékání). Pacient může mít problémy s řečí a často bývá dezorientován v čase a prostoru [1]. Poškozují se rovněž behaviorální funkce. Jedince mohou sužovat psychiatrické potíže, jako je deprese, úzkost, psychóza, halucinace nebo agrese [2]. V konečné fázi nemoci již pacient nepoznává blízké osoby a není schopen vykonávat běžné každodenní činnosti. Stává se zcela závislým na pomoci svého okolí [1].

2.2 Etiopatogeneze

Přesná etiopatogeneze AD dodnes není zcela známa. Předpokládá se, že klíčovou roli zde hraje $A\beta$, bílkovinný agregát skládající se z 36 až 43 aminokyselin [10]. $A\beta$ vzniká z amyloidového prekurzorového proteinu (APP), transmembránového glykoproteinu nacházejícího se v mnoha tkáních, zejména však na synapsích neuronů. Podílí se především na transportu železa a regulaci vytváření synapsí [11].

APP je za fyziologických podmínek štěpen enzymem α -sekretasou na rozpustný peptidový fragment neamyloidového typu o velikosti 1 až 39 aminokyselin vyznačující se neuroprotektivní aktivitou a podílející se na plasticitě neuronů [3, 7]. Za patologických podmínek je APP štěpen enzymem β -sekretasou a γ -sekretasou na delší nerozpustné fragmenty tvořené 40 až 42 aminokyselinami, které nejprve oligomerují za vzniku výrazně neurotoxických oligomerů, které jsou mnohem toxičtější než vlastní $A\beta$. Následně v mezibuněčných prostorech mozkové kůry polymerují a koagulují v $A\beta$ [3]. Extraneuronální akumulací $A\beta$ dochází k syntéze senilních

neuronálních plaků, a tím k brzkému zániku neuronů, intraneuronální akumulace souvisí s hyperfosforylací mikrotubulárních τ -proteinů a s tvorbou intraneuronálních neurofibrilárních klubek (NFTs), které rovněž přispívají k neuronální smrti [2]. Procesy spojené s $A\beta$ vyvolávají zvýšené uvolňování reaktivních kyslíkových sloučenin (ROS), toxicitu a zánět, deficit acetylcholinu (ACH), které zvyšují progresi a manifestaci onemocnění [3].

Vědci se domnívají, že ke strukturálním změnám v mozkové tkáni dochází zhruba 10 let před výskytem prvních symptomů AD [1, 10]. Anatomické abnormality jsou vysoce selektivní pro určité oblasti mozku, s progresí onemocnění se rozšiřují. Primárně je poškozen hippokampus, který souvisí s ranou ztrátou paměti a poruchou kognitivních funkcí [1].

2.3 Rizikové faktory

Vznik AD může být ovlivněn několika rizikovými faktory, mezi které se řadí především věk (nejrizikovější faktor), dále pohlaví, způsob životního stylu, hypercholesterolémie, hypertenze, úraz hlavy a genetická predispozice, která je příčinou familiární formy AD, pro kterou je typický časný nástup symptomů [6]. Tento typ AD je spojen s mutacemi v APP, konkrétně s mutací genu kódující prenisilin-1 (PS-1) a genu pro prenisilin-2 (PS-2). PS-1 a PS-2 jsou transmembránové proteiny, které ve zmutovaném stavu mohou působit jako γ -sekretasy a mohou štěpit APP na delší nerozpustné fragmenty vedoucí ke vzniku $A\beta$ [10, 11].

2.4 Současná léčba

AD je nevléčitelnou nemocí. Jelikož není známá přesná příčina jejího vzniku, neexistuje v současné době kauzální léčba. Terapie této choroby je pouze symptomatická. Jejím cílem je zmírnit příznaky nemoci, zpomalit nástup progresu a co nejvíce oddálit těžká stádia [3]. Symptomatická léčba se dělí na terapii kognitivní, jejímž úkolem je zlepšit kognitivní funkce pacienta, a terapii nekognitivní, která se zaměřuje na poruchy behaviorální a spolu vyskytující se psychiatrické obtíže. Z hlediska kognitivní terapie jsou v současné době v klinickém užívání pouze dvě skupiny látek – inhibitory cholinesteras a inhibitory NMDA receptorů [2, 3].

2.4.1 Inhibitory cholinesteras

Inhibitory cholinesteras – acetylcholinesterasy (ACHE) a butyrylcholinesterasy (BCHE) jsou určeny pro léčbu lehkých až středních forem AD. Studie prokázaly jejich možné pozitivní účinky i u těžších forem. Tyto inhibitory zlepšují acetylcholinergní transmissi tím, že zvyšují množství ACH na synapsích prostřednictvím inhibice enzymů (ACHE a BCHE), jejichž funkcí je degradace ACH [3].

V současnosti jsou k dispozici tři kognitiva – galanthamin (inhibitor ACHE), donepezil (inhibitor ACHE s nízkou afinitou k BCHE) a rivastigmin (inhibitor ACHE i BCHE) [3]. Tato kognitiva mohou doprovázet nežádoucí účinky v podobě gastrointestinálních potíží. Čtvrté kognitivum, seskviterpenový alkaloid nazývaný huperzin A, byl poprvé izolován v roce 1980 v Číně z plavuně *Huperzia serrata*. Představuje silný, reverzibilní, selektivní inhibitor ACHE. Závěry mnoha preklinických a klinických studií potvrzují, že vykazuje příznivý účinek na průběh AD a zlepšuje kognitivní funkce [12]. Lépe prostupuje hematoencefalickou bariérou (HEB), dokáže ACHE inhibovat déle než galanthamin, donepezil nebo rivastigmin a vykazuje lepší biologickou dostupnost po perorálním podání. V terapii AD je využíván v Číně, v USA a v Evropě podléhá klinickému testování [13].

2.4.2 Inhibitory NMDA receptorů

Správná funkce NMDA receptorů je důležitá pro normální činnost neuronů. U AD dochází k nadměrné aktivaci NMDA receptorů přispívající ke vzniku excitotoxicity, která napomáhá zvýšenému zaplavení buněk kalciumem, způsobující poškození neuronů až jejich buněčnou smrt. Tento jev souvisí s poklesem kognitivních funkcí [14].

V klinické praxi se jako nekompetitivní antagonistu využívá memantin – derivát adamantanu. Jeho funkcí je blokáda nadměrné aktivity NMDA receptorů bez narušení normální aktivity. Bylo prokázáno, že memantin má neuroprotektivní vlastnosti [14]. Je obecně dobře tolerovanou látkou, u pacientů je dobře snášen bez výskytu nežádoucích účinků [3, 14]. V Evropě a v USA byl schválen pro léčbu AD [14].

3 Kinasy jako potenciální terapeutický zásah u AD

Vedle symptomatické terapie existují přístupy, které jsou v současné době ověřovány a jeví se jako perspektivní. Jedná se o látky, které mají schopnost inhibovat zejména tvorbu, oligomeraci a ukládání A β , odstraňovat neuronální senilní plaky, potlačovat fosforylaci a degradaci τ -proteinu. Do těchto perspektivních zásahů patří inhibice β -sekretasy a γ -sekretasy, stimulace aktivity α -sekretasy, modulátory γ -sekretasy, agonisté jádrového transkripčního faktoru PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor), blokátory oligomerace solubilního A β , imunoterapie zaměřená vůči A β , agonisté nikotinových receptorů, agonisté M1 muskarinových receptorů, antagonisté receptorů pro konečné produkty pokročilé glykace, sloučeniny MPACs (metal-protein attenuating compounds) blokuující agregaci A β a další. Do perspektivních zásahů v terapii AD patří i dnes nadějný způsob – inhibice kinas, především GSK-3 β [3].

Kinasy jsou enzymy, které jsou schopny procesu fosforylace. To znamená, že přenášejí fosfátovou skupinu z donorové molekuly s velkou energií, například z adenosintrifosfátu (ATP), na určitou cílovou skupinu, tzv. substrát [15]. Nejvýznamnější jsou proteinové kinasy, které za vzniku esterové vazby přemísťují fosfátovou skupinu na cílový protein, konkrétně dochází k vazbě mezi přenášenou skupinou fosfátu a hydroxylovou skupinou postranního řetězce aminokyseliny [15, 16]. Podle typu fosforylované aminokyseliny se fosforylace proteinů dělí na dva základní typy. Jedním z nich je fosforylace tyrosinu (tzv. tyrosinkinasy), druhým je fosforylace serinu/threoninu (tzv. serin-threoninové kinasy) [15]. U prokaryot, a zejména u eukaryotických organismů, hraje fosforylace serinu, threoninu nebo tyrosinových zbytků proteinovými kinasami důležitou roli v mnoha významných buněčných procesech [15, 16].

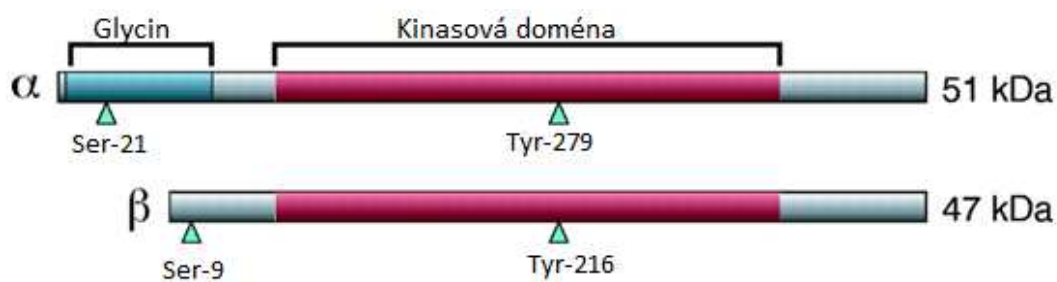
3.1 Glykogensynthasa kinasa-3

Glykogensynthasa kinasa-3 (GSK-3) je serin-threoninová proteinová kinasa patřící do rodiny glykogensynthasy. Vyskytuje se u všech eukaryot [17]. Poprvé byla objevena v roce 1980 v souvislosti s regulací metabolismu glykogenu [2]. Později bylo prokázáno, že se jedná o klíčový enzym zúčastňující se buněčného dělení, proliferace, pohybu a přežívání buněk a je součástí kaskády signální transdukce velkého množství

růstových faktorů, cytokinů, aminokyselin a insulinu [2, 17]. Tvoří součást Wingless/Int-1 (WNT) signální dráhy, ovlivňuje embryogenezi a homeostázu u dospělých jedinců [2]. Podílí se také na řadě patologických stavů, včetně rakoviny, diabetu mellitu druhého typu a v současné době je stále více chápána jako součást důležitých onemocnění neurologického druhu, mezi které se řadí především AD, bipolární porucha, Parkinsonova choroba a další [17, 18]. GSK-3 reguluje neurogenezi, polarizaci neuronů, tvorbu a růst axonů v mozku. Zvýšená aktivita GSK-3 je nezbytná pro migraci neuronů do kortikální vrstvy, zatímco nižší aktivita je důležitá pro adherenci neuronálních progenitorových buněk v subkortikální zóně mozku. GSK-3 se nachází v různých tkáních organismu [2].

GSK-3 fosforyluje a reguluje přes 40 různých substrátů, včetně signálních a strukturálních proteinů, transkripčních faktorů, mikrotubulárního τ -proteinu a PS-1 [17]. GSK-3 katalyzuje substráty, které jsou nejprve aktivovány nebo prefosforylovány jinými kinasami, a je jednou z mála proteinových kinas, které mohou být inhibovány extracelulárními dráhami, jež indukují rychlou reverzibilní fosforylaci samotné GSK-3 [19]. Aktivita GSK-3 může být regulována navázáním na proteiny, jako je β -katenin, axin, APC (adenomatous polyposis coli) a kaseinkinasa-1 (CK-1), defosforylací způsobenou fosfatasou-1 (PP-1) a fosfatasou-2 (PP-2), fosforylací prostřednictvím kinas – ribozomální S6 kinasou, p90 ribozomální S6 kinasou, cyklický adenosinmonofosfát (cAMP)-dependentní proteinkinasa (PKA) a proteinkinasa C (PKC) [17]. Léčba sérem, insulinem nebo růstovými faktory vede k redukci aktivity během 10 minut o 30 až 70 % [19].

U savců existují dvě isoformy GSK-3 – isoforma GSK-3 α , která je kódována genem *GSK3A* na devatenáctém chromozomu v pozici 19q13.2, a GSK-3 β , jež je exprimována *GSK3B* genem na třetím chromozomu v lokalizaci 3q13.33 [17, 20, 21]. Obě formy se vyznačují téměř identickou doménovou morfologií a substrátovou specifitou *in vitro* [20]. Hlavní kinasová doména u GSK-3 α je tvořena tyrosinem-279 (tyr-279), u isoformy GSK-3 β tyrosinem-216 (tyr-216) (Obrázek 1). Základní rozdíly mezi GSK-3 α a GSK-3 β byly objeveny v N-terminální a C-terminální části řetězců. GSK-3 α je charakteristická delším N-terminálním úsekem a obsahuje zde větší množství glycinu. V posledních 76 C-terminálních zbytcích jsou obě isoformy obzvláště variabilní, shodují se pouze ze 36 % [20]. Bylo zjištěno, že vymizení funkce jedné isoformy není kompenzováno isoformou stávající [2].



Obrázek 1: Rozdíly ve struktuře GSK-3α a GSK-3β. Upraveno podle [20].

3.1.1 GSK-3α

Isoforma GSK-3α je monomer o velikosti 51 kDa skládající se ze 483 aminokyselin [20, 21]. Nachází se v buněčném cytosolu, jádře, mitochondriích a cytoskeletu. Exprimována je ve všech tkáních. Ke zvýšení enzymové aktivity dochází fosforylací tyr-279, fosforylací na serinu-21 (ser-21) se její aktivita snižuje. Je zapojena do kontroly různých regulačních proteinů, mikrotubulů a transkripčních faktorů. GSK-3α dokáže fosforylovat, a tím inaktivovat glykogensynthasu, APC, axin-1, β-kenin, u většiny substrátů vyžaduje prefosforylaci jiným enzymem. Prostřednictvím fosforylace antiapoptického proteinu MCL-1 (myeloid cell leukemia-1) může kontrolovat buněčnou apoptózu v odpovědi na nedostatek růstových faktorů. Působí jako negativní regulátor v hormonální kontrole homeostázy glukosy a reguluje metabolismus glykogenu v játrech. Může být zapojena do regulace replikace β-buněk v pankreatu. Důležitou roli hraje ve WNT a fosfoinositid-3 (PI-3) kinasové dráze. Je nezbytná pro vytváření polarity neuronů a růst axonů. Vysoká exprese a aktivita GSK-3α byla nalezena v kosterním svalu s diabetem mellitus druhého typu. Podílí se také na vzniku schizofrenie a AD, kde reguluje vznik Aβ při štěpení APP v mozku [21]. Zjistilo se, že má rovněž úlohu při vzniku nádorového bujení. Podle posledních studií bylo objeveno, že GSK-3α hraje predominantní roli u rakoviny slinivky břišní a umí inhibovat karcinom prostaty. Snížením exprese GSK-3α dochází k potlačení proliferace nádorových buněk a ke zvýšení apoptózy [22].

Fyziologické a patofyziologické vlastnosti GSK-3α nebyly doposud probádány do hloubky, neboť se předpokládá, že v etiologii nemocí nemá zásadní význam jako isoforma GSK-3β [22].

3.1.2 GSK-3 β

GSK-3 β se vyskytuje v celé živočišné říši. Je důležitá pro správný vývoj jedince [23]. Exprimována je ve všech typech tkání [11]. Poprvé byla izolována z kosterní svaloviny. Následně se zjistilo, že v nejvyšší koncentraci se nachází v mozkové tkáni, zejména v neuronech. Je nezbytná pro formování synapsí a prodlužování dendritů u novorozenců. Zvýšená exprese v mozku je zapotřebí k neuronální signalizaci. GSK-3 β je hlavním regulátorem neurogeneze v hippocampu u dospělých. Jedná se o multifunkční kinasu, která se podílí na energetickém metabolismu, průběhu buněčného cyklu a je součástí mnoha signálních drah [23]. Bylo zjištěno, že hladina GSK-3 β je zvýšena ve stárnoucím mozku a rovněž u lidí trpících AD [5]. Nadměrná exprese této kinasy u dospělých jedinců narušuje správný průběh neurogeneze [11].

Strukturálně jde o protein ve tvaru monomeru o velikosti 47 kDa [10]. Lidská forma se skládá celkem ze 433 aminokyselin. N-terminální doména představuje kratší úsek a je tvořena 135 aminokyselinovými zbytky. V tomto místě se vytváří sedm β -vláken. 78. až 92. molekula aminokyseliny je nezbytná pro interakci s proteinem p53. Krátká spojovací část připojuje N-terminální doménu k centrální oblasti α -helikálního typu tvořeným 139. až 342. aminokyselinou. ATP-vazebné místo enzymu se nachází na rozhraní N-terminální a α -helikální části. C-terminální úsek, nejdelší část molekuly, je utvářen 343. až 433. aminokyselinovým zbytkem a představuje základní část spirály, jež je velmi důležitý pro interakci s jádrem α -helixu [23].

3.1.2.1 Regulace enzymové aktivity GSK-3 β

Jelikož GSK-3 β má význam v celé řadě důležitých buněčných funkcí, musí být velmi přísně regulována. Na regulaci enzymové aktivity se podílí čtyři fyziologické mechanismy, které se vzájemně doplňují. Cílem je zajistit odpovídající substrátově specifickou regulaci [24].

Regulace fosforylací

Patří mezi základní a nejdůležitější princip regulace. Ke snížení aktivity GSK-3 β zpravidla dochází fosforylací serinu-9 (ser-9), který se nachází v N-terminální části molekuly enzymu. Toho je schopna například proteinkinasa B (Akt), která je aktivována prostřednictvím PI-3 kinasy při stimulaci buněk insulinem, nebo PKC [23]. K inaktivaci dochází také fosforylací serinu-389 (ser-389) a threoninu-390 (thr-390) v C-terminálním regionu prostřednictvím p38 mitogenem aktivované kinasy (p38 MAPK),

obzvlášť v thymocytech a v mozku. Extracelulárním signálem regulovaná kinasa (ERK) dokáže fosforylovat GSK-3 β na threoninu-43 (thr-43). Následkem je inhibice GSK-3 β . Ke zvýšení enzymové aktivity GSK-3 β dochází při fosforylaci tyrosinu-216 (tyr-216), který leží v C-terminální doméně. Tímto krokem dochází ke změně konformace tyr-216 umožňující vazbu substrátu k molekule enzymu [19]. Mezi enzymy, podporující růst její aktivity, se dále řadí gen *ZAK1* (sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase AZK) či protoonkogen Fyn [23].

Regulace tvorbou komplexů

Aktivita GSK-3 β je regulována rovněž tvorbou komplexů. WNT vylučované glykoproteiny aktivují kanonický a nekanonický signál, který je závislý na proteinu zvaném β -katenin. Kanonická WNT signální dráha využívá odlišnou regulaci aktivity GSK-3 β než je tomu u regulace fosforylací, protože nefosforyluje serotonin ani tyrosin. Místo toho se spoléhá na proteiny, konkrétně na proteinové interakce a intracelulární sekvestraci. Kanonická WNT dráha zahrnuje fylogeneticky konzervované proteiny, jako je WNT receptor, koreceptor, lipoproteinový receptor s nízkou hustotou (LRP), axin, APC, β -katenin a další [19]. GSK-3 β má tendenci fosforylovat β -katenin a způsobovat jeho degradaci. Receptor LRP přispívá rovněž k degradaci β -kateninu nezávisle na fosforylaci [5]. Navázáním axinu na proteinové receptory dochází k rozpuštění destruovaného komplexu umožňující stabilizaci a akumulaci β -kateninu. Stabilní β -katenin je transportován do jádra, kde se váže na receptory transkripčních faktorů, které se vyznačují vysokou afinitou k DNA. Následkem je transkripční aktivace genů. β -Katenin je defosforylován především proteinovou PP-2A. PP-1 defosforyluje axin spolu s antagonistou CK-1. To představuje negativní regulaci komplexu GSK-3 β -axin s následkem úplného rozložení tohoto komplexu [19].

GSK-3 β se může vázat na protein FRAT (frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas) a GSKIP (GSK-3 β interaction protein), ale význam komplexu nebyl dodnes plně objasněn [19].

Regulace intracelulární lokalizací

GSK-3 β může být považována za cytoplasmatický protein, ale ve velké míře se vyskytuje zejména v mitochondriích a v jádře, kde vykazuje vyšší aktivitu. Kapacita GSK-3 β je dynamická a závislá na buněčném cyklu [19]. Schopnost fosforylovat

jaderné substráty (například faktory transkripce) je úměrná hladině GSK-3 β v jádře [24]. Nejvyšší aktivitu vykazuje v S-fázi a v průběhu apoptózy u různých buněčných kultur. K redukci její koncentrace v jádře dochází aktivací PKB/Akt. Vazbou na FRAT1 se aktivuje jaderný transport. Delecí N-terminální části molekuly dochází ke snižování akumulace v jádře buňky [19].

Substrátově selektivní fosforylace

Aktivita enzymu může být ovlivňována fosforylací substrátu, protože převážná většina jejích substrátů musí být nejprve prefosforylována jinou kinasou na aminokyselinové zbytky odlišných od fosforylačního místa GSK-3 β . To znamená, že aktivita signální dráhy vedoucí k fosforylaci primárního místa substrátu reguluje schopnost GSK-3 β primární místo fosforylovat. Souhra substrátové fosforylace s ostatními mechanismy regulace (fosforylací, intracelulární lokalizací, tvorbou komplexů) zajišťuje integrovanou kontrolu, která umožňuje lokální a substrátově specifickou regulaci GSK-3 β . Díky vícenásobné regulaci může GSK-3 β své substráty fosforylovat selektivně [24].

3.1.2.2 Dysregulace a patofyziologické vlastnosti GSK-3 β

Dysregulace exprese GSK-3 β má za následek vznik několika závažných patofyziologických stavů. Patří mezi ně zejména onemocnění centrálního nervového systému (CNS) spojené s neurologickou a psychiatrickou dysfunkcí [23]. Takovou chorobou je například schizofrenie, bipolární afektivní porucha, deprese, amyotrofická laterální sklerosa, Parkinsonova choroba, defekty neuronů, poruchy nálady, změny chování spojené s dysfunkcí dopaminu, ale dosud největší význam je předkládán AD, sporadické i familiární formě [5, 18, 23].

Alzheimerova choroba

Mechanismus vzniku AD je založen na tvorbě extraneuronálních povlaků A β a NFTs, jejichž základ je tvořen hyperfosforylovaným τ -proteinem (Obrázek 2). τ -Protein se v hojném množství vyskytuje v mozku, převážně v axonech neuronů, a ve svém defosforylovaném či částečně fosforylovaném stavu se váže k mikrotubulům prostřednictvím 3 nebo 4 opakujících se sekvencí v C-terminální části své molekuly [5]. Existuje 6 isoform tohoto proteinu vyplývajících z alternativního splétání exonů 2, 3 a 10. Exon 10 představuje jednu z domén přiléhajících k mikrotubulům a jeho

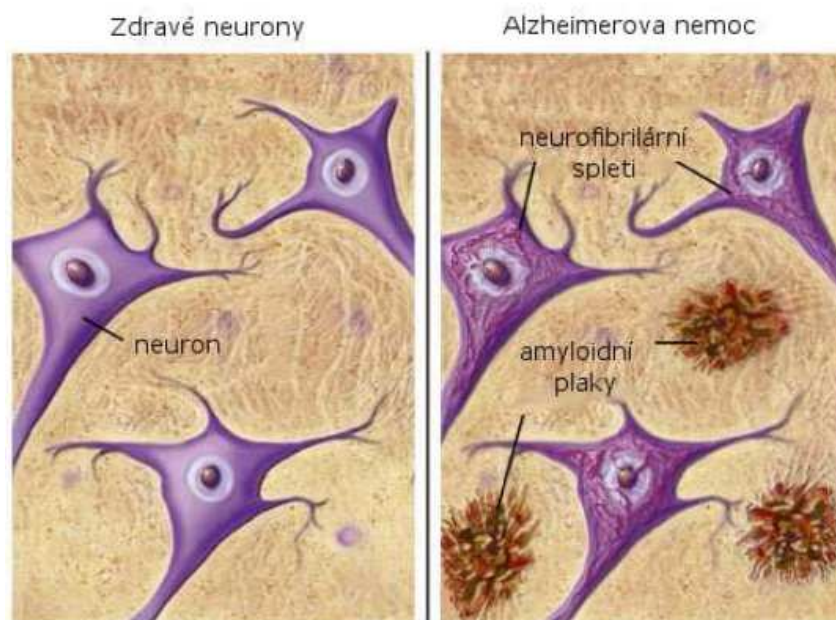
alternativním splétáním se tvoří isoformy obsahující 3 nebo 4 opakovaně se vážající mikrotubuly (v pořadí τ -protein-3R nebo τ -protein-4R). Funkcí τ -proteinu je mikrotubuly zpevňovat, udržovat síť cytoskeletu a zajistit axonální transport [2]. Za patologických stavů jsou z τ -proteinu odštěpeny krajní aminokyseliny a samotný protein je hyperfosforylován enzymem GSK-3 β . Tím dochází k vytvoření vláken a z důvodu hromadění nervových perikaryí se vlákna začnou párovat, čímž vznikají nerozpustná klubka ve formě oligomerů, dimerů či větších agregátů [5].

U τ -proteinu bylo identifikováno zhruba 45 míst, která bývají zpravidla fosforylována. Většina z nich se nachází v doménách bohatých na prolin, nebo v C-terminálním úseku, kterým se τ -protein váže k mikrotubulům [2]. Hyperfosforylace τ -proteinu a intracelulární depozice neurofibrilárních klubek vede ke ztrátě dendritických mikrotubulů a synapsí a k cytoskeletální degradaci. Následkem je smrt neuronů. Hyperfosforylace je považována za příčinu neurodegenerace [5]. Hustota NFTs koreluje se závažností AD [2].

Kromě fosforylace τ -proteinu má GSK-3 β schopnost ovlivňovat i jeho spojování a splétání, a to tak, že fosforyluje nukleární faktor SC 35, který kontroluje splétání τ -proteinu v exonu 10, čímž se snižuje exprese τ -protein-4R. Nerovnováha mezi τ -proteinem-3R a τ -proteinem-4R vede ke zvýšené fosforylaci samotného τ -proteinu. Toto zjištění není ale pro vyvíjející se kauzální léčbu AD podnětné, výzkum se zaměřuje především na dovednost GSK-3 β ovlivňovat funkci τ -proteinu prostřednictvím fosforylace [2].

GSK-3 β se vyznačuje rovněž schopností ovlivňovat proteolytické štěpení APP. To probíhá dvěma způsoby, neamyloidní a amyloidogenní cestou. Neamyloidní zpracování APP je katalyzováno prostřednictvím γ -sekretasy a α -sekretasy, která je tvořena komplexem rodiny α -disintegrin a metaloproteinasou (ADAM), konkrétně jejími třemi členy ADAM-10, ADAM-17 a ADAM-9. Kinasa GSK-3 β snižuje aktivitu α -komplexu inhibicí aktivity ADAM. GSK-3 β reguluje produkci A β interakcí s APP během štěpení γ -sekretasou, neboť APP, PS-1 a PS-2, jež utvářejí katalytické jádro γ -sekretasového komplexu, se řadí mezi substráty této kinasy. Studie *in vitro* prokázala, že GSK-3 β reguluje funkci PS-1, která je nezbytná pro generaci toxického A β v mozku. Naopak v amyloidogenní dráze je APP katalyzován β -sekretasou iniciující syntézu A β a následně γ -sekretasou, která ho uvolňuje. A β poté agreguje a vytváří senilní plaky,

kteře přispívají k axonální dystrofii, která způsobuje rozsáhlé poškození axonálního transportu, ztrátu synapsí, buněčnou smrt. Následkem je porucha kognitivních funkcí. Bylo zjištěno, že inhibice GSK-3 β redukuje štěpení APP pomocí β -sekretasy prostřednictvím signalační dráhy nukleárního faktoru kappa B (NF- κ B) [11]. Dále bylo objeveno, že expozice neuronů k A β zvyšuje aktivitu GSK-3 β prostřednictvím inhibice signalační dráhy PI-3 kinasy. Vysoká aktivita GSK-3 β byla detekována v mozcích pacientů s AD a bylo prokázáno, že podporuje abnormální zpracování APP, synaptické selhání a degradaci neuronů u sporadické i familiární formy AD. Toto pozorování naznačuje, že blokáda exprese GSK-3 β nebo inhibice její aktivity snižuje patologii A β vedoucí k neurodegeneraci [25].



Obrázek 2: Neurodegenerativní změny v mozku u AD. Upraveno podle [26].

GSK-3 β se podílí na alteraci cholinergního systému. Velký úbytek cholinergních neuronů v kortikálních oblastech mozku je typickým rysem pro AD. Ztráta cholinergních neuronů v bazálním předním mozku a v hipokampu koreluje s přechodnou sníženou fosforylací na ser-9 ve struktuře GSK-3 β a s hyperfosforylací τ -proteinu. Naopak cholinergní stimulací v hipokampu a v mozkové kůře dochází k rychlému nárůstu fosforylace na ser-9 [11].

Synaptická ztráta je neurobiologickým korelátem kognitivních deficitů u AD. Do mechanismu, který umožňuje ukládání informací do mozku, jsou zapojeny změny

v synaptických spojích, včetně dlouhodobé potenciace (LTP), jež je vyvolána vysokofrekvenční stimulací presynaptické části, a dlouhodobé deprese (LTD), ke které dochází při částečné depolarizaci neuronu při otevírání NMDA receptorů. LTP a LTD působí v zásadě proti sobě, ale jejich cílem je zachování správného poměru vzniku a zániku synapsí. Během LTP je postsynaptická membrána obohacena o ionotropní glutamové receptory kyseliny α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionové (AMPA), které jsou zabudovány v membráně postsynaptického neuronu v oblasti postsynaptické denzity. Úkolem LTP je formování paměti a správný proces učení. GSK-3 β zvyšuje bazální endocytózu v AMPA receptorech, která vede k disociaci vezikulů. Dále GSK-3 β je schopna fosforylovat kanály u AMPA receptorů, čímž dochází k jejich odstranění z povrchu synapse. Zvýšená exprese GSK-3 β zabraňuje správné funkci LTP a vyvolává poruchu prostorové orientace [11]. Potlačením WNT signální dráhy či signalizace PI-3 kinasy se LTP zhoršuje. GSK-3 β je negativně regulována WNT a insulinovou signální dráhou a její inhibice následuje inhibici LTP, která naznačuje, že GSK-3 β může zprostředkovávat účinky insulinu a dráhy WNT na proces LTP. Inhibitory GSK-3 β blokují i LTD. GSK-3 β navíc může fosforylovat další významné substráty vyskytující se v synaptické aktivitě, například protein vázající element odpovídající na cAMP (CREB) nebo mediátorový protein odpovídající na kolapsin (CRMP). GSK-3 β podporuje splétání aktinu a tubulinu, procesy důležité pro synaptické uspořádání během formování paměti. Z těchto důvodů je tato kinasa jednou z nejdůležitějších složek procesu LTP a utváření paměťových pochodů. Vzhledem k tomu, že aktivita GSK-3 β je během AD zvýšená, porucha paměti u této nemoci může být přičítána inhibici LTP a ztrátě neuronů plynoucí z progresu choroby [25].

Do etiopatogeneze AD, včetně fosforylace τ -proteinu, jsou zapojeny i další kinasy, jako je cyklin-dependentní kinasa-5 (Cdk-5), CK-1, ERK, PKA a jiné [2, 7]. Každá z těchto kinas preferuje určitý seroninový a threoninový zbytek pro fosforylaci τ -proteinu. Porovnáním těchto fosforylovaných aminokyselinových zbytků každé kinasy s hyperfosforylovaným epitopem pozorovaným *post mortem* v mozku postiženém AD, bylo prokázáno, že právě GSK-3 β je klíčovým enzymem podílejícím se na hyperfosforylaci τ -proteinu a současně představuje důležitý potenciální cíl pro kauzální léčbu AD [2]. Při navrhování nových terapeutických postupů a hledání

jejích inhibitorů je důležité, aby inhibitory jedince ochraňovaly před aktivací vnitřní apoptické signalizace a zároveň potencovaly vnější signalizaci apoptózy [11].

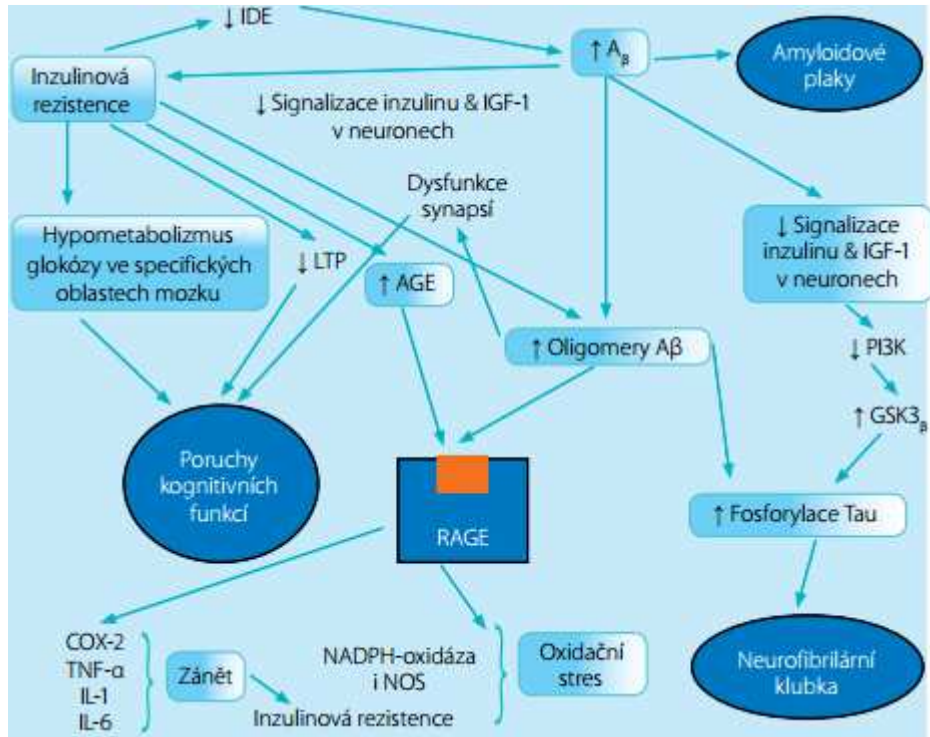
Rakovina

GSK-3 β může být příčinou i dalších chorob, například různých druhů rakoviny. To souvisí s kontrolou její aktivity pomocí WNT dráhy a s apoptózou buněk. GSK-3 β může mít onkogenní vlastnosti, kdy podporuje pozitivní buněčnou proliferaci a její abnormální expresi. Rozvinutí tumoru napomáhá tím, že stabilizuje komponenty β -kateninového komplexu, které se začnou hromadit v jádře postižené buňky [18]. Postupně se zvyšuje exprese β -kateninových cílových genů, jako je gen pro protein cyklin D1 (jeden z nejdůležitějších regulátorů buněčného cyklu). Jeho nadměrnou produkcí dochází k alteraci ve vývoji buňky následovanou dalšími změnami v kontrolních mechanismech, které mohou být součástí tumorové transformace buňky [18, 23]. V takovém případě dochází k nadprodukcí GSK-3 β v konkrétních postižených tkáních. Patří mezi ně vaječníky, játra, pankreas, nádory tlustého střeva a rakovina prsu. V jiných případech se GSK-3 β může vyznačovat tumor supresorovými funkcemi. Jedná se například o souhru GSK-3 β a Akt [18]. Kinasa Akt je zapojena do onkogenní transformace, růstu nádorů a do tvorby jejich metastáz. Vědci se nejprve domnívali, že aktivace GSK-3 β by mohla vést k zastavení nádorové progresi. Po experimentech bylo zjištěno, že k potlačení rakovinového bujení dochází právě inhibicí aktivity GSK-3 β vyvolanou fosforylací pomocí Akt. Inhibicí exprese GSK-3 β dochází k potlačení růstu rakoviny pankreatu a angiogeneze [22].

Diabetes mellitus

GSK-3 β přispívá k regulaci glukosové homeostázy [27]. Dokáže vyvolávat poruchu utilizace glukosy a sníženou schopnost insulinu aktivovat glukosové transportéry v kosterní svalové tkáni, která vede k navození insulinové rezistence a postupně se vyvíjející glukosové intoleranci [27, 28]. To vyúsťuje v plné rozvinutí diabetu mellitu druhého typu [28]. Insulinové receptory stimulují signální kaskádu aktivující kinasu Akt, která inhibuje GSK-3 β fosforylací ser-9 [27]. Selektivní inhibicí GSK-3 β v insulin-rezistentním kosterním svalu dochází ke zlepšení glukosového transportu prostřednictvím zvýšené aktivity post-insulinových receptorů v insulinové signalizaci a translokací glukosového transportéru typu 4 (GLUT4). Redukuje se množství glukosy v játrech [28]. Diabetes se často vyskytuje v souvislosti s AD

(Obrázek 3) [27]. Insulinové receptory se nacházejí ve většině periferních tkání, rovněž v oblastech mozku, kde se utváří paměť, proto některé pacienty s diabetem mohou sužovat problémy s verbální a vizuální pamětí a mohou se objevovat klinické příznaky AD, avšak bez diagnostiky demence [5, 27]. Navíc pacienti nemocní diabetem druhého typu mají vyšší riziko vzniku samotné AD [5].

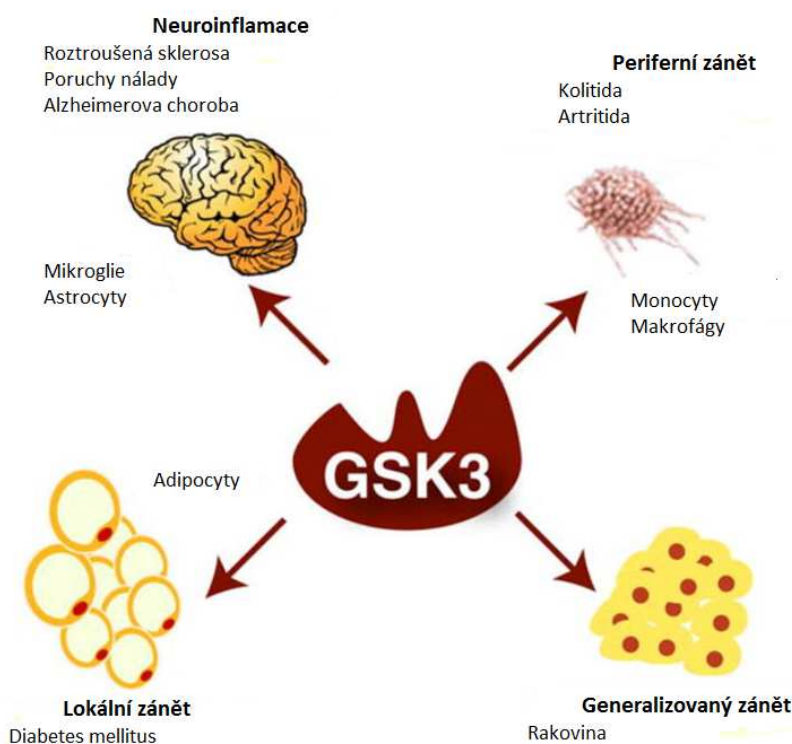


Obrázek 3: Mechanismy spojující AD a diabetes [29].

Patologický zánět

Podle nového zjištění je GSK-3 β jedním z hlavních faktorů zánětlivého procesu, který může být společným rysem pro více patofyziologických stavů (Obrázek 4). Tato kinasa způsobuje rozvoj nejen primárních zánětlivých onemocnění, nýbrž podmiňuje i sekundární záněty přidružené k primární chorobě. Jedná se zejména o zánět v periférii, kde GSK-3 β představuje významný zánětlivý regulátor, jenž podporuje tvorbu prozánětlivých cytokinů, zejména interleukinu-6 (IL-6), interleukinu-1 β (IL-1 β) a tumor nekrotizujícího faktoru (TNF). K tomu dochází po stimulaci Toll receptorů v mononukleárních buňkách periferní krve a v monocitech. Naopak produkci protizánětlivého cytokinu – interleukinu-10 (IL-10) GSK-3 β redukuje [27].

GSK-3 β má schopnost ovlivňovat migraci, adhezi a buněčné kontakty prostřednictvím integrinů. To vše přispívá k hlubšímu a nekontrolovatelnému rozvoji zánětlivého procesu v postižené tkáni s následkem chronických potíží. V nedávné studii bylo zjištěno, že inhibitory tohoto enzymu dokážou výrazně snížit vznik prozánětlivých cytokinů a dostatečně zvyšují protizánětlivé cytokiny, čímž dochází k potlačení rozvoje zánětu. To ukázalo na možný terapeutický potenciál GSK-3 β v léčbě závažných zánětlivých stavů [27].



Obrázek 4: GSK-3 β a patologický zánět. Upraveno podle [27].

GSK-3 β podmiňuje rovněž inflamaci v oblasti CNS. Mozek je charakteristický vlastním imunitním systémem. HEB slouží k oddělení místního zánětu mozku od systémového omezením penetrace zánětlivých mediátorů a umožňuje pronikání pouze leukocytů. Tato ochrana je důležitá, protože neurony mají omezenou schopnost regenerovat a autodestruktivní imunitní procesy by mohly mít ničivý dopad pro mozek. Pokud je tato bariéra narušena, dochází k infiltraci makrofágů a monocytů z cirkulující krve. Zároveň se aktivují rezidentní gliové buňky, jako jsou astrocyty a mikroglie (klíčové buňky imunitního systému v mozku), které vyvolávají zánětlivou reakci

a migraci, čímž se aktivují cytokiny a růstové faktory, které mohou přispět k regeneraci postižených neuronů. K aktivaci gliových buněk dochází i při neurodegenerativních onemocněních, traumatech a ischemii [27]. Trvalá aktivace těchto buněk při chronické chorobě, jako je AD, kdy dochází k hromadění mikroglíí v okolí amyloidových plaků, může vést k poruchám neuronálních funkcí a ke sníženému přežívání neuronů [25, 27]. GSK-3 β prostřednictvím cytokinů a chemokinů ovlivňuje mikrovaskulární endoteliální buňky v mozku, které během neuroinflamace poškozují HEB. Bylo zjištěno, že inhibice GSK-3 β vede k redukci exprese adhezivních molekul a ke snížené adhezi monocytů na endotel mozku. Proto se GSK-3 β jeví jako důležitý cíl pro stabilizaci HEB při zánětu neuronů [30].

GSK-3 β je dále schopna navodit další potíže a choroby lidského organismu, například poruchy imunity, aterosklerosu, polycystické onemocnění ledvin, mozkovou mrtvici, srdeční hypertrofii, dysfunkci metabolismu a za následek má také stárnutí organismu [18].

3.2 Kaseinkinasa-1

Kaseinové kinasy (CK) patří do skupiny serin-threoninových neprolinových proteinových kinas [31]. Mléčný protein kasein není jejich přirozeným substrátem [32]. CK se nacházejí u všech eukaryotických organismů [16]. Z důvodu vysoké homologie v jejich katalytických doménách se rozdělují do rodiny kaseinkinasy-1 (CK-1) a kaseinkinasy-2 (CK-2) [31]. CK-1 a CK-2 jsou rozdílné ve struktuře, funkci a v reakci na efektorové molekuly [33].

Členové rodiny CK-1 se vyskytují v různých živočišných druzích – v savcích, prvocích, kvasinkách, řasách a v rostlinách, například v rýži [32, 33, 34]. Nejčastěji jsou izolovány v cytosolu a v buněčném jádře [33]. Nejblíže příbuzní jsou τ -tubulinové kinas-1 a 2 [22]. CK-1 je tvořena několika podtypy (α , β , δ , ϵ , γ 1, γ 2, γ 3) a několika sestříhovými variantami pro CK-1 α , CK-1 δ , CK-1 ϵ a CK-1 γ 3 [31, 32]. Navzájem se liší délkou a primární strukturou N-terminálních a především C-terminálních nekatalytických domén. N-terminální doména, která je zodpovědná za katalytickou aktivitu enzymu, dosahuje velikosti od 9 do 76 v pořadí za sebou jdoucích aminokyselin a její součástí jsou β -listy, zatímco větší, α -helikální C-terminální doména, jež hraje klíčovou roli v substrátové specifitě a v regulaci kinasové aktivity, se skládá z 24 až 200 opakujících se aminokyselin. Díky tomuto rozdílu se mění molekulová hmotnost

jednotlivých isoform CK-1. Ta se pohybuje v rozmezí přibližně od 37 kDa (CK-1 α) do 51 kDa (CK-1 γ 3). Protože podtypy CK-1 jsou vysoce konzervativní ve svých kinasových doménách (identita činí 51 až 98 %), jsou zodpovědné za různé fyziologické vlastnosti všech CK-1. Některé vykazují vysokou homologii (především CK-1 δ a CK-1 ϵ). U lidí se nachází 6 isoform – CK-1 α , CK-1 δ , CK-1 ϵ , CK-1 γ 1, CK-1 γ 2, CK-1 γ 3 . Dosud nejvíce byly probádané CK-1 α , CK-1 δ , CK-1 ϵ [31].

CK-1 patří do skupiny enzymů, které mají schopnost fosforylovat přes 140 substrátů *in vivo* a *in vitro* [32]. Mezi substráty patří faktory transkripce a translace, klíčové regulační molekuly zapojené do buněčného cyklu, struktury cytoskeletu. Podílejí se na regulaci buněčné cytokineze, adheze, vezikulárního a membránového transportu, biogenezi ribozomů, reparaci DNA, receptorů v signální transdukcii [31]. Mezi další substráty patří řada proteinů, jako je glykogensynthasa, tumor supresorový protein p53, cAMP a mnoho dalších [33]. Významnou funkcí je navozování reakce na stres a utváření cirkadiálních rytmů, které souvisí s uložením CK-1 (zejména CK-1 δ a CK-1 ϵ) v suprachiasmatických jádrech v hypotalamu, která jsou zodpovědná za kontrolu a koordinaci cirkadiálních rytmů v celém organismu [35]. CK-1 je součástí i imunitního systému a svůj podíl nachází v rozvoji zánětlivé reakce. Dokáže vyvolat apoptózu [32]. Dysfunkce CK-1 vede k rozvoji řady patologických stavů, jako jsou neurologická onemocnění (zejména AD) nebo rakovina různých orgánů, například ledvin, tlustého střeva, dále adenokarcinom slinivky břišní, karcinom prsu a vaječníků, rakovina ústní dutiny a choriokarcinom. Toto zjištění vedlo ke zvýšenému úsilí nalézt funkční inhibitory vůči CK-1 [16, 31].

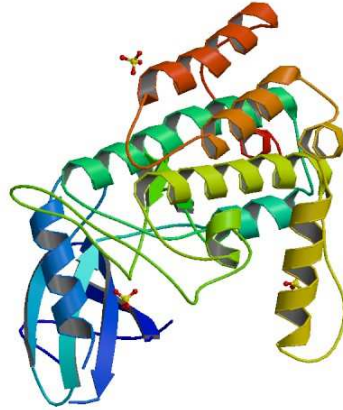
Jelikož je CK-1 zapojena do regulace mnoha klíčových fyziologických funkcí, je nezbytná přísná regulace její aktivity a exprese [32]. K tomu dochází prostřednictvím specifické fosforylace jinými proteinovými kinasami, interakcí s buněčnými proteiny, subcelulární lokalizací, reverzibilní fosforylací C-terminální domény pomocí inhibiční autofosforylace, která vede ke snížení enzymové aktivity [31, 32]. Autofosforylace probíhá u CK-1 δ a CK-1 ϵ v C-terminální doméně s motivem pser/thr-X-X-Y, kde pser/thr označuje fosforylovaný serinový nebo threoninový zbytek. Docházet k ní může i u isoformy CK-1 γ 1, CK-1 γ 2, CK-1 γ 3 a CK-1 α . Fosforylace CK-1 ostatními serin-threoninovými kinasami má za následek zvýšení její aktivity. Stejně působí i prostředí o nízké koncentraci H₂O₂. Proteolytické štěpení C-terminální domény vede k několikanásobnému vzrůstu kinasové aktivity *in vitro*. I přesto, že členové rodiny

CK-1 jsou exprimovány všudypřítomně, míra exprese závisí na typu tkání a buněk. Hladinu a aktivitu CK-1 mohou ovlivňovat některé faktory, například změna membránové koncentrace fosfatidylinositolu-4-5-bisfosfátu (PIP₂), γ -záření, virová transformace, stimulace insulinem nebo gastrinem, léčba topoisomerasovými inhibitory nebo jinými malými molekulami, například kalotropinem. Z hlediska proteinů se jedná o regulaci prostřednictvím subcelulární lokalizace, regulaci pomocí struktury, interakce s jinými proteiny a posttranslační modifikace [32].

Členové rodiny CK-1 využívají ATP, který se váže na oblast mezi N-terminálním a C-terminálním lalokem, jako donor fosfátu k fosforylaci serinových a threoninových reziduí na cílových proteinech [33]. CK-1 rozpoznávají substráty, které obsahují kyselé nebo prefosforylované aminokyselinové zbytky. Zpravidla fosforylují zbytky serinu, které jsou blízké fosfoserinu v souladu s motivem pser-X-X-S. Motivem pser/thr-X-X-(X)-ser/thr je reprezentována kanonická konvenční sekvence pro CK-1. Fosfoserin či fosfothreonin může být však nahrazen aglomerací negativně nabitých kyselých aminokyselin. Byly popsány také nekanonické konvenční sekvence pro členy rodiny CK-1, kam spadá motiv lysin/arginin-X-lysin/arginin-X-X-serin/threonin (lys/arg-X-lys/arg-X-X-ser/thr) nacházející se v cholesterol-3-sulfátu a sulfamidech, dále SLS motiv v β -kateninu a v nukleárním faktoru aktivovaných T-buněk [32].

3.2.1 CK-1 δ

CK-1 δ je protein ve tvaru dimeru (Obrázek 5) [32]. U lidí je kódován na 17. chromozomu v lokalizaci 17q25 genem označovaným *CSNK1D* [36]. Ze 76 % je identický s podjednotkou CK-1 α , s ostatními členy je shodný zhruba z 52 % v katalytické doméně [37]. Největší homologii vykazuje s isoformou CK-1 ϵ , neboť z 98 % jsou shodné v N-terminální doméně a z 53 % jsou identické v C-terminální regulační doméně. Z tohoto důvodu mají CK-1 δ a CK-1 ϵ velmi podobné vlastnosti a obě jsou přítomny u většiny fyziologických, ale i patologických procesů [31].



Obrázek 5: Struktura CK-1δ [36].

Kromě regulace inhibiční autofosforylací je CK-1δ ovlivňována specifickou fosforylací jinými kinasami, jako je Akt, isoforma PKC- α , jež fosforyluje serin-328 (ser-328), serin-331 (ser-331), serin-370 (ser-370) a threonin-397 (thr-397), čímž dochází ke zvýšení enzymové aktivity, a zejména PKA, která je zaměřena na fosforylací ser-370 v C-terminální doméně *in vitro* a *in vivo*. Dále samotná molekula CK-1δ může ovlivňovat svoji aktivitu. Oblast pro vazbu donoru ATP je obsazena specifickým intramolekulárním spojením dimerizační domény a ATP je odstraňován z aktivního centra kinasy. Tvorba homodimerů z tohoto důvodu může mít negativní regulační efekt na aktivitu CK-1δ *in vivo* [32].

3.2.1.1 Fyziologické funkce CK-1δ

Fyziologickou funkcí CK-1δ je zprostředkovávání růstu axonů a zapojuje se do regulace dynamiky mikrotubulů [32, 38]. Společně s CK-1 ϵ se účastní kontroly cirkadiálních rytmů u všech eukaryotických buněk. CK-1δ zde hraje dominantní roli. Centrální hodiny jsou tvořeny homologem třech proteinů označovaných PER1 – 3 (period circadian protein homolog 1 – 3). Cytoplasmatický PER je fosforylován CK-1δ, čímž dochází k jeho degradaci. Pokud je v komplexu s kryptochromem, místo pro fosforylací není dostupné a komplex je společně s CK-1δ transportován do jádra, kde potlačuje další hodinový transkripční faktorový komplex a inhibuje transkripci mnoha hodinových genů [31].

CK-1δ se podílí i na regulaci WNT signální dráhy, oddělování chromozomů během mitózy, transportním procesu přes buněčnou membránu, jaderném importu

a ovlivňuje funkce centrozomu během buněčného dělení [38]. Vyvolává apoptózu. *In vivo* a *in vitro* fosforylace N-konce tumor supresorového proteinu p53 pomocí CK-1δ dochází k aktivaci p53 a následně k vyvolání apoptózy. Dále CK-1δ fosforyluje enzym MDM2 (mouse double minute 2 homolog) – dochází ke snížení interakce MDM2 s p53, které přispívá ke stabilizaci a následné aktivaci p53. Z toho vyplývá, že zvýšenou expresí nebo zvýšenou aktivitou isoformy CK-1δ dochází k aktivaci p53, postupné zástavě buněčného cyklu a ke spuštění apoptózy [31]. V odpovědi na buněčný stres má CK-1δ schopnost se specificky spojovat s mitotickým vřeténkem ve zvýšené míře. CK-1δ dokáže fosforylovat α -, β - a γ -tubulin stejně jako další proteiny vyskytující se v neuronech, dále fosforyluje s mikrotubuly spojené proteiny (MAPs), mezi které se řadí MAP4, onkoprotein stathmin a τ -protein. Bylo prokázáno, že fosforylace τ -proteinu pomocí CK-1δ moduluje jeho afinitu k mikrotubulům [38].

3.2.1.2 Patofyziologické funkce CK-1δ

CK-1δ se podílí na vzniku a rozvoji několika neurodegenerativních onemocnění, jako je Downův syndrom, progresivní supranukleární obrna, amyotrofická laterální sklerosa, Pikova choroba, Parkinsonova choroba a především AD [39]. V mozcích pacientů s AD dochází k její zvýšené expresi. CK-1δ má souvislost s granulovaskulárními a neuritickými lézemi, kterým předchází časná hyperfosforylace τ -proteinu na pozici serin-202/threonin-205 (ser-202/thr-205) a serin-396/serin-404 (ser-396/ser-404), která má za následek tvorbu NFTs [32]. V nedávné studii byla zjištěna souvislost AD s velmi zvýšenou expresí CK-1δ mRNA v mozku, ale ne v periferních orgánech. Stupeň zvýšené exprese v mozku nemocného AD koreluje s mírou patologie v dané mozkové oblasti a zároveň se zvýšenou expresí CK-1δ proteinu. Navíc při AD dochází k poruše cirkadiálního rytmu [40]. CK-1δ je po GSK-3 β nejvíce zkoumanou kinasou způsobující AD a badatelé se zajímají o nalezení jejích specifických inhibitorů [32, 40].

CK-1δ dále podmiňuje vznik karcinomů a jejich metastáz. Je schopna zvýšení, nebo snížení aktivity proteinu p53 přímou fosforylací, nebo přímou modulací p53 prostřednictvím interakce proteinu MDM2 a MDMX. Genotoxický stres způsobuje transkripční aktivaci CK-1δ proteinem p53. Dochází k poškození DNA přispívající ke zvýšené interakci mezi CK-1δ a CK-1 ϵ . Odhaluje se více míst na MDM2 pro fosforylaci těmito isoformami, která způsobuje degradaci MDM2 a následně zvýšenou aktivitu p53. Inaktivace CK-1δ a CK-1 ϵ zapříčiní akumulaci MDM2,

sníženou aktivitu p53 a rezistenci vůči apoptóze indukovanou faktory vyvolávající poškození DNA. Aktivita p53, stejně jako aktivita enzymu CK-1 δ , je zvýšena za stresových podmínek [31].

3.3 Cyklin-dependentní kinasa-5

Cyklin-dependentní kinasa-5 (Cdk-5) je unikátní katalytickou podjednotkou cyklin-dependentních kinas (Cdks), které se řadí mezi kinasy serin-threoninového typu [42]. Na rozdíl od hlavních Cdks, které jsou aktivovány v určité fázi buněčného cyklu a podporují jeho progresi v proliferujících buňkách, Cdk-5 je aktivována v postmitotických neuronech prostřednictvím pouhé vazby na neuron-specifické aktivátory p35 nebo p39 [41]. Ostatní Cdks navíc vyžadují ke své aktivaci prefosforylaci v aktivační T-smyčce [42]. Cdk-5 je exprimována v řadě buněk a tkání, v největším množství se však nachází v postmitotických neuronech z důvodu vysoké koncentrace jejích vazebních partnerů p35 a p39 [41]. Fyziologickou vlastností Cdk-5 je regulace mnoha neuronových funkcí, včetně migrace neuronů, synaptické aktivity a neuronální smrti [42].

Cdk-5 vykazuje 55 až 60% aminokyselinovou sekvenční homologii s ostatními členy Cdks, především s Cdk-1, Cdk-2, Cdk-4 a Cdk-6. Její aktivátory, p35 a p39, nejsou homologní s cykliny – jsou složeny z 307 až 369 aminokyselin obsahujících Cdk-5 aktivační doménu v C-terminální oblasti. Aktivační doména p35 tvoří terciální strukturu, která má obdobné složení jako cyklin A v komplexu Cdk-2-cyklin A, a vysvětluje jeho schopnost aktivovat kinasu Cdk-5. Dalším aktivujícím faktorem může být cyklin 1, jenž představuje aktivátor v ledvinových podocytech [41].

Aktivita enzymu Cdk-5 může být ovlivňována mechanismem fosforylace prostřednictvím ostatních kinas. Fosforylací v oblasti tyrosin-15 (tyr-15) ve struktuře monomerní Cdk-5 pomocí kinasové rodiny Src, nerekceptor-tyrosinovými kinasami či receptor-tyrosinovými kinasami dochází ke stimulaci enzymové aktivity. Fosforylace tyr-15 vede rovněž k aktivaci komplexu Cdk-5-p53, jenž hraje rozhodující úlohu při vývoji mozkové tkáně, míchy, fyziologické synaptické činnosti a při neuronální smrti [42]. Činnost Cdk-5 je dále ovlivňována samotnými neuron-specifickými receptory p35 a p39, konkrétně jejich rozpadem. Jedná se o proteiny s krátkou životností, biologický poločas trvá u p35 30 minut a u p39 120 minut, poté jsou

degradovány ubiquitin-proteazomovým systémem. Fosforylace vyvolaná Cdk-5 v místě threonin-138 (thr-138) p53 podporuje degradaci [41].

Cdk-5 je zapojena do abnormální fosforylace v mozcích postižených AD. Předpokládá se, že komplex Cdk-5-p35 zajišťuje fyziologickou fosforylaci, spojení Cdk-5-p25 zaručuje fosforylaci patologickou [42]. Množství p25 je u AD zvýšeno [43]. Cdk-5 dokáže fosforylovat u τ -proteinu až 13 míst – jedná se především o ser-202, thr-205, threonin-212 (thr-212), serin-235 (ser-235), serin-396 (ser-396) a serin-404 (ser-404) [44]. Tímto procesem snižuje vazebnou schopnost τ -proteinu s mikrotubuly, napomáhá rozpadu komplexu mikrotubulů, a tím zcela mění mikrotubulární dynamiku [43, 45]. Úloha Cdk-5 může být však mnohem složitější, nemusí se pouze přímo podílet na fosforylaci τ -proteinu, ale tato fosforylace může probíhat i prostřednictvím regulace aktivity GSK-3 β [44]. Spojením Cdk-5 s p25, N-terminální zkrácenou formou p35, dochází k hyperaktivaci Cdk-5, která má za následek hyperfosforylaci τ -proteinu s následnou agregací do mikrofilament a tvorbou NFTs [42]. Cdk-5 se svou katalytickou aktivitou podílí rovněž na vzniku plaků A β v mozku nemocného [44, 45]. Navíc studie zaměřené na bezprostřední účinky A β *in vivo* prokázaly, že tvorba A β vede intraneuronálně ke zvýšení koncentrace kalcia, která může mít za následek aktivaci kalpainu a hyperaktivaci Cdk-5, neboť dochází ke štěpení p35 na p25 ve větší míře [45].

3.4 C-Jun N-terminální kinasa

C-Jun N-terminální kinasa (JNK) je členem rodiny mitogenem aktivovaných kinas (MAPK), které zastávají celou řadu intracelulárních signalizací [46]. JNK je známá i pod pojmem stresem aktivovaná proteinkinasa (SAPK) [47]. Vyskytuje se u savců, v rostlinách a houbách [46, 47]. Poprvé byla objevena ve spojitosti fosforylace N-terminálního transkripčního faktoru c-Jun a schopnosti své aktivace v reakci na různé stresové podněty, například zvýšenou expresi cytokinů [47]. JNK transkripční aktivita je stimulována fosforylací na dvou N-koncových místech – serin-63 (ser-63) a serin-73 (ser-73). Fosforylace v těchto místech se zvyšuje v odezvě na různé další extracelulární stimuly, včetně růstových faktorů a UV záření [48]. U savců se vyskytují tři geny (*JNK1*, *JNK2* a *JNK3*) na třech různých chromozomech, z nichž každý má svůj alternativní sestřih. Kinasy JNK-1 a JNK-2 jsou exprimovány prakticky ve všech tkáních, zatímco JNK-3 ve vysoké koncentraci v neuronech CNS, dále v srdeční hladké

svalovinně a ve varlatech. Velikost savčích JNK proteinů se pohybuje v rozmezí 46 až 66 kDa [47].

JNK náleží mezi multifunkční kinasy, které jsou zapojeny do řady biologických procesů. Biochemická dráha JNK hraje významnou roli v apoptóze buněk a v její spojitosti s patologickými procesy. Například k vyvolání neuronální buněčné smrti vyžaduje několik apoptických stimulů, jako je deprivace nervového růstového faktoru, poškození DNA, oxidační stres, ztráta přísunu energie, uvolnění TNF a další [47]. Podílí se také na embryogenezi, ale i na tumorogenezi, zánětlivém onemocnění, diabetu mellitu druhého typu, onemocnění srdce a na vzniku neurodegenerativních chorob zahrnujících ischemickou mrtvici, amyotrofickou laterální sklerosu, Parkinsonovu chorobu, polyglutaminové choroby a různé tzv. taupatologie, mezi které se řadí Pikova choroba, progresivní supranukleární obrna, kortikobazální degenerace, familiární frontotemporální demence, parkinsonismus a AD [7, 46, 47].

Aktivita JNK koreluje s oběma znaky AD – s hyperfosforylovaným τ -proteinem i s depozicí A β . Ve studii byla v mozcích postižených AD analyzována zvýšená hladina aktivované JNK, která vykazovala silnou imunoreaktivitu v neuronech a gliích obsahujících hyperfosforylovaný τ -protein, ale i v dystrofických nervech se senilními amyloidními plaky [47]. JNK navíc při hyperfosforylaci τ -proteinu usnadňuje uvolnění H₂O₂ a ROS, zejména superoxidu a volného hydroxylového radikálu, které přispívají k toxicitě nervových buněk. Studie *in vitro* prokázala, že inhibice aktivity JNK potlačuje toxicitu A β a blokuje aktivaci kaspas, které by mohly indukovat expresi proapoptických genů [7]. Z těchto důvodů se JNK stává předmětem nového terapeutického cíle v léčbě nejen AD a vědci se v současné době zabývají hledáním jejích inhibitorů [7, 46, 47].

3.5 Apoptózou regulovaná kinasa-1

Apoptózou regulovaná kinasa-1 (ASK-1) je kinasa serin-threoninového typu. Exprimována je téměř ve všech tkáních. ASK-1 je jedním z více než 20 členů rodiny enzymů MAP3K (mitogenem aktivovaná proteinkinasa kinasa kinasa) [49]. Tvoří mediátor dráhy MAPK, který reguluje řadu buněčných reakcí, jako je přežívání buněk, apoptóza a buněčná diferenciaci. Přímou fosforylací aktivuje kinasu JNK a p38 MAPK [50]. Funkcí ASK-1 je buněčná odpověď na širokou škálu environmentálních a biologických stresových faktorů, včetně ROS, stres endoplazmatického retikula

způsobující agregaci proteinů, intracelulární zaplavení kalciových iontů, receptory zprostředkované signály transdukovaných liposacharidů, cytokinů, Fas ligandů a dalších. Tyto faktory ji zároveň aktivují. Exogenní exprese ASK-1 v buňkách vyvolává vnitřní apoptickou dráhu podporující uvolňování cytochromu c z mitochondrií a následnou aktivaci kaspasy-3 a 9. Naopak ASK-1 deficientní buňky se vyznačují rezistencí k buněčné smrti způsobenou oxidačním stresem a stresem endoplazmatického retikula. To naznačuje, že ASK-1 funguje jako iniciátor stresem indukované buněčné smrti [49].

V posledních letech se stále více hromadí důkazy, že ASK-1 hraje klíčovou roli v patogenezi neurodegenerativních poruch, jako je Huntingtonova choroba nebo AD. U AD je ASK-1 aktivována dimerizací APP, syntézou A β a uvolněním ROS [50]. ASK-1 se u AD podílí na řadě mechanismů zahrnujících toxicitu buněk vyvolanou uvolněním ROS, neurotoxicitu způsobenou depozicí A β , hyperfosforylaci τ -proteinu a poškození insulinové signální transdukce [49, 50]. Do insulinové signální transdukce je ASK-1 zapojena prostřednictvím TNF α -zprostředkované aktivace JNK. ASK-1 slouží jako klíčový faktor při modulaci insulinové signální transdukce a její regulace může zvýšit kognitivní pokles u AD. Inhibicí aktivity ASK-1 dochází k fosforylaci tyrosinu v insulinu podobném růstovém faktoru-1 (IGF-1), čímž se zabrání kognitivním poruchám v mozku. IGF-1, který zprostředkovává signalizaci pomocí svých specifických receptorů, potlačuje ASK-1-indukovanou dráhu JNK/p38 MAPK. IGF-1 může inhibovat apoptózu a blokovat ASK-1-vyvolanou aktivaci JNK při depozici A β . Deficit CNS prostřednictvím funkce insulinových receptorů je spojen s patogenezí sporadické formy AD [50]. Insulinová dysfunkce v mozku vede ke kognitivním deficitům. ASK-1 aktivuje dráhu, která spouští smrt mozkových endoteliálních buněk způsobenou tvorbou A β a zvýšenou hladinou proapoptického proteinu Bax [49, 50]. Podílí se i na hyperfosforylaci τ -proteinu prostřednictvím JNK – vznikají NFTs v neuronech [50]. Studie prokázaly, že tato kinasa může tvořit komplex s APP prostřednictvím proteinu JIP-1b (JNK signaling scaffold protein) a JNK-1. Následkem je smrt neuronů v závislosti na kaspasach [49].

Podle nových získaných důkazů ze studií bylo zjištěno, že ASK-1 propojuje signalizaci s patogenezí AD a zároveň dokáže měnit její progresi – ASK-1 představuje možnost terapeutické intervence v prevenci a léčbě AD [50].

3.6 Extracelulárními signály regulovaná kinasa

Extracelulárními signály regulovaná kinasa (ERK) patří do skupiny MAPK [51]. Skládá se až z 8 isoform, z nichž nejdůležitější jsou isoformy ERK-1 (44 kDa) a ERK-2 (42 kDa) [51, 52]. Obě isoformy sdílí 83% homologii v aminokyselinové sekvenci a jsou exprimovány téměř ve všech typech tkání [53]. Aktivovány jsou duální fosforylací threonin-202/tyrosin-204 (thr-202/tyr-204) prostřednictvím mitogenů nebo růstových faktorů [51, 52]. Po aktivaci jsou schopny fosforylovat regulační cíle v cytosolu, nebo jsou transportovány do buněčného jádra, kde fosforylují substráty včetně extracelulárních proteinů, efektorů a transkripčních faktorů. Následkem je buněčná proliferace, diferenciací, genová exprese a regulace neuronální aktivity. Isoformy hrají důležitou roli v synaptické a strukturální plasticitě [54]. ERK je klíčovým enzymem v několika krocích tumorogeneze, včetně proliferace, migrace, invaze nádorových buněk a v jejich rezistenci k apoptóze [51].

Podle studií bylo zjištěno, že k aktivaci ERK dochází v počátečních fázích AD [51]. K patogenezi AD přispívá svou schopností regulovat neuronální apoptózu a hyperfosforylovat τ -protein – z těchto důvodů je zkoumána jako potenciální terapeutický zásah u AD [51, 52]. Negativně ovlivňuje β -sekretasu při štěpení APP, čímž reguluje produkci $A\beta$ v neuronech [51]. Snížením regulace aktivity ERK-2 dochází ke zvýšené akumulaci $A\beta$. ERK se podílí i na vzniku toxické formy $A\beta_{42}$ v mozku, převážně v hippocampu, která vede k poruchám formování paměti doprovázející AD [52].

3.7 p38 MAPK

p38 MAPK je stresem aktivovaný enzym zodpovědný za přenos zánětlivých signálů a iniciaci apoptózy. V neaktivovaném stavu se nachází v buněčném cytosolu. Na specifické doméně threonin-180-glycin-181-tyrosin-182 (thr-180-gly-181-tyr-182) je aktivován duální fosforylací. Aktivaci mohou indukovat stimulační signály, jako je $IL-1\beta$, $TNF\alpha$ a H_2O_2 . Inhibován naopak bývá prostřednictvím antioxidantů, nebo redukčním činidlem thiolu. Fosforylovaný p38 MAPK přechází do buněčného jádra, kde katalyzuje fosforylací a aktivaci několika významných transkripčních faktorů, čímž je usnadněna exprese specifických buněčných produktů [55].

V mozkové tkáni starého člověka, ale i ve tkáni postižené AD, dochází ke vzrůstu koncentrace fosforylované kinasy p38 a současně k hyperaktivaci její kinasové aktivity. Zejména v mikroglíích je fosforylace p38 silně stimulována kontaktem s A β . V mikroglíích, astrocytech a NFTs v neuronech dochází k syntéze NO₂. Zvyšuje se přítomnost nitrotyrosinu v hippocampu. Následkem je zánět neuronů. V nedávné studii byla zjištěna intenzivní fosforeaktivita p38, která korelovala se senilními plakami a NFTs. Kinasa p38 má schopnost hyperfosforylovat τ -protein. Fosforylace p38 probíhá v odpovědi na buněčný stres (amyloidní plakami a zánětlivá ložiska v mozku), není spouštěcím faktorem AD, nicméně může usnadnit progresi onemocnění a v konečném důsledku vést ke ztrátě neuronů. Z tohoto důvodu se stává novým terapeutickým cílem ve výzkumu kauzální léčby AD [55].

3.8 cAMP-dependentní proteinkinasa

cAMP-dependentní proteinkinasa (PKA) je kinasa serin-threoninového typu. V neaktivovaném stavu za nepřítomnosti cAMP existuje jako heterotetramerní holoenzym skládající se ze dvou katalytických podjednotek C a dvou regulačních podjednotek R, které slouží nejen ke kontrole enzymové aktivity PKA, ale i k lokalizaci této kinasy uvnitř buňky [56, 57]. Obě katalytické podjednotky C tvoří několik isoform (především C α , C β , C γ) a obě regulační podjednotky R isoformy RI α , RI β , RII α a RII β , které byly izolovány ve tkáních savců. PKA-C α je exprimována téměř ve všech tkáních, C β ve vysoké koncentraci v mozku a C γ ve varlatech. Všechny čtyři isoformy regulačních podjednotek R se nacházejí v mozkové tkáni [57]. Po aktivaci PKA adenylátcyklasou prostřednictvím extracelulární signalizace je donor ATP přenesen na cAMP, který se váže k regulačním podjednotkám R, a dochází k uvolnění katalytických podjednotek C, které fosforylují substrátové proteiny [56].

PKA představuje hlavní regulátor CREB. Jedná se o transkripční faktor, jehož funkcí je ukládání a zpracování paměti. Převádí krátkodobou paměť do dlouhodobé, svou roli hraje v procesu učení [57]. Po své aktivaci v důsledku zvýšené hladiny intracelulárního kalcia se PKA přesouvá do buněčného jádra, kde CREB aktivuje fosforylací v místě serin-133 (ser-133) [57, 58]. Fosforylovaný CREB iniciuje transkripci a translaci cílových genů, které jsou vyžadovány pro utváření synaptické plasticity vedoucí k zprostředkovávání dlouhodobé paměti [58]. Nedostatečná funkce CREB a dysfunkce paměti při AD je vyvolána dysregulací PKA. Protože během AD je

aktivita PKA v mozku snížena a je regulována v co nejmenší míře, může vést k degradaci některých jejích isoform (zejména PKA-RII) v důsledku zvýšené exprese kalpainu [57]. Inhibice této signální dráhy cAMP/PKA/CREB je alespoň částečně zodpovědná za deficit učení a paměti při AD. Tato inhibice může být vyvolána zvýšenou expresí β -sekretasy-1. Poškozením cAMP/PKA/CREB navíc dochází v mozku trpícím AD k $A\beta$ toxicitě, proto se PKA stává novou zkoumanou strategií v terapii AD [58].

3.9 Fyn

Protoonkogen Fyn je protein o velikosti 59 kDa patřící do Src rodiny nereceptorových tyrosinových kinas. Lokalizován je na chromozomu 6q21 a vyznačuje se třemi sestříhovými variantami. Známé jsou dvě aktivní formy, Fyn-T a Fyn-B, které jsou exprimovány převážně v buňkách hematopoetického původu, ačkoliv Fyn-B se může vyskytovat ve všech buňkách a tkáních, zejména v mozku. Biologické funkce Fyn jsou rozmanité, zajišťují buněčné dělení a adhezi, funkci krevních destiček, plasticitu a myelinizaci neuronů v CNS a především reguluje synaptické funkce. Aktivace Fyn zlepšuje synaptickou funkci, avšak dokáže vyvolat synaptotoxicitu u náchylnějších neuronů. Inhibice Fyn má opačný účinek, může být neuroprotektivní, ale nadměrná inhibice může přispívat k defektům kognitivních funkcí pacienta. Při terapeutickém zásahu určeném pro optimalizaci synapsí a celé neuronální sítě je proto nutno zachovat rovnováhu mezi aktivací a inhibicí [59].

Aktivita Fyn, stejně jako aktivita ostatních členů kinasové rodiny Src, je regulována intramolekulární interakcí, která závisí na rovnováze mezi tyrosinovou fosforylací a defosforylací. V bazálním stavu je její katalytická aktivita omezena záběrem SH2 domény fosforylovaným C-terminálním tyrosinem-531 (tyr-531). Vnější proteinová interakce SH2 a SH3 domén fosforylací na tyrosin-420 (tyr-420) v místě aktivační smyčky kinasové domény, či defosforylace tyr-531, mají za následek aktivaci Fyn. Defosforylace na tyr-420 významně aktivitu snižuje [59].

Fyn je lokalizován v postsynaptických denzitických frakcích mozku, v místě určeném pro primární postsynaptickou signální transdukcí a procesy v neuronech. Fyn reguluje synaptickou aktivitu prostřednictvím hospodaření s glutamát, který hraje zásadní roli v synaptických funkcích. Mezi Fyn substráty se řadí glutamátové receptory, které specificky fosforyluje v místě NMDA podjednotky NR2A a NR2B. Tyto

podjednotky jsou nezbytné pro modulaci paměti a učení. Souvislost se nachází i u vzniku chronické deprese [59].

Kinasa Fyn hraje rozsáhlou roli v patogenezi AD. Podle nových zjištění je Fyn kinasa zapojena do synaptických a behaviorálních poruch spojených s depozicí A β . Fyn reguluje produkci A β a zprostředkovává neurotoxicitu a synaptické deficity způsobené vznikem amyloidových plaků [60]. Kritickým krokem v patofyziologii AD je interakce oligomeru A β s povrchem neuronů, která vede ke změně biochemie v neuronech, zvyšuje se koncentrace kalcia a narušuje se synaptická plasticita. Postupně dochází k zániku neuronů [59, 60]. Čím vyšší je hladina A β , tím více se redukuje excitační synaptická transmise v hippocampu [60]. Fyn u AD může být aktivována pomocí povrchové buněčné vazby mezi extracelulárními oligomery A β a buněčnými prionovými proteiny PrP^C, které se k sobě vážou s vysokou afinitou. Aktivovaný Fyn poté hyperfosforyluje τ -protein na tyr-18, který vede k tvorbě neurofibrilárních klubek v mozku. Fyn podporuje degradaci podjednotek NR2A a NR2B, která následně vede k deficitu paměti a učení. Již v roce 1993 bylo zjištěno, že podstatná část neuronů v mozku postiženém AD vykazovala silnou Fyn imunoreaktivitu v porovnání s kontrolními mozky, a navíc tyto neurony byly pozitivní na hyperfosforylovaný τ -protein [59].

3.10 Duálně specifická fosforylací tyrosinu regulovaná kinasa

Duálně specifická fosforylací tyrosinu regulovaná kinasa-1A (DYRK-1A) je proteinová kinasa, která je kódována v kritické oblasti na chromosomu 21 [61]. Exprimována je prakticky ve všech tkáních, ale v nejvyšší koncentraci se nachází v mozku a v srdci [62]. Vyznačuje se duální fosforylací, a to autofosforylací tyrosinu-321 (tyr-321), čímž se sama aktivuje, a fosforylací serinových či threoninových zbytků na cílových proteinech [63]. DYRK-1A reguluje biologické funkce interakcí a potenciální fosforylací několika významných proteinů, včetně transkripčních faktorů, eukaryotických iniciačních faktorů, α -synukleinu a glykogensynthasy [62]. Podílí se rovněž na vzniku několika závažných onemocnění. Jedná se zejména o Downův syndrom, Pikovu chorobu a AD [61]. Downův syndrom se v tomto případě vyskytuje v souvislosti s AD [64]. Při polymorfismu DYRK-1A, konkrétně při trisomii chromozomu 21, roste koncentrace mRNA DYRK-1A v mozkové tkáni a dochází k její nadměrné expresi. To je považováno za faktor

přispívající k časnému počátku neurofibrilární degradace [63]. Téměř všichni jedinci trpící Downovým syndromem v dospělosti získají demenci Alzheimerova typu, neboť u nich dochází k předčasné akumulaci A β v mozku. Z tohoto důvodu vědci spekulovali, že genetický faktor související s AD by mohl existovat na chromosomu 21 [64].

V *in vitro* studii bylo prokázáno, že kinasa DYRK-1A fosforyluje τ -protein na několika místech, převážně však threonin-181 (thr-181), serin-199 (ser-199), ser-202, thr-205, thr-212, threonin-217 (thr-217), threonin-231 (thr-231), ser-396, serin-400 (ser-400), ser-404 a serin-422 (ser-422). Fosforylace pomocí DYRK-1A prefosforyluje τ -protein na místech thr-181, ser-199, ser-202, thr-205 a serin-208 (ser-208) a tato místa jsou následně fosforylována GSK-3 β . Hyperfosforylace v těchto lokalitách byla pozorována u jedinců s AD a u dospělých jedinců s Downovým syndromem. Fosforylace thr-212, ser-202 a ser-204 znemožňuje fyziologickou funkci τ -proteinu a postupně se zvyšuje množství τ -protein-3R, čímž dochází k nerovnováze mezi τ -proteinem-3R a τ -proteinem-4R, která usnadňuje neurofibrilární degeneraci [64]. Tyto výsledky dokazují, že další kopie genu pro DYRK-1A *in vivo* přispívá k brzkému začátku AD prostřednictvím hyperfosforylace τ -proteinu [62].

U lidí trpících AD dochází k nadměrné expresi mRNA DYRK-1A v hippocampu. Bylo zjištěno, že ukládání A β , zejména A β ₄₂, v mozku postiženém Downovým syndromem, stimuluje transkripci DYRK-1A v lidských neuroblastomových buňkách vedoucí k hyperfosforylaci τ -proteinu na thr-212 [63]. Tento jev by mohl být společným rysem mezi nemocemi a může být příčinou kognitivních deficitů u pacientů s AD. Gen pro DYRK-1A je zodpovědný za poruchu učení a paměti u AD. Inhibice DYRK-1A představuje nový potenciální terapeutický zásah v léčbě AD [63, 65].

3.11 Adenosinmonofosfátem aktivovaná proteinkinasa

Adenosinmonofosfátem aktivovaná proteinkinasa (AMPK) je heterotrimerní neprolinová serin-threoninová kinasa, jejíž majoritní funkcí je regulace buněčné homeostázy a metabolismu glukosy a lipidů [66, 67]. Jedná se o protein, který kontroluje a ovlivňuje funkci jiných proteinů. AMPK se podílí na procesu učení a ukládání paměti – reguluje proteinovou syntézu, která hraje roli v dlouhodobé synaptické plasticitě a dlouhodobé paměti [68].

AMPK, kromě podílu na fyziologických funkcích v organismu, zasahuje i do vzniku a vývoje patofyziologických potíží. Jedná se zejména o nemoc neurodegenerativního typu, jako je Pikova nemoc a AD, jež je spojena s abnormálním neuronálním energetickým metabolismem a poruchou učení a paměti v důsledku dysregulace AMPK [66, 67]. AMPK je aktivována fosforylací threoninu-172 (thr-172) komplexem jaterní kinasy B1 – v reakci na zvýšený poměr AMP/APT a kalmodulin-dependentní proteinkinasy- β – v reakci na zvýšenou hladinu kalciových iontů. Při taupatologiích se aktivovaná AMPK hromadí v neuronech, kde způsobuje sníženou mitochondriální biogenezi a redukuje jejich funkci. Role AMPK v patogenezi AD spočívá především v generaci $A\beta$ a hyperfosforylaci τ -proteinu. Fosforylace τ -proteinu probíhá na několika místech. AMPK je fyziologická τ -kinasa, ale je schopna vyvolat zvýšenou fosforylaci τ -proteinu na serin-262 (ser-262) [67]. *In vitro* analýza ukázala, že AMPK dokáže přímo fosforylovat τ -protein na thr-231 a ser-396/404 [66]. Vznik $A\beta$ reguluje prostřednictvím modulace neuronálního cholesterolu a sfingomyelinu a regulací distribuce APP v lipidových frakcích [67].

Inhibice aktivity AMPK může mít významné preventivní účinky před narušením synaptické aktivity způsobené extracelulárním $A\beta$. Potlačení aktivity AMPK je potenciálním kandidátem v kauzální léčbě AD už jen z hlediska toho, že AMPK je regulátorem energetického metabolismu [67]. AMPK se však vyznačuje neuroprotektivními, ale i neprotektivními vlastnostmi. Z tohoto důvodu je vhodné podrobit působení této kinasy dalším studiím, protože vedlejší účinky na molekulovou signalizaci a buněčné posláním zprostředkovávající kognitivní funkce nejsou dosud zcela objasněny. Inhibice AMPK může pacientovi přinést značný benefit, ale současně může být i škodlivá. Proto je stále předmětem diskuse [67, 68].

3.12 Mikrotubulární afinitu-regulující kinasa

Mikrotubulární afinitu-regulující kinasa (MARK) patří do kinasové skupiny AMPK podčeledi kalcium/kalmodulin-dependentních kinas [69]. Proteinová rodina MARK je u lidí tvořena čtyřmi vysoce konzervovanými členy MARK-1, MARK-2, MARK-3 a MARK-4, které jsou kódovány na chromozomech 1, 11, 14 a 19 [66, 69]. Jejich funkcí je utváření buněčné polarity, která je zásadní pro vývoj jedince. Dále se mohou podílet na diferenciaci neuronů, vývinu axonů, dendritických trnů a dalších buněčných procesech [70]. Zprostředkovávají přenos signálu [69]. Poruchy jejich

funkce vedou ke vzniku rakoviny nebo onemocnění mozku. V neuronech se vyskytují převážně isoformy MARK-1 a MARK-2. Protože MARK-2 navíc zajišťuje řízení neuronální migrace během vývoje mozku, je spojena s dynamikou cytoskeletu [70].

Jedná se o kinasy o velké velikosti (téměř 800 aminokyselinových zbytků), obsahujících několik domén. Regulovány jsou více způsoby. Jedním z nich je fosforylace aktivační smyčky ve dvou katalytických doménách. Další možností je fosforylace threonin-208 (thr-208) u MARK-2, čímž dochází k aktivaci kinasy, fosforylací serinu-212 (ser-212) je navozena inhibice. Inaktivace je dosaženo prostřednictvím kinasy GSK-3 β [69].

Zvýšená úroveň exprese proteinů MARK byla detekována v mozcích pacientů trpících AD. Kinasa MARK hraje důležitou roli v několika aspektech AD. Nejznámější vlastností je, že dovede fosforylovat τ -protein podle motivu KXGS ve své opakující se doméně [69]. K fosforylaci dochází na ser-262, serin-293 (ser-293), serin-324 (ser-324), serin-356 (ser-356) [66]. Důsledkem je ztráta afinity k mikrotubulům a odpojení se od nich. Mikrotubuly jsou destabilizovány a nenávaný τ -protein podléhá abnormální agregaci. K fosforylaci τ -proteinu a tvorbě NFTs dochází již v raných stádiích AD [66, 69].

Protože MARK vykazuje vztah k neurofibrilární degradaci pomocí hyperfosforylaci τ -proteinu, je v zájmu nalézt nízkomolekulární sloučeniny, které by aktivitu MARK inhibovaly. Jedním z příkladů je látka hymenialdisin, která potlačuje MARK a další kinasy vazbou na katalytickou kapsu [69].

4 Inhibice GSK-3 β , CK-1 δ

Předpokládá se, že za etiopatogenezi AD je zodpovědná nadměrná akumulace A β v mozku. Přestože amyloidová hypotéza je dominantní ve výzkumu léčby AD, nebyla dosud s jistotou potvrzena a hromadící se důkazy naznačují, že samotný A β na vyvolání této nemoci nestačí, neboť zatížení amyloidem nekoreluje vždy s klinickou závažností tohoto onemocnění. Z tohoto důvodu se někteří domnívají, že hlavní příčinou AD je spíše hyperfosforylovaný τ -protein [2, 10]. S identifikací stěžejní kinasy GSK-3 β a s poznáním jejích vlastností v průběhu hyperfosforylace τ -proteinu a při štěpení APP, a s objevením schopnosti kinasy CK-1 δ hyperfosforylovat τ -protein, se výzkum sloučenin s kinasovou inhibiční aktivitou stal jedním z předních zájmů studia nových terapeutických možností této choroby [2].

Aby sloučeniny vykazující inhibiční kinasovou aktivitu mohly být účinné, důležitá je jejich specifická distribuce v mozku. Inhibitory musí umět procházet přes HEB, aby dokázaly regulovat aktivovanou GSK-3 β v konkrétních mozkových oblastech [71]. Pro některé strukturní typy léčiv (především pro polární organické sloučeniny a peptidy) bývá často nesnadné procházet přes HEB, zvláště při perorálním způsobu podávání léčiva při chronické formě AD [8, 71]. Je velmi obtížné vyrovnat rovnováhu mezi molekulární lipofilitou důležitou pro vstup léčiva do mozku a molekulární hydrofilností, která je významná pro perorální podání. Z tohoto důvodu bylo vyloučeno několik slibných kinasových inhibitorů z trhu. Kromě toho vhodný poměr koncentrací léčiva v plazmě a mozku může být rozhodující pro dosažení adekvátních terapeutických hladin. Pro léčbu neurodegenerativních chorob je nezbytné použití malých GSK-3 β inhibitorů s nízkou molekulovou hmotností a dobrou průchodností přes HEB. Tyto inhibitory by neměly snížit fyziologickou aktivitu enzymu GSK-3 β o více než 25 %, aby se zabránilo riziku vzniku nežádoucích a toxických účinků [71].

Protože inhibice sama o sobě je schopna snížit zvýšené koncentrace GSK-3 β ve tkáních postižených chorobou, ale současně redukuje koncentraci a aktivitu GSK-3 β i ve tkáních zdravých, je pro terapii patologických stavů žádoucí pouze mírná kinasová inhibice. Ta dokáže obnovit aktivitu GSK-3 β a snížit její hladinu v postižených tkáních na fyziologickou úroveň [8].

V současné době bylo nalezeno a identifikováno více než 750 nízkomolekulárních sloučenin vykazujících inhibiční kinasovou aktivitu vůči GSK-3 β a dalším kinasám. Zahrnují nízkomolekulární sloučeniny izolované z přírodních zdrojů, kovové kationty a syntetické sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností [72]. Jedná se o řadu různorodých chemotypů, pro které jsou typické různé funkce a různý mechanismus působení [8].

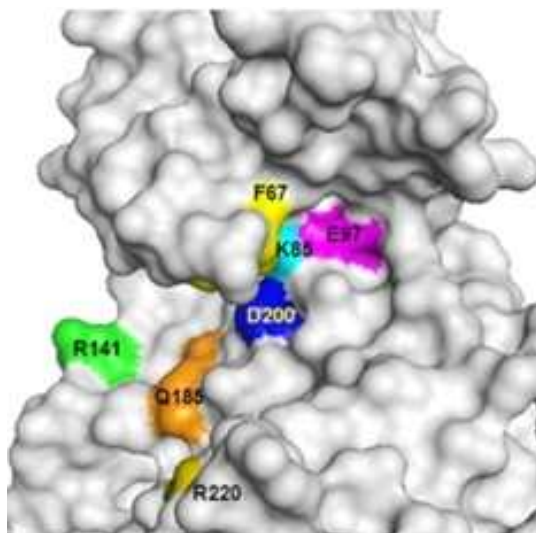
Z hlediska mechanismu inhibice tyto sloučeniny dělíme na substrátově kompetitivní inhibitory, ATP-kompetitivní inhibitory a ATP-nekompetitivní inhibitory [8].

Substrátově kompetitivní inhibitory se vážou na molekulu enzymu v malé míře. To představuje jejich nevýhodu. Specifická vazebná afinita a účinnost těchto inhibitorů *in vivo* může být zvýšena řadou chemických modifikací, přesto jsou pro výběr terapie AD nejméně vhodné [73].

Většina inhibitorů proteinových kinas je ATP-kompetitivní. Tento typ inhibitorů soutěží s molekulou substrátu o ATP-vazebné místo na kinase. Vyznačuje se nízkou specifitou [73]. Důvodem nízké specifity je fakt, že lidský kinom obsahuje více než 500 různých proteinových kinas s vysokým stupněm homologie v katalytickém místě, zejména v ATP-vazebné kapse [8]. Kromě toho ATP-kompetitivní inhibitor musí soutěžit s vysokou hladinou intracelulárního ATP. To vede k nesouladu mezi poloviční hodnotou maximální inhibiční koncentrace (IC_{50}) měřenou v biochemických a buněčných testech [74]. Jelikož hodnota IC_{50} bývá u těchto inhibitorů vyšší, hrozí riziko vzniku toxicity buněk. Při hledání a navrhování nových ATP-kompetitivních inhibitorů proteinových kinas je jedním z hlavních úkolů zvýšit jejich specifitu. Při dlouhodobé léčbě chronických onemocnění by tyto inhibitory mohly vyvolávat řadu nežádoucích účinků [8].

Pomocí krystalografické analýzy GSK-3 β byly identifikovány jednotlivé interakce uvnitř ATP-vazebného místa (Obrázek 6) a současně byly nalezeny i další vazebné aminokyselinové zbytky pro vazbu ATP-kompetitivních inhibitorů. Jsou lokalizovány na rozhraní C-terminálního a N-terminálního laloku katalytické domény. Patří mezi ně lysin-85/kyselina glutamová-97 (lys-85/glu-97), kyselina asparagová-133 (asp-133), arginin-141 (arg-141), kyselina glutamová-185 (glu-185), kyselina asparagová-200

(asp-200), arginin-200 (arg-200). Toto zjištění může mít přínos pro návrh nových inhibitorů [8].



Obrázek 6: ATP-vazebná místa v molekule GSK-3 β . Upraveno podle [8].

ATP-nekompetitivní inhibitory nabízejí možnost překonat tyto problémy [74]. Vzhledem k nepřítomnosti endogenní ATP kompetice vykazují lepší výsledky v buněčných a *in vivo* testech, které jsou srovnatelné s výsledky absorpce-distribuce-metabolismus-exkrece (ADME). Tento typ inhibitorů má navíc nižší hodnotu IC₅₀, která je žádoucí k zabránění buněčné toxicity [71]. Pro ATP-nekompetitivní inhibitory je charakteristická mnohem lepší selektivita, neboť se vážou mimo vazebné místo pro substrát [74]. Využívají mechanismus alosterické modulace [8]. Vazbou dochází ke změně konformace enzymu tak, že ovlivní i konfirmaci aktivního místa a je znemožněna vazba substrátu. Kinaso již není schopna fungovat [74]. Tímto způsobem je dosaženo jemnější modulace kinasové aktivity, než je tomu u zablokování vstupu do ATP-vazebné kapsy. ATP-nekompetitivní GSK-3 β inhibitory představují nově vznikající alternativní a slibné přístupy pro bezpečnější využití v klinické praxi a jsou vhodnými sloučeninami pro léčbu chronických onemocnění, včetně AD [8, 71].

Inhibice GSK-3 β a CK-1 δ prostřednictvím farmakologické intervence se stává novou strategií pro terapii neurodegenerativních a psychiatrických poruch [8].

4.1 Metody pro stanovení inhibice enzymů *in vitro*

Pro rychlý screening sloučenin s inhibiční kinasovou aktivitou a pro měření aktivity a inhibice kinas *in vitro* se nejčastěji používají různé formy fluorescenčního nebo chemiluminiscenčního záření [75]. Nejvyšší citlivost pro analýzu kinasových aktivit zajišťuje značení radioisotopy [76].

4.1.1 Kapalinová scintilační spektrometrie

Kapalinová scintilační spektrometrie je nejčastější používaná technika pro měření aktivity a inhibice kinas *in vitro*. Patří do skupiny analytických metod, při kterých se používá radioaktivní značení. Zabývá se měřením záření α a β . Využívá začlenění radioaktivní fosfátové skupiny do peptidových substrátů s následnou imobilizací peptidu na fosfocelulózové membráně [76]. Principem je interakce jaderného záření s hmotou, přičemž nedochází ke vzniku komplexu iont-elektron, ale dojde ke krátkodobé excitaci látky s následným vyzářením energie v podobě světelného impulzu s vlnovou délkou v oblasti viditelného záření, popřípadě v oblasti UV záření. Počet impulzů je úměrný počtu částic (α a β aktivitě zářiče) a jas světla energii záření. Jako detektor je používána organická nebo anorganická látka, která splňuje určité podmínky [77].

Tuto metodu ke stanovení aktivity GSK-3 β a Cdk-5 využili Plattner *et al.* K analýze nejprve zhotovili buněčné lyzáty o určité koncentraci proteinů, které nechali inkubovat se specifickými protilátkami anti-GSK-3 β a anti-Cdk-5. Po přidavku kuličkové suspenze a následně přidaných koncentracích specifických inhibitorů, zahájili scintilační měření přidáním roztoku ATP, jenž obsahoval radioaktivně značený [γ -³²P]-ATP. Reakce byla zastavena nanesením testované směsi na P81 nitrocelulózový papír, který byl několikrát promyt v kyselině fosforečné a poté v acetonu. Radioaktivita byla změřena Čerenkovým detektorem pomocí 25 ml polyetylenových scintilačních lahvíček naplněných 12 ml vody. Aktivita kinasy GSK-3 β byla vypočtena jako rozdíl mezi aktivitou bez přidavku inhibitoru a aktivitou s přidavkem inhibitoru. Stejným způsobem byla vyjádřena aktivita Cdk-5 [44].

Gebhardt *et al.* ve své studii použili kapalinovou scintilační spektrometrii ke stanovení fosforylace GSK-3 β a CK-1. Aktivitu GSK-3 β a CK-1 měřili v testovacích pufrech o celkových objemech 20 μ l obsahujících 3,75 μ M neznačeného ATP a 0,2 μ Ci radioaktivně značeného [γ -³²P]-ATP. Po inkubaci reakci zahájili přidavkem GSK-3 β

a CK-1 syntetického peptidového substrátu. V případě GSK-3 β byla reakce zastavena přidavkem neznačeného ATP, u CK-1 přidavkem kyseliny orthofosforečné. Obě reakční směsi byly přeneseny na P81 fosfocelulózové filtry, které nechali vysušit, poté několikrát promyli v kyselině fosforečné za stálého třepání. Po vysušení byly filtry ponořeny do roztoku určeného pro scintilaci a záření bylo měřeno prostřednictvím analyzátoru Tri-carb 2500TR [78].

Kapalinová scintilační spektrometrie byla použita Gebhardtem *et al.* pro stanovení inhibice GSK-3 β . Použili hepatocyty izolované z jater, které byly předem kultivovány vzestupnými koncentracemi inhibitorů této kinasy. Připravili 45 μ l lyzátu, který byl přidán k 90 μ l testovacího pufru s 1 μ Ci uridindifosfo-[6-³H]-D-glukosy. Směs inkubovali v přítomnosti a za absence glukosa-6-fosfátu. Po inkubaci reakční směs nanесли na Whatman ECH 2R filtrační papír a několikrát promyli v 66% ethanolu a následně v acetonu. Po vysušení, během kterého došlo k začlenění glukosy z uridindifosfo-D-[6-³H]-D-glukosy, následovala kvantifikace. Aktivita GSK-3 β byla vyjádřena jako poměr aktivity v přítomnosti a za absence glukosa-6-fosfátu [78].

Kapalinová scintilační spektrometrie má několik nevýhod, příkladem může být relativně slabá vazba peptidového substrátu k fosfocelulózové membráně, která často vede ke ztrátě ³²P-peptidového produktu během promývání. Dalším nedostatkem může být to, že tento postup vyžaduje alespoň jeden základní bazický aminokyselinový zbytek v peptidovém substrátu, který limituje navrženou peptidovou sekvenci pro stanovení specifčnosti a pro optimalizaci. K překonání těchto problémů může být peptidový substrát označen skupinou biotinu. Biotinylovaný ³²P-peptidový produkt se důkladně naváže ke streptavidinové membráně nezávisle na peptidové sekvenci. Separace ³²P-peptidu od volného ³²P-ATP prostřednictvím streptavidinové membrány navíc vyžaduje intenzivnější a nevyhovující promývání, ultrafiltraci a centrifugaci [76]. Dalším negativem je, že se jedná o metodu s vysokými finančními náklady [79].

Řešením mohou být homogenní scintilační proximitní testy (SPA), které mají překonat problém separace produktů klasickou radioaktivní cestou. Díky snadné automatizaci jsou vhodné pro vysoce výkonný screening (HTS). Využívají se pro stanovení enzymatické kinetiky a k analýze receptorových vazeb. Zachovávají si však řadu nevýhod v podobě vysokých nákladů činidel a obav z manipulace s radioaktivitou [76].

4.1.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická biofyzikální metoda, která stanovuje efektivní hmotnosti atomů, molekul a jejich fragmentů po převedení na ionty. Je využívána i pro měření aktivity a inhibice enzymů *in vitro* a jejich kinetiky [75]. Tuto metodu využili Martínez *et al.*, kteří prostřednictvím MS analyzovali úroveň fosforylace specifických aminokyselinových zbytků v molekule τ -proteinu [71].

V současné době je MS spojována s jinou analytickou metodou. Marchand *et al.* využili spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS) pro stanovení vlivu inhibice GSK-3 β na autofagii nádorových pankreatických buněk [80]. Bock *et al.* použili spojení LC-MS pro analýzu potkaních embryonálních kmenových buněk po ošetření kinasovým inhibítorem ke zjištění modulace aktivity kinasy GSK-3 β a ERK [81]. Spojením imunoprecipitace s MS detekcí provedli Li *et al.* analýzu destruovaného komplexu axin-1- β -katenin při zahájení *in vitro* fosforylace β -kateninu prostřednictvím GSK-3 β ve WNT signální dráze po přidavku GSK-3 β inhibitoru. Jednotlivé proteiny poté kvantifikovali [82].

Výhodou této metody je robustnost, vysoká citlivost a rychlost [75].

4.1.3 NMR spektroskopie

NMR spektroskopie je analytický nástroj vhodný pro analýzu strukturálních vlastností a molekulové dynamiky nestrukturálních proteinů, jako je τ -protein. Pomocí této metody je možné studovat různé aspekty fyziologických a patologických funkcí τ -proteinu. Z intenzity nebo integrální rezonance je možné odvodit relativní procento fosforylace konkrétních aminokyselinových reziduí v proteinovém vzorku po fosforylaci *in vitro* rekombinantními kinasami. Zaměření na hyperfosforylaci τ -proteinu v raných stádiích se v současné době stává předmětem zájmu při hledání léčiv [83].

Leroy *et al.* studovali pomocí 2D NMR spektroskopie kvalitativní a kvantitativní fosforylaci τ -proteinu, kterou způsobovala GSK-3 β *in vitro*. K analýze použili trojitou rezonanční kryogenní sondu [84].

Corbel *et al.* použili tuto metodu pro detekci interakce proteinu p25 s inhibítorem tamoxifenem. Sledovali, zda dojde k inhibici aktivity patologické formy Cdk-5-p25,

jenž vyvolává taupatologii při AD. K analýze použili vzorek s přítomným proteinem p25 a s absencí p25 [85].

Landrieu *et al.* použili SY5Y buněčnou linii s nadměrnou expresí Cdk5 za účelem analýzy a kvantifikace míry fosforylace τ -proteinu [83].

NMR spektroskopie je poměrně náročná vzhledem k tomu, že τ -protein se skládá ze 441 aminokyselin. Další nevýhodou je špatný rozptyl a nízká citlivost vzhledem k imunochemii a MS. Výhodou je možnost kvantifikace [83].

4.1.4 Luminiscenční metody

Inhibice GSK-3 β byla stanovena Baki *et al.* luminiscenční metodou, ve které použili vysoce selektivní, citlivou, reprodukovatelnou a univerzální platformu ADP-GloTM. Jelikož všechny kinasy využívají ATP jako fosfátový donor substrátu, který se během reakce spotřebovává, funkcí tohoto testu je kvantifikace zbývajících ATP po kinasové reakci [79].

V prvním kroku nechali proběhnout kinasovou reakci za absence inhibitoru a v přítomnosti inhibitoru o určité koncentraci. Reakce byla ukončena přidáním ADP-GloTM. Po oxidaci luciferinových substrátů, které jsou oxidovány luciferasou za vzniku oxyluciferinu a energie ve formě paprsku světla, přičemž jeden obrat mezi luciferinem a luciferasou spotřebovává jednu molekulu ATP a uvolňuje jeden foton, byla luminiscence měřena luminometrem. Luminiscenční signál je přímo úměrný množství přítomného ATP a nepřímo koreluje s aktivitou kinasy [79].

Tento postup využili také Sanphui *et al.* pro posouzení inhibiční aktivity Cdk-2, Cdk-4 a Cdk-5 [86].

Výhodou luminiscenčních metod je, že představují homogenní, neradioaktivní metody vhodné pro testování ATP-kompetitivních i ATP-nekompetitivních inhibitorů. Test se používá pro sledování aktivity jakékoliv kinasy [79]. Běžné luminiscenční a fluorescenční metody mají tu nevýhodu, že k získání signálu jsou nutné další komponenty (enzymy katalyzující reakce, protilátky). Proto jsou tyto metody snadno náchylné k analytickým chybám [79, 86].

4.1.5 Multiplexní kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza je analytická metoda, která slouží k separaci látek na základě jejich rozdílné pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli. Existuje celá řada variant kapilární elektroforézy [87]. Jednou z nich je multiplexní kapilární elektroforéza (MCE), která je vhodnou metodou pro měření enzymové aktivity a testování účinnosti inhibitorů *in vitro* [76, 87]. Tato metoda našla uplatnění zejména v proteinovém inženýrství a slouží k rychlému screeningu aktivity především proteinových kinas [87].

Metodu MCE využili badatelé He a Yeung pro sledování kinasových inhibitorů. Při analýze použili kapilární elektroforézní systém s UV absorpční detekcí. Diverzifikované peptidy s nativní aminokyselinovou sekvencí a jejich fosforylovanými zbytky mohly být přímo analyzovány bez potřeby fluorescenčního nebo radioaktivního značení. Účinky inhibitorů a jejich IC_{50} hodnoty byly měřeny celkem 3krát, a to za použití nejprve jedné purifikované kinas, dvou purifikovaných kinas a surových buněčných extraktů. Spojení MCE/UV dokáže velmi rychle separovat peptidy, fosfopeptidy a je jednoduchým a vysoce výkonným testem pro analýzu úspěšnosti silných a selektivních inhibitorů různých proteinových kinas [76].

Výhodou MCE je vysoká separační účinnost, malá spotřeba vzorků, rychlost analýzy a schopnost detekce velkého množství vzorků najednou [76, 87].

4.1.6 Imunochemické metody

Imunochemické metody jsou využívány k identifikaci a kvantifikaci cílových molekul prostřednictvím vysoce selektivních protilátek [88].

K přípravě vzorků pro imunochemickou analýzu jsou využívány lyzační pufrů, které uvolní a následně rozpustí proteiny obsažené v testovaných tkáních. Výběr lyzačního pufru závisí na vlastnostech protilátky, neboť některé protilátky vyžadují navíc denuraci studovaných proteinů. Analýza by měla probíhat za snížené teploty kvůli rychlému a nežádoucímu rozkladu tkání. Jako tkáně pro studium inhibitorů se nejčastěji používají primární neuronové kultury izolované z hippocampu dospělých potkanů, protože obsahují značné množství kinas GSK-3 β a CK-1 δ [44, 89]. Potkani se usmrtí použitím CO₂. Po jejich usmrcení je z mozků vyjmut hippocampus, který je

homogenizován při 4 °C v lyzačním pufru (nejčastěji RIPA), jež obsahuje i inhibitory fosfatas a proteas, a poté je uložen při teplotě -80 °C [44].

4.1.6.1 Western blot

Jednou z imunochemických metod je Western blot, při které se vzorek primární neuronové hippocampální kultury kultivuje s určitými studovanými inhibitory o různých koncentracích po dobu alespoň 24 hodin. Podmínkou je, aby testované inhibitory byly do reakce přidávány v takovém množství, které stanovily publikované studie, aby nedošlo k toxicitě buněk. Poté je vzorek lyzován, centrifugován a přidává se vzorkovací pufr [89].

Nezbytnou součástí této metody je kvantifikace. Měří se celková koncentrace exprimovaného proteinu v lyzátu metodou využívající kyselinu bicinchonovou (BCA), jejímž principem je konverze Cu^{2+} na Cu^{1+} v alkalickém prostředí. S kationtem Cu^{1+} dále reaguje kyselina bicinchonová, čímž dochází k tvorbě intenzivně fialového komplexu, který vykazuje maximum absorpance při 562 nm, jež se detekuje spektrofotometricky. Obsah celkové koncentrace proteinu ve vzorku se stanoví porovnáním hodnot absorpance koncentrační řady se standardem, který je tvořen albuminem [90].

Ekvivalentní množství proteinů v řádech μg je následně nanášeno na gel, nejčastěji polyakrylamidového typu, na kterém se vzorky elektroforeticky separují podle své molekulové hmotnosti, a poté jsou prostřednictvím elektroforetického děje přeneseny na polyvinylou či polyvinylidendifluoridovou membránu [89, 91]. V této fázi je nezbytné membránu s imobilizovanými proteiny inkubovat v blokovacím pufru za účelem zablokování nescifických vazebných míst. Pro detekci míry exprese a aktivity GSK-3 β jsou do reakce přidávány primární specifické protilátky, například primární králičí polyklonální protilátka anti-GSK-3 β ser-9 a pro detekci změn v gliových proteinech myší protilátka anti-GFAP [89]. Směs se nechává inkubovat obvykle přes noc při 4 °C [91]. Po promytí inkubovaných membrán následuje přidavek sekundární protilátky (králičí protilátka kongujovaná s peroxidasou), která se naváže na Fc fragmenty protilátky primární, a směs se nechává znovu inkubovat při určité teplotě po dobu zpravidla 1 hodiny. Membrána je znovu několikrát promyta pufrům [89, 91]. Utvořené imunoreaktivní frakce na membráně se detekují chemiluminiscencí

a kvantifikují denzitometrií v lineárním rozsahu. Denzitometrická analýza se vždy provádí nejméně 3krát [89].

Western blot je velmi často používanou metodou pro analýzu řady inhibitorů ovlivňujících kinasovou aktivitu. Je možné ji využít pro detekci fosforylované formy GSK-3 β , a tím i pro zjištění konkrétního fosforylovaného místa v molekule kinasy, i pro detekci tvorby A β , na jehož syntéze se tato kinasa podílí [89]. V takovém případě se kultivuje N2a myší neuroblastomová buněčná linie stabilně tvořící APP nesoucí švédskou mutaci ve speciálním médiu za přítomnosti a za absence GSK-3 β specifických inhibitorů. Do reakce se v prvním kroku přidává primární monoklonální protilátka namířená proti 17. až 42. aminokyselině lidského A β a po inkubaci sekundární protilátka rozpoznávající 1. až 17. aminokyselinu lidského amyloidu [92].

4.1.6.2 Imunoprecipitace

Metodu koimunoprecipitace (spojení imunoprecipitace a Western blotu) využili Cuchillo-Ibanez *et al.*, kteří použili jako zdroj GSK-3 β primární neuronovou kulturu izolovanou z potkanů. Tuto kulturu nejprve ošetřili určitými typy GSK-3 β inhibitorů a kontrolou o různých koncentracích a směs nechali inkubovat po dobu 4 hodin. Po sklizení buněk vytvořili vychlazený buněčný lyzát obsahující navíc kompletní inhibitory proteas a fosfatas zabraňující nežádoucím rozkladným procesům. Lyzát uložili do ledu po dobu 30 minut a poté centrifugovali. Supernatanty předčistili proteinem A a inkubovali je po dobu 1 hodiny při 4 °C. Před vlastní imunoprecipitací byla spočítána a standardizována celková koncentrace proteinu v předčištěných lyzátech [93].

V následujícím kroku proběhla vlastní imunoprecipitace, kdy proteiny byly imunoprecipitovány přidavkem polyklonální protilátky proti lidskému τ -proteinu přes noc při teplotě 4 °C za stálého míchání. Její funkcí je vyvázat antigen ze směsi. K oddělení vzniklých imunoprecipitátů došlo po přidavku proteinu A/G navázaném na kuličkové suspenzi z agarosy, jehož cílem je vysrážet antigen. Tyto navázané proteiny byly získány zahříváním ve vzorkovacím pufru. Vizualizované proteiny byly separovány na SDS/PAGE gelu a elektroforeticky přeneseny na membránu, kde byly detekovány polyklonální protilátkou anti- τ [93].

4.1.6.3 ELISA

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) je jednou z nejpoužívanějších imunoanalýz [88]. Používají se monoklonální a polyklonální protilátky k testování enzymových vlastností. Společným cílem je určení enzymové aktivity [94]. ELISA se vyznačuje dobrou reprodukovatelností, rychlostí, citlivostí, schopností detekovat antigeny v pikogramových koncentracích v buněčných či tkáňových lyzátech, nebo v biologických tekutinách. Patří do heterogenních analýz a dělí se na kompetitivní a nekompetitivní (sendvičovou) [88, 94]. Jako detekční činidlo využívá sekundární protilátku s kovalentně navázaným enzymem, jehož aktivita je měřena prostřednictvím fluorogenního nebo chromogenního substrátu [88]. Pro kvantifikaci a analýzu GSK-3 β se nejčastěji používá ELISA sendvičového typu se spektrofotometrickou detekcí [95].

Pastorino *et al.* pomocí sendvičové ELISA změřili aktivitu dvou kinas, konkrétně GSK-3 β a Akt. Tyto dvě kinasy byly nejprve imunoprecipitovány z celkových buněčných extraktů a po přidavku specifických peptidových substrátů byla kinasová reakce zahájena přidavkem ATP. Po inkubaci, centrifugaci a přenesení supernatantu do mikrotitrační destičky s fosfocelulózovým povrchem byla reakční směs promyta vazebným pufrům. Úroveň fosforylace peptidů byla detekována anti-fosfoserinovou protilátkou a změřena spektrofotometricky [95].

Eldar-Finkelman a Martinez využili sendvičovou metodu pro analýzu inhibice kinasy GSK-3 β . Pomocí této metody kvantifikovali míru fosforylace τ -proteinu, která proběhla prostřednictvím kinasy GSK-3 β po ošetření lidských SH-SY5Y neuroblastomových buněk inhibitorem o třech různých koncentracích [8].

4.1.7 Molekulárně genetické metody

4.1.7.1 qPCR

Mendes *et al.* využili kvantitativní PCR k hodnocení transkripční regulace GSK-3 α a GSK-3 β v lithiem ošetřené primární kortikální a hippokampální kultuře neuronů izolovaných z potkanů. Embryonální mozky potkanů byly po izolaci ponořeny do solného roztoku, kde se rozčlenily a jednotlivé fragmenty byly disociovány trypsinizací a následně mechanickou disociací v solném roztoku s Master mixem pro přípravu PCR. Buňky byly spočítány a resuspendovány v neurobazálním mediu a byly kultivovány na miskách obsahujících poly-D-lysin. Kultivační medium po 24 hodinách inkubace bylo nahrazeno mediem se sérem. Neuronální životaschopnost byla

pozorována mikroskopicky. Po 5 dnech byly kultury inkubovány dalších 5 dní s různými koncentracemi inhibitoru LiCl. Výsledky byly prezentovány přímo z primárních neuronálních kultur měřením pomocí real-time qPCR. Bylo zjištěno, že přidavkem inhibitoru LiCl dochází ke snížení exprese GSK-3 β v hippokampálních neuronech [96].

4.2 Výzkum inhibice kinas *in silico*

Výpočetní metody, označované jako metody *in silico*, jsou založené na vztahu mezi strukturními vlastnostmi chemických látek a jejich biologickými, popřípadě toxikologickými účinky. Jedná se o predikční metody, při kterých se z chemické struktury látky předpovídá její biologický účinek. Tyto metody se vykazují značným potenciálem a podléhají aktivnímu rozvoji. V současné době se stávají stále významnějšími nástroji pro studium vývoje nových léčiv a předpokládá se, že v blízké budoucnosti budou nejvyhledávanějšími metodami v oblasti testování účinků chemických látek [97]. Metody *in silico* přinášejí řadu výhod, například vysokou rychlost ve srovnání s rutinním testováním, vysokou efektivitu, snížení počtu testovaných zvířat a relativně nízké finanční náklady [97, 98].

Existuje několik druhů metod *in silico*, které se navíc liší různými softwarovými programy určujícími molekulovou strukturu látek [97]. Martinez *et al.* prostřednictvím metody SAR (structure-activity relationship), jenž slouží k analýze a popisu kvalitativních vztahů klíčových strukturálních vlastností látek a jejich vlivu na biologické, chemické či fyzikální vlastnosti, stanovili první ATP-nekompetitivní inhibitor vůči GSK-3 β [97, 99].

Model QSAR (quantitative structure-activity relationship) udává kvantitativní vztah mezi chemickou strukturou látky a její biologickou účinností. V toxikologické, ale především ve farmakologické praxi zabývající se výzkumem nových léčiv, je tento model nejrozšířenější. Nevýhodou je, že je vhodný pouze pro průmyslově vyráběné látky, ne pro látky přírodní [97].

QSAR je rovněž hojně využíván pro studium a výzkum inhibice aktivity mnoha kinas [97]. Spojení 2D/3D QSAR se softwarovým programem OSIRIS Property Explorer, jehož úlohou je kreslit chemické struktury a vypočítávat vlastnosti

chemických látek, využili Balakrishnan *et al.* pro studium účinků nově navržených inhibitorů GSK-3 β [98].

Kolegové Akhtar a Bharatam prostřednictvím 3D QSAR s použitím statistické analýzy CoMFA a CoMSIA analyzovali sérii ATP-kompetitivních GSK-3 β inhibitorů. Toto spojení má vysokou účinnost, neboť statisticky významná CoMSIA umožňuje výraznější disekci mnoha energií v molekule, včetně sterických, elektrostatických a entropických efektů, které je jinak obtížné kvantifikovat. CoMSIA navíc obsahuje cenné doplňující informace o hydrofobních vlastnostech ligandů a jejich vodíkových a donor-akceptorových vazbách [100].

Přístup 3D QSAR lze kombinovat s deskripčním softwarem SMILES (simplified molecular input line entry specification), jehož hlavním úkolem je zjednodušit zápis chemických struktur v podobě jednoduchého lineárního záznamu strukturního vzorce [101]. Pomocí tohoto přístupu zjistili badatelé Quesada-Romero a Caballero informace o stereochemickém rozložení látky, jež vykazovala inhibiční aktivitu vůči GSK-3 β [102]. Výhodou tohoto programu je dobrá čitelnost, jednoduchost jazyka, malá velikost kódu a spolupráce s chemickou databází [101]. Nevýhodou je, že jedna molekula může být zapsána více možnými způsoby a ne všechny jsou vždy správné [101, 102].

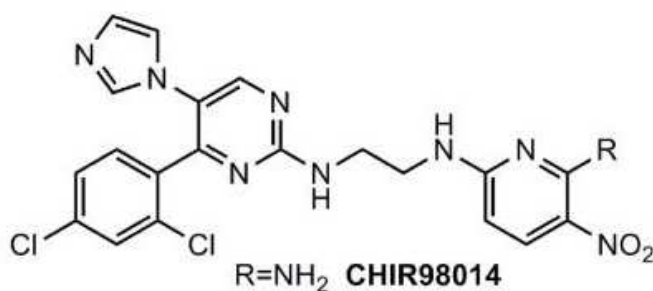
4.3 Syntetické inhibitory

4.3.1 Syntetické ATP-kompetitivní inhibitory

4.3.1.1 Aminopyrimidiny

Mezi syntetické kinasové inhibitory s malou molekulovou hmotností patří analogy purinu, konkrétně aminopyrimidiny, které vynalezli vědci z biotechnologické společnosti Chiron. Souhrnně se tyto látky označují jako CHIRs inhibitory. Řadí se mezi ně CHIR-98014, CHIR-98023 a CHIR-99021, které působí již v nanomolárních koncentracích. Systémová analýza potvrdila jejich buněčnou propustnost a vysokou selektivitu vůči GSK-3. Studie, které se zabývaly testováním účinnosti těchto inhibitorů prostřednictvím kultivace mozku potkanů s CHIRs, potvrdily, že došlo k silné redukci fosforylace τ -proteinu. Navíc ošetření CHIRs inhibitory snižovalo růst axonů v mozečku a v gangliích dorzálních kořenů, rovněž zabraňovalo vzniku LTD v hippokampálních řezech a inhibovalo smrt neuronů v ischemickém mozku potkanů [8].

CHIR-98014 (Obrázek 7) je vysoce selektivní, reverzibilní inhibitor isoformy GSK-3 α a GSK-3 β s hodnotami $IC_{50} = 0,65$ nM a $IC_{50} = 0,58$ nM, které byly získány buněčným měřením *in vitro*. CHIR-98014 velmi dobře rozpoznává také jejich nejbližší homology (ERK-2 a Cdk-2) a další serin-threoninové a tyrosinové kinasy. Prostřednictvím svých účinků na GSK-3 stimuluje glykogensyntasu v buňkách ($EC_{50} = 106$ nM), podněcuje insulin-dependentní transport glukosy ve svalech, zlepšuje odstraňování glukosy u diabetiků, inhibuje fosforylaci τ -proteinu a podporuje WNT signalizaci během osteogeneze [103].



Obrázek 7: CHIR-98014. Upraveno podle [8].

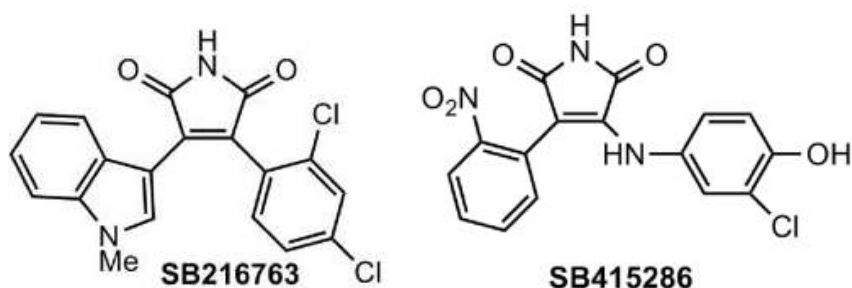
4.3.1.2 Maleimidy

Maleimidové ATP-kompetitivní inhibitory SB-216763 a SB-415286 (Obrázek 8), vyznačující se rozdílnou chemickou strukturou, byly vyvinuty farmaceutickou společností GlaxoSmithKline. Obecně jsou označovány jako látky SBs [8]. Jsou buněčně propustné a vysoce selektivní vůči GSK-3, kterou inhibují již v nanomolárních koncentracích. Pomocí *in vitro* analýzy byly naměřeny pro isoformu GSK-3 α hodnoty $K_{(i)} = 9$ nM a $IC_{50} = 34$ nM a pro isoformu GSK-3 β hodnoty $K_{(i)} = 31$ nM a $IC_{50} = 7$ nM [104, 105]. SBs se vyznačují neuroprotektivními vlastnostmi. Jejich předností je schopnost redukce toxicity neuronů vyvolanou A β , snížení fosforylace τ -proteinu a blokace LTD. Dále dokážou inhibovat kinasovou dráhu PI-3/Akt, aktivitu kinasy JNK a kaspasy-3. Snižují také trofickou deprivaci a NMDA excitotoxicitu v neuronech [8]. Další jejich funkcí je stimulace syntézy glykogenu v lidských játrech a indukce exprese β -kateninu v buněčné linii odvozené od embryonálních buněk ledvin (buňky HEK293) [104].

SB-216763 dokáže vyvolat inhibici růstu axonů v postnatálních a embryonálních gangliích dorzálních kořenů míchy. Některé studie naopak uvádějí, že tento inhibitor

podporuje růst několika dlouhých axonů v hippocampu, gangliích dorzálních kořenů míchy a v granulových buňkách v mozečku. Dále bylo zjištěno, že SB-216763 má schopnost zlepšovat regeneraci axonů v poškozených neuronech. Z těchto rozporuplných závěrů bylo usouzeno, že stav a osud axonů je závislý na stupni inhibice GSK-3. Silná inhibice způsobená přidavkem nadměrné koncentrace GSK-3 inhibitorů růst axonu potlačuje, naopak slabá inhibice GSK-3 podporuje axonové větvení [8]. SB-216763 kromě snižování kumulace A β v mozkové tkáni a inhibice fosforylace τ -proteinu v hippocampu, chrání také kultivované neurony centrálního a periferního nervového systému před buněčnou smrtí [8, 104]. SB-216763 může působit i neurodegenerativně, neboť nadměrná inhibice GSK-3 β může vyvolat abnormální chování neuronů [8].

Vývoj podobných sloučenin může být užitečný při léčbě chorobných stavů spojených s nadměrnou expresí GSK-3 β , jako jsou neurodegenerativní choroby nebo diabetes mellitus [104].



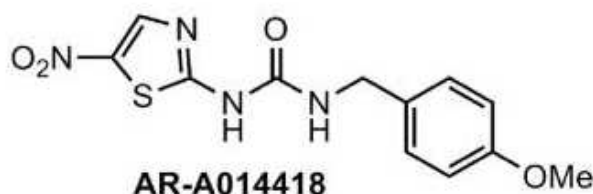
Obrázek 8: SB-216763 a SB-415286. Upraveno podle [8].

4.3.1.3 Aminothiazoly

Farmaceutická společnost AstraZeneca vyvinula syntetický ATP-kompetitivní inhibitor AR-A014418 (Obrázek 9), který vykazuje v porovnání s ostatními kinasami silnou selektivitu vůči GSK-3 β s hodnotou IC₅₀ = 104 nM. Bylo prokázáno, že AR-A014418 zprostředkovává neuroprotektivní účinky u buněk, u nichž nastala apoptóza v důsledku inhibice PI-3 kinasy a zabraňuje neurodegeneraci v hippocampálních řezech, jenž byly exponovány A β [8].

AR-A014418 má schopnost rovněž inhibovat hyperfosforylaci τ -proteinu. Po inkubaci AR-A014418 u JNPL3 transgenních myší se zvýšenou expresí mutantního lidského τ -proteinu, byly zaznamenány snížené hladiny agregovaného nerozpustného

τ -proteinu v mozkovém kmeni, ale AR-A014418 nevykazoval žádný inhibiční účinek na fosforylaci τ -proteinu v kůře ani v hippocampu u postnatálního modelu potkanů. Při pozorování transgenního myššího modelu ALS inhibitor AR-A014418 potlačoval smrt motorických neuronů a zlepšil jejich kognitivní funkce. Dále bylo potvrzeno, že léčba pomocí AR-A014418 snižuje prodlužování axonů v hippocampální neuronové kultuře. Tento inhibitor je také vhodný pro léčbu deprese, manické poruchy a schizofrenie [8].



Obrázek 9: AR-A014418 [8].

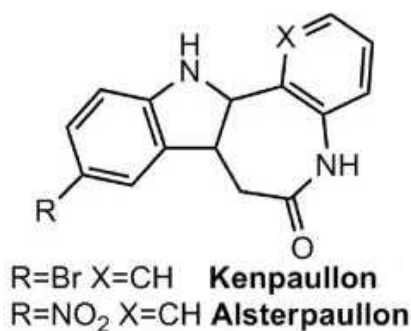
V současné době byla nalezena strukturně podobná sloučenina AZD-1080, která se nachází v první fázi klinické studie [8]. AZD-1080 je silný a selektivní inhibitor GSK-3 β , který inhibuje fosforylaci v buňkách exprimujících lidský τ -protein. Inhibiční schéma fosforylace τ -proteinu prostřednictvím AZD-1080 odhaluje jeho prodloužený farmakologický účinek předpovídající méně častou potřebu dávkování u lidí. AZD-1080 vykazuje dobrou biologickou dostupnost důležitou pro podání perorální cestou. Dokáže prostupovat HEB [106].

4.3.1.4 Paullonové sloučeniny

Z paullonových sloučenin vykazujících inhibiční kinasovou aktivitu je nejvýznamnější zejména kenpaullon a alsterpaullon (Obrázek 10). Jedná se o tetracyklické sloučeniny, které inhibují obě formy GSK-3 a kinasy Cdk_s již v nanomolárních koncentracích [8]. Alsterpaullony se dobře absorbují a díky své lipofilitě prostupují přes HEB [107]. Jako nejvíce selektivní inhibitor vůči GSK-3 β byla stanovena strukturně podobná sloučenina nazvaná 1-azakenpaullon. Její derivát kazpaullon byl jako inhibitor této kinasy identifikován teprve nedávno [8].

Kenpaullony a alsterpaullony se vyznačují jako inhibitory neuronální smrti, která nastává jako odezva na řadu stimulů, včetně trofické deprivace a mitochondriální

smrti. Bylo prokázáno, že alsterpaullon v kultivovaných neuronech redukuje fosforylaci τ -proteinu a v hippokampálních řezech snižuje LTD. Kenpaullon naopak redukuje produkci A β a podporuje diferenciaci prekurzorových buněk na dopaminové neurony [8].



Obrázek 10: Paullonové sloučeniny [8].

4.3.2 Syntetické ATP-nekompetitivní inhibitory

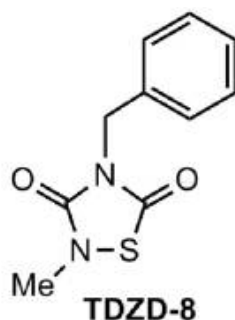
4.3.2.1 Thiazolidiny

Mezi nejdříve objevené ATP-nekompetitivní inhibitory patří thiazolidiny (TDZD). Jsou to syntetické heterocyklické bazické sloučeniny s malou molekulovou hmotností, vysoce selektivní vůči GSK-3 β . I přestože jejich přesný mechanismus nebyl dosud experimentálně potvrzen, předpokládá se, že klíčovou roli zde představuje interakce TDZD s cysteinem-199 (cys-199) lokalizovaným v aktivním místě molekuly GSK-3. TDZD nevykazují inhibiční aktivitu ke kinase CK-2, PKA, PKC ani ke komplexu Cdk-1/cyklin B [8].

Po ošetření zvířecího modelu různorodými typy TDZD inhibitorů, jako jsou NP001111, NP031112, NP031115, bylo zjištěno, že tyto látky mají neuroprotektivní a antidepressivní vlastnosti. Po inkubaci primární neuronové kultury s TDZD byla detekována snížení hladina fosforylovaného τ -proteinu [8]. Rovněž bylo zjištěno, že některé nové sloučeniny TZDZ prostupují HEB a mohou být podávány perorální cestou [108].

Nedávno byly objeveny sloučeniny TDZD-8 (Obrázek 11) a tideglusib (NP031112, NP-12). Velký potenciál představuje tideglusib, nízkomolekulární sloučenina vykazující ireverzibilní účinky a vysokou selektivitu vůči GSK-3 β

($IC_{50} = 60 \text{ nM}$) [8, 109]. Tato látka dokáže prostupovat HEB. V současné době dosáhla druhé fáze klinické studie zabývající se onemocněním, jako je progresivní supranukleární paralýza a především AD. Výzkum ukázal, že u pacientů trpících mírnou až střední formou AD, kteří po dobu 24 týdnů užívali tideglusib, došlo ke zlepšení kognitivních funkcí [8]. Dále bylo prokázáno, že perorálním podáváním této sloučeniny se redukovaly všechny histopatologické funkce souvisejících s AD u potkanů, včetně depozice $A\beta$, hyperfosforylace τ -proteinu a smrti neuronů [8, 109].



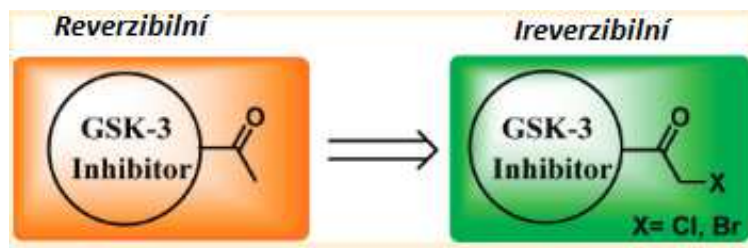
Obrázek 11: TDZD-8 [8].

4.3.2.2 Halomethylketonové deriváty

Halomethylketonová jednotka je nezbytná pro inhibiční aktivitu enzymu. Přidáním této jednotky k reverzibilnímu inhibitoru se inhibitor změní na ireverzibilní (Obrázek 12) [111].

Prvními ireverzibilními inhibitory GSK-3 jsou fenylnalomethylketony s hodnotou IC_{50} v nanomolárním rozsahu [111]. K inaktivaci kinasy dochází vytvořením ireverzibilní kovalentní vazby síra-uhlík mezi tímto inhibitorem a klíčovým cys-199 umístěným při vstupu do ATP-vazebného místa v molekule GSK-3 [8].

K dispozici je několik komerčně dostupných halomethylketonových derivátů, které jsou buněčně prostupné a vysoce selektivní k řadě proteinových kinas [8]. Vysokou selektivitu vykazují i vůči neurotransmiterům v CNS [111]. Dokážou prostupovat HEB [71]. Jejich funkcí je především redukce hyperfosforylace τ -proteinu v primární neuronové buněčné kultuře, a to již po 2 hodinách od zahájení léčby [8].



Obrázek 12: Reverzibilní a ireverzibilní inhibitor. Upraveno podle [111].

4.4 Přírodní inhibitory

V posledních letech farmaceutické firmy a akademická pracoviště vynakládají velké úsilí v objevu a ve vývoji přírodních inhibitorů GSK-3 β [8]. Protože 70 % zemského povrchu pokrývají oceány, které činí zhruba 95 % biosféry, jsou dosud ne příliš probádanými oblastmi a představují významnou příležitost pro objev řady farmakologicky účinných látek. V oceánech se nachází přes milion rostlinných a živočišných druhů, které se stávají předmětem mnoha farmakologických studií. Vzhledem k rozdílným biogenetickým podmínkám, jako je vysoký obsah soli, vysoký tlak a konstantní teplota, sekundární metabolity mořských živočichů jsou strukturálně odlišné od suchozemských přírodních produktů. Mořské přírodní sloučeniny jsou v současné době součástí preklinických hodnocení, vykazují slibnou biologickou aktivitu v biologických testech *in vitro* a *in vivo* [9]. Bylo prokázáno, že mořské prostředí poskytuje zdroje chemických sloučenin s biologickou aktivitou vhodnou pro léčbu CNS onemocnění [8].

Nejrozšířenějšími a všudypřítomnými sloučeninami jsou látky, které ve své struktuře obsahují heterocyklický indolový kruhový systém. Ten se stal důležitou komponentou v řadě farmakologicky zajímavých produktů. Jsou považovány za stěžejní sloučeniny vedoucí k objevování nových léčiv v medicíně a farmakologii. Mezi biologicky aktivními indoly existují značné strukturální rozdíly. Jejich biologická aktivita odráží jejich unikátní funkci [9].

Indolové alkaloidy se v největším množství nacházejí v mořských bezobratlých, proto se staly subjektem zájmu. Vědci diskutují, zda tyto molekuly pocházejí přímo z buněk bezobratlých, nebo zda byly kontaminovány mikroorganismy. Bylo zjištěno, že pěstováním bezobratlých v umělých akváriích často dochází ke ztrátě potenciálu produkce těchto významných molekul. Vědci stále více uznávají, že mikroorganismy

asociované s mořskými bezobratlými hrají důležitou roli v biosyntéze sekundárních metabolitů. Izolace a kultivace symbiontů zůstává nadále důležitou výzvou vzhledem k jejich potenciální závislosti na hostitelských zásobních faktorech a produkci přírodních sekundárních metabolitů [9].

Jelikož sklizeň mořských hub a bezobratlých není příliš ekologická ani praktická, cílem je z přírodních produktů vykazujících inhibiční kinasovou aktivitu vyrábět přímou či nepřímou cestou syntetické moderní inhibitory s rozmanitými chemickými vlastnostmi vhodné pro léčbu řady chorob [8, 112].

4.4.1 Přírodní ATP-kompetitivní inhibitory

Během hledání přírodních sloučenin s protinádorovou aktivitou inhibující kinasy Cdk_s bylo nalezeno velké množství látek vykazujících inhibiční kinasovou aktivitu vůči GSK-3. Jedná se především o inhibitory izolované z mořských organismů [8]. Krystalografická analýza prokázala, že tyto přírodní sloučeniny jsou specifické vůči GSK-3 a Cdk_s, protože obě vlastní strukturálně podobnou ATP-vazebnou doménu, která je specifická až 86 % [8, 113].

4.4.1.1 Meridianiny

Meridianiny mají strukturu bromovaných 3-(2-aminopyrimidin)-indolů. Získávají se izolací z pláštěnce *Aplidium meridianum*, který hojně žije v Jižním Pacifiku poblíž ostrovů Jižní Georgie [8]. Meridianiny se dělí na meridianiny A – G, které jsou substituované na pozici C-3 2-aminopyrimidinového kruhu. V roce 1998 Palermo *et al.* objevili meridianiny A – E, později v roce 2007 byly pomocí MS identifikovány meridianiny F – G ze stejného přírodního zdroje. V nedávné době byl meridianin A, B, C a E izolován také z antarktického pláštěnce *Synoicum sp.* [9].

Tyto sloučeniny inhibují velké množství kinas (GSK-3, CK-1, Cdk-1, Cdk-5, PKA) hrajících roli v patogenezi rakoviny a neurodegenerativních chorob. Všechny meridianiny (s výjimkou G a některých typů isomeridianinů) inhibují GSK-3, Cdk_s a PKA při nízké mikromolární koncentraci, přičemž meridianiny B a E se jeví jako nejsilnější inhibitory [9]. Mají také schopnost zabránit buněčné proliferaci a indukovat apoptózu. Dokážou prostupovat do buněk a interferovat s aktivitou kinas významných pro buněčné dělení a buněčnou smrt [8].

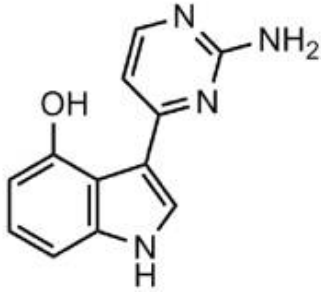
Martinez *et al.* provedli sérii měření selektivity těchto sloučenin vůči kinasám. Kinasové aktivity byly stanoveny za použití koncentrace 15 μM ATP v přítomnosti s rostoucí koncentrací meridianinů. Nejlepší inhibiční aktivita vůči GSK-3 β byla zaznamenána ve chvíli, kdy došlo k substituci bromu na pozici 6' a k substituci hydroxylové skupiny na pozici 4' v indolovém kruhu [105]. Meridianinové sloučeniny (zejména meridianin E) jsou nejvíce selektivní k ostatním kinasám, převážně k Cdk-1 ($\text{IC}_{50} = 180 \text{ nM}$), Cdk-2 ($\text{IC}_{50} = 800 \text{ nM}$) a Cdk-5 ($\text{IC}_{50} = 150 \text{ nM}$). Inhibice GSK-3 β nastává při $\text{IC}_{50} = 2,50 \mu\text{M}$ a inhibice CK-1 δ při hodnotě $\text{IC}_{50} = 0,40 \mu\text{M}$ [9, 105]. Nedostatek substituentů v indolovém kruhu vede ke snížené selektivitě vůči GSK-3 β . Pro inhibici GSK-3 β je rozhodující pozice indolu, kde je připojen 2-aminopyrimidin [9].

Pro nejsilnější inhibici Cdk-1 a Cdk-5 je důležitá substituce bromu na pozici 7' a substituce hydroxylové skupiny na pozici 4'. Blokací těchto substitucí dojde k inaktivaci meridianinů typu A, B, D, E, G, které ztrácí schopnost Cdks inhibovat. Jedna substituce bromu v pozici 5' nebo 6' výrazně zvýší inhibiční aktivitu (především meridianinu C, D a G), naopak dvě bromové substituce u meridianinů C, D a F inhibiční aktivitu snižuje. Posunutím 2-aminopyrimidinového kruhu z pozice 3' na pozici 2' dochází k inaktivaci meridianinu C a isomeridininu C [9].

In silico analýzou SAR, kdy byl zjišťován vztah mezi strukturou a aktivitou meridianinů a kinas PKA, bylo zjištěno, že účinek inhibice je obdobný jako u ostatních kinas. Bromová substituce v poloze 7' a substituce hydroxylové skupiny na pozici 4' poskytuje nejlepší inhibiční aktivitu vůči PKA [9].

Jelikož meridianiny vykazují slibnou biologickou aktivitu, několik výzkumných pracovníků se zabývá jejich syntézou. Doposud je známo asi 20 studií. Některé syntetické analogy (Tabulka 1) jsou vhodnými potenciálními cíli pro léčbu neurodegenerativních onemocnění a zejména rakoviny. Byly připraveny různými substitucemi především na pyrimidinovém kruhu [9].

Tabulka 1: Přehled syntetických analogů meridianinů vhodných pro potenciální terapii rakoviny a AD. Upraveno podle [8, 9].

			Kinasy IC₅₀ (μM)	
R	R1	R2	GSK-3α/β	CK-1δ/ε
7-Br	H	H	>10	4,2
6-Br	H	I	1,1	0,7
7-Br	H	I	4	1,6
6-Br	H	4-acetylfenyl	2,0	>10
5-Br	H	4-acetamidofenyl	0,4	2,1
7-Br	H	4-acetamidofenyl	2,2	>10
4-Br	H	3-methoxyfenyl	1,4	>10
7-Br	H	3-methoxyfenyl	>10	4,2
7-NO ₂	H	H	>10	10
6-NO ₂	H	I	2,6	1
H	H	I	3,7	0,9
5-NH ₂	H	I	>10	0,27
6-NH ₂	H	I	4,2	0,51
7-NH ₂	H	I	4,4	1,1
H	H	4-trifluoromethylfenyl	1,9	8,3
H	Me	4-acetylfenyl	1,4	>10
H	Me	I	4,2	1,1

4.4.1.2 Indirubiny

Bis-indol indirubin a jeho deriváty jsou sloučeniny, které mají svou tradici a význam v čínské medicíně zabývající se léčbou chronických onemocnění, jako je myeloidní leukémie [8]. Indirubiny, které jsou substituovány halogeny v pozici 3' a 7', ukazují na apoptózu indikující efekt v nádorových buněčných liniích [114]. Jejich protinádorové účinky korelují s jejich antimitotickými vlastnostmi [113]. Indirubiny dokážou prostupovat přes HEB [107].

V současné době indirubiny představují významný potenciál v terapii neurodegenerativních chorob, včetně AD. Indirubin byl v nedávné době popsán jako účinný inhibitor Cdk_s (IC₅₀ = 50 – 100 nM). Testy prokázaly, že dokáže inhibovat

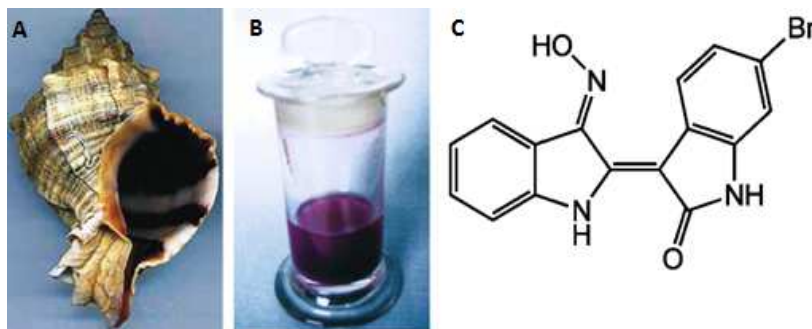
Cdk-1/cyklin B a Cdk-5/p25. Indirubiny (zřejmě substituované v pozicích 3' a 5') fungují i jako inhibitory GSK-3 β ($IC_{50} = 5 - 50$ nM) [113].

Indirubin-3'-monoxim inhibuje fosforylaci τ -proteinu *in vitro* a *in vivo* na specifických místech. Vyvolává také inhibici fosforylace threoninu-75 (thr-75) na DARPP-32 (dopaminem a cAMP-regulovaném fosfoproteinu) způsobenou Cdk-5 *in vivo*, čímž napodobuje jeden z účinků dopaminu v kůře [113]. Výzkum vedený badateli Sharmou a Taliyanem prokázal, že u myší léčených indirubin-3'-monoximem došlo k významnému poklesu koncentrace glukosy, triacylglyceridů, cholesterolu a hladiny insulínu v plazmě. Rovněž se u těchto myší zlepšila paměť a proces učení. Dále bylo zjištěno, že indirubin-3'-monoxim snižuje buněčný oxidační stres a aktivitu ACHE [115]. Eldar-Finkelmann a Martinez sledovali účinky indirubin-3'-monoximu *in vivo* na hladinu APP u transgenních myší s příznaky AD. Potvrdilo se, že došlo ke zmírnění symptomů AD, včetně redukce akumulace A β , hyperfosforylace τ -proteinu, zánětu a zlepšila se prostorová paměť. Zjistili, že tento účinek nefunguje na model *in vitro*, při kterém po ošetření indirubin-3'-monoximem kultivovaných neuronů a potkaního mozku nedošlo ke zmírnění τ -fosforylace. Tyto rozdíly mohly být způsobeny rozdílnou biologickou dostupností, neboť indirubin-3'-monoxim, stejně jako ostatní indirubiny, jsou omezeně rozpustné ve vodě [8].

6-bromoindirubin, izolovaný z mořských měkkýšů čeledi *Muricidae*, *Thaididae* a především z rodu *Hexaplex trunculus* (Obrázek 13A) používaného k získávání barviva „Tyrian purple“ (Obrázek 13B), které obsahuje směs bromem substituovaných indirubinových isomerů, vykazuje určitou selektivitu ke GSK-3. Jeho syntetický buněčně prostupný derivát 6-bromoindirubin-3'-oxim (6BIO) (Obrázek 13C) je několikrát selektivnější vůči GSK-3 β ($IC_{50} = 5$ nM) [8, 116]. Jeho biologická aktivita byla podrobena výzkumu v několika analýzách nervového systému. Výsledkem bylo zjištění, že v kultivovaných kortikálních neuronech snižuje fosforylaci τ -proteinu a inhibuje růst axonů v mozečku a v embryonálních nebo v postnatálních gangliích dorzálních kořenů míchy. 6BIO je schopný regenerace a pluripotence v lidských embryonálních kmenových buňkách [8].

Nedávná studie popsala syntézu nových indirubinových derivátů s lepší rozpustností ve vodě, ale dosud nebyla hlášena jejich biologická aktivita. Tyto nové

indirubiny by mohly mít přínos pro léčbu pacientů, kteří trpí diabetem a současně AD [8].



Obrázek 13: A – *Hexaplex trunculus*, B – „Tyrian purple“ [116], C – 6BIO [8].

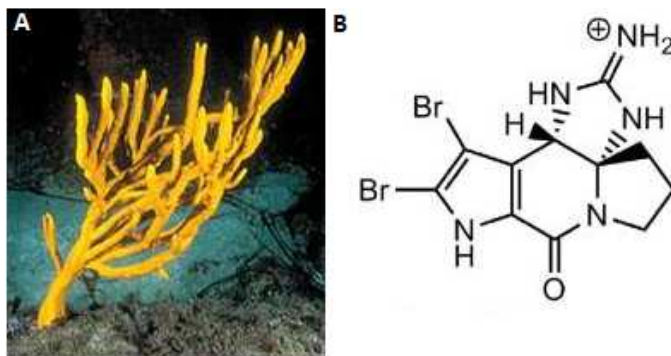
4.4.1.3 Hymenialdisiny

Tyto alkaloidy byly získány z houbovců (*Porifera*), jakožto z nejrozšířenějšího přírodního mořského zdroje bioaktivních látek [8]. Poprvé byly izolovány v roce 1980 z čeledi *Agelasidae*, *Axinellidae* a *Halichondridae*, nyní se čerpají ze sferul *Axinella sp.* (Obrázek 14A) [8, 117]. Hymenialdisiny jsou sloučeniny obsahující bromopyrrollové a guanidinové skupiny [8].

Stanovením struktury hymenialdisinů na základě rentgenové krystalografie bylo zjištěno, že se jedná o potenciální inhibitory řady kinas, včetně ERK, JNK, PKC, PKA, MARK, ale především se jeví jako zajímavé inhibitory GSK-3 β (IC_{50} = 10 nM), CK-1 δ (IC_{50} = 35 nM) a Cdk s (IC_{50} = 22 – 28 nM) [8, 118]. Kromě toho mají schopnost inhibovat GSK-3 β *in vivo*, a tím potlačovat *in vivo* fosforylaci τ -proteinu u AD [8, 119]. Vyznačují se protizánětlivými, antineurodegenerativními a antiproliferativními účinky [117, 120].

Brompyrrollový alkaloid dibromokantharellin (Obrázek 14B) je selektivní pouze vůči GSK-3 β (IC_{50} = 3 μ M), nikoliv k Cdk s [119]. Inhibiční aktivita dibromokantharellinu vůči GSK-3 β inspirovala vědce k nalezení ještě silnějších a selektivnějších inhibitorů GSK-3 β a rozšíření inhibiční aktivity i vůči Cdk-1 a Cdk-5 [8]. Pomocí dokovacích analýz a molekulárně dynamických simulací bylo odhaleno, že aminokyselinový zbytek cys-199 v blízkosti ATP-vazebného místa v molekule GSK-3 β je hlavním vodítkem pro konstrukci nových, účinnějších a selektivnějších inhibitorů [8, 117].

Strukturně zajímavý je také pyrrol-azepin-8-onový kruhový systém, který se váže na guanidinacetátový kruh v molekule hymenialdisinů. Tento fakt farmaceutické firmy přivedl k myšlence vyrobit vlastní syntetické hymenialdisiny a jejich analogy [8]. Výroba analogů by přinesla v klinické medicíně řadu benefitů, neboť hymenialdisiny by mohly být použity nejen pro léčbu AD, ale i pro další onemocnění CNS [117]. Využití by našly i v oblasti terapie diabetu, zánětlivých a proliferativních onemocnění [117, 120].



Obrázek 14: A – *Axinella* sp. [121], B – Dibromokantharellin [8].

4.4.1.4 Hydantoiny

Mořská houba rodu *Hemimycale*, čeledi *Mycalidae*, nazývaná *Hemimycale arabica* (Obrázek 15) žije v Rudém moři a je známá pro tvorbu bioaktivních sekundárních metabolitů, tzv. hydantoinů (1,3-imidazolidinedionů), jenž mají strukturu guanidinových alkaloidů. Tyto sloučeniny se vyznačují rozmanitými farmakologickými vlastnostmi. Významné jsou především dva silné a selektivní alkaloidy – přírodní fenylmethylenhydantoin a derivát (Z)-5-(4-(ethylthio)benzyliden)-hydantoin, který byl vyroben synteticky [122]. Jedná se o sloučeniny velmi dobře prostupné přes HEB [123]. Jsou účinné především proti rakovině prostaty, přičemž pozastavují růst a snižují proliferaci nádorového bujení *in vitro* [122].

Khanfar *et al.* ve snaze objevit všechny potenciální molekulární cíle fenylmethylenhydantoinu s protinádorovým účinkem, přednesli hypotézu, že fenylmethylenhydantoin by mohl mít vliv i na aktivitu kinasy GSK-3 β . Na tuto domněnku je přivedl jev, při kterém se strukturně podobné látky s vazebnou orientací 1 – 5 vázaly na GSK-3 β v ATP-vazebném místě [122].

Pro potvrzení těchto vlastností fenylmethylenhydantoinových analogů byla provedena *in silico* screeningová analýza, během které byla zaznamenána značná afinita ke GSK-3 β . Analýza *in vitro* pomocí sendvičové ELISA navíc odhalila, že fenylmethylenhydantoin snižuje fosforylaci τ -proteinu v místě ser-396. V souladu s *in silico* analýzou fenylmethylenhydantoin vykazuje nejsilnější inhibici při hodnotě $IC_{50} = 4,2 \mu\text{M}$ [122]. Dále bylo prokázáno, že je afinitní také k Cdk-2 [123].

Na základě těchto výsledků byl proveden test *in vivo* na modelu potkana pro detekci glykogenové dispozice v játrech. Bylo zjištěno, že u potkana došlo ke snížení genové exprese glukosy-6-fosfatasy a fosfoenolpyruvátkarboxylasy. To vedlo k redukci hladiny glukosy a ke zvýšené syntéze glykogenu z D-glukosy. Výsledkem bylo zvýšené množství glykogenu v játrech, čímž byla potvrzena GSK-3 β inhibice [122].

Fenylmethylenhydantoiny se jeví jako nové potenciální a selektivní inhibitory GSK-3 β nejen pro léčbu AD, ale také pro udržení optimální hladiny glukosy v krvi [122].



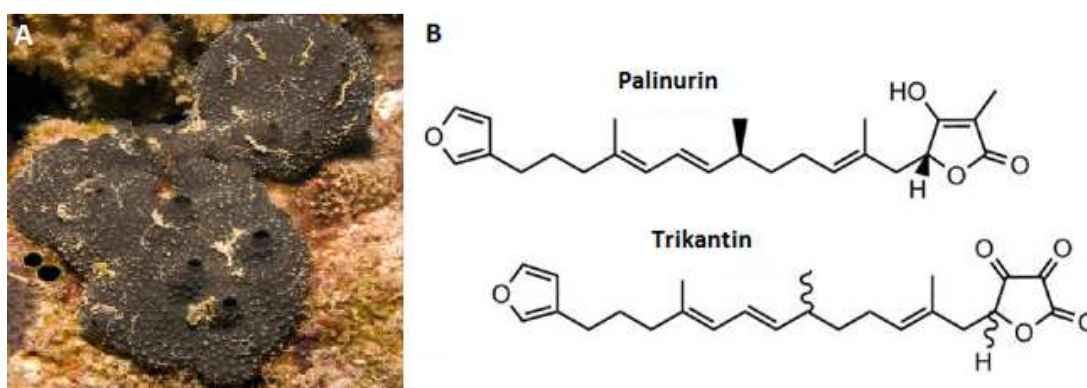
Obrázek 15: *Hemimycala arabica* [124].

4.4.2 Přírodní ATP-nekompetitivní inhibitory

4.4.2.1 Furanoseskviterpeny

Furanoseskviterpeny patří k nejmladším objeveným sloučeninám. Izolovány jsou z mořských organismů *Ircinia sp.* (Obrázek 16A), *Ircinia dendroides*, *Ircinia variabilis* a *Ircinia oros* vyskytující se ve Středozezemním moři [8]. Furanoseskviterpenové sloučeniny inhibují rekombinantní lidskou GSK-3 β *in vitro* při 50 mg/ml až z 90 % [130].

Lineární furanoseskviterpen nazývaný palinurin, který se v těchto živočiších nachází v největším množství, a jeho metabolit nazývaný trikantin jsou buněčně dostupné inhibitory se schopností redukovat fosforylaci τ -proteinu v buněčných neuroblastomových SH-SY5Y kulturách [8, 130]. Palinurin a trikantin (Obrázek 16B) byly podrobeny kinetické analýze, která prokázala, že trikantin inhibuje rekombinantní lidskou GSK-3 β při hodnotě $IC_{50} = 7,5 \mu M$, zatímco inhibiční aktivita palinurinu se projevila při hodnotě $IC_{50} = 4,5 \mu M$ [8]. Palinurin má schopnost inhibovat i GSK-3 α ($IC_{50} = 1,6 \mu M$), Cdk-1, Cdk-5, CK-2 a MAPK [130]. Charakteristické jsou pro něj protizánětlivé a antibakteriální vlastnosti [8, 130].



Obrázek 16: A – *Ircinia* sp. [132], B – Palinurin a trikantin. Upraveno podle [8].

Přírodní sloučeniny ircinin-1 a ircinin-2 společně s deriváty variabilinu, strobilinu a felixininu patří do furanoseskviterpenových tetronových kyselin produkovaných houbami různých druhů rodu *Ircinia*. Inhibiční aktivita ircininů namířená vůči GSK-3 β je velmi podobná inhibiční aktivitě palinurinu, pro ircinin-1 byla detekována hodnota $IC_{50} = 0,8 \mu M$ a pro ircinin-2 $IC_{50} = 2,3 \mu M$ [130].

Molekulární modelovací techniky odhalily, že inhibiční aktivita palinurinu vůči GSK-3 β je zprostředkována alosterickým mechanismem. Palinurin se váže na alosterické místo lokalizované v N-terminálním laloku kinasy, dříve označované jako kapsa č. 5. Vazba palinurinu na neobvyklé místo kinasy ovlivňuje dostupnost ATP γ -fosfátu ze substrátu a omezuje konformační flexibilitu smyčky bohaté na glycin. Tento nový alosterický mechanismus uděluje palinurinu vysoký stupeň selektivity vůči GSK-3 β s ohledem na ostatní kinasy a díky tomu je zajímavým molekulovým kandidátem pro navrhnutí a vyvinutí nových účinnějších a selektivnějších inhibitorů vhodných pro léčbu onemocnění, na jejichž vzniku se podílí GSK-3 β [130].

Enantioselektivní syntézou z komerčně dostupného furaldehydu a (R)-methyl-3-hydroxy-2-methylpropionátu byl v roce 2009 vynalezen první syntetický analog palinurinu [131]. Cílem je vyvinout deriváty palinurinu a trikantinu vhodné pro přípravu léčiv, které by mohly být využity v léčebných metodách zabývajících se onemocněním, na jejichž patogenezi se podílejí kinasy, včetně GSK-3 β . Záměrem je výroba léčiv přijatelných pro perorální podání [130, 131].

4.4.2.2 Manzaminy

Manzaminy představují komplex β -karbolinových alkaloidů izolovaných z Indo-Pacifických mořských hub, nejčastěji z aktinomycet indonéské houby *Acanthostrongylophora igens* (Obrázek 17A) [8, 125]. V současné době je k dispozici 16 druhů manzaminových alkaloidů, které se nacházejí v 8 čeledích mořských hub [125]. Pro tyto alkaloidy je charakteristický poměrně složitý polycyklický kruhový systém [8]. Vyznačují se antibakteriálními, cytotoxickými, insekticidními, antiinfekčními, antiparazitárními, protizánětlivými a protinádorovými účinky [126].

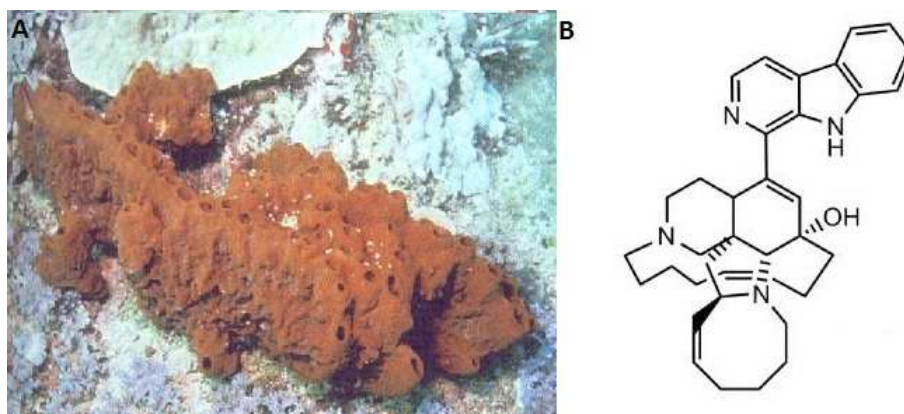
Molekulární modulací byla detekována vazba manzaminů na GSK-3 β . Bylo zjištěno, že manzaminy se na tuto kinasu vážou alosterickým způsobem, konkrétně na alosterické místo na zadní straně ATP-vazebné kapsy v místě spojení C-terminálního a N-terminálního laloku [71].

Manzamin A (Obrázek 17B) byl poprvé izolován v roce 1986 z houby rodu *Hacliona* [125]. Je buněčně prostupný a inhibuje lidskou formu GSK-3 β *in vitro* při 25 μ M až ze 70 % [8]. Dokáže procházet přes HEB [127]. Perorální a intravenózní farmakokinetické studie u potkanů prokázaly, že manzamin A se vyznačuje nízkou metabolickou clearencí, přiměřeně dlouhým farmakokinetickým poločasem rozpadu a dobrou perorální biologickou dostupností (20,6 %) [128]. Testováním vlastností prekurzorů manzaminu A (karbolinu a ircinalu A) bylo zjištěno, že oba prekurzory jsou inaktivní ve schopnosti vázat se na GSK-3 β . To naznačuje, že k vazbě je nutná celá molekula. Manzamin A má schopnost inhibovat také další kinasy, včetně GSK-3 α , Cdk-1, Cdk-5, MAPK a PKA, ale nejvyšší specifický inhibiční účinek je prokázán vůči GSK-3 β (IC₅₀ = 10 μ M) a Cdk-5 (IC₅₀ = 1,5 μ M). Toto zjištění má zásadní význam pro potenciální léčbu AD. Při testování SH-SY5Y buněk inkubovaných s manzaminem A o různých koncentracích bylo pomocí kvantifikační sendvičové metody ELISA potvrzeno, že došlo k poklesu fosforylace τ -proteinu v místě ser-396. Manzamin A

blokuje i hyperfosforylaci τ -proteinu způsobenou GSK-3 β v lidských neuroblastomových buňkách [8]. Působí také jako supresor hyperlipidemie a aterosklerosy *in vivo* [112]. Vědci došli k závěru, že manzamin A díky svým vlastnostem představuje velmi slibný potenciální cíl pro terapii AD a doporučují ho k dalšímu preklinickému hodnocení a možnému vývoji [8, 128]. Měl by být navržen jako léčivo pro choroby, na jejichž patogenezi se z velké části podílí GSK-3 β [125].

Porovnáním semisyntetických analogů a několika derivátů manzaminu A izolovaných z různých druhů mořských hub metodou SAR byla po dosažení 50% GSK-3 β inhibice při 25 μ M detekována hodnota IC₅₀ v mikromolárním rozsahu. V některém případě byly nalezeny látky účinnější než je samotný manzamin A. Z tohoto důvodu byly zkoumány reakce na změnu v alifatickém heterocyklickém systému. Bylo zjištěno, že konfirmační restrikce polycyklické části vyvolá významný vliv na inhibici GSK-3 β . To znamená, že například nepřítomnost dvojné vazby mezi pozicí 15' a 16' vede k inaktivaci derivátů (tetrahydromanzamin A, tetrahydro-8-hydroxymanzamin A), deriváty s karbonylovou skupinou (manzamin E a F) v pozici 31' jsou méně účinné než manzamin A, ale v případě, že u manzaminu F dojde k substituci hydroxylové skupiny v pozici 12' jinou objemnější skupinou, jeho inhibiční aktivita vůči GSK-3 β bude mnohem vyšší, než vykazuje manzamin A [125].

I přestože vykazují silnou biologickou aktivitu a významný přínos nejen pro léčbu AD, jejich léčivý potenciál je omezen tím, že není možný stálý přísun přírodních manzaminů jako zdroj klíčových prekurzorů důležitých pro farmaceutický vývoj syntetických manzaminů a jejich optimalizaci. Ačkoliv jsou tvořeny v řadě hub, jejich sklizeň není ekologicky udržitelná [8, 112].



Obrázek 17: A – *Acanthostrongylophora igens* [129], B – Manzamin A [8].

5 Závěr

Při hledání přírodních látek, které by mohly mít přínos a využití v kauzální terapii AD, bylo nalezeno několik sloučenin vykazujících inhibiční aktivitu vůči kinasám (především GSK-3 β , CK-1 δ a Cdk-5), které jsou klíčové v patogenezi choroby. Jedná se o produkty pocházející z mořských organismů, zejména z mořských hub a bezobratlých. Nejrozšířenější skupinu představují indolové alkaloidy. Protože podmínkou jejich efektivity je specifická distribuce v mozku, musí umět procházet přes HEB a buněčné plazmatické membrány. Jako potenciální cíle v terapii AD jsou proto vhodné sloučeniny s přijatelnou lipofilitou a nízkou molekulovou hmotností. Jelikož GSK-3 β je nezbytná pro normální funkci buněk, je nutná pouze mírná kinasová inhibice, která by redukovala nadměrnou aktivitu GSK-3 β v patologických tkáních zasažených chorobou na fyziologickou úroveň a zachovala by normální aktivitu ve tkáních zdravých. Plazmatická hladina nízkomolekulárních inhibitorů by neměla snížit fyziologickou aktivitu GSK-3 β o více než 25 % [71].

Většina kinasových inhibitorů je ATP-kompetitivní. Z důvodu jejich nízké specifity nejsou vhodnými kandidáty pro léčbu AD [73]. Nové perspektivní přístupy pro bezpečnější využití v klinické praxi představují ATP-nekompetitivní inhibiční sloučeniny, které na rozdíl od ATP-kompetitivních inhibitorů vykazují dobré výsledky získané z buněčných a *in vivo* testů, které korelují s výsledky ADME, vysokou selektivitu ke kinase, mechanismus alosterické modulace navozující cílenou mírnou kinasovou inhibici a požadovanou hodnotu IC₅₀, díky které se sníží riziko vzniku toxicity a nežádoucích účinků [8, 71, 74].

Klinických zkoušek dosáhly dvě sloučeniny. Jednou z nich je syntetický AZD-1080 – ATP-kompetitivní, silný, selektivní inhibitor GSK-3 β řadící se do skupiny aminothiazolů. Vykazuje dobrou biologickou dostupnost důležitou pro podání perorální cestou a prostupuje HEB. Snižuje hyperfosforylaci τ -proteinu [106]. AZD-1080 dosáhl první fáze klinické studie, ale byl vyloučen pro nežádoucí účinky v podobě nefrotoxicity. ATP-nekompetitivní syntetický inhibitor tideglusib, patřící do skupiny TDZD, se v současné době nachází ve druhé fázi klinické studie a dosud nebyly popsány žádné nežádoucí účinky. Dokáže prostupovat buněčnou membránou a přes HEB [8]. Je ireverzibilním inhibitorem GSK-3 β (IC₅₀ = 60 nM) [8, 109]. Bylo

prokázáno, že u lehké až střední formy AD po 24 týdnech užívání dokáže zlepšit kognitivní funkce a snížit histopatologické symptomy AD [8].

Farmakologicky zajímavé jsou halomethylketony – syntetické, ATP-nekompetitivní inhibitory. Jejich potenciál spočívá v předcházení vzniku drogové závislosti na léčivu díky ireverzibilnímu působení [71]. Jsou vysoce selektivní k neurotransmiterům v CNS a k řadě kinasám, včetně GSK-3 β s hodnotou IC₅₀ v mikromolárním rozsahu. Prostupují přes HEB a buněčnými membránami. Dokážou rychle redukovat hyperfosforylaci τ -proteinu. K dispozici je několik komerčně dostupných halomethylketonových derivátů, které potvrzují perspektivitu těchto sloučenin hodných dalšímu preklinickému hodnocení [8].

Potenciálně nejzajímavějšími kandidáty pro léčbu AD z řady přírodních alkaloidů jsou manzamininy, které představují komplex ATP-nekompetitivních β -karbolinových alkaloidů izolovaných z Indo-Pacifických mořských hub, nejčastěji z houby *Acanthostrongylophora igens* [8, 125]. Nejperspektivněji se jeví manzamin A, který inhibuje řadu kinas, včetně GSK-3 β (IC₅₀ = 10 μ M) a Cdk-5 (IC₅₀ = 1,5 μ M) [8]. Prostupuje přes HEB a buněčné membrány [127]. Vyznačuje se nízkou metabolickou clearencí, dostatečně dlouhým farmakokinetickým poločasem rozpadu a dobrou perorální biologickou dostupností (20,6 %) [128]. Jeho funkcí je nejen snížení hyperfosforylace τ -proteinu, ale i potlačení hyperlipidemie a aterosklerosy [8, 112]. Manzamininy jsou velmi slibnými potenciálními cíli a jsou doporučeny k dalšímu preklinickému hodnocení a možnému syntetickému vývoji [8, 128].

Dalšími perspektivními přírodními inhibitory jsou furanoseskviterpeny. ATP-nekompetitivní palinurin se nachází v organismu rodu *Ircinia* žijícím ve Středozezemním moři [8]. Palinurin je buněčně prostupný a jeho funkcí je inhibice řady kinas, včetně GSK-3 β (IC₅₀ = 4,5 μ M), blokace hyperfosforylace τ -proteinu a vyznačuje se rovněž protizánětlivými a antibakteriálními vlastnostmi [8, 130]. Jeho metabolit trikantin inhibuje GSK-3 β při IC₅₀ = 7,5 μ M [8].

Přírodní ATP-kompetitivní alkaloidy (indirubiny, meridianiny, hydantoiny, hymenialdisiny) by mohly mít přínos především pro pacienty trpící AD a současně diabetem, ale pro efektivní léčebné použití je třeba vylepšit jejich farmakodynamické vlastnosti, včetně specifity.

V současné době ATP-nekompetitivní sloučeniny představují reálná léčiva pro potenciální léčbu chronických chorob, včetně AD [8]. Protože zhruba 95 % biosféry se vyskytuje v oceánech, jsou tudíž dosud ne příliš probádanými oblastmi a představují významnou příležitost pro objev řady farmakologicky účinných látek [9]. Cílem vědeckých pracovníků je nadále hledat přírodní sloučeniny a snažit se z nich přímou či nepřímou cestou syntetizovat ATP-nekompetitivní inhibitory s vhodnými farmakodynamickými vlastnostmi [8].

6 Použitá literatura

1. National Institutes of Health: Alzheimer's disease – fact sheet. NIH Publication 2011, 1.
2. Liu H. Ch., Leu S. J., Chuang D. M.: Role of glycogen synthase kinase-3 in Alzheimer's disease: From pathology to treatment target. *J. Exp. Clin. Med.* 4, 135 (2012).
3. Jiráček R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Remedia* 19, 342 (2009).
4. WHO: Dementia cases set to triple by 2050 but still largely ignored. *Neurosciences* 17, 296 (2012).
5. Bhat R. V., Budd Haeberlein S. L., Avila J.: Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *J. Neurochem.* 89, 1313 (2004).
6. Mayeux R., Stern Y.: Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, 1 (2012).
7. Longo F. M., Massa S. M.: Neuroprotective strategies in Alzheimer's disease. *NeuroRX.* 1, 117 (2004).
8. Eldar-Finkelman H., Martinez A.: GSK-3 inhibitors: Preclinical and clinical focus on CNS. *Front. Mol. Neurosci.* 4, 1 (2011).
9. Bharate S. B., Yadav R. R., Battula S., Vishwakarma R. A.: Meridianins: Marine-derived potent kinase inhibitors. *Mini Rev. Med. Chem.* 12, 1 (2012).
10. Ballard C., Gauthier S., Corbett A., Brayne C., Aarsland D., Jones E.: Alzheimer's disease. *Lancet.* 377, 1019 (2011).
11. Llorens-Martín M., Jurado J., Hernández F., Ávila J.: GSK-3 β , a pivotal kinase in Alzheimer's disease. *Front. Mol. Neurosci.* 7, 1 (2014).
12. Yang G., Wang Y., Tian J., Liu J. P.: Huperzine A for Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis of randomized trials. *PLOS ONE* 8, 1 (2013).

13. Ma X., Tan Ch., Zhu D., Gang D. R., Xiao P.: Huperzine A from *Huperzia species* – an ethnopharmacological review. *J. Ethnopharmacol.* *113*, 15 (2007).
14. Lipton S. A.: Failures and successes of NMDA receptor antagonist: Molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic insults. *NeuroRX.* *1*, 101 (2004).
15. Chen H. Ch., Qi R. Z., Paudel H., Zhu H. J.: Regulation and function of protein kinases and phosphatases. *Enzyme Res.* *2011*, 1 (2011).
16. Cozza G., Gianoncelli A., Montopoli M., Caparrotta L., Venerando A., Maggio F., Pinna L. A., Zagotto G., Moro S.: Identification of novel protein kinase CK1 delta (CK1 δ) inhibitors through structure-based virtual screening. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *18*, 5672 (2008).
17. Gene Cards: The Human Gene Database: Glycogen synthase kinase-3 beta. Gene Cards: The Human Gene Database, Rechovot 2015. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GSK3B>, staženo 6. srpna 2015
18. McCubrey J. A., Steelman L. S., Bertrand F. E., Davis N. M., Sokolovsky M., Abrams S. L., Montalto G., D'Assoro A. B., Libra M., Nicoletti F., Maestro R., Basecke J., Rakus D., Gizak A., Demidenko Z., Cocco L., Martelli A. M., Cervello M.: GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer. *Oncotarget.* *5*, 2881 (2014).
19. Kaidanovich-Beilin O., Woodgett J. R.: GSK-3: Insights from cell biology and animals models, *Front. Mol. Neurosci.* *4*, 1 (2011).
20. Doble B. W., Woodgett J. R.: GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J. Cell. Sci.* *116*, 1175 (2003).
21. Gene Cards: The Human Gene Database: Glycogen synthase kinasa-3 aplha. Gene Cards: The Human Gene Database, Rechovot 2015. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GSK3A>, staženo 4. srpna 2015

22. Gao F., Al-Azayzih A., Somanath P. R.: Discrete function of GSK3 α and GSK3 β isoforms in prostate tumor growth and micrometastasis. *Oncotarget*. 6, 5947 (2015).
23. Jacobs K. M., Bhave S. R., Ferraro D. J., Jaboin J. J., Hallahan D. E., Thotala D.: GSK-3 β : A bifunctional role in cell death pathways. *Int. J. Cell. Biol.* 2012, 1 (2012).
24. Jope R. S., Roh M. S.: Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic interventions. *Curr. Drug Targets* 7, 1421 (2006).
25. Hooper C., Kilick, R., Lovestone, S.: The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 104, 1433 (2008).
26. BrightFocus Foundantion: Amyloid plaques and neurofibrillary tangles. BrightFocus Foundantion, Clarksburg 2015. <http://www.brightfocus.org/alzheimers/infographic/amyloid-plaques-and-neurofibrillary-tangles>, staženo 26. srpna 2015.
27. Jope R. S., Yuskaitis Ch. J., Beurel E.: Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem. Res.* 32, 577 (2007).
28. Henriksen E. J., Dokken B. B.: Role of glycogen synthase kinase-3 in insulin resistance and type 2. diabetes. *Curr. Drug Targets.* 7, 1435 (2006).
29. Zeman M., Jirák R.: Alzheimerova choroba a diabetes mellitus typu 2. *Neurol. prax.* 13, 105 (2012).
30. Ramirez S. H., Fan S., Zhang M., Papugami A., Reichenbach N., Dykstra H., Mercer A. J., Tuma R. F., Persidsky Y.: Inhibition of glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) decreases inflammatory responses in brain endothelial cells. *Am. J. Pathol.* 176, 881 (2010).
31. Schitteck B., Sinnberg T.: Biological functions of casein kinase 1 isoforms and putative roles in tumorigenesis. *Mol. Cancer.* 13, 1 (2014).
32. Knippschild U., Krüger M., Richter J., Xu P., García-Reyes B., Peifer Ch., Halekotte J., Bakulev V., Bischof J.: The CK1 family: contribution to cellular stress response and its role in carcinogenesis. *Front. Oncol.* 4, 1 (2014).

33. Park Y., Do K. H., Kim I. S., Park H. H.: Structural and functional studies of casein kinase 1 – like protein from rice. *Plant Cell Physiol.* 53, 304 (2012).
34. Behrend L., Stöter M., Kurth M., Rutter G., Heukeshoven J., Deppert W., Knippschild U.: Interaction of casein kinase 1 delta (CK1delta) with post-Golgi structures, microtubules and the spindle apparatus, *Eur. J. Cell. Biol.* 79, 240 (2000).
35. Wager T. T., Chandrasekaran R. Y., Bradley J., Rubitski D., Berke H., Menté S., Butler T., Doran A., Chang Ch., Fisher K., Knafels J., Liu S., Ohren J., Marconi M., DeMarco G., Sneed B., Walton S., Horton D., Rosado A., Mead A.: Casein kinase 1 δ/ϵ inhibitor PF-5006739 attenuates opioid drug-seeking behavior. *ACS Chem. Neurosci.* 5, 1253 (2014).
36. IUPHAR/BPS Guide to pharmacology: Casein kinase 1 delta. IUPHAR/BPS Guide to pharmacology , Velká Británie 2015. <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/ObjectDisplayForward?objectId=1997>, staženo 12. srpna 2015
37. Gross S. D., Anderson R. A.: Casein kinase 1: Spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family. *Cell. Signal.* 10, 699 (1998).
38. Wolff S., Xiao Z., Wittau M., Süßner N., Stöter M., Knippschild U.: Interaction of casein kinase 1 delta (CK1 δ) with the light chain LC2 of microtubule associated protein 1A (MAP1A) *Biochim. Biophys. Acta* 1745, 196 (2005).
39. Schwab C., DeMaggio A. J., Ghoshal N., Binder L. I., Kuret J., McGeer P. L.: Casein kinase 1 delta is associated with pathological accumulation of tau in several neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging.* 21, 503 (2000).
40. Yasojima K., Kuret J., DeMaggio A. J., McGeer E., McGeer P. L.: Casein kinase 1 delta mRNA is upregulated in Alzheimer disease brain. *Brain Res.* 865, 116 (2000).
41. Kimura T., Ishiguro K., Hisanaga S.: Physiological and pathological phosphorylation of tau by Cdk5. *Front. Mol. Neurosci.* 7, 65 (2014).

42. Kobayashi H., Saito T., Sato K., Furusawa K., Hosokawa T., Tsutsumi K., Asada A., Kamada S., Ohshima T., Hisanaga S.: Phosphorylation of cyclin-dependent kinase-5 (Cdk5) at tyr-15 is inhibited by Cdk5 activators and does not contribute to the activation of Cdk5. *J. Biol. Chem.* 289, 19627 (2014).
43. Sobue K., Agarwal-Mawal A., Li W., Sun W., Miura Y., Paudel H. K.: Interaction of neuronal Cdc2-like protein kinase with microtubule-associated protein tau. *J. Biol. Chem.* 275, 16673 (2000).
44. Plattner F., Angelo M., Giese G. P.: The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation. *J. Biol. Chem.* 281, 25457 (2006).
45. Dolan P. J., Johnson G. V. W., The role tau kinases in Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 13, 595 (2010).
46. Davies C., Tournier C.: Exploring the function of the JNK (c-Jun N-terminal kinase) signalling pathway in physiological and pathological processes to design novel therapeutic strategies. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 85 (2012).
47. Cui J., Zhang M., Zhang Y. Q., Xu Z. H.: JNK pathway diseases and therapeutic potential. *Acta Pharmacol. Sin.* 28, 601 (2007).
48. Minden A., Lin A., Smeal T., Dérijard B., Cobb M., Davis R., Karin M.: C-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* 14, 6683 (1994).
49. Chang R. Ch. Ch. (ed): *Neurodegenerative diseases-processes, prevention, protection and monitoring*. InTech, Rijeka 2011.
50. Song J., Park K. A., Lee W. T., Lee J. E.: Apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1): Potential as a therapeutic target for Alzheimer's disease, *Int. J. Mol. Sci.* 15, 2119 (2014).
51. Kim E. K., Choi E. J.: Pathological role of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 396 (2010).

52. Dineley K. T., Westerman M., Bui D., Bell K., Ashe K. H., Sweatt J. D.: β -Amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors: *In vitro* and *in vivo* mechanisms related to Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* *21*, 4125 (2001).
53. Frémin Ch., Saba-El-Leil M. K., Lévesque K., Ang S. L., Meloche S.: Functional redundancy of ERK1 and ERK2 MAP kinases during development. *Cell Rep.* *12*, 913 (2015).
54. Dwivedi Y., Rizavi H. S., Zhang H., Roberts R. C., Conley R. R., Pandey G. N.: Aberrant extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 signalling in suicide brain: role of ERK kinase 1 (MEK1). *Int. J. Neuropsychopharmacol.* *12*, 1337 (2009).
55. Hensley K., Floyd R. A., Zheng N. Y., Nael R., Robinson K. A., Nguyen X., Pye Q. N., Steward Ch. A., Geddes J., Markesbery W. R., Patel E., Johnson G. V. W., Bing G.: P38 kinase is activated in the Alzheimer's disease brain. *J. Neurochem.* *72*, 2053 (1999).
56. Jicha G. A., Weaver Ch., Lane E., Vianna C., Kress Y., Rockwood J., Davies P.: cAMP-dependent protein kinase phosphorylation on tau in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* *19*, 7486 (1999).
57. Liang Z., Liu F., Grundke-Iqbal I., Gong Ch. X.: Down-regulation of cAMP-dependent protein kinase by over-activated calpain in Alzheimer disease brain. *J. Neurochem.* *103*, 2462 (2007).
58. Chen Y., Huang X., Zhang Y., Rockenstein E., Bu G., Golde T. E., Masliah E., Xu H.: Alzheimer's β -secretase (BACE1) regulates the cAMP/PKA/CREB pathway independently of β -amyloid. *J. Neurosci.* *32*, 11390 (2012).
59. Nygaard H. B., van Dyck Ch. H., Strittmatter, S. M.: Fyn kinase as a novel therapy for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Res. Ther.* *6*, 1 (2014).
60. Yang K., Belrose J., Trepanier C. H., Lei G., Jackson M. D., MacDonald J. F.: Fyn, a potential target for Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* *27*, 243 (2011).

61. Ferrer I., Barrachina M., Puig B., Martínez de Lagrán M., Martí E., Avila J., Dierssen M.: Constitutive DYRK1A is abnormally expressed in Alzheimer disease, Down syndrome, Pick disease, and related transgenic models. *Neurobiol. Dis.* 20, 392 (2005).
62. Ryoo S. R., Jeong H. K., Radnaabazar Ch., Yoo J. J., Cho H. J., Lee H. W., Kim I. S., Cheon Y. H., Ahn Y. S., Chung S. H., Song W. J.: DYRK1A-mediated hyperphosphorylation of tau – A functional link between Down syndrome and Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 282, 34850 (2007).
63. Kimura R., Kamino K., Yamamoto M., Nuripa A., Kida T., Kazzui H., Hashimoto R., Tanaka T., Kudo T., Yamagata H., Tabara Y., Miki T., Akatsu H., Kosaka K., Funakoshi E., Nishitomi K., Sakaguchi G., Kato A., Hattori H., Uema T., Takeda M.: The *DYRK1A* gene, encoded in chromosome 21 Down syndrome critical region, bridges between β -amyloid production and tau phosphorylation in Alzheimer disease. *Hum. Mol. Genet.* 16, 15 (2007).
64. Weigel J., Kaczmarek W., Barua M., Kuchna I., Nowicki K., Wang K. Ch., Weigel J., Ma S. Y., Franckowiak J., Mazur-Kolecka B., Silverman W. P., Reisberg B., Monteiro I., de Leon M., Wisniewski T., Dalton A., Lai F., Hwang Y. W., Adayev T., Liu F., Iqbal K., Iqbal I. G., Gong Ch. X.: The link between DYRK1A overexpression and several-fold enhancement of neurofibrillary degeneration with 3-Repeat tau protein in Down syndrome. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 70, 36 (2011).
65. Coutadeur S., Benyamine H., Delalonde L., de Oliveira C., Leblond B., Foucourt A., Besson T., Casagrande A. S., Taverne T., Girard A., Pando P. M., Désiré L.: A novel DYRK1A (Dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A) inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease: effect on tau and amyloid pathologies *in vitro*. *J. Neurochem.* 133, 440 (2015).
66. Mietelska-Porowska A., Wasik U., Goras M., Filipek A., Niewiadomska G.: Tau protein modifications and interactions: Their role in function and dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 4671 (2014).

67. Cai Z., Yan L. J., Li K., Quanzi S. H., Zhao B.: Roles of AMP-activated protein kinase in Alzheimer's disease. *Neuromolecular. Med.* 14, 1 (2012).
68. Ma T., Chen Y., Vingtdeux V., Zhao H., Viollet B., Marambaud P., Klann E.: Inhibition of AMP-activated protein kinase signaling alleviates impairments in hippocampal synaptic plasticity induced by amyloid β . *J. Neurosci.* 34, 12230 (2014).
69. Timm T., Marx A., Panneerselvam S., Mandelkow E., Mandelkow E. M.: Structure and regulation of MARK, a kinase involved in abnormal phosphorylation of Tau protein. *BMC Neurosci.* 9, 1 (2008).
70. Timm T., Kries J. P., Li X., Zempel H., Mandelkow E., Mandelkow E. M.: Microtubule affinity regulating kinase (MARK) activity in living neurons examined by a genetically encoded FRET/FLIM based biosensor: Inhibitors with therapeutic potential, *J. Biol. Chem.* 286, 41711 (2011).
71. Martinez A., Gil C., Perez D. I.: Glycogen synthase kinase 3 inhibitors in the next horizon for Alzheimer's disease treatment. *Int. J. Alzheimer's Dis.* 2011, 1 (2011).
72. ChemDiv, Inc.: *GSK-3 β -Targeted Library*. ChemDiv, San Diego 2014. <http://www.chemdiv.com/wp-content/uploads/2014/02/GSK3b-Targeted-Library.pdf>, staženo 13. ledna 2016.
73. Eldar-Finkelman H., Licht-Murava A., Pietrokowsky S., Eisenstein M.: Substrate competitive GSK-3 inhibitors – strategy and implications. *Biochim. Biophys. Acta* 1804, 1 (2010).
74. Garuti L., Roberti M., Bottegoni G.: Non-ATP competitive protein kinase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* 17, 2804 (2010).
75. Greis K. D.: Mass spectrometry for enzyme assays and inhibitor screening: An emerging application in pharmaceutical research. *Mass Spectrom. Rev.* 26, 324 (2007).
76. He Y., Yeung E. S.: High-throughput screening of kinase inhibitors by multiplex capillary electrophoresis with UV absorption detection. *Electrophoresis* 24, 101 (2003).

77. Ross H., Noakes J. E., Spaulding J. D. (eds): *Liquid scintillation counting and organic scintillators*. Lewis publishers, Chelsea 1991.
78. Gebhardt R., Lerche K. S., Götschel F., Günther R., Kolander J., Teich L., Zellmer S., Hofmann H. J., Eger K., Hecht A., Gaunitz F.: 4-Aminoethylamino-emodin – a novel potent inhibitor of GSK-3 β -acts as an insulin-sensitizer avoiding downstream effect of activated β -catenin. *J. Moll. Cell. Med.* 14, 1276 (2010).
79. Baki A., Bielik A., Molnár L., Szendrei G., Keserü G. M.: A high throughput luminescent assay for glycogen synthase kinase-3 β inhibitors. *Assay Drug Dev. Technol.* 5, 75 (2007).
80. Marchand B., Arsenault D., Raymond-Fleury A., Boisvert F. M., Boucher M. J.: Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) inhibition induces pro-survival autophagic signals in human pancreatic cancer cells. *J. Biol. Chem.* 290, 5592 (2015).
81. Bock A. S., Leigh N. D., Bryda E. C.: Effect of GSK3 inhibitor CHIR99021 on aneuploidy levels in rat embryonic stem cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 50, 572 (2014).
82. Li V. S. W., Ng S. S., Boeserma P. J., Low T. Y., Karthaus W. R., Gerlach J. P., Mohammed S., Heck A. J. R., Maurice M. M., Mahmoudi T., Clevers H.: WNT signaling through inhibition of β -catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell* 149, 1245 (2012).
83. Landrieu I., Leroy A., Smet-Nocca C., Huvent I., Amniai L., Hamdane M., Sibille N., Buée L., Wieruszeski J. M., Lippens G.: NMR spectroscopy of the neuronal tau protein: normal function and implication in Alzheimer's disease. *Biochem. Soc. Trans.* 38, 1006 (2010).
84. Leroy A., Landrieu I., Huvent I., Legrand D., Codeville B., Wieruszeski J. M., Lippens G.: Spectroscopic study of GSK3 β phosphorylation of the neuronal tau protein and its interaction with the N-terminal domain of apolipoprotein E. *J. Biol. Chem.* 285, 33435 (2010).

85. Corbel C., Zhang B., Le Parc A., Baratte B., Colas P., Couturier C., Kosik K. S., Landrieu I., Le Tilly V., Bach S.: Tamoxifen inhibits Cdk-5 kinase activity interacting with p35/p25 and modulates the pattern of tau phosphorylation. *Chem. Biol.* 22, 1 (2015).
86. Sanphui P., Pramanik S. K., Chatterjee N., Moorthi P., Banerji B., Biswas S. Ch.: Efficacy of cyclin dependent kinase 4 inhibitors as potent neuroprotective agents against insults relevant to Alzheimer's disease. *PLOS ONE* 8, 1 (2013).
87. Pang H., Kenseth J., Coldrion S.: High-throughput multiplexed capillary electrophoresis in drug discovery. *Drug Discov. Today* 9, 1072 (2004).
88. Coligan J. E. (ed): *Current protocols in immunology*. Wiley, New York 2001.
89. Hu S., Begum A. N., Jones M. R., Oh M. S., Beech W. K., Beech B. H., Yang F., Chen P., Ubeda O. J., Kim P. C., Davies P., Ma Q., Cole G. M., Frautschy S. A.: GSK3 inhibitors show benefits in Alzheimer's disease (AD) model of neurodegeneration but adverse effects in control animals. *Neurobiol. Dis.* 33, 193 (2009).
90. Walker M. J.: The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for protein quantification. *Methods Mol. Biol.* 32, 5 (1994).
91. Bolós M., Fernandez S., Torres-Aleman I.: Oral administration of a GSK3 inhibitor increases brain insulin-like growth factor I levels. *J. Biol. Chem.* 285, 17693 (2010).
92. Parr C., Carzaniga R., Gentleman S. M., Van Leuvan F., Walter J., Sastre M.: Glycogen synthase kinase 3 inhibition promotes lysosomal biogenesis and autophagic degradation of the amyloid- β precursor protein. *Moll. Cell. Biol.* 32, 4410 (2012).
93. Cuchillo-Ibanez I., Seereeram A., Byers H. L., Leung K. Y., Ward M. A., Anderton B. H., Hanger D. P.: Phosphorylation of tau regulates its axonal transport by controlling its binding to kinesin. *The FASEB Journal* 22, 3186 (2008).

94. Kemeny D. M., Challacombe S. J. (eds): *ELISA and other solid phase immunoassays: Theoretical and practical aspects*. Wiley, New York 1988.
95. Pastorino J. G., Hoek J. B., Shulga N.: Activation of glycogen synthase kinase 3 β disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity. *Cancer Res.* 65, 10545 (2005).
96. Mendes C. T., Mury F. B., Sá Moreira E., Alberto F. L., Forlenza O. V., Dias-Neto E., Gattaz W. F.: Lithium reduces GSK-3 β mRNA levels: implications for Alzheimer disease. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 259, 16 (2009).
97. Novotný T., Heřmánková Z.: Predikční metody „*in silico*“ a softwarové nástroje pro REACH a CLP. Techem cz, s.r.o., Praha 2007.
98. Balakrishnan N., Raj J. S., Kandakatla N.: *In silico* studies on new Indazole derivatives as GSK-3 β inhibitors. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 7, 295 (2015).
99. Martinez A., Alonso M., Castro A., Pérez C., Moreno F. J.: First non-ATP competitive glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3beta) inhibitors: thiadiazolidinones (TDZD) as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* 45, 1292 (2002).
100. Akhtar M., Bharatam P. V.: 3D-QSAR and molecular docking studies on 3-Anilino-4-Arylmaleimide derivatives as glycogen synthase kinase-3 β inhibitors. *Chem. Biol. Drug Des.* 79, 560 (2012).
101. Weininger D.: SMILES, a chemici language and information system. 1. Introduction to methology and encoding rules. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 28, 31 (1988).
102. Quesada-Romero L., Caballero J.: Docking and quantitative structure-activity relationship of oxadiazole derivatives as inhibitors of GSK 3. *Mol. Divers.* 18, 149 (2014).
103. Medkoo Biosciences, Inc.: CHIR98014. Medkoo Biosciences, Chapel Hill 2016. <http://www.medkoo.com/products/4808>, staženo 23. ledna 2016.

104. Coghlan M. P., Culbert A. A., Cross D. A., Corcoran S. L., Yates J. W., Pearce N. J., Rausch O. L., Murphy G. J., Carter P. S., Roxbee Cox L., Mills D., Brown M. J., Haigh D., Ward R. W., Murray K. J., Reith A. D., Holder A. C.: Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem. Biol.* 7, 793 (2000).
105. Martinez A., Castro A., Medina M. (eds): *Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) and its inhibitors: Drug discovery and development*. Wiley-Interscience, Hoboken 2006.
106. Georgievska B., Sandin J., Doherty J., Mörtberg A., Neelissen J., Andersson A., Gruber S., Nilsson Y., Schött P., Arvidsson P. I., Hellberg S., Osswald G., Berg S., Fälting J., Bhat R. V.: AZD1080, a novel GSK3 inhibitor, rescues synaptic plasticity deficits in rodent brain and exhibits peripheral target engagement in humans. *J. Neurochem.* 125, 446 (2013).
107. Lau L. F., Brodney M. A. (eds): *Alzheimer's disease*. Springer, Londýn 2008.
108. Martínez A. (ed): *Emerging drugs and targets for Alzheimer's disease*. RSC drug discovery series, Cambridge 2010.
109. Domínguez J. M., Fuertes A., Orozco L., Monte-Millán M., Delgado E., Medina M.: Evidence for irreversible inhibition of glycogen synthase kinase-3 β by Tideglusib. *J. Biol. Chem.* 287, 893 (2012).
110. Morales-Garcia J. A., Luna-Medina R., Alonso-Gil S., Sanz-SanCristobal M., Palomo V., Gil C., Santos A., Martinez A., Perez-Castillo A.: Glycogen synthase kinase 3 inhibition promotes adult hippocampal neurogenesis *in vitro* and *in vivo*. *ACS Chem. Neurosci.* 3, 963 (2012).
111. Perez I. D., Palomo V., Pérez C., Gil C., Dans P. D., Luque F. J., Conde S., Martínez A.: Switching reversibility to irreversibility in glycogen synthase kinase 3 inhibitors: Clues for specific design of new compounds. *J. Med. Chem.* 54, 4042 (2011).

112. Waters A. L., Peraud O., Kasanah N., Sims J. W., Kothalawala N., Anderson M. A., Abbas S. H., Rao K. V., Jupally V. R., Kelly M., Dass A., Hill R. T., Hamann M. T.: An analysis of the sponge *Acanthostrongylophora igens*' microbiome yields an actinomycete that produces the natural product manzamine A. *Front. Mar. Sci.* *1*, 1 (2014).
113. Leclerc S., Garnier M., Hoessel R., Marko D., Bibb J. A., Snyder G. L., Biernat J., Wu Y. Z., Mandelkow E. M., Eisenbrand G., Meijer L.: Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 β and CDK5/p25, two protein kinase involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* *276*, 251 (2001).
114. Ferandin Y., Bettayeb K., Kritsanida M., Lozach O., Polychronopoulos P., Magiatis P., Skaltsounis A. L., Meijer L.: 3'-substituted 7-halogenoindirubins, a new class of cell death inducing agents. *J. Med. Chem.* *49*, 4638 (2006).
115. Sharma S., Taliyan R.: Neuroprotective role of indirubin-3'-monoxime, a GSK-3 β inhibitor in high fat diet induced cognitive impairment in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *452*, 1009 (2014).
116. Meijer L., Skaltsounis A. L., Magiatis P., Polychronopoulos P., Knockaert M., Leost M., Ryan X. P., Vonica C. A., Brivanlou A., Dajani R., Crovace C., Tarricone C., Musacchio A., Roe S. M., Pearl L., Greengard P.: GSK-3-selective inhibitors derived from *Tyrian Purple* indirubins. *Chem. Biol.* *10*, 1255 (2003).
117. Nguyen T. N., Tepe J. J.: Preparation of hymenialdisine, analogues and their evaluation as kinase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* *16*, 3122 (2009).
118. Macor J. E. (ed): *Annual reports in medicinal chemistry*. Academic Press, Oxford 2011.
119. Zhang N., Zhong R., Yan H., Jiang Y.: Structural features underlying selective inhibition of GSK3 β by dibromocantharelline: implications for rational drug design. *Chem. Biol. Drug Des.* *77*, 199 (2011).

120. Meijer L., Thunnissen A. M., White A. W., Garnier M., Nikolic M., Tsai L. H., Walter J., Cleverley K. E., Salinas P. C., Wu Y. Z., Biernat J., Mandelkow E. M., Kim S. H., Pettit G. R.: Inhibition of cyclin-dependent kinases, GSK-3 β and CK-1 by hymenialdisine, a marine sponge constituent. *Chem. Biol.* 7, 51 (2000).
121. Hakkimda: Türkiye Denizlerinin Bilindik Canlı Türleri. Turecko 2012. http://www.abcakaloz.com/yazilarim_files/dcf0c338faf61139631fc8accb4d3fd3-14.html, staženo 19. ledna 2016.
122. Khanfar M. A., Asal B. A., Mudit M., Kaddoumi A., El Sayed K. A.: The marine natural-derived inhibitors of glycogen synthase kinase-3 β phenylmethylen hydantoin: *In vitro* and *in vivo* activities and pharmacophore modeling. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 6032 (2009).
123. Khanfar M. A., Hill R. A., Kaddoumi A., El Sayed K. A.: Discovery of novel GSK-3 β inhibitors with potent *in vitro* and *in vivo* activities and excellent brain permeability using combined ligand – and structure-based virtual Screening. *J. Med. Chem.* 53, 8534 (2010).
124. Youssef D. T. A., Shaala L. A., Alshali K. Z.: Bioactive hydantoin alkaloids from the Red Sea marine sponge *Hemimycale arabica*. *Mar. Drugs* 13, 6609 (2015).
125. Hamann M., Alonso D., Martín-Aparicio E., Fuertes A., Pérez-Puerto M. J., Castro A., Morales S., Navarro M. L., Monte-Millán M., Medina M., Pennaka H., Balaiah A., Peng J., Cook J., Wahyuono S., Martínez A.: Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitory activity and structure-activity relationship (SAR) studies of manzamine alkaloids. Potential for Alzheimer's Disease. *J. Nat. Prod.* 70, 1397 (2007).
126. Rao K. V., Donia M. S., Peng J., Garcia-Palomero E., Alonso D., Maerinez A., Medina M., Franzblau S. G., Tekwani B. L., Khan S. I., Wahyuono S., Willet K. L., Hamann M. T.: Manzamine B and E and ircinal A related alkaloids from an Indonesian *Acanthostrongylophora* Sponge and their activity against infectious, tropical parasitic, and Alzheimer's diseases. *J. Nat. Prod.* 69, 1034 (2006).

127. Kim S. K. (ed): *Marine biomaterials: characterization, isolation, and applications*. Taylor & Francis Group, Boca Raton 2011.
128. Yousaf M., Hammond N. L., Peng J., Wahyuono S., McIntosh K. A., Charman W. N., Mayer A. M., Hamman M. T.: New manzamine alkaloids from an Indo-Pacific sponge. Pharmacokinetics, oral availability, and the significant activity of several manzamines against HIV-I, AIDS opportunistic infections, and inflammatory diseases. *J. Med. Chem.* *47*, 3512 (2004).
129. Coremap: Coral reef rehabilitation and management program – Coral triangle initiative. Coremap, Indonesie 2016. <http://www.coremap.or.id/datin/sponge/index.php?keyid=25&act=detail>, staženo 18. ledna 2016.
130. Bidon-Chanal A., Fuertes A., Alonso D., Pérez D. I., Martínez A., Luque F. J., Medina M.: Evidence for a new binding mode to GSK-3: Allosteric regulation by the marine compound palinurin. *Eur. J. Med. Chem.* *60*, 479 (2013).
131. Pérez M., Pérez D. I., Martínez A., Castro A., Gómez G., Fall Y.: The first enantioselective synthesis of palinurin. *Chem. Commun. (Camb.)* *14*, 3252 (2009).
132. Ratnasingham S., Hebert P. D. N.: BOLD: The barcode of life data system. IBOL, Kanada 2016. http://www.boldsystems.org/index.php/Taxbrowser_Taxonpage?taxid=85237, staženo 3. února 2016.

7 Abstrakt

Polzerová, I: Ovlivnění kinas uplatňující se v patogenezi Alzheimerovy choroby. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové 2016, 91 s.

Tato rešeršní diplomová práce čerpá především ze zahraniční odborné literatury. Poskytuje přehled dosud prozkoumaných přírodních látek z mořských organismů vykazujících inhibiční kinasovou aktivitu.

Úvodní kapitola Alzheimerova choroba popisuje charakteristiku choroby, etiopatogenezi, rizikové faktory a současnou dostupnou léčbu. Na začátku druhé kapitoly jsou zmíněny nové perspektivní přístupy terapie Alzheimerovy choroby. Větší část této kapitoly se zabývá kinasami jako potenciálními terapeutickými cíli v terapii Alzheimerovy choroby. Jsou zde uvedeny fyziologické a patofyziologické funkce GSK-3 β a CK-1 δ v organismu a zmíněny jsou zde i další kinyasy, které se podílejí na patogenezi nemoci. Další oddíl se věnuje analytickým metodám vhodným k testování aktivity a inhibice kinas *in vitro* a *in silico*, zabývá se souhrnem syntetických kinasových inhibitorů a popisuje jejich vlastnosti. V této kapitole je uvedena také stěžejní část práce – ucelený přehled dosud prozkoumaných přírodních produktů z mořských organismů s inhibiční kinasovou aktivitou. Tato část je rozdělena podle mechanismu inhibice přírodních inhibitorů. U látek, které vykazují dobrou biologickou dostupnost a jeví se jako potenciálně zajímavé pro terapii Alzheimerovy choroby, je účinnost porovnána podle poloviční hodnoty maximální inhibiční koncentrace IC₅₀. Je zde zhodnocen také současný stav výzkumu přírodních inhibičních sloučenin.

Klíčová slova: Alzheimerova choroba, přírodní látky, kinyasy (GSK-3 β a kaseinkinasa-1 δ)

8 Abstract

Polzerová, I: Use of kinase modulation in the Alzheimer's disease pathogenesis. Diploma thesis, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Hradec Králové 2016, 91 p.

Data used in this Diploma Thesis have been taken from foreigner scientific literary sources. It provides the summary of the not yet explored natural compounds from marine organisms with kinase inhibitory activity.

The first chapter Alzheimer's disease describes a characteristic of the disease, its etiopathogenesis, risk factors and currently available treatment. At the beginning of the second chapter are mentioned new perspective approaches to treatment of Alzheimer's disease. Most of this chapter deals with kinases as potential therapeutic targets in the treatment of Alzheimer's disease. In the chapter, physiologic and pathophysiologic functions of GSK-3 β and CK-1 δ are described in the organism, and also, other kinases are mentioned which are involved in the pathogenesis of the disease. Next part dedicates analytical methods suitable for testing activity and inhibition of kinases *in vitro* and *in silico*, also deals with summary of the synthetic kinase inhibitors and characterizes an their properties. In this chapter is also described main part of this work – the whole summary of the not yet explored natural products from marine organisms with kinase inhibitory activity. This part is structured according the mechanism of inhibition of natural inhibitors. For compounds, which exhibit good bioavailability and which seem to be of potentially interesting for the treatment of Alzheimer's disease, the effectivity is compared using values of the half maximal inhibitory concentration IC₅₀. There is also evaluated the current state of scientific research of natural inhibitory compounds.

Key words: Alzheimer's disease, natural products, kinases (GSK-3 β a casein kinase-1 δ)