

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Biologické a biochemické účinky inhibitorů proliferace



DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor:	Mgr. Iva Dolečková
Studijní program:	P1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.

„Díky...“

„Prohlašuji, že jsem předloženou disertační práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

.....

Bibliografické informace

Jméno a příjmení autora: Iva Dolečková
Název práce: Biologické a biochemické účinky inhibitorů proliferace
Typ práce: Disertační
Pracoviště: Laboratoř růstových regulátorů, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého & Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i.
Vedoucí práce: doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
Rok obhajoby práce 2013

Abstrakt:

Cyklin-dependentní kinasy (CDK) jsou specifické serin/threoninové proteinkinasy, které hrají klíčovou roli v regulaci buněčného cyklu, transkripci, apoptóze a diferenciaci. Nadměrná aktivita CDK bývá častým znakem různých lidských onemocnění spojených s abnormální mírou proliferace jako je rakovina. Z tohoto důvodu se CDK staly slibným terčem cílených protinádorových léčiv. První část práce využívá racionálního přístupu při hledání nových inhibitorů CDK. Struktury známých inhibitorů olomoucinu a roskovitinu zde byly použity jako výchozí strukturní motiv, na jehož základě byla syntetizována série 2,9-substituovaných 6-guanidinopurinů. Všechny připravené deriváty byly testovány na CDK1 a CDK2 inhibiční aktivitu *in vitro*, cytotoxicitu a efekt na buněčný cyklus v nádorové buněčné línii MCF7 odvozené od karcinomu prsu a byl u nich studován vztah mezi strukturou a biologickou aktivitou. Další část práce je zaměřena na hledání inhibitorů CDK mezi přírodními látkami. Studovány byly antiproliferační a anti-angiogenní účinky flavonu eupatorinu a mechanismus jeho biologické aktivity. Eupatorin je také jednou z hlavních složek extraktů z listů léčivé rostliny *Orthosiphon stamineus* používané v jihovýchodní Asii k léčbě různých onemocnění. Její sušené, drcené listy byly v této práci využity pro vytvoření chloroformového extraktu, který byl poté testován na buněčných kulturách a jeho účinky byly srovnávány s aktivitou samotného eupatorinu.

Klíčová slova: rakovina, CDK inhibitory, flavonoidy, eupatorin, *Orthosiphon stamineus*, olomoucin, roskovitin, 6-guanidinopuriny
Počet stran: 68
Počet příloh: 3
Jazyk: český

Bibliographic information

Author's name: Iva Dolečková
Title: Biological and biochemical effects of inhibitors of proliferation
Type of thesis: Ph.D.
Department: Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacky University & Institute of Experimental Botany AS CR
Supervisor: doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
The year of presentation: 2013

Abstract:

Cyclin-dependent kinases (CDKs) are specific serine/threonine protein kinases which play a key role in regulation of the cell cycle, transcription, apoptosis and differentiation. Overactivation of CDKs is a frequent feature of human pathologies associated with abnormal rates of proliferation such as cancer. For these reasons, CDKs have become a promising target in anticancer research. In the first part of the thesis, a series of 2,9-substituted 6-guanidinopurines, structurally related to the CDK inhibitors olomoucine and roscovitine, has been synthesized and characterized. All prepared compounds were screened for their CDK1 and CDK2 inhibitory activities, cytotoxicity, effects on the cell cycle in the breast cancer-derived cell line MCF7 and the structure-activity relationship was evaluated. The second part is focused on CDK inhibitors of the natural origin. We investigated the antiproliferative and anti-angiogenic properties of flavone eupatorin and the mechanisms of its biological action. Eupatorin is also one of the constituents of the medicinal herb *Orthosiphon stamineus* used in folk medicine in South East Asia for treatment of various disorders. We prepared a chloroform extract of dried, crushed leaves of this plant, tested it on the cell cultures and its activity was then compared to that of the eupatorin standard.

Keywords: cancer, CDK inhibitors, flavonoids, eupatorin, *Orthosiphon stamineus*, olomoucine, roscovitine, 6-guanidinopurines
Number of pages: 68
Number of appendices: 3
Language: Czech

Obsah

1.	Cíle disertační práce	1
2.	Teoretický úvod.....	2
2.1	Protinádorová léčiva.....	2
2.1.1	Strategie hledání nových protinádorových léčiv	2
2.1.2	Mechanismy účinku a molekulární cíle protinádorových léčiv	3
2.3	CDK terčem cílených protinádorových léčiv	9
2.3.1	CDK a jejich role v regulaci buněčného cyklu a transkripci.....	9
2.3.2	Vzájemná kompenzace CDK	11
2.3.3	Deregulace CDK v rakovině	12
2.3.4	Nízkomolekulární inhibitory CDK.....	12
2.3.5	Guanidinopurinové deriváty jako inhibitory CDK.....	14
2.2	Flavonoidy	16
2.2.1	Výskyt a význam flavonoidů.....	16
2.2.2	Struktura	16
2.2.3	Biologická dostupnost a metabolismus flavonoidů.....	18
2.2.4	Flavonoidy jako nízkomolekulární inhibitory procesu karcinogeneze	18
2.2.5	Eupatorin	20
3.	Materiál a metody.....	22
3.1	Příprava extraktu z listů <i>Orthosiphon stamineus</i>	22
3.2	Chemikálie a protilátky	22
3.3	Buněčné kultury a test viability	22
3.4	Sledování tvorby kolonií	23
3.5	Analýza buněčného cyklu	23
3.6	SDS–PAGE a imunodetekce.....	23
3.7	Měření aktivity caspasy 3/7	23
3.8	Imunofluorescenční značení.....	24
3.9	Měření inhibice proteinkinas.....	24
4.	Komentované výsledky a diskuse	25
4.1	Biologická aktivita guanidinových analogů roskovitinu.....	25
4.2	Antiproliferační a anti-angiogenní účinky flavonu eupatorinu.....	28
4.3	Aktivita inhibitorů CDK na potkaní embryonální fibroblasty s různým funkčním statusem proteinů p53 a c-Ha-ras	37
5.	Závěr.....	43
6.	Literatura	45
7.	Seznam použitých zkratk.....	60
9.	Prohlášení o spoluautorství	65
10.	Seznam příloh.....	67

1. Cíle disertační práce

Cyklin-dependentní kinasy (CDK) jsou specifické serin/threoninové proteinkinasy, které hrají klíčovou roli v regulaci buněčného cyklu, transkripci, apoptóze a diferenciaci. Nadměrná aktivita CDK bývá častým znakem různých lidských onemocnění spojených s abnormální mírou proliferace, jako je rakovina. Z tohoto důvodu se CDK staly slibným terčem cílených protinádorových léčiv.

Cílem této práce byla jednak literární rešerše na téma protinádorových léčiv se zaměřením na CDK, dále v experimentální části hledání nových inhibitorů CDK a ověření mechanismu jejich účinku. Využity přitom byly dva přístupy. První, racionální přístup, byl založen na obměňování struktur již známých inhibitorů CDK ve snaze zvýšit jejich biologickou aktivitu, druhý poté využíval jako zdroj látky přírodního původu.

Dalším cílem bylo posoudit závislost vlivu CDK inhibitorů na genetickém pozadí, konkrétně v buněčných modelech potkaních embryonálních fibroblastů s různě funkčními proteiny p53 a c-Ha-ras.

2. Teoretický úvod

2.1 Protinádorová léčiva

2.1.1 Strategie hledání nových protinádorových léčiv

Rostoucí počet případů nádorových onemocnění obvykle doprovázených drastickou léčbou s řadou závažných vedlejších účinků s sebou přináší potřebu vyvíjet stále nová léčiva s menšími negativními dopady na lidský organismus. Kromě toho se navíc zavedená léčiva potýkají podobně jako antibiotika s problémem vytvoření lékové resistance a je tedy i z tohoto důvodu nezbytné hledat nejen nové látky, ale i celkové přístupy pro překonání tohoto fenoménu.

Jednou z historicky nejstarších strategií ve vývoji chemoterapeutik je hledání biologicky aktivních látek mezi přírodními produkty mikroorganismů, rostlin či živočichů. Látky jako vinca alkaloidy, paclitaxel, camptotecin či epipodophyllotoxin již našly své terapeutické uplatnění a staly se nedílnou součástí standardní léčby různých typů rakovin. Objev nové aktivní látky byl však převážně dílem náhody a její mechanismus účinku byl také do nedávné doby předmětem retrospektivního výzkumu. Příkladem může být paclitaxel, jehož struktura a protinádorové vlastnosti byly publikovány již v roce 1971 (Wani et al., 1971), avšak mechanismus účinku – stabilizace mikrotubulů – až o 8 let později (Schiff et al., 1979). Současné pokroky v molekulární biologii a stále hlubší znalosti v oblasti nádorové transformace však obrátily pozornost vědců na cílenou terapii a molekulárně cílená léčiva. Tento typ léčiv je zaměřen na inhibici/modifikaci určité vybrané molekulární dráhy považované za klíčovou pro vznik rakoviny či její rozvoj a metastazování. Hlavní myšlenkou této strategie je individualizovaný přístup k pacientům a co nejpřesnější charakterizace nádoru, na jejímž základě je poté zvolen určitý typ terapie. Imatinib (Gleevec®) se stal prvním představitelem této skupiny inhibující specifickou tyrosinkinasu, Bcr-Abl fúzní onkoprotein, a je v současnosti používán pro léčbu chronické myeloidní leukémie a gastrointestinálních stromálních nádorů (Druker, 2002). Nová cílená léčiva mohou být hledána pomocí high-throughput screeningu různých přírodních produktů či chemických knihoven za účelem modifikace konkrétní molekulární dráhy nebo jsou pro tuto modifikaci přímo navrhována a syntetizována. Aktivní látky ovšem nemusí mít vhodné vlastnosti z hlediska farmakokinetiky, farmakodynamiky, vedlejších účinků a stávají se poté výchozím strukturním motivem pro vývoj derivátů s lepšími biologickými vlastnostmi.

2.1.2 Mechanizmy účinku a molekulární cíle protinádorových léčiv

Onkoproteiny a nádorové supresory

Je známo, že udržení nádorového bujení je velmi často závislé na neustálé aktivitě určitých onkogenů (Weinstein, 2002). Tento fenomén byl demonstrován *in vivo* pro některé onkogeny. Např. myší modely využívající indukovatelný onkogen *MYC* prokázaly, že papilomy, lymfomy či osteosarkomy nevznikají, pokud není onkogen *MYC* aktivní (Felsher et Bishop 1999; Pelengaris et al., 1999; Jain et al., 2002). Podobně i závislost na onkogenech *HRAS* a *BCR-ABL* byla prokázána na myších modelech melanomu a leukémie (Chin et al., 1999; Heuttner et al., 2000). Z těchto důvodů se skupina onkogenů, jejichž inhibice vede k zastavení proliferace, buněčné smrti, diferenciaci či senescenci, stala zájmem výzkumu protinádorových léčiv. Na základě této myšlenky byly vyvinuty inhibitory některých protenkinas jako Bcr-Abl (imatinib/Gleevec), EGFR (gefitinib/Iressa, erlotinib/Tarceva), HER2 (trastuzumab/Herceptin) atd. (Druker, 2002; Roberts et Der, 2007; Sharma et Settleman, 2007).

Narozdíl od onkogenů jsou nádorové supresory součástí procesů, které brání nadměrnému růstu a dělení, přežívání a genomické nestabilitě. Ztráta jejich funkce vlivem delecí, inaktivujících mutací nebo epigenetického umlčení vede k rozvoji rakoviny a naopak obnova funkce těchto genů v nádorových buňkách může vést k regresi nádoru. Využití tohoto konceptu v praxi ovšem zůstává pozadu za využitím inhibice onkogenů, jelikož je často poměrně složité využít nízkomolekulární látku k obnově nebo napodobení funkce proteinu, který je nefunkční nebo zcela chybí. V případě nádorových supresorů, které negativně regulují aktivitu protoonkogenu, lze jako léčiva využít látky cílené na tyto protoonkogeny. Příkladem může být nádor s nefunkčním nádorovým supresorem, lipidovou fosfatase PTEN, který za normálních okolností inhibuje PI3 kinasovou signální dráhu a je tedy citlivý k inhibitorům PI3 kinasy. Podobně ztráta nádorových supresorů Rb, p16, p21, p27 vede k nadměrné aktivitě CDK, klíčových regulátorů buněčného cyklu, a proto může být proliferace nádorových buněk s těmito aberacemi inhibována pomocí inhibitorů CDK.

Poškození DNA

Typickým znakem většiny nádorových buněk je zvýšená hladina poškození DNA a replikační stres vedoucí ke genomické nestabilitě. Jednou z nejčastějších příčin jsou mutace v genech DNA reparačních enzymů nebo proteinů zahrnutých v signálních drahách odpovídajících na poškození DNA jako např. p53 nebo ATM (Harper et Elledge, 2007). Stres z poškození DNA, se kterým se nádorové buňky musí neustále vypořádávat, je možné využít terapeuticky několika způsoby. Například nádorové buňky podléhající častým spontánním mutacím vykazují zvýšenou citlivost k látkám interferujícím se signální dráhou odpovídající na poškození DNA, jako jsou inhibitory kinas ATM nebo Chk1 (Chen et al., 2006; Kennedy et al., 2007). Podobný přístup byl využit i pro léčbu

nádorových buněk s mutací nádorového supresorového genu *BRCA2* zodpovědného za opravu dvouvláknových zlomů DNA pomocí homologní rekombinace. Tyto buňky jsou závislé na ostatních formách opravných mechanismů DNA např. na enzymu poly(ADP-ribose)polymerasa (PARP1) účastnící se oprav jednovláknových zlomů a jsou tedy citlivé na jeho inhibici (Bryant et al., 2005; Farmer et al., 2005). Netransformované buňky přitom inhibici enzymu PARP1 tolerují díky funkčnímu proteinu BRCA2, který jeho funkci kompenzuje (Conde et al., 2001). Další možností využití genomické nestability je i podpora již existujícího stresu natolik, že ho odpovídající mechanismy nedokážou vykompenzovat a dochází tak k zastavení buněčného cyklu a apoptóze. Tímto mechanismem pravděpodobně působí i radioterapie či některá v klinické praxi standardně používaná, DNA poškozující léčiva.

Mitotický stres

Jednou z významných charakteristik nádorových buněk je narušený proces mitózy vedoucí k aneuploidii a genomické nestabilitě (Thompson et Compton, 2010). Tyto buňky jsou pro své přežití závislé na molekulárních drahách odpovídajících na mitotický stres a stávají se citlivé na jeho další zvyšování (Weaver et Cleveland, 2005). Kontrolní bod vřeténka je jedním z mechanismů umožňujících opravit defekty v mitóze, na němž jsou nádorové buňky se zvýšenou chromozómovou nestabilitou závislé, a jeho inhibice je u těchto buněk letální. V jiných případech může být v nádorových buňkách přítomna naopak mutace oslabující funkci kontrolního bodu vřeténka (Cahill et al., 1998). Buňky s tímto fenotypem jsou senzitivní k látkám zvyšujícím mitotický stres, který nejsou schopny překonat a umírají. Takovým mechanismem účinku se vyznačují jednak některá standardní léčiva jako např. mikrotubuly stabilizující paclitaxel nebo moderní inhibitory mitotických kinas PLK1 a aurory A či B nacházející se v současné době ve fázi klinických testů (Strebhardt et Ullrich, 2006; Carpinelli et Moll, 2008).

Proteotoxický stres

Proteotoxický stres vzniká pravděpodobně jako následek vysokého stupně aneuploidie, změn v počtech kopií genů nebo změn v úrovni transkripce (Pollack et al., 2002; Torres et al., 2007). Odlišná míra transkripce poté vede k nesrovnalostem ve stechiometrii podjednotek proteinových komplexů (Papp et al., 2003) a k rostoucímu množství volných proteinů, jejichž odstraňování je pro buňku zátěží (Denoyelle et al., 2006). Odpovědí na proteotoxický stres je aktivace chaperonů, např. heat shock proteinů podílejících se na vazbě volných proteinů či jejich degradaci. Zvýšená aktivita heat shock proteinů je pozorována v mnoha typech nádorů, a proto se také stala potenciálním cílem protinádorových léčiv (Whitesell et Lindquist, 2005).

Další obranou proti nadměrnému množství nevázaných proteinů je jejich degradace proteasomem. Experimentálně bylo zjištěno u kvasinek, že přítomnost jediného nadbytečného chromozómu a s tím související nadbytečný obsah některých proteinů je dostačující pro citlivost

buněk k inhibitorům proteasomu (Torres et al., 2007). Bortezomid (Velcade) se stal prvním inhibitorem proteasomu používaným v klinické praxi pro léčbu mnohočetného myelomu (MM). Po dlouhou dobu nebylo jasné, z jakého důvodu je zrovna MM tak citlivý k inhibitorům proteasomu. Jedno ze současných vysvětlení je založeno na faktu, že buňky MM syntetizují a poté i sekretují značné množství protilátek typu IgG nebo IgA (Bianchi et al., 2009; Cenci et al., 2011), které ovšem nejsou správně vázány a dochází tedy k jejich degradaci proteasomem. Inhibice proteasomu vede k nadměrnému proteotoxickému stresu, který již buňky MM nedokážou překonat a umírají. Netransformované buňky přitom nebývají k těmto látkám citlivé vlivem jejich nízké bazální hladiny proteotoxického stresu. Úspěch bortezomidu stimuloval vývoj nových inhibitorů proteasomu, které jsou v současnosti v různých stádiích klinického testování (Kisselev et al., 2012).

Zajímavým využitím proteotoxického stresu pro léčbu rakoviny je zvýšení teploty pro uvolnění proteinů z komplexů. Hypertermie, v historii často používaná léčba pro celou řadu onemocnění, je v současné době opět extensivně zkoumána v souvislosti s léčbou rakoviny. Kromě zvyšování proteotoxického stresu se podílí také na změnách ve vlastnostech plazmatické membrány, vaskulatuře nádoru, na snižování replikace DNA atd. a je u ní prokázána synergie v kombinaci s chemoterapií a radioterapií (Fiorentini et Szasz, 2006). Experimentální podporou této teorie jsou výsledky pokusů na kvasinkách prokazující zvýšenou teplotní citlivost u aneuploidních buněk obsahujících jeden nadbytečný chromozóm (Torres et al., 2007).

Metabolický stres

Zdravé buňky za normálních okolností získávají převážnou část ATP oxidativní fosforylací v mitochondriích. Většina nádorových buněk ovšem přednostně produkuje energii pomocí méně efektivní glykolýzy dokonce i v prostředí s dostatečným přísunem kyslíku pravděpodobně vlivem poškození mitochondriálního citrátového cyklu (tzv. Warburgův efekt, Warburg, 1956; DeBerardinis et al., 2008). Na zvýšeném příjmu glukózy jsou založeny i některé zobrazovací techniky využívající radioaktivně značenou glukózu. Čím je ovšem glykolýza pro nádorové buňky takovou výhodou? Jednak umožňuje využití hojně se vyskytující živiny k produkci ATP, a ačkoliv je výtěžek ATP v porovnání s oxidativní fosforylací nízký, při dostatečném přísunu glukózy může množství ATP produkované glykolýzou překonat množství vytvářené oxidativní fosforylací (Guppy et al., 1993; Pfeiffer et al., 2001). Dále také degradace glukózy zásobuje buňku prekuzory pro biosyntézu nukleotidů, lipidů, cholesterolu, isoprenoidů, neesenciálních aminokyselin atd. Sekrece kyseliny mléčné jako konečného produktu glykolýzy a s tím související snižování pH okolního prostředí má také svůj význam – usnadňuje šíření nádoru a potlačuje imunitní reakci. U nádorových buněk, které jsou pod neustálým proliferačním tlakem onkogenů, dochází inhibicí klíčových enzymů glykolytických či biosyntetických drah k nezvladatelnému metabolickému stresu vedoucímu k úmrtí buněk. Příkladem mohou být inhibitory ATP-citrátlyasy (syntéza acetyl-CoA z citrátu při biosyntéze lipidů; Bauer et al., 2005), laktátdehydrogenasy A (konverze pyruvátu na laktát v posledním kroku

glykolýzy; Fantin et al., 2006) či synthasy mastných kyselin (syntéza palmitátu z acetyl CoA a malonyl-CoA; Wang et al., 2005). Jedním z dalších přístupů je zablokování transportu glukózy do buněk např. pomocí 2-deoxyglukózy, která má radiosenzitizující a chemosenzitizující účinky (Simons et al., 2007).

Oxidativní stres

Oxidativní stres je charakterizován přítomností reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), jejichž produkce je v nádorových buňkách zvýšena (Szatrowski et Nathan, 1991). K tvorbě ROS přispívají onkogenní signální dráhy jako např. Ras (Lee et al., 1999). ROS jsou vysoce reaktivní a přispívají ke zvýšené míře poškození DNA, proteinů, lipidů a dalších buněčných komponent. Nádorové buňky zmírňují tento stres navozením glykolýzy a snížením funkce mitochondrií (Gogvadze et al., 2008). ROS jsou také významní signální přenašeči. Aktivují např. transkripční faktor HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1) při hypoxii (Dewhirst et al., 2008), který je zodpovědný za odklon od oxidativní fosforylace ke glykolýze a navození angiogeneze, jevy často pozorované v nádorech. Látky indukující tvorbu ROS přispívají v nádorových buňkách k již do značné míry zvýšenému oxidativnímu stresu, který se pro ně poté stává letálním. Dichloroacetát inhibuje pyruvátdehydrogenasukinasu (PDK), stimuluje mitochondriální oxidativní fosforylaci a tedy i tvorbu ROS a selektivně vyvolává apoptosu v nádorových buňkách (Bonnet et al., 2007).

Modulace imunitní odpovědi

Nádorové buňky často exprimují mutantní formy antigenů s novými epitopy, které mohou potenciálně vyvolat imunitní odpověď. Nádory se ovšem imunitnímu systému efektivně brání několika způsoby. Některé redukují expresi komplexu MHC (major histocompatibility complex) zodpovědných za prezentaci antigenů na povrchu buňky (Garrido et Algarra, 2001), jiné zase syntetizují a uvolňují řadu imunomodulačních molekul jako chemokiny (např. CCL2), cytokiny (např. IL6, IL10) a prostaglandiny (např. PGE2) pro potlačení aktivity T-buněk (Sharma et al., 2005). Inhibitor cyklooxygenasy-2 (COX2) celecoxib blokuje syntézu PGE2 a zlepšuje tak v myších modelech imunitní reakci na nádor (Stolina et al., 2000). Reaktivace genů MHC u buněk se sníženou expresí těchto komplexů je jeden z dalších příkladů zvýšení imunitní odpovědi. Atraktivita této metody spočívá hlavně v její použitelnosti na širokém spektru nádorů a také v možnosti vymýcení nádoru v relativně brzkém stadiu vývoje.

Hypoxie, nutriční stres a angiogeneze

Solidní nádory díky své nedokonalé nádorové vaskulatuře často trpí nedostatečným příjmem kyslíku a živin. Nádorové buňky reagují na tento stres zvýšenou tvorbou transkripčního faktoru HIF-1 (Pouyssegur et al., 2006), který podporuje indukci angiogenních signálních molekul (VEGF-A, angiotensin-2) a navozuje glykolýzu indukci glukózového transportéru 1, hexokinasy,

laktátdehydrogenasy nebo pyruvátdehydrogenasykinasy 1 (PDK1). Navíc HIF-1 chrání buňky před laktátem vyvolanou acidózou indukcí monokarboxylátového transportéru MCT4 (přenos laktátu přes membránu), karbonátdehydratasy (usnadňuje transport laktátu přes membránu) a Na^+/H^+ antiportéru NHR1 (úprava pH). Látky inhibující HIF-1 nebo některou z podřízených komponent této signální dráhy senzitivizují buňky k hypoxickému stresu. Inhibice monokarboxylátového transportéru vedoucí k akumulaci laktátu v buňce a acidóze je jedním z přístupů pro selektivní likvidaci nádorových buněk závislých na glykolýze (Pouyssegur et al., 2006).

Nádorová vaskulatura se vytváří v okamžiku, kdy rozvíjející se nádor dosáhne kritického průměru (do 2 mm) a pro další růst již zásobení kyslíkem a živinami z okolních tkání difúzí není dostačující (Folkman, 1971). Buňky uvnitř nádoru začínají v tuto chvíli trpět hypoxií, která spouští uvolňování angiogenních faktorů difundujících do okolních tkání. Endoteliální buňky krevních cév nacházející se v blízkosti nádoru reagují na koncentrační gradient angiogenních faktorů dělením a migrací směrem k nádoru (Ausprunk et Folkman, 1977; Sholley et al., 1984). Mimo svou funkci zásobování kyslíkem a živinami se nádorové cévy také stávají cestou pro šíření nádorových buněk po organismu. Pro svůj nesporný význam při růstu, rozvoji a šíření nádoru se nádorová vaskulatura stala jedním z dalších terapeutických cílů (Folkman, 2007). Jedním z klíčových signálních molekul a aktivátorů angiogeneze jak ve zdravých, tak v nádorových tkáních je VEGF (vascular endothelial growth factor; Ferrara et al., 2003), který se stal jedním z prvních cílů anti-angiogenních látek. Počáteční experimenty na myších xenograftech vedly k objevu monoklonální, VEGF-neutralizující protilátky redukující angiogenezi a růst nádoru (Kim et al., 1993). Humanizovaná anti-VEGF monoklonální protilátka (bevacizumab) se poté stala první anti-angiogenní látkou používanou v klinické praxi a to v kombinaci se standardními typy léčby u pacientů s metastatickou rakovinou tlustého střeva (Hurwitz et al., 2004), nemalobuněčným karcinomem plic (Sandler et al., 2006) a metastazující rakovinou prsu (Miller et al., 2007). Od té doby byla vyvinuta řada nových inhibitorů VEGF, popř. VEGF receptorů (sorafenib, sunitinib, axitinib atd.), které jsou nyní v různých fázích klinického vývoje (Shojaei, 2012).

Matrixové metaloproteiny (MMP) byly původně identifikovány jako hlavní proteasy zodpovědné za degradaci různých složek extracelulární matrix (ECM), avšak jejich funkce jsou mnohem komplexnější. Cílem protinádorového výzkumu se staly převážně pro svoji účast v nádorové angiogenezi a metastazování. Příkladem může být MMP-9 zprostředkovávající uvolnění VEGF (Bergers et al., 2000). Řada studií potvrdila souvislost mezi zvýšenou aktivitou některých MMP a vyšší tumorigenitou, invazivitou a metastazováním nádoru a jejich inhibice tedy může vést k poklesu tumorigenicity a v některých případech i k inhibici metastazování (Deryugina et Quigley, 2006).

Stromální podpora

Nádorové buňky jsou obklopeny mikroprostředím tvořeným extracelulární matrix a různými typy buněk podle tkáně, ve které se nádor nachází (epiteliální, endoteliální, fibroblasty, myofibroblasty, leukocyty). Toto mikroprostředí se dramaticky mění během růstu a vývoje nádoru a je charakteristické rostoucím počtem fibroblastů a myofibroblastů, infiltrací lymfocytů, angiogenezí a remodelováním ECM. Různé typy interakcí mezi nádorovými buňkami a okolními stromálními buňkami vedou k fenotypovým změnám stromatu nádoru, který se poté stává lepší podporou pro rostoucí nádor (Hu et Polyak, 2008). Příkladem mohou být myofibroblasty v okolí prsního karcinomu, které se liší od normálních prsních stromálních fibroblastů ve schopnosti sekrece chemokinu SDF1 (stromal-derived factor 1) stimulujícího růst nádoru a vazbou endoteliálních progenitorových buněk pro angiogenezi (Orimo et al., 2005). Tento odlišný fenotyp může být založen na změnách genové exprese a epigenetických změnách pozorovaných ve stromálních buňkách asociovaných s rakovinou (Allen et Louise Jones, 2011). Dále např. hematopoetické progenitorové buňky v kostní dřeni exprimující VEGFR1 (vascular endothelial growth factor receptor 1) vytváří na vzdálených místech těla pro nádor specifická, pre-metastatická místa ještě před příchodem vlastních nádorových buněk a usnadňují jim zde zahájení. Inhibice funkce VEGFR1 pomocí protilátek či odstranění VEGFR1 pozitivních buněk z kostní dřene na myších modelech zabránilo formování těchto pre-metastatických klastrů a tím i nádorovému metastazování (Kaplan et al., 2005).

2.3 CDK terčem cílených protinádorových léčiv

2.3.1 CDK a jejich role v regulaci buněčného cyklu a transkripci

Cyklin-dependentní kinasy (CDK) jsou specifické serin/threoninové proteinkinasy, které hrají klíčovou roli v regulaci buněčného cyklu, transkripci, diferenciaci a apoptóze (Malumbres et Barbacid, 2005). Pro jejich aktivitu je nutná asociace s cykliny. Na základě sekvenčních analýz je zatím známo 21 genů kódujících CDK a dalších 5 genů kódujících vzdálenější skupinu proteinů zvanou CDK-like kinasy (CDKL; Malumbres et al, 2009). Podobně bylo na základě analýzy lidského genomu odhaleno 29 genů cyklinů (Malumbres et Barbacid, 2005). Současná navržená nomenklatura CDK zahrnuje 20 klasických CDK označovaných CDK1-20 a 5 CDKL (CDKL1-5) a nahrazuje tak některé jejich starší názvy (Malumbres et al, 2009).

Průběh G1 fáze je regulován komplexním mechanismem zahrnujícím minimálně 3 CDK: CDK4, CDK6, CDK2 a jejich regulátory (Sherr et Roberts, 1999; Malumbres et Barbacid, 2001). Mitogenní signály indukují nejprve syntézu cyklinů typu D a pravděpodobně i transport CDK4 a 6 do jádra. Aktivní komplexy CDK4/6 s cykliny typu D poté fosforylují členy rodiny retinoblastomového proteinu (Rb) zahrnující pRb, p107 a p130. Tyto proteiny obsahují řadu vazebných míst pro CDK (pRb jich má např. 16), z nichž pouze některá jsou rozpoznávána komplexy CDK4/6 s cykliny D. *In vitro* studie neodhalily žádné významné rozdíly ve strukturách CDK4 a 6 ani mezi cykliny D, je tedy pravděpodobné, že jednotlivé molekuly jsou významné spíše z hlediska tkáňové specifity a rozdílné aktivace během vývoje organismu (Ciemerych et Sicinski, 2005). Fosforylaci proteinů rodiny Rb dochází k uvolnění vázaných transkripčních faktorů z rodiny E2F, histondeacetylasy a komplexů remodelujících chromatin (Cobrinik, 2005). Mezi substráty E2F se řadí i cykliny typu E, které jsou vyžadovány pro aktivaci CDK2 a dokončení G1 fáze. Ačkoliv je prvotní fosforylace Rb proteinů zprostředkována komplexy CDK4/6 s cykliny D, jejich ireverzibilní inaktivace je uskutečněna až komplexem CDK2/cyklin E. V tomto tzv. restričním bodu přestávají být buňky závislé na přítomnosti mitogenních signálů a dokončují buněčný cyklus i při jejich absenci (Malumbres et Barbacid, 2001). Kinasa CDK3 je strukturně příbuzná CDK2 a CDK1, interaguje s cykliny typu E, A a C a pravděpodobně se účastní fosforylace Rb proteinů na přechodu G0/G1 ještě před fosforylací CDK4/6 v komplexu s cykliny D (Ren et Rollins, 2004).

Komplex CDK2/cyklin E kromě fosforylace proteinů Rb umožňuje vazbu proteinového komplexu MCM (minichromosome maintenance) na DNA v místech začátku replikace a je tedy zodpovědný za zahájení replikace DNA. Jakmile dojde k zahájení replikace, je cyklin E rychle ubiquitinylován a degradován proteasomem, aby se zabránilo re-replikaci DNA (Hwang et Clurman, 2005). Mezi další substráty CDK2/cyklin E patří proteiny účastnící se modifikace histonu, opravy DNA nebo duplikace a maturace centrosomu. Kromě toho tento komplex fosforyluje svůj vlastní inhibitor p27^{Kip1} a zprostředkovává tak jeho degradaci proteasomem (Hwang et Clurman, 2005).

Inhibice Rb proteinů vede také k transkripci genů cyklinů A a B nezbytných pro další fáze buněčného cyklu. Po degradaci cyklinu E interaguje CDK2 s nově syntetizovanými cykliny typu A. Substráty tohoto komplexu zahrnují převážně proteiny nezbytné pro ukončení replikace DNA a opuštění S-fáze včetně proteinů, které jsou součástí kontrolních bodů buněčného cyklu (p53, p21^{Cip1}, MDM2; Sherr et Roberts, 1999).

Na konci S-fáze dochází k asociaci cyklinů A s CDK1. Oba přítomné komplexy CDK1/cyklin A i CDK2/cyklin A fosforylují některé stejné substráty jako jsou proteiny účastníci se replikace DNA, progresu buněčného cyklu či jeho kontroly. Rozdíly v jejich úloze na přechodu S/G2-fáze jsou prozatím nejasné. Během G2 fáze je cyklin A degradován ubiquitylací zprostředkovanou proteolýzou a naopak aktivně syntetizovány jsou cykliny typu B. Aktivací komplexů CDK1 a cyklinů B je zahájena mitóza. Tyto komplexy regulují řadu procesů jak na přechodu G2/M-fáze, tak v průběhu mitózy a fosforylují více než 70 proteinů (Ubersax et al., 2003). Cykliny typu B zahrnují 3 členy: B1, B2 a B3. Cykliny B1 a B2 jsou exprimovány ve většině proliferujících buněk a liší se svou nitrobuněčnou lokalizací. Cyklin B1 je asociován s mikrotubuly a v komplexu s CDK1 zahajuje rozpad jaderné membrány během mitózy, kondenzaci chromozomů a utváření mitotického vřeténka. Cyklin B2 je asociován s intracelulárními membránami a spolu s CDK1 se v průběhu mitózy podílí na reorganizaci Golgiho aparátu (Draviam et al., 2001). Cyklin B3 sdílí vlastnosti jak cyklinů typu B, tak i typu A, lokalizován je v jádře, asociuje s CDK2 a jeho exprese je omezena na varlata a fetální vaječníky (Gallant et Nigg, 1994; Nguyen et al., 2002). Na závěr buněčného dělení jsou cykliny typu B ubiquitylovány APC/C komplexem a následně degradovány proteasomem (Harper et al., 2002).

CDK7-11 se podílí na regulaci transkripce a v některých případech zároveň i na řízení buněčného cyklu. Typickou proteinkinaseou vykazující obě zmiňované funkce je CDK7. Tato molekula je součástí CDK-aktivující kinasy (CAK), která fosforyluje a tím i aktivuje všechny CDK účastníci se regulace buněčného cyklu a navíc vytváří spolu s dalšími podjednotkami obecný transkripční faktor TFIIF (Lolli et Johnson, 2005) a fosforyluje C-terminální domény (CTD) velké podjednotky RNA polymerasy II. Mezi CDK regulující transkripci patří CDK9 v komplexu s cykliny typu T a cyklinem K, které jsou součástí komplexu pozitivního transkripčního elongačního faktoru P-TEFb a podílí se na fosforylaci C-terminální domény (CTD) velké podjednotky RNA polymerasy II (Garriga et Graña, 2004). CTD RNA polymerasy II je fosforylována i CDK8 s cyklinem C, které jsou součástí holoenzymu RNA polymerasy II. Kromě toho se CDK8/cyklin C podílí na fosforylaci cyklinu H vedoucí k inhibici aktivity CAK (Akoulitchiev et al., 2000). CDK10 také reguluje transkripci vybraných genů vazbou transkripčního faktoru Ets2, regulátora exprese CDK1 a navíc se podílí na regulaci G2/M-fáze buněčného cyklu (Kasten et Giordano, 2001). Další CDK regulující transkripci je i CDK11 s cyklinem L (Loyer et al., 2005). CDK5 je aktivována proteiny p35, p39, které jsou exprimovány téměř výlučně v mozku, fosforyluje celou řadu substrátů a její funkce je zvláště významná pro správný vývoj a funkci centrální nervové soustavy (Cruz et Tsai, 2004). Role zbylých CDK nejsou prozatím dostatečně prozkoumány.

2.3.2 Vzájemná kompenzace CDK

Přítomnost různých typů CDK a cyklinů u vyšších eukaryotických buněk vedla k domněnce, že pro každý komplex CDK/cyklin je charakteristická specifická funkce v rámci určité fáze buněčného cyklu. Experimenty využívající vyřazení genů CDK a cyklinů v myších modelech však ukázaly značnou míru redundance. Myši postrádající některý z typů cyklinů D jsou životaschopné, vyvíjí se normálně, ale vykazují určité tkáňově specifické abnormality (Fantl et al., 1995). Vyřazení dvou nebo všech tří typů cyklinů D má za následek předčasnou smrt myši převážně z důvodů proliferčních defektů hematopoetických buněk a buněk srdeční svaloviny (Kozar et al., 2004). Genetické nahrazení chybějícího cyklinu D1 cyklinem E1 zvrátilo fenotyp D1-knockoutovaných myši a vedlo tak k závěru, že cykliny typu E jsou pravděpodobně primárním kompenzačním mechanismem chybějících cyklinů D (Geng et al., 1999). Podobně je tomu i u myši postrádajících jeden z typů cyklinu E, i v tomto případě zde dochází ke vzájemné kompenzaci a takové myši jsou životaschopné a vyvíjejí se normálně (Geng et al., 2003). V případě delece obou cyklinů E1 i E2 dochází k jejich funkční substituci cykliny typu A a D. Cykliny typu E tedy nehrají klíčovou úlohu pro proliferaci, ačkoliv některé typy tkání jako např. placenta jsou na nich závislé a jejich defekty jsou poté příčinou předčasného úmrtí embryí (Geng et al., 2003; Parisi et al., 2003). V současné době jsou známy dva typy cyklinů A: A1 a A2. A1-deficientní myši jsou životaschopné a vyvíjí se normálně narozdíl od myši s delecí cyklinu A2, které umírají v časných stadiích embryonálního vývoje (Murphy et al., 1997; Liu et al., 1998). Cykliny typu B zahrnují 3 členy: B1, B2 a B3. Delece cyklinu B1 vede k brzkému úmrtí embrya, ačkoliv přesná příčina embryonální letality není známa (Brandeis et al., 1998). Naopak cyklin B2-knockoutované myši jsou životaschopné a bez růstových abnormalit pravděpodobně z důvodu úplné kompenzace cyklinem B1 (Brandeis et al., 1998). Cyklin B3-deficientní myši nebyly doposud připraveny a tudíž je přesná funkce a kompenzace cyklinu B3 zatím otázkou.

Ztráta CDK má podobný efekt jako knockout celé rodiny cyklinů. Myši postrádající CDK4 nebo CDK6 jsou životaschopné a vykazují defekty ve stejných tkáních a orgánech jako myši bez cyklinů typu D (Tsutsui et al., 1999; Malumbres et al., 2004). Tyto experimenty naznačují vzájemnou kompenzaci mezi CDK4 a CDK6. Myši postrádající jak CDK4, tak CDK6 umírají v pozdním stadiu embryogeneze vlivem vážné anémie, ačkoliv organogeneze embrya i proliferace většiny buněčných typů probíhá normálně pravděpodobně zastoupením CDK1 a CDK2 (Malumbres et al., 2004). Delece CDK2 v buněčných kulturách vede k bloku buněčného cyklu v G1 fázi (van den Heuvel et Harlow, 1993). Z tohoto důvodu se předpokládalo, že pro přechod G1/S je CDK2 nezbytnou podmínkou. Překvapením potom byly CDK2-deficientní myši, které byly plně životaschopné (Berthet et al., 2003; Ortega et al., 2003). Později byla demonstrována kompenzace chybějící funkce CDK2 pomocí CDK1/cyklin E navozující přechod G1/S (Aleem et al., 2005) a v některých typech buněk i pomocí jiných typů CDK jako např. CDK4 v neurálních progenitorových buňkách (Jablonska et al., 2007). CDK1 je pravděpodobně jedinou CDK, která je pro regulaci buněčného cyklu nezbytná. CDK1-

deficientní myši umírají v raných stádiích embryonálního vývoje (Santamaría et al., 2007). Navíc je CDK1 univerzální CDK schopná nahradit funkce všech interfázních CDK (CDK2, 3, 4 a 6) (Santamaría et al., 2007).

2.3.3 Deregulace CDK v rakovině

V rakovině je deregulace CDK častým úkazem. Např. CDK1 má svůj diagnostický význam v rakovině jícnu (Hansel et al., 2005) či prsu (Kim et al., 2008; Nakayama et al., 2009), sledování exprese/aktivity CDK2 našlo také své využití v prognóze rakoviny prsu (Kim et al., 2008), vaječníků (Marone et al., 1998) nebo dutiny ústní (Mihara et al., 2001). Nadměrná exprese CDK4 byla pozorována v malém procentu melanomů (Wolfel et al., 1995), v rakovině vaječníků (Kusume et al., 1999), močového měchýře (Simon et al., 2002), endometria (Semczuk et al., 2004) i dutiny ústní (Poomsawat et al., 2010). Zvýšená aktivita CDK6 byla také nalezena v rakovině dutiny ústní (Poomsawat et al., 2010) a v některých typech leukémií a lymfomů (Hayette et al., 2003; Corcoran et al., 1999). Polymorfismy CDK7 se ukázaly být významným aspektem rakoviny prsu (Jeon et al., 2010), v rakovině plic byla nalezena deregulace CDK5 (Choi et al., 2009; Liu et al., 2011).

Ačkoliv je zvýšená aktivita CDK pozorována v řadě případů rakovin, mutace v genech CDK jsou poměrně vzácné. Jednu z výjimek tvoří bodové mutace v genech CDK4 v určitých případech melanomů, které způsobují ztrátu citlivosti CDK4 vůči svým přirozeným inhibitorům INK4A/B (Wolfel et al., 1995), nebo translokace způsobující zvýšenou expresi CDK6 v chronické lymfocytické leukémii nebo některých typech lymfomů (Hayette et al., 2003; Corcoran et al., 1999). Mutace v genech CDK1 a CDK2 nebyly zatím pozorovány. Zvýšená aktivita CDK ve většině lidských nádorových onemocnění obvykle vzniká jako následek změn v aktivitě regulátorů CDK (Ortega et al., 2002; Lapenna et Giordano, 2009). Často se jedná o inaktivaci endogenních inhibitorů z rodin INK4 a Cip/Kip vlivem bodových mutací, delecí nebo epigenetických umlčení nebo naopak o zvýšenou expresi cyklinů či CDK-aktivujících fosfatasy Cdc25. V řadě typů rakovin je nadměrná aktivace CDK důsledkem ztráty aktivity nádorového supresoru pRb.

2.3.4 Nízkomolekulární inhibitory CDK

Význam CDK v regulaci buněčného cyklu a jejich častá zvýšená aktivita vedla k myšlence vyvinout inhibitory CDK jako protinádorová léčiva. Řada selektivních, nízkomolekulárních inhibitorů CDK byla vyvinuta pomocí různých přístupů během posledních 20 let a přibližně 24 látek je v současnosti v různých fázích klinického testování. Navzdory značné chemické diverzitě tvoří většinu inhibitorů CDK nízkomolekulární, ploché, hydrofobní, heterocyklické molekuly, které kompetují s ATP v aktivním místě kinasy. Vývoj těchto látek často čerpal inspiraci v přírodních látkách.

Flavopiridol, semisyntetický analog alkaloidu rohitukinu, se stal prvním inhibitorem CDK, který vstoupil do klinického testování pod názvem alvocidib a nyní se nachází ve fázích I a II pro léčbu různých typů nádorových onemocnění. Inhibitor ZK304709 svou strukturou zase nápadně připomíná přírodní indigoidní barvivo indirubin. Od rostlinných hormonů cytokininů se odvíjel výzkum purinových inhibitorů CDK. Purinový skelet byl vůbec prvním strukturním motivem systematicky modifikovaným za účelem nalezení účinných CDK inhibitorů, který vedl k objevům známého olomoucínu a roskovitinu (Vesely et al., 1994; Havlíček et al., 1997; Meijer et al., 1997) následovaných syntézou purvalanolů (Gray et al., 1998; Chang et al., 1999), olomoucínu II (Krystof et al., 2005) či různých biarylových derivátů jako CR8, DRF053 atd. (Bettayeb et al., 2008; Oumata et al., 2008; Trova et al., 2009a; Trova et al., 2009b). Různými obměnami v počtu a polohách atomů dusíku v purinovém jádře byly dále připraveny syntetické inhibitory pyrazolo[1,5-a]pyrimidiny, pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny nebo pyrazolo[1,5-a]pyridiny atd. (Jorda et al., 2012). Pyrazolo[1,5-a]pyrimidin dinaciclib dokonce vstoupil do III. fáze klinických testů pro léčbu chronické lymfocytické leukémie (www.clinicaltrials.gov). Všechny účinné purinové a jim příbuzné CDK inhibitory obsahují aromatický kruh připojený k purinovému skeletu přes aminoskupinu na pozici C6 jako jsou benzylamino- nebo fenylaminoskupina, které se vážou do hydrofobní kapsy blízko aktivního místa CDK a zajišťují tak selektivitu a dále formují nezbytné vodíkové vazby s karbonylem Leu83 u CDK2 popř. s korespondujícími residui u jiných CDK.

Cytostatický efekt inhibitorů CDK je primárně dán inhibicí těch CDK, které se podílejí na regulaci buněčného cyklu, tedy CDK1, CDK2, CDK4 a CDK6. Typická je pro ně schopnost indukovat defosforylace příslušných substrátů CDK v závislosti na selektivitě inhibitoru a tím také navozovat blok buněčného cyklu na přechodu G1/S-fáze, v S-fázi nebo na přechodu G2/M-fáze. Příkladem může být pyridopyrimidinový derivát PD0332991 selektivní vůči CDK4 a CDK6 a indukující tedy pouze G1/S blok buněčného cyklu. Jeho antiproliferační schopnost je ovšem omezena pouze na nádorové buňky exprimující funkční pRb, buňky s nefunkční, mutantní formou pRb jsou výrazně méně citlivé (Fry et al., 2004; Baughn et al., 2006). Většina používaných CDK inhibitorů je však méně selektivní a jejich cílem nemusí být tedy pouze CDK účastníci se regulace buněčného cyklu, ale i transkripční CDK7 a CDK9. Některé experimenty potvrdily zvláštní význam inhibice CDK9 v nádorových buňkách (Demidenko et al., 2004; MacCallum et al., 2005; Raje et al., 2005; Byth et al., 2006; Cai et al., 2006). Bylo prokázáno, že simultánní inhibice CDK9 s některou z CDK regulující buněčný cyklus vyvolává nejen zastavení buněčného cyklu, ale i masivní apoptózu (Cai et al., 2006). Následky této simultánní deplece kinas se podobají efektům pan-selektivních CDK inhibitorů jako jsou flavopiridol, roskovitin či SNS-032. Některé inhibitory CDK nacházející se v klinickém testování mají kromě CDK i další proteinkinasové cíle. Např. aminopyrazolový derivát AT7519 interaguje nejenom s různými CDK, ale i s GSK3- β , čímž dále zvyšuje svůj antiproliferační potenciál (Squires et al., 2009). Dobře známý, pan-selektivní CDK inhibitor roskovitin je schopen inhibovat kromě CDK také MAPkinasy a pyridoxalkinasu a zvyšovat tak protinádorový účinek. VEGFR a PDGFR tyrosinkinasy patří k cílům

dalšího, méně selektivního CDK inhibitoru ZK 304709. Z tohoto důvodu tedy nejsou překvapením jeho anti-angiogenní a anti-metastatické efekty (Siemeister et al., 2006). Některé další inhibitory CDK jako flavopiridol či SNS-032 také limitují proces angiogeneze prostřednictvím inhibice produkce angiogenních faktorů VEGF (Melillo et al., 1999; Ali et al., 2007). Přesný mechanismus anti-angiogenních účinků není zcela jasný, ale vzhledem k inhibici kinas se pravděpodobně jedná o inhibici syntézy VEGF mRNA jako nepřímý následek inhibice transkripční CDK9. Nižší selektivita je sice obvykle doprovázena zvýšeným antiproliferačním potenciálem, na druhou stranu však přináší i určité riziko přítomnosti dalších, neočekávaných molekulárních cílů, které znesnadňují charakterizaci mechanismů účinku i predikci chování v *in vivo* testech včetně vedlejších účinků. Přehled vybraných inhibitorů CDK v klinických testech podává **Tabulka 1**.

2.3.5 Guanidinopurinové deriváty jako inhibitory CDK

Látky obsahující guanidinoskupinu jako např. aminokyseliny jsou široce rozšířené v různých biologických systémech a vykazují celé spektrum biologických aktivit (Berlinck et Kossuga, 2005). Schopnost guanidinoskupiny formovat silné, nekovalentní interakce v aktivních místech enzymů hraje klíčovou roli pro jejich biologické efekty. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli vytvořit sérii 2,9-disubstituovaných-6-guanidinopurinů odvozených od struktury olomoucinu nebo roskovitinu a studovat vliv zavedení guanidinoskupiny na CDK-inhibiční a antiproliferační vlastnosti v porovnání s roskovitinem.

Tabulka 1. Přehled vybraných inhibitorů CDK v klinických testech (zdroj www.clinicaltrials.gov)

CDK Inhibitor	Cílená CDK	Onemocnění	Fáze klinického testování
AT-7519	CDK1, CDK2, CDK4, CDK5, CDK6, CDK9	mnohočetný myelom non-Hodgkinův lymfom chronická lymfocytická leukémie	I/II
BAY 1000394	CDK1, CDK2, CDK7, CDK9	malobuněčný plicní karcinom, poročílé solidní nádory	I/II
flavopiridol (alvocidib)	CDK2, CDK4, CDK6, CDK9	hematologické malignity	I/II
LEE011	CDK4, CDK6	pokročilé solidní nádory, lymfomy	I
P1446A-05	CDK4	pokročilé solidní nádory hematologické malignity	I
P-276-00	CDK1, CDK4, CDK9	rakovina slinivky, karcinomy hlavy a krku, prsni karcinom, melanom, lymfomy, mnohočetný myelom	I/II
PD-0332991	CDK4, CDK6	lymfomy, karcinom tlustého střeva, hepatocelulární karcinom, hematologické malignity, sarkomy, glioblastom atd.	I/II
PHA-848125 (milciclib)	CDK1, CDK2, CDK4	karcinom brzlíku, pokročilé solidní nádory	I/II
R547	CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, CDK7, CDK9	pokročilé solidní nádory	I
RGB-286638	CDK1, CDK2, CDK4, CDK5, CDK7, CDK9	hematologické malignity	I
roskovitin (seliciclib)	CDK1, CDK2, CDK5, CDK7, CDK9	pokročilé solidní nádory, nemalobuněčný karcinom plic	I II (ukončeno)
SCH-727965 (dinaciclib)	CDK1, CDK2, CDK5, CDK9	lymfomy, melanomy, prsní karcinom, leukémie, mnohočetný myelom	I/II/III
SNS-032	CDK2, CDK7, CDK9	pokročilé solidní nádory, chronická lymfocytická leukémie, mnohočetný myelom	I
TG02	CDK1, CDK2, CDK7, CDK9	hematologické malignity	I

2.2 Flavonoidy

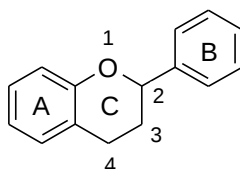
2.2.1 Výskyt a význam flavonoidů

Flavonoidy (z latinského *flavus* – žlutý) zahrnují skupinu polyfenolických látek běžně se vyskytující jako sekundární metabolity v rostlinách s různými fyziologickými funkcemi jako je ochrana před fotosyntetickým stresem, UV zářením, volnými radikály či herbivory. Původně byly flavonoidy identifikované jako pigmenty zodpovědné za různé odstíny žluté, oranžové a červené v květech, plodech či podzimem zbarvených listech (Timberlake et Henry, 1986; Brouillard et Cheminant, 1988). Vysoký obsah flavonoidů lze nalézt v ovoci, zelenině, obilí, semenech, ořechách, květech atd., známá je jejich přítomnost v citrusových plodech, čaji a červeném víně (Manach et al., 2004). Příjem flavonoidů v lidské stravě byl již předmětem řady výzkumů v různých zemích a bývá odhadován na desítky až stovky mg/den (Chun et al., 2007; Ilow et al., 2012). Celkové množství i zastoupení jednotlivých skupin flavonoidů je samozřejmě ovlivněno stravovacími návyky jednotlivých kultur.

Všudypřítomnost flavonoidů v lidské stravě i v různých léčivých rostlinách využívaných v tradiční medicíně vedla k důkladnému zkoumání jejich biologické aktivity. Mezi významné efekty patří antioxidační, protizánětlivé, hepatoprotektivní účinky, známá je jejich úloha v prevenci kardiovaskulárních chorob a nádorových onemocnění, prokázány byly také jejich účinky antivirální, antidiabetické, při hojení ran atd. (Middleton et al., 2000; Havsteen, 2002).

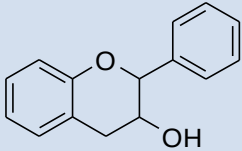
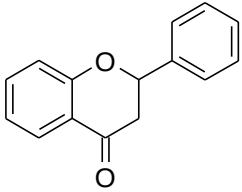
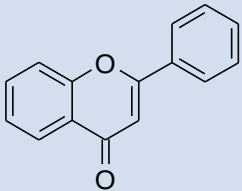
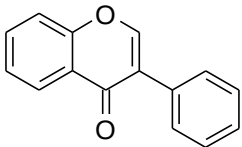
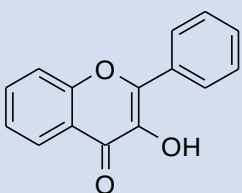
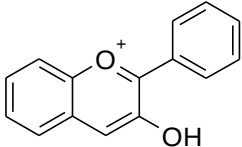
2.2.2 Struktura

Ze strukturního hlediska jsou flavonoidy nízkomolekulární látky, jejichž základem jsou dva aromatické cykly (A a B) propojené O-heterocyklem (**Obrázek 1**). Další dělení do skupin je založeno na přítomnosti oxoskupiny na pozici 4, dvojité vazby mezi atomy uhlíku 2 a 3 C kruhu a na přítomnosti hydroxylových skupin. Přehled nejvýznamnějších skupin flavonoidů, jejich zástupců a nejčastější výskyt v potravinách je znázorněn v **Tabulce 2**.



Obrázek 1: Obecná struktura flavonoidů

Tabulka 2. Přehled nejběžnějších skupin flavonoidů a jejich zástupců

skupina	schéma struktury	zástupci	zdroj
flavan-3-oly		katechin epikatechin gallokatechin epigallokatechin epikatechin-3-gallát epigallokatechin-3-gallát	čaje červené víno červený grep jablka kakao
flavanony		naringenin hesperetin eriodyctiol silybin	citrusy
flavony		apigenin luteolin (eupatorin)	petržel, tymián
isoflavony		genistein daidzein glycitein biochanin A	sójové boby zelenina
flavonoly		kaempferol myricetin quercetin	jablka, brokolice, rajčata, kapusta, bobule, čaj, červené víno
antocyanidiny		cyanidin delphinidin malvidin petunidin pelargonin	červené, modré, fialové bobule

2.2.3 Biologická dostupnost a metabolismus flavonoidů

Je důležité si uvědomit, že ačkoliv patří flavonoidy k běžným látkám v lidské stravě, nepatří mezi biologicky nejaktivnější. Nízká aktivita je způsobena jednak špatnou absorpcí ve střevě, vysokou mírou metabolizace a rychlou eliminací z těla. Biologická dostupnost flavonoidů značně kolísá v závislosti na typu flavonoidu, jeho formě, dalších přítomných látkách a nezanedbatelný význam má také variabilita v rámci lidské populace. Někteří lidé mohou mít odlišné hladiny metabolizujících enzymů či transportérů ovlivňujících absorpci flavonoidů. Koncentrace všech metabolitů flavonoidu v krevní plasmě se po příjmu 50 mg aglykonu pohybuje v rozmezí 0 – 4 μM . Nejlépe absorbované jsou isoflavony, katechiny, flavanony a glukosidy quercetinu. Naopak mezi nejhůře přijímané flavonoidy patří antocyanidiny a galloylované čajové katechiny (Manach et al., 2005). Při podání vysoké dávky flavonoidu intravenózně pro terapeutické účely však koncentrace flavonoidu může dosáhnout i více než 100 μM (Ferry et al., 1996).

Flavonoly, isoflavony, flavony a anthocyanidiny jsou ve stravě přítomny většinou ve formě glykosidů, které jsou hydrolyzovány v tenkém střevě příslušnými glykosidasami nebo střevní mikroflorou v tlustém střevě. V případě hydrolyzy střevní mikroflorou je ovšem efektivita absorpce flavonoidů snížena v důsledku degradace aglykonů na jednoduché aromatické kyseliny bakteriálními enzymy. Během absorpce jsou aglykony v buňkách tenkého střeva a později i v játrech metabolicky upravovány methylací, sulfatací a glukuronidací, tedy procesy, které jsou součástí běžných detoxifikačních procesů společných mnoha xenobiotikům a usnadňujících jejich eliminaci z těla. Biologická aktivita těchto metabolitů může být odlišná od původních flavonoidů (Williamson et al., 2005a). V krvi se konjugované deriváty extenzivně vážou na albumin. Flavonoidy jsou z těla eliminovány převážně močí a žlučí. Žlučové cesty přivádí metabolizované flavonoidy do dvanácterníku, kde jsou podrobeny účinkům bakteriálních enzymů, zvláště β -glukuronidasy, a mohou být poté reabsorbovány. Tato recyklace může vést k prodloužení přítomnosti flavonoidů v těle (Scalbert et Williamson, 2000; Manach et al., 2004; Manach et al., 2005).

2.2.4 Flavonoidy jako nízkomolekulární inhibitory procesu karcinogeneze

Pravděpodobně nejlépe popsanou vlastností společnou prakticky celé skupině flavonoidů jsou jejich antioxidační účinky (RiceEvans et al., 1996), a u některých z nich (quercetin, katechin, epikatechin) byly dokonce prokázány silnější antioxidační účinky než u vitamínu C *in vitro* (Kim et al., 2002). Flavonoidy mají schopnost jak přímo zhaset ROS, tak i inhibovat enzymy zapojené v různých oxidačních procesech jako je xanthinoxidasa (Lin et al., 2000) či NADPHoxidasa (Chow et al., 2007) nebo naopak zvyšovat aktivitu antioxidačních enzymů jako katalasa, superoxiddismutasa,

glutathionperoxidasa či glutathionreduktasa (Rajendran et al., 2008). Tímto způsobem flavonoidy fungují jako významné chemopreventivní látky.

U řady flavonoidů byl potvrzen antiproliferační efekt na různých nádorových buněčných liniích (Kawaii et al., 1999; Kuntz et al., 1999). Výzkumy ukázaly schopnost těchto látek ovlivňovat aktivitu různých regulátorů buněčného cyklu a indukovat tak jeho zastavení. Flavopiridol, semisyntetický analog flavonu rohitukinu, se stal prvním inhibitorem CDK, který vstoupil do klinického testování pro léčbu různých typů nádorových onemocnění (Zhai et al., 2002; Karp et al., 2012). Mezi další molekulární cíle flavonoidů inhibujících proliferaci patří i receptorové tyrosinkinasy (EGFR, IGF-1R, PDGFR, VEGFR, c-Met; Teillet et al., 2008) nebo Ras/MAP-kinasová (Chung et al., 2001) či PI3-kinasová/Akt signální dráha (Siddiqui et al., 2004) atd.

Významným způsobem likvidace nádorových buněk je indukce buněčné smrti – apoptózy. Flavonoidy již opakovaně prokázaly schopnost vyvolat apoptózu v různých nádorových buněčných liniích (Kuntz et al., 1999; Wang et al., 1999; Sakagami et al., 2000; Wenzel et al., 2000; Erhart et al., 2005). Mechanizmy účinku zahrnují inhibici DNA topoisomerasy I/II (Markovits et al., 1989; Bailly, 2000), uvolnění cytochromu c, aktivaci caspas (Wang et al., 1999; Erhart et al., 2005; Lee et al., 2002), inhibici exprese antiapoptotických mitochondriálních proteinů Bcl-2 a Bcl-X_L (Erhart et al., 2005) nebo naopak aktivaci proapoptotických Bax a Bak, jaderného transkripčního faktoru NF-kappa B, endonukleas atd. (Wenzel et al., 2000; Lee et al., 2002).

Kromě výše zmiňovaných antiproliferačních efektů je zajímavou vlastností některých flavonoidů indukce terminální diferenciace nádorových buněk. Flavonoidy genistein, apigenin, luteolin, quercetin, phloretin či daidzein prokázaly schopnost diferenciace buněk akutní myeloidní leukemie HL-60 do buněk granulocytů a monocytů (Jing et al., 1993; Takahashi et al., 1998), erythroidní diferenciace buněk myelogenní leukemie K562 byla pozorována po aplikaci isoflavonu genisteinu. Dalším příkladem může být i indukce diferenciace buněk HT-29 odvozených od karcinomu tlustého střeva samotným flavonem (Wenzel et al., 2000).

Řada flavonoidů již také prokázala svůj inhibiční efekt na nádorovou angiogenezi (Mojzis et al., 2008). Konkrétním příkladem mohou být flavonoidy obsažené v červeném víně nebo zeleném čaji, které jsou schopné inhibovat některé klíčové procesy angiogeneze jakými jsou proliferace a migrace endoteliálních buněk nebo exprese proangiogenních faktorů (Oak et al., 2005). Jedním z dalších mechanismů účinku je i inhibice matrixových metaloproteinů (Mantena et al., 2005) nebo inhibice PI3-kinasové/Akt a Erk1/2 signálních drah vedoucí k poklesu hypoxií indukovaného HIF-1 α faktoru s následkem snížené exprese VEGF (Zhang et al., 2006). Anti-angiogenní účinky flavonoidů byly prokázány i *in vivo* např. u myši s rakovinou kůže vyvolanou UV-zářením (Mantena et al., 2005), u myši s rakovinou prostaty (Adhami et al., 2003) nebo u myši s plicními nádory vyvolanými urethany (Singh et al., 2006). Díky této vlastnosti se flavonoidy stávají potenciálními léčivy zvláště pro léčbu solidních nádorů.

Kromě angiogeneze flavonoidy také ovlivňují celou řadu klíčových procesů metastazování jako jsou mezibuněčné interakce, degradace tkáňové bariéry, migrace, adheze buněk k matrix atd. Aktuální, podrobný přehled vlivu flavonoidů na invazi a metastazování nádorových buněk *in vitro* i *in vivo* shrnuli Weng a Yen ve svém aktuálním review (Weng et Yen, 2012).

Určité flavonoidy mají i efekt na mnohočetnou lékovou resistenci. Mechanismem účinku je obvykle schopnost inhibovat funkci P-glykoproteinu, který patří do rodiny ABC (ATP-binding cassette) transportérů aktivně přečerpávajících široké spektrum xenobiotik z buňky na úkor ATP a snižujících tak účinnost léčiv. P-glykoprotein je tvořen transmembránovou doménou zprostředkovávající vazbu látky a vlastní transport z buňky a nukleotid-vazebnou doménu zodpovědnou za vazbu a hydrolýzu ATP. Mechanismem inhibice P-glykoproteinu flavonoidy je jednak snížení jeho exprese, dále také přímá vazba s vysokou afinitou na nukleotid-vazebnou doménu a/nebo vazba do vazebného místa substrátu nebo inhibice ATPasové aktivity (Di Pietro et al., 2002; Morris et Zhang, 2006). Interakce flavonoidů s dalšími členy rodiny ABC transportérů (MRP1, MRP2, BCRP) byly také pozorovány (Morris et Zhang, 2006).

2.2.5 Eupatorin

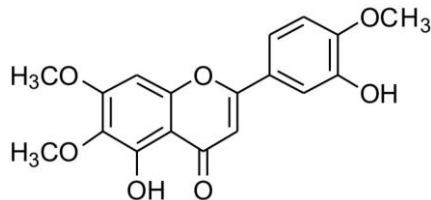
Část práce je zaměřena na antiproliferační potenciál flavonu eupatorinu. Tato látka byla vybrána z důvodu zajímavých biologických efektů, kterými vynikala nad ostatními látkami z naší testované série potenciálních CDK inhibitorů přírodního původu. Navíc v té době nebylo známo nic o jejím mechanismu účinku.

Eupatorin je jednou ze složek rostlin *Orthosiphon stamineus* (JV Asie; Yam et al., 2010), *Lantana Montevidensis* (tropy J Ameriky; Nagao et al., 2002), *Tanacetum vulgare* (mírné pásmo Evropy, Asie; Schinella et al., 1998) či zástupců rodu *Eupatorium* (Dobberstein et al., 1977) atd. Mezi rostliny vyskytující se i v našich středoevropských podmínkách patří *Eupatorium cannabinum* (sadec konopáč), v jejímž extraktu z listů jsme ovšem přítomnost eupatorinu neprokázali (nepublikovaná data). V České republice je však komerčně dostupná i rostlina *Orthosiphon stamineus* v podobě čaje nebo ve formě kapslí jako potravinový doplněk, kde se nám eupatorin podařilo prokázat a které jsme proto využili pro naše experimenty.

Orthosiphon stamineus Benth. (Lamiaceae) je léčivá rostlina používaná již po několik století v přírodní medicíně v jihovýchodní Asii pro léčbu řady onemocnění včetně žlučových či ledvinových kamenů, otoků, horečky, chřipky, revmatismu, hepatitidy atd. (Tran, 1990). Známá je i pod jinými jmény jako „Misai kuching“ v Indonézii, „Rau meo“ ve Vietnamu, „Neko no hige“ (kočičí vous) v Japonsku či jako „Jávský čaj“ pro detoxifikaci organismu (Chin et al., 2008). Známé pozitivní účinky na lidský organismus se staly podnětem pro bližší studium extraktů z této rostliny a výsledky potvrdily její diuretické (Adam et al., 2009), antioxidační (Akowuah et al., 2005; Yam et al., 2007), hepatoprotektivní (Yam et al., 2007), protizánětlivé (Yam et al., 2008; Yam et al., 2010), analgetické

(Yam et al., 2008), antipyretické (Yam et al., 2009) a antidiabetické účinky (Sriplang et al., 2007). Extrakty z listů *Orthosiphon stamineus* obsahují široké spektrum látek: flavonoidy, terpenoidy, saponiny, hexosy, organické kyseliny atd. (Tezuka et al., 2000; Awale et al., 2003; Akowuah et al., 2004; Loon et al., 2005). Polymethoxylované flavonoidy sinensetin, eupatorin a 3'-hydroxy-5,6,7,4'-tetramethoxyflavon, patří k dominantním složkám chloroformových frakcí těchto extraktů a zároveň i k terapeuticky nejzajímavějším (Yam et al., 2010). Sušené, drcené listy obsažené v kapslích byly v této práci využity pro vytvoření chloroformového extraktu, v němž byla stanovena koncentrace eupatorinu a který byl dále testován na buněčných kulturách. Výsledky poté byly porovnávány s účinky samotného eupatorinu odpovídající koncentrace.

Eupatorin, 3',5-dihydroxy-4',6,7,-trimethoxyflavone (**Obrázek 2**), již v minulosti prokázal své antiproliferační účinky na buněčných liniích HeLa odvozených od rakoviny děložního čípku (Csapi et al., 2010), na buňkách MK-1 karcinomu žaludku (Tezuka et al., 2000) či MDA-MB-468 prsního karcinomu, avšak žádné cytotoxické účinky nebyly potvrzeny na normálních prsních buňkách MCF-10A (Androutsopoulos et al., 2008). V jedné z nejnovějších studií byl eupatorin nalezen v sérii přírodních látek jako inhibitor kontrolního bodu mitotického vřeténka (Salmela et al., 2012).



Obrázek 2: Struktura eupatorinu

3. Materiál a metody

3.1 Příprava extraktu z listů *Orthosiphon stamineus*

Suché, drcené listy *O. stamineus* byly zakoupeny z firmy Expharma (Česká republika), homogenizovány chloroformem (40 ml na 2 g) pomocí vibračního kulového mlýnku (MM 301, Retsch, Německo). Surový extrakt byl centrifugován 10 min při 20 000 g, supernatant byl zfiltrován přes 0,45µm nylonový membránový filtr (Alltech, Nizozemí) a odpařen pomocí rotační vakuové odparky (Buchi, Švýcarsko). Suchý isolát byl rozpuštěn v DMSO a roztok byl použit pro testy na buněčných kulturách.

3.2 Chemikálie a protilátky

Olomoucín, *R*-roskovitin a *R*-olomoucín II byly syntetizovány dle publikované metodiky (Havlicek et al., 1997; Krystof et al., 2002). Eupatorin standard (čistota 94.1 % determinována pomocí HPLC dodavatelem) byl zakoupen z firmy Phytolab (Německo) a inhibitor farnesyltransferasy L744,832 z firmy Alexis Biochemicals (Švýcarsko). Látky byly rozpuštěny v DMSO na koncentraci 100 mM a použity pro testy na buněčných kulturách. Specifické protilátky byly zakoupeny z firem Cell Signaling Technology (USA; anti-caspasa 3), Sigma-Aldrich (USA; anti- α -tubulin, klon DM1A; peroxidasou značené sekundární protilátky), Santa Cruz Biotechnology (USA; anti-Mcl-1, klon S-19; anti-PARP, klon F-2; anti-Mdm-2, klon SMP14; VEGFR1, klon C-17), Millipore (USA; anti-pH3^{Ser10}), Jackson ImmunoResearch Laboratory (VB; kozí protilátka proti myším IgG značená FITC), Exbio (Česká republika; anti- γ -tubulin značený Dyomics 647), Invitrogen (USA; kozí sekundární protilátka proti králíčím IgG značená Alexa Fluor 488) nebo byly poskytnuty jako dar od B. Vojtěška (Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Česká republika; anti-p53, klon DO-1). Všechny protilátky byly rozpuštěny v roztoku 5% nízkotučného mléka a 0.1% Tweenu 20 v PBS.

3.3 Buněčné kultury a test viability

Buněčné linie MCF7 (prsni adenokarcinom), RPMI8226 (mnohočetný myelom), HL-60 (akutní promyelocytická leukémie), MOLT-4 (akutní lymfoblastická leukémie), K562 (chronická myelogenní leukémie), HeLa (adenokarcinom děložního čípku) a BJ (předkožkové fibroblasty) byly zakoupeny z firmy American Type Culture Collection (USA) nebo European Collection of Cell Cultures (VB). HUVEC endoteliální buňky byly poskytnuty prof. J. Ulrichovou (Univerzita Palackého, Olomouc, Česká republika). Buňky byly kultivovány podle pokynů dodavatele. Klony potkaních embryonálních fibroblastů byly připraveny dle publikované metodiky (Schmid et al., 2009). Testy buněčné viability byly prováděny pomocí kalceinu AM (Invitrogen, USA), fluorescence živých

buňek byla měřena při 485/538 nm (ex/em) pomocí Fluoroskan Ascent Plate Reader (Thermo Labsystems, USA) podle zavedené metodiky (Jorda et al., 2011).

3.4 Sledování tvorby kolonií

HeLa buňky byly nasazeny v nízké hustotě (200 buněk na jamku) do šestijamkového panelu a nechány 24 hod adherovat. Byla provedena buď kontinuální kultivace s eupatorinem na 12 dní anebo pouze 24-hodinová inkubace následovaná kultivací v čistém médiu po dobu 11 dní. Po ukončení kultivací byly buňky promyty, zafixovány 70% ethanolem a nabarveny 25 mM krystalovou violetí. Po promytí byly jednotlivé kolonie spočítány.

3.5 Analýza buněčného cyklu

Přibližně 10^6 buněk bylo sklizeny a zafixováno 90% methanolem. Po rehydrataci byly buňky inkubovány s primární protilátkou proti pH3^{Ser10} a poté s příslušnou sekundární protilátkou značenou Alexa Fluor 488. DNA byla značena propidium jodidem. Fluorescence byla měřena při 488/575 (ex/em) pro propidium jodid a 488/525 (ex/em) pro Alexa Fluor 488 pomocí průtokového cytometru Cell Lab QuantaTM SC (Beckman Coulter, USA). Buněčný cyklus byl analyzován pomocí programu Multicycle AV for Windows.

3.6 SDS–PAGE a imunodetekce

Po sklizení buněk a jejich lýzi se koncentrace proteinů v lyzátech stanovila Bradfordovou metodou. Vzorky byly separovány pomocí SDS-polyakrylamidové gelové elektroforézy a přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Následovalo blokování membrán a jejich inkubace s primárními a příslušnými sekundárními protilátkami. Komplexy protein-protilátka byly vizualizovány pomocí ECL (Thermo Fisher Scientific, USA), jak již bylo popsáno dříve (Jorda et al., 2011).

3.7 Měření aktivity caspasy 3/7

Metoda byla provedena podle Jordy et al., 2011. Ve stručnosti, buňky byly sklizeny, lyzovány a koncentrace proteinů se stanovila Bradfordovou metodou. 15 µg proteinů se smíchalo se 100 µl reakční směsí obsahující 100 µM Ac-DEVD-AMC jako substrát. Fluorescence byla měřena pomocí Fluoroskan Ascent reader (Thermo Labsystems, USA) při 346/442 nm (ex/em).

3.8 Imunofluorescenční značení

Buňky byly kultivovány na krycích sklíčkách v šestijamkových panelech. Po promytí PBS následovala fixace směsí methanol : aceton (1:1) a blokování 10% fetálním hovězím sérem. V dalším kroku proběhla inkubace s primárními a příslušnými sekundárními protilátkami. DNA byla značena DAPI. K pořizování fotografií byl použit fluorescenční mikroskop BX50 (Olympus, Japan) vybavený digitální kamerou Cool Snap (Photometrics, USA).

3.9 Měření inhibice proteinkinas

CDK1/cyklin B a CDK2/cyklin E byly produkovány pomocí bakulovirového expresního systému a purifikovány pomocí Ni^{2+} -NTA kolony (Qiagen, Německo). Reakční směs obsahovala enzym, 1 mg/ml histon H1, 15 μM ATP, 0,05 μCi [γ - ^{33}P]ATP a testovanou látku, vše v reakčním pufru (60 mM HEPES-NaOH, pH 7,5, 3 mM MgCl_2 , 3 mM MnCl_2 , 3 μM orthovanadát sodný, 1,2 mM DTT, 2,5 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ PEG_{20.000}). Reakce byla po inkubaci zastavena přidavkem 3% H_3PO_4 . Podíl reakční směsi se nanese na P-81 fosfocelulózový papír (Whatman, VB), který se poté 3x promyje 0,5% vodným roztokem H_3PO_4 a nechá na vzduchu uschnout. Radioaktivita byla měřena pomocí digitálního obrazového analyzátoru FLA-7000 (Fujifilm, Japonsko). Hodnoty IC_{50} byly získány z grafické analýzy.

4. Komentované výsledky a diskuse

4.1 Biologická aktivita guanidinových analogů roskovitinu

Testování biologické aktivity

CDK inhibiční aktivity 2,9-disubstituovaných-6-guanidinopurinů (**Tabulka 1 Přílohy I**) byly studovány pomocí purifikovaných rekombinantních enzymů CDK1/cyklin B a CDK2/cyklin E. Testy viability byly prováděny na nádorové buněčné linii MCF7 odvozené od karcinomu prsu. Analýza průtokovým cytometrem prokázala schopnost některých látek indukovat nárůst populace G2+M buněk. Ve snaze odlišit G2 a M fázi jsme sledovali intracelulární hladinu histonu H3 fosforylovaného na serinu 10 (pH3^{Ser10}). Tato fosforylace, katalyzovaná aurora kinasami A a B, je nezbytná pro kondenzaci chromatinu během mitózy a je proto často využívána jako mitotický marker (Crosio et al., 2002; Perez-Cadahia et al., 2009). Všechna data jsou shrnuta v **Tabulce 2 Přílohy I**. CDK inhibitor roskovitin vyvolávající specificky G2 blok byl použit jako pozitivní kontrola (IC₅₀: CDK2 = 0,17 μM, CDK1 = 2,4 μM, MCF7 = 20,2 μM).

Vztah mezi strukturou a aktivitou

Aromatická substituce na pozici 6 purinového skeletu je kritickým elementem determinujícím účinnost a selektivitu purinových derivátů vůči CDK (DeAzevedo et al., 1997; Jorda et al., 2012). Schopnost guanidinoskupiny na pozici 6 stabilizovat vazebné interakce v aktivním místě CDK byla demonstrována zvýšenými aktivitami 6-guanidinopurinů **3** a **5** (IC₅₀ CDK2 < 2 μM, CDK1 < 15 μM) ve srovnání s odpovídajícími 6-aminoderiváty **11** a **12**. Dále také srovnání inaktivní látky **13** se slabým CDK inhibitorem **9** poukázalo na fakt, že nahrazení dimethylamino skupiny (**13**) guanidinoskupinou (**9**) vede ke zlepšení inhibičních vlastností. Na základě těchto výsledků jsme připravili sérii N9-substituovaných 2-amino-6-guanidinopurinů a testovali jejich biologickou aktivitu. Podobným způsobem byly již dříve připraveny a evaluovány i jiné sety purinových derivátů (Havlicek et al., 1997; Meijer et al., 1997; Williamson et al., 2005b).

Naše výsledky ukázaly, že nejsilnějšími inhibitory CDK byly deriváty obsahující malý, nepolární, alkylový N9-substituent. Mezi nejaktivnější z této řady patřily látky obsahující na pozici N9 ethyl (**5**) nebo isopropyl (**3**), dále methyl (**1**), propyl (**2**) a nejméně aktivní byla látka **4** obsahující isobutyl. N9-substituce polárními heteroalkyly obecně vedla ke ztrátě CDK inhibičních i cytotoxických vlastností.

Navzdory určité schopnosti těchto N9-substituovaných 2-amino-6-guanidinopurinů inhibovat CDK neměla většina těchto látek žádný významný cytotoxický efekt na buňky MCF7 (IC₅₀ > 100 μM) nebo pouze slabý (IC₅₀ > 50 μM). Nicméně některé tyto deriváty byly i přesto schopné akumulovat buňky v G2+M fázi (deriváty **2-5**). V porovnání s roskovitinem byly látky **3** a **5** slabšími inhibitory

CDK s hodnotami IC_{50} alespoň pětikrát vyššími, jejich cytotoxicita byla také nižší (4x, resp. 2x), avšak schopnost ovlivňovat buněčný cyklus byla obdobná. Došlo k nárůstu populace buněk v G2+M fázích buněčného cyklu (2x, resp. 1,6x) a více než pětinasobnému poklesu buněk pozitivních na $pH3^{Ser10}$, který je charakteristický pro G2 blok buněčného cyklu. Na druhé straně deriváty obsahující propyl (2) a isobutyl (4) způsobily nárůst populace mitotických buněk prokázaný akumulací mitotického markeru $pH3^{Ser10}$. Tato pozorování poukazují na skutečnost, že i malá změna v N9-substituentu zjevně vede k alternativním mechanismům účinku.

Jelikož derivát nesoucí isopropyl na pozici N9 (3) patřil k neúčinnějším z dané série a také protože N9-isopropyl obsahuje i molekula roskovitinu, syntetizovali jsme sérii substituovaných 6-guanidino-9-isopropylpurinů s různými C2-substituenty odvozenými od C2-postranního řetězce olomoucínu či roskovitinu. Význam C2-substituentu byl demonstrován porovnáním biologických aktivit 2-amino-6-guanidino-9-methylpurinu (1), který inhiboval CDK řádově v mikromolech, a neaktivního, C2-nesubstituovaného 6-guanidino-9-methylpurinu (10). Látka **16a** nesoucí na pozici C2 hydroxyethylamino skupinu, olomoucínový postranní řetězec, významným způsobem nezvýšila CDK inhibiční vlastnosti odpovídajícího 2-aminoderivátu (3), avšak zlepšila jeho antiproliferační vlastnosti na buňkách MCF7 téměř osmkrát. Z toho vyplývá, že tato zvýšená účinnost pravděpodobně nesouvisí s inhibicí CDK. Prodloužení olomoucínového postranního řetězce o jednu methylenovou skupinu (**16b**) vedlo ke zvýšení CDK inhibiční aktivity přibližně čtyřikrát, avšak k významnému zlepšení antiproliferačních vlastností na buňkách MCF7 nedošlo. Další prodlužování řetězce (**16c**) již nevedlo k žádné významné změně v biologické aktivitě.

Dále byla připravena série 6-guanidino-9-isopropylpurinů s *N*- a *O*-vázanými C2-substituenty. Obecně lze říci, že 2-*N*- i 2-*O*-deriváty s vysokou aktivitou vůči CDK vykazovaly ve většině případů i vyšší aktivitu na buňkách MCF7. Z toho lze usoudit, že alespoň část biologické aktivity je způsobena inhibicí CDK. 2-*O*-deriváty byly v porovnání se svými 2-*N*-regioisomery několikanásobně méně aktivní. Výjimkou byla látka **16j**, jedna z neaktivnějších z celého setu. Ačkoliv byla podobně jako ostatní 2-*O*-deriváty slabším inhibitorem CDK2 (25x) než odpovídající 2-*N*-regioisomer **16k**, její efekt na CDK1 i buňky MCF7 byl překvapivě téměř identický.

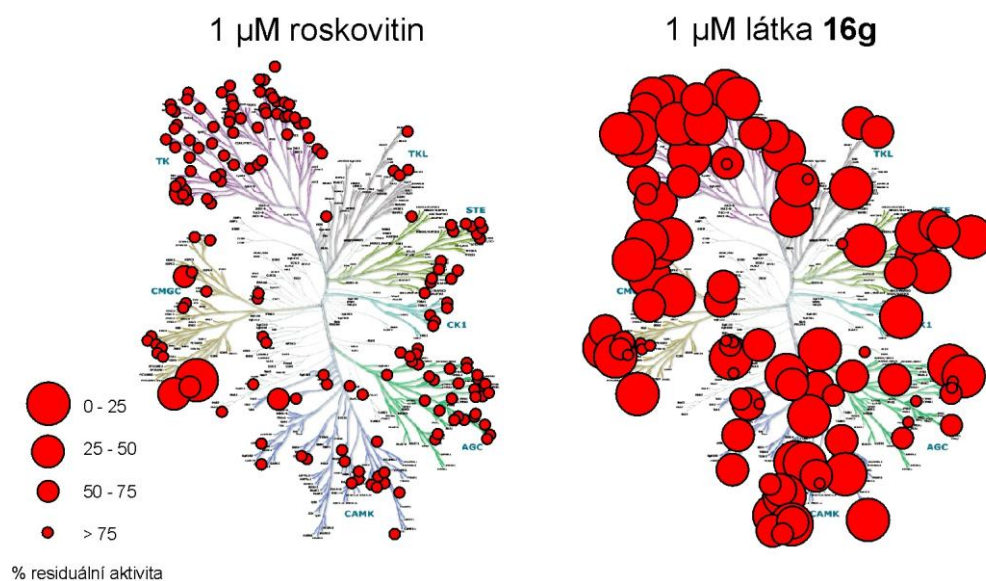
Neaktivnější látkou z celého setu byl derivát **16g** nesoucí jak stejný N9-, tak i C2-substituent jako molekula roskovitinu. Tato látka byla několikanásobně účinnější v inhibici CDK (2,7x pro CDK1 a 4,6x pro CDK2) stejně jako na buňkách MCF7 (IC_{50} více než 10x nižší) než samotný roskovitin. Jelikož je C2-postranní řetězec roskovitinu opticky aktivní, je třeba poznamenat, že mluvíme-li zde o roskovitinu, jedná se o jeho (*R*)-enantiomer, který byl dříve popsán jako aktivnější forma v porovnání se svým (*S*)-isomerem (Bach et al., 2005). U námi syntetizovaných látek byl překvapivě pozorován opačný trend. (*S*)-enantiomery byly obecně aktivnější než příslušné (*R*)-isomery, a to jak v řadě 2-*N*-derivátů **16e** a **16g**, **16i** a **16k** tak i 2-*O*-derivátů **16d** a **16f**, **16h** a **16j**.

Poslední charakterizovanou skupinou látek byly deriváty obsahující ve své molekule cyklus na pozici C2. Přítomnost cyklopropylaminoskupiny na pozici C2 (**16l**) zlepšila CDK inhibiční (přibližně

2,5x) a cytotoxické vlastnosti (téměř 20x) ve srovnání s odpovídajícím 2-aminoderivátem (**3**). D- a L-prolinol byly další zkoumané cyklické C2-substituenty. Ve skupině různých isomerů prolinolu na pozici C2 (**16m-p**) byl nejaktivnější derivát **16n** nesoucí *N*-vázaný L-prolinol, jehož biologická aktivita byla velmi podobná roskovitinu.

Kinasová selektivita

U dvou nejaktivnějších (*R*)- a (*S*)-enantiomerů **16e** a **16g** byla sledována schopnost inhibovat různé kinasové cíle na panelu 121 proteinkinas. Je známo, že účinnost a selektivita spolu negativně korelují (Posy et al., 2011), proto nebylo překvapením, když se oba deriváty ukázaly být nespecifickými inhibitory redukcujícími aktivitu celé řady proteinkinas (**Tabulka 3 Přílohy I**). Roskovitin je naproti tomu znám jako selektivní inhibitor CDK významně ovlivňující kromě aktivity CDK pouze několik málo dalších kinas jako CaM kinasu 2, CK1 α , CK1 δ , DYRK1A, EPHB2, ERK1, ERK2, FAK a IRAK4 (Bach et al., 2005; Bain et al., 2007; **Obrázek 3**). Důvodem snížené selektivity 6-guanidinopurinů je pravděpodobně odstranění aromatického substituentu na pozici C6, který hraje klíčovou úlohu v selektivitě vůči CDK (DeAzevedo et al., 1997). V souladu s předchozími daty (*S*)-enantiomer **16g** inhiboval testované kinasy efektivněji než (*R*)-enantiomer **16e**.



Obrázek 3: Porovnání specifity 1 μ M roskovitinu (zdroj www.invitrogen.com) a 1 μ M látky **16g** na reprezentativním panelu proteinkinas.

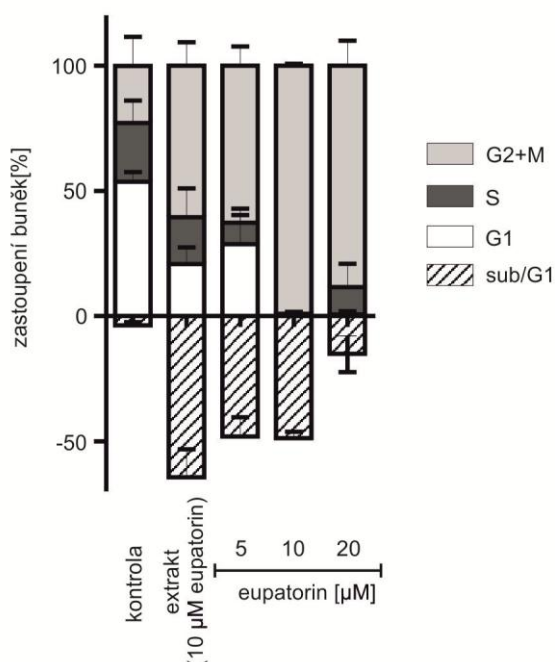
4.2 Antiproliferační a anti-angiogenní účinky flavonu eupatorinu

Eupatorin je aktivní složkou extraktu z listů *Orthosiphon stamineus*

Příprava chloroformového extraktu je popsána v sekci Materiál a metody. Extrakt významně redukoval viabilitu nádorových buněk, jak ukazuje **Tabulka 1 Přílohy II** a **Suppl. 2 Přílohy II**. Již dříve bylo popsáno, že eupatorin patří k neaktivnějším látkám v chloroformovém extraktu z listů *O. stamineus* (Yam et al., 2010). Naši snahou bylo ohodnotit příspěvek eupatorinu k celkové aktivitě extraktu. Za tímto účelem byla stanovena koncentrace eupatorinu v extraktu pomocí UPLC-MS/MS ($0,53 \pm 0,08$ mg/g DW; **Suppl. 1 Přílohy II**) a účinky extraktu o známé koncentraci eupatorinu byly poté porovnávány s čistým, komerčně dodávaným eupatorinem odpovídající koncentrace (**Tabulka 1 a 2 a Suppl. 2 Přílohy II**). Výsledky jasně demonstrují, že eupatorin významným způsobem přispívá k celkové aktivitě extraktu. Navíc byl tento flavon selektivně aktivní v nádorových buněčných liniích a mnohem méně účinný v netransformovaných buňkách (**Tabulka 2 Přílohy II**).

Eupatorin indukuje G2+M blok buněčného cyklu

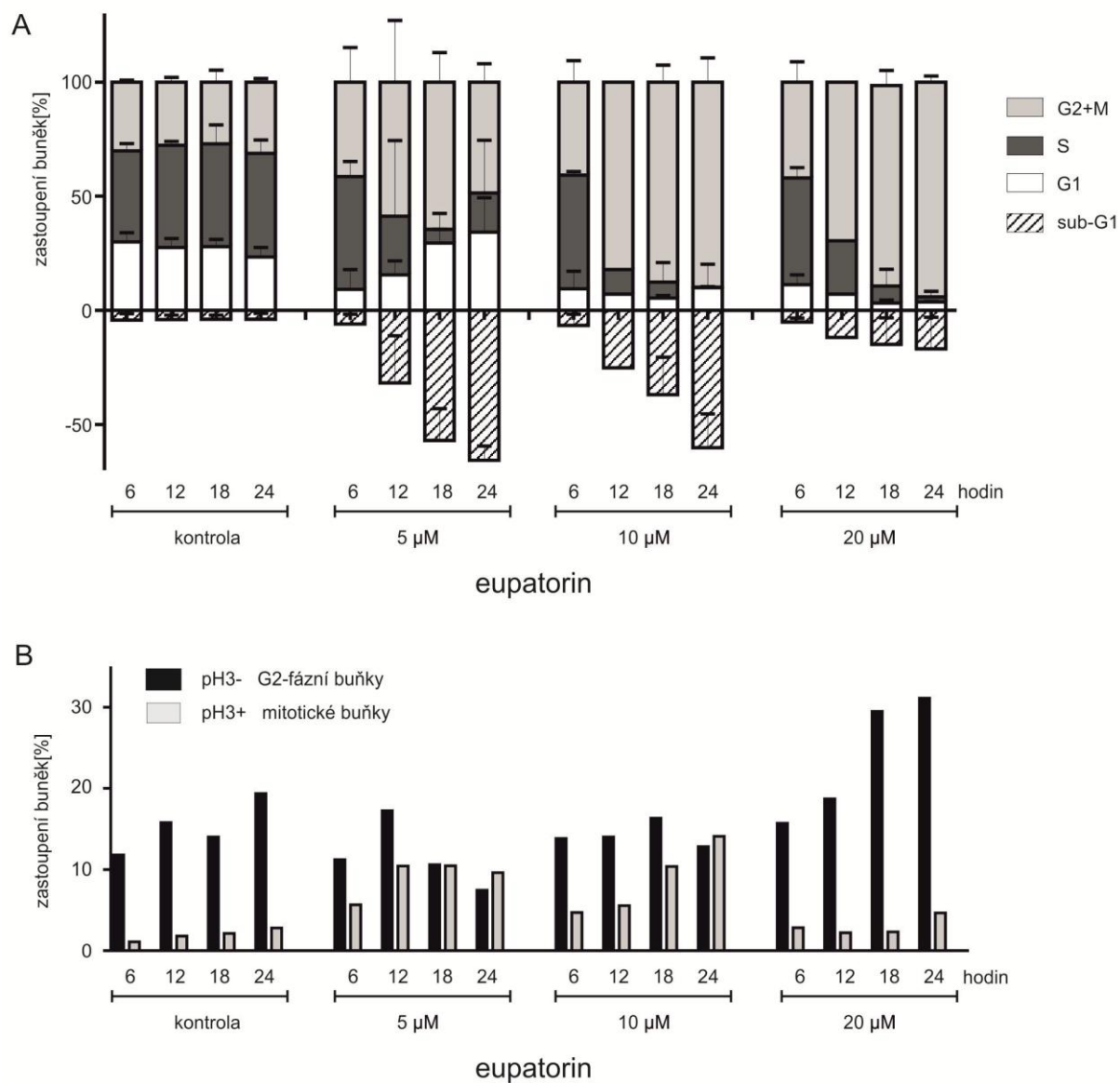
Připravený extrakt (6,48 mg DW/ml, konečná koncentrace eupatorinu v médiu byla 10 μ M, **Fig. 2A Přílohy II**) i čistý eupatorin (**Fig. 2B Přílohy II**) indukovali po 24 hod G2+M blok buněčného cyklu HeLa buňkách (kvantifikace na **Obrázku 4**).



Obrázek 4: Kvantifikace analýzy buněčného cyklu HeLa buněk značených propidium jodidem po aplikaci extraktu a eupatorinu na 24 h.

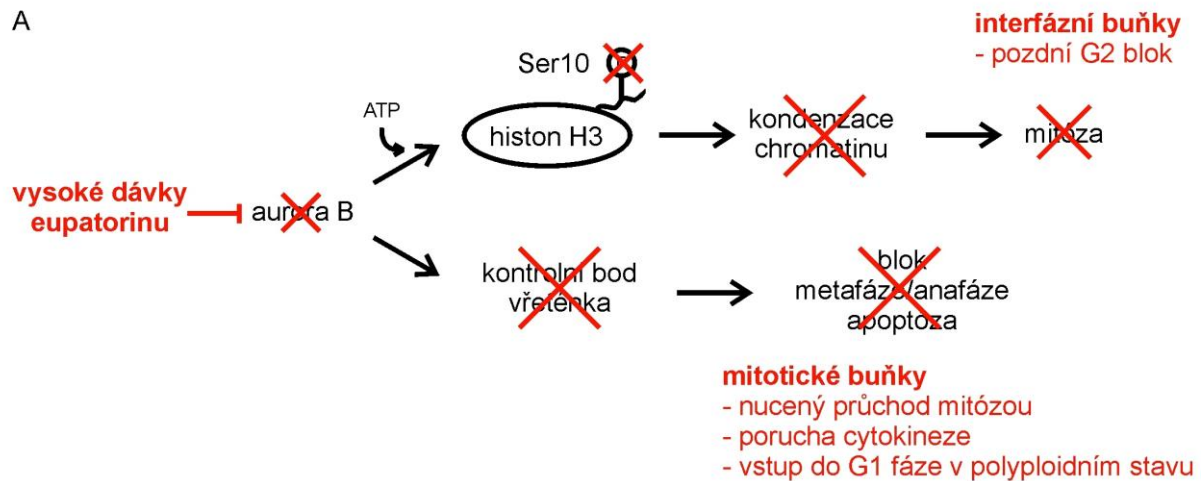
Pro odlišení G2 fáze od mitózy jsme sledovali intracelulární hladinu histonu H3 fosforylovaného na serinu 10 ($\text{pH3}^{\text{Ser10}}$) průtokovou cytometrií (**Fig. 2C Přílohy II**) a imunofluorescenční mikroskopií (**Suppl. 3 Přílohy II**). Tato fosforylace, katalyzovaná aurorami A a B, je nezbytná pro kondenzaci chromatinu na počátku mitózy a je proto často využívána jako mitotický marker (Crosio et al., 2002; Perez-Cadahia et al., 2009). Její inhibice vede k bloku buněčného cyklu v pozdní G2 fázi (Prigent et Dimitrov, 2003). Aurora B je také součástí kontrolního bodu vřeténka a je aktivována v případě nedostatečného napětí mikrotubulů napojených ke kinetochorům chromozómů (Ditchfield et al., 2003; Hauf et al., 2003). Inhibice její aktivity v mitotických buňkách vede k inaktivaci tohoto kontrolního mechanismu a následnému nucenému průchodu mitózou s narušeným procesem cytokineze (Salmela et al., 2012). Vysoké koncentrace eupatorinu inhibují aurora kinasu B jak v *in vitro* testech, tak i v buňkách HeLa, jak bylo v nedávné době prokázáno (Salmela et al., 2012). V asynchronní populaci buněk HeLa je ovšem pouze část buněk v mitóze (přibližně 25 %) a pouze u těchto buněk tedy dochází účinkem vysokých koncentrací eupatorinu k inhibici aurory B a s tím souvisejícímu překonání kontrolního bodu vřeténka. Tyto buňky prochází mitózou s narušeným procesem cytokineze a vstupují poté do G1 fáze v tetraploidním, mnohojaderném stavu. Přítomnost malé subpopulace polyploidních buněk po aplikaci eupatorinu podporuje tuto hypotézu (**Fig. 2B,C Přílohy II**). Avšak více než 75% asynchronní populace HeLa buněk je v momentě aplikace eupatorinu přítomno v interfázi. Inhibice aurory B vlivem vysokých koncentrací eupatorinu (20 μM) vede v tomto případě k bloku fosforylace histonu H3 na serinu 10 a k následnému selhání kondenzace chromatinu. Výsledkem je tedy akumulace interfázních buněk v pozdní G2 fázi, které obsahují defosforylovaný histon H3 (**Fig. 2C Přílohy II**).

Jiná situace nastává při použití nízkých koncentrací eupatorinu (5 μM), kdy nedochází k úplnému potlačení aktivity aurory B. Interfázní buňky jsou tedy schopny vstoupit do mitózy, kde dochází k aktivaci funkčního kontrolního bodu vřeténka, protože, jak bude ukázáno později, je proces mitózy poškozen. Výsledkem je blok buněčného cyklu v mitóze charakterizovaný stoupajícím počtem buněk pozitivních na $\text{pH3}^{\text{Ser10}}$. Funkční kontrolní bod vřeténka má kromě bloku buněčného cyklu za následek aktivaci apoptózy, charakterizované nárůstem umírajících, degradovaných buněk (Debris) (**Fig 2C Přílohy II, Obrázek 4**) a prokázané i dalšími experimenty (viz. dále). Velmi podobné výsledky byly pozorovány i u linie K562, u které byla navíc prováděna analýza buněčného cyklu v šestihodinových intervalech (**Obrázek 5**). Z těchto výsledků je patrné, že eupatorin má v nižších dávkách cytotoxické účinky a při vyšších spíše cytostatické (**Schéma 1**). Uvedené tvrzení je ovšem platné pouze v případě kratších, 24-hodinových inkubací, při dlouhodobých kultivacích už je cytotoxický účinek koncentračně závislý, jak je možné pozorovat u třídních testů viability (**Suppl. 2 Přílohy II**). Z toho je zřejmé, že ačkoliv buňky vystavené 20 μM eupatorinu po 24 hodinách neumírají bezprostředně z důvodu nefunkčního kontrolního bodu vřeténka, který by vyvolal buněčnou smrt, jejich poškození je při delších inkubacích závažné a neslučitelné s přežitím.



Obrázek 5: Časový průběh působení eupatorinu na buněčný cyklus buněk K562. (A) Zastoupení buněk značených propidium jodidem v jednotlivých fázích buněčného cyklu, (B) zastoupení buněk značených propidium jodidem a protilátkou proti fosfo-histonu H3 (serin 10) v G2 fázi a mitóze.

A



B

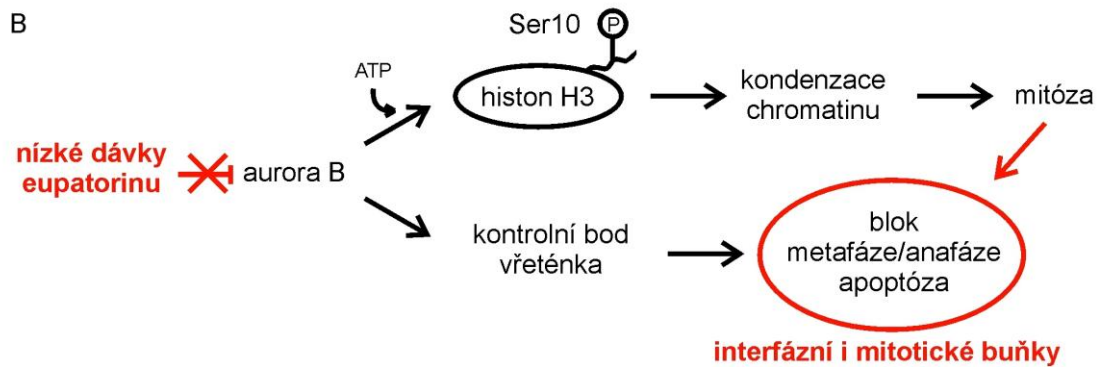
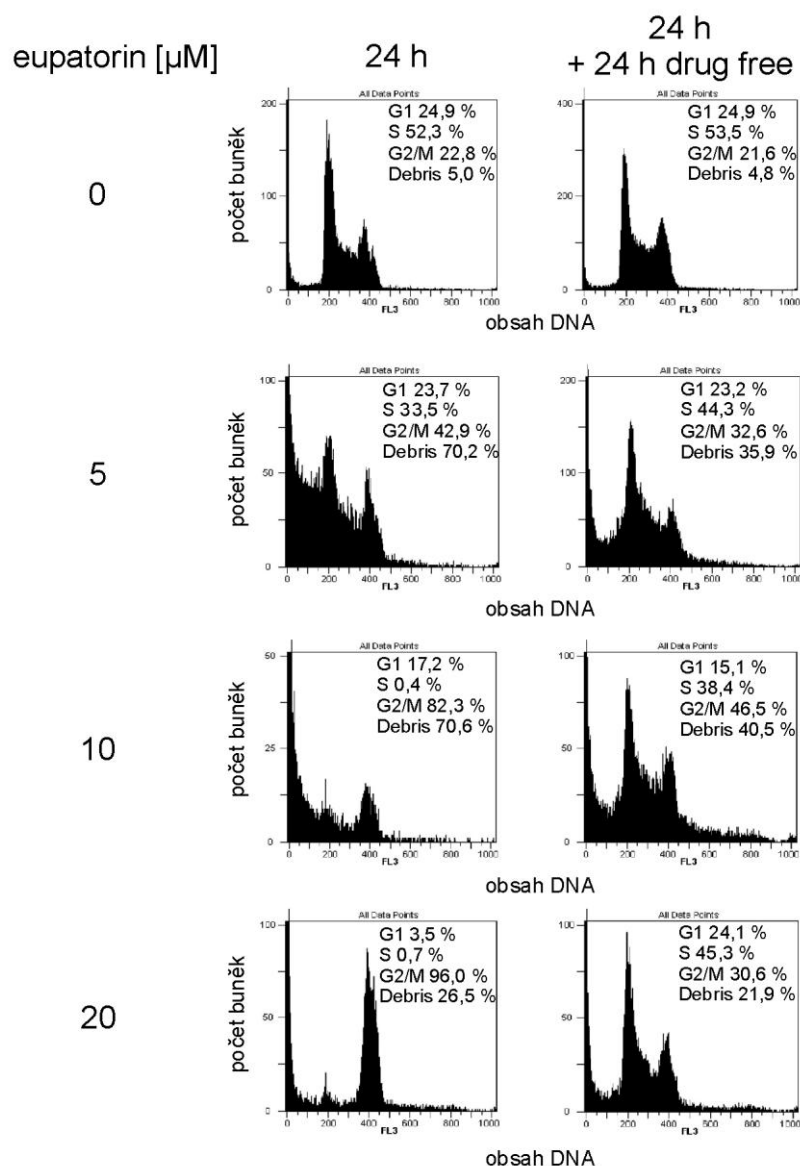


Schéma 1: Navrhovaný mechanismus působení vysokých (A) a nízkých (B) dávek eupatorinu na průchod buněčným cyklem.

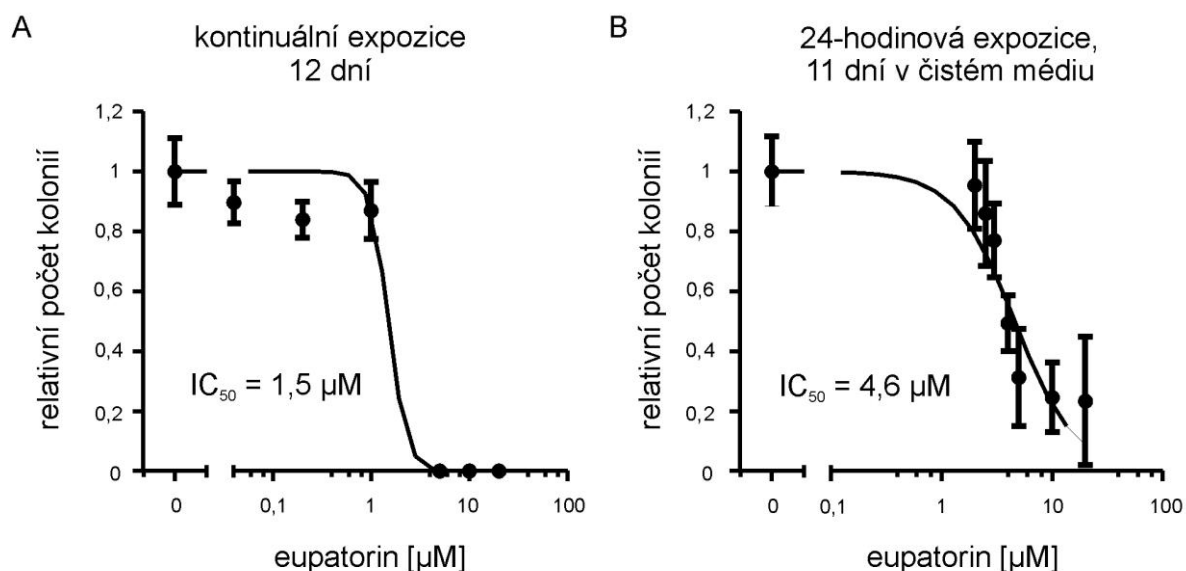
Účinky eupatorinu jsou částečně reverzibilní

Jedním z dalších cílů bylo prozkoumat reverzibilitu účinků eupatorinu. Za tímto účelem jsme buňky K562 kultivovali 24 hod v přítomnosti eupatorinu, poté jsme médium vyměnili za čisté na dalších 24 hodin. Analýza buněčného cyklu průtokovou cytometrií odhalila částečnou schopnost reverzibility (**Obrázek 6**). Buněk akumulovaných v G2/M fázi ubývalo a S-fázových naopak přibýlo. Řada buněk však již byla poškozena natolik, že nebyla schopna přežít, čemuž nasvědčuje stále vysoké zastoupení subdiploidní populace (Debris; mrtvé, degradované buňky).



Obrázek 6: Buňky K562 byly kultivovány v přítomnosti eupatorinu na 24 h, poté bylo médium vyměněno za čisté na dalších 24 hod. Buňky byly značeny propidium jodidem a analyzovány průtokovou cytometrií.

V dalším testu jsme sledovali schopnost buněk tvořit kolonie. HeLa buňky byly v nízké hustotě nasazeny a inkubovány s eupatorinem kontinuálně na 12 dní anebo na 24 h s následnou kultivací v čistém médiu po dobu 11 dní. Tvorba kolonií byla při kontinuální inkubaci s 5, 10 a 20 μM eupatorinem úplně potlačena, avšak při nahrazení eupatorinu čistým médiem došlo k částečné obnově této schopnosti (**Obrázek 7**).



Obrázek 7. Sledování schopnosti HeLa buněk tvořit kolonie. (A) HeLa buňky byly kultivovány kontinuálně 12 dní v médiu obsahující eupatorin, (B) HeLa buňky byly kultivovány s eupatorinem 24 hodin a následně 11 dní v čistém médiu. Kolonie byly zafixovány 70% ethanolem, nabarveny krystalovou violetí a spočítány.

Eupatorin indukuje mitotickou katastrofu a apoptózu

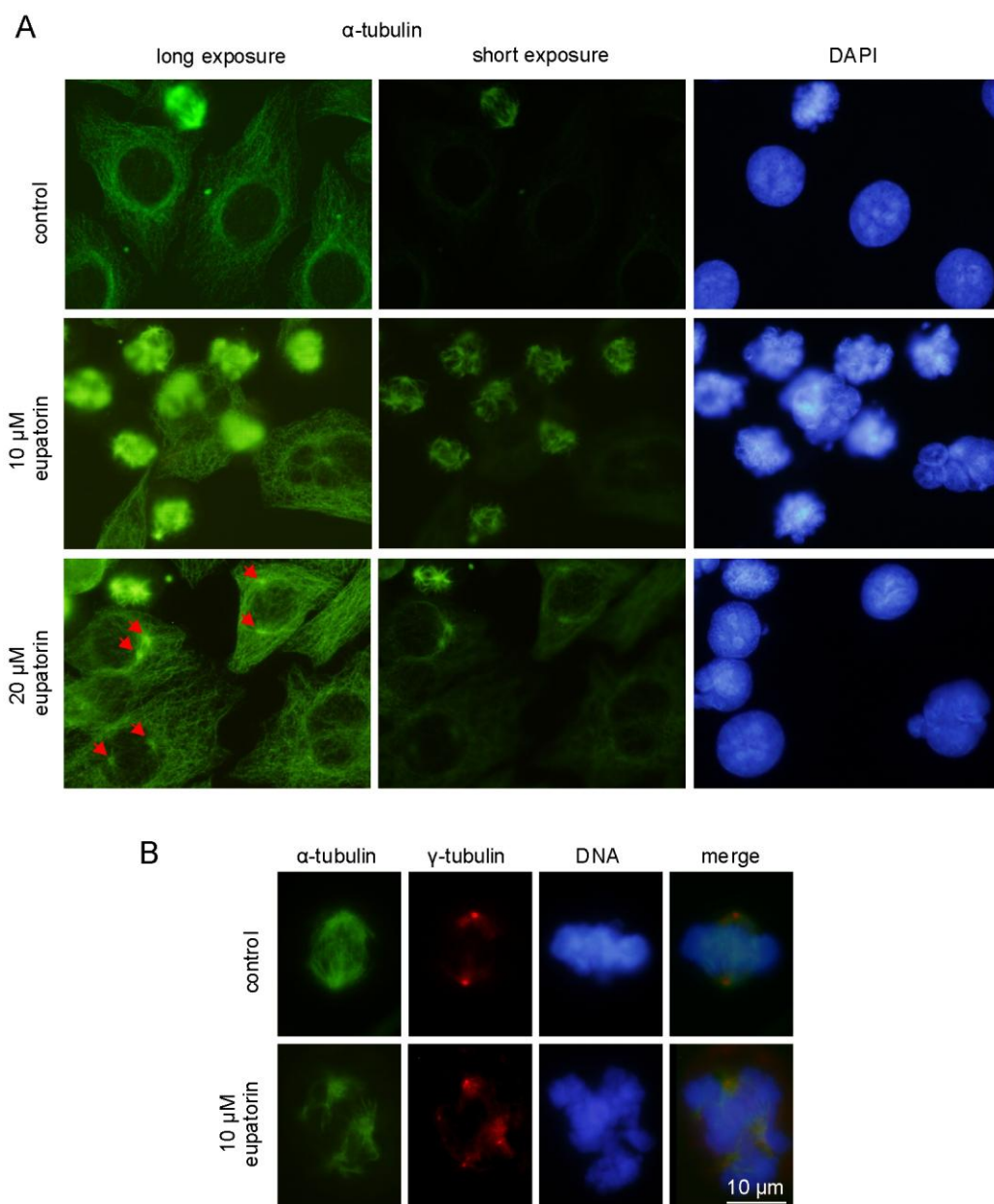
Předchozí experimenty prokázaly schopnost eupatorinu vyvolat buněčnou smrt nádorových buněk, avšak její mechanismus bylo nutné ještě dále experimentálně potvrdit. Za tímto účelem jsme provedli imunodetekci vybraných markerů apoptózy v lyzátech HeLa buněk kultivovaných s eupatorinem 24 hod. Detekováno bylo štěpení proteinu PARP, aktivující štěpení caspasy 3 či mírný pokles v hladinách antiapoptotických mitochondriálních proteinů Bcl-2 a Mcl-1 (**Fig. 3A Přílohy II**). U proteinu Bcl-2 byla navíc pozorována pomaleji migrující, fosforylovaná forma spojovaná s G2+M blokem buněčného cyklu a inaktivací jeho antiapoptotické funkce (Terrano et al., 2010). Hladina proteinu p53 v buňkách HeLa je redukována důsledkem asociace s virálním onkoproteinem E6 vedoucí k jeho degradaci proteasomem (Scheffner et al., 1993). Po aplikaci eupatorinu bylo možné pozorovat stabilizaci tohoto nádorového supresoru a s tím související redukcí jeho negativního regulátoru Mdm2 (**Fig. 3A Přílohy II**). Kromě toho byla také v buněčných lyzátech naměřena zvýšená aktivita caspas 3 a 7, efektorových caspas zodpovědných za štěpení celé řady proteinů jako laminin či

PARP (**Fig. 3B Přílohy II**). Výše jmenované markery apoptózy byly zřetelnější při nižších koncentracích eupatorinu (5 a 10 μM) a naopak slabší v případě vyšší dávky (20 μM). Tyto výsledky jsou v souladu s předchozími experimenty, které poukazovaly na duální chování (cytotoxické vs. cytostatické) eupatorinu při 24-hodinové inkubaci (**Fig 2B,C Přílohy II, Obrázek 4**).

Jelikož byla u řady flavonoidů strukturně blízkých eupatorinu prokázána schopnost inhibice polymerizace mikrotubulů (Beutler et al., 1998), bylo naším dalším cílem posoudit vliv eupatorinu na mikrotubulární systém. Pomocí imunofluorescenčního značení α - a γ -tubulinu jsme vizualizovali mikrotubuly, resp. centrosomy HeLa buněk ovlivněných eupatorinem. Žádnou významnou depolymerizaci mikrotubulů jsme nepozorovali, avšak po aplikaci 10 μM eupatorinu bylo možné pozorovat nárůst mitotických buněk obsahující multipolární dělicí vřeténka s γ -pozitivními centrosomálními póly a také velké, mnohojaderné buňky s dekonzenzovaným chromatinem (**Obrázek 8A, B**). Tyto znaky jsou charakteristické pro mitotickou katastrofu (Roninson et al., 2001), která již byla popsána jako odpověď na řadu protinádorových léčiv jako je např. bleomycin, etoposid nebo taxol (Tounekti et al., 1993; Lock et Stribinskiene, 1996; Torres et Horwitz, 1998). Tento typ buněčné smrti je výsledkem narušeného procesu mitózy a bývá také často doprovázen klíčovými molekulárními jevy typické pro apoptózu jako je aktivace caspas, uvolnění cytochromu c z mitochondrií či degradace DNA (Castedo et al., 2004). Z tohoto důvodu usuzujeme, že mitotická katastrofa následovaná apoptózou je mechanismem buněčné smrti indukované 10 μM eupatorinem. Účinkem vyšší dávky eupatorinu (20 μM) dochází, jak již bylo diskutováno dříve, pravděpodobně vlivem inhibice aurory B k bloku interfázních buněk v pozdní G2 fázi. Tomu nasvědčuje přítomnost řady buněk s velkým jádrem, dekonzenzovaným chromatinem a často i se zřetelně oddělenými centrosomy (**Obrázek 8A**). Kromě těchto buněk byly pozorovány i buňky mnohojaderné podporující teorii nuceného průchodu mitózou vlivem nefunkčního kontrolního bodu vřeténka v případě mitotických buněk (**Obrázek 8A**).

Eupatorin je nespecifický inhibitor proteinkinas

Vzhledem ke strukturní podobnosti eupatorinu a známých inhibitorů proteinkinas (Singh et Agarwal, 2006; Teillet et al., 2008) jsme zkoumali schopnost 1 μM eupatorinu redukovat aktivitu přibližně 110 lidských proteinkinas. Eupatorin se ukázal být nespecifickým inhibitorem (**Suppl. 4 Přílohy II**) snižující nejvýznamněji aktivity kinas RIPK2, VEGFR1 a MLK3 s residuálními aktivitami pod 33 %. Ačkoliv byla inhibice aurory B prokázána jinými autory *in vitro* i v buněčných lyzátech (Salmela et al., 2012), v našich testech nepatřila aurora B s residuální aktivitou 79 % k těm nejcitlivějším. Avšak *in vitro* testy s rekombinantními enzymy nemusí nutně odrážet reálnou situaci v buňkách a navíc k významnému buněčnému efektu, který je pravděpodobně způsoben inhibicí aurory B, docházelo právě až při vyšších koncentracích eupatorinu (20 μM).



Obrázek 8: (A) Imunofluorescenčního značení α -tubulinu v buňkách HeLa kultivovaných s eupatorinem na 24 h. (B) Imunofluorescenční značení α -tubulinu (dělicí vřeténka), resp. γ -tubulinu (centrosomy) v buňkách HeLa kultivovaných s eupatorinem 24 h. DNA byla značena DAPI. Červené šipky označují separované centrosomy.

Eupatorin redukuje schopnost angiogeneze *in vitro*

Silná inhibice VEGFR1 eupatorinem *in vitro* a také fakt, že řada flavonoidů (Fotsis et al. 1997; Igura et al. 2001; Mojzis et al. 2008) i extrakty z *O. stamineus* (Sahib et al., 2009; Ahamed et al., 2012) negativně ovlivňují proces angiogeneze, nás inspiroval ke studiu anti-angiogenních vlastností tohoto flavonu. Jako *in vitro* model angiogeneze jsme použili endoteliální buňky HUVEC a sledovali jejich schopnost migrovat a tvořit tubuly v přítomnosti eupatorinu. V migračním testu byla

do souvislé vrstvy HUVEC buněk vytvořena rýha, do které buňky migrovaly. Kontrolní buňky během 20 hodin zaplnily celou rýhu narozdíl od buněk vystavených účinkům eupatorinu, kde byla schopnost migrace omezena a rýha zůstala částečně či zcela zachována (**Fig. 5 Přílohy II**). Také počet a délka tubulů vytvářených HUVEC buňkami a jejich větvení byly významným způsobem redukovány (**Fig. 6 Přílohy II**). V obou případech byl efekt koncentračně závislý.

VEGF receptory jsou důležitou součástí molekulárních drah procesu angiogeneze a zahrnují 3 typy receptorových tyrosinkinaz: VEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (KDR, Flk-2) a VEGFR3 (Olsson et al., 2006). Silná inhibice VEGFR1 eupatorinem byla v předchozích experimentech prokázána *in vitro* s rekombinantním enzymem (**Suppl. 4 Přílohy II**). V buněčných lyzátech HUVEC buněk byla dále sledována intracelulární hladina receptorů VEGFR1 pomocí imunodetekce. Účinkem eupatorinu došlo už po 2 h v nejvyšší koncentraci (20 μ M) k poklesu hladiny VEGFR1 (**Fig. 7 Přílohy II**). Vzhledem ke strukturní podobnosti VEGF receptorů (Neufeld et al., 1999) a také nespecifickému inhibičnímu potenciálu eupatorinu lze očekávat i inhibici VEGFR2 a VEGFR3, kterou jsme ovšem neprokazovali. Redukce hladiny VEGF receptorů přispívá ke snížení citlivosti endoteliálních buněk vůči molekulám VEGF a tím i k potlačení angiogeneze. Naše závěry jsou podpořeny současnými výsledky Ahameda a jeho spolupracovníků (Ahamed et al., 2012), kteří potvrdili anti-angiogenní účinky 50% ethanolického roztoku *O. stamineus* obsahující eupatorin *in vitro* i *in vivo* jako důsledek potlačení funkce VEGFR2.

4.3 Aktivita inhibitorů CDK na potkaní embryonální fibroblasty s různým funkčním statusem proteinů p53 a c-Ha-ras

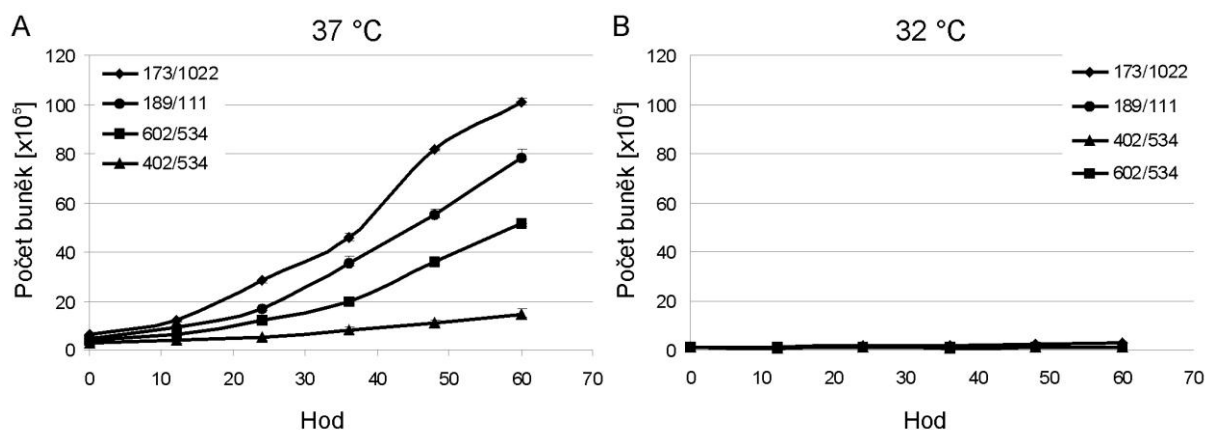
Buněčný model

Analýza vlastností nádorových supresorů a onkoproteinů hraje významnou roli pro pochopení procesu karcinogeneze. Gen nádorového supresoru *TP53* a onkogen *RAS* patří k nejčastěji mutovaným genům v různých typech rakovin. Z tohoto důvodu jsme náš výzkum zaměřili právě na tyto dva proteiny a zkoumali vliv inhibitorů CDK na potkaní embryonální fibroblasty s různým funkčním statusem těchto proteinů.

Primární potkaní fibroblasty (REFs, rat embryonal fibroblasts) izolované z embryí starých 13,5 dne (yREFs, young REFs, klony 402/534 a 189/111) nebo 15,5 dne (oREFs, old REFs, klony 602/534 a 173/1022) byly transfekovány teplotně senzitivním (ts), mutantním nádorovým supresorem p53 obsahující substituci alaninu 135 valinem (klony 402/534 a 602/534) samostatně anebo v kombinaci s mutantním onkoproteinem c-Ha-ras (klony 173/1022 a 189/111; Schmid et al., 2009). Za normálních okolností není konstitutivní nadměrná exprese proteinu p53 uskutečnitelná z důvodů indukce bloku buněčného cyklu či apoptózy, proto model REF představuje užitečný nástroj při studiu funkce tohoto proteinu, jehož aktivita je přepínána jednoduše na základě změny konformace vlivem teploty. Ts p53^{135Val} přechází mezi funkční (wild type, wt) konformací při 32 °C a mutantní, nefunkční konformací při 37-39 °C. Různě stará embrya zde slouží pro posouzení vlivu vnitřního buněčného programu daného embryonálního vývoje na chování buněk.

Buňky nasazené v definované hustotě byly kultivovány při 32 °C resp. při 37 °C a jejich počet byl měřen ve 12ti-hodinových intervalech. Při 37 °C exprimovaly buňky mutantní a tedy nefunkční formu p53^{135Val}. REFs transfekované pouze ts p53^{135Val} (klony 402/534 a 602/534) nabývaly v tomto případě fenotyp imortalizovaných buněk, překonávaly Hayflickův limit a nepodléhaly senescenci. Při porovnání yREFs a oREFs starší klony (602/534) proliferovaly rychleji (**Obrázek 9A**). Kotransfekce mutantním c-Ha-ras (klony 173/1022 a 189/111) vedla k buňkám s vysokým proliferacním potenciálem (**Obrázek 9A**). Tyto klony měly charakter transformovaných buněk, jak bylo prokázáno při jejich aplikaci pod kůži potkanů vedoucí k tvorbě rozsáhlých nádorů (Schmid et al., 2009). Při 32 °C docházelo u klonů k expresi wt p53 způsobující inhibici proliferace u všech klonů (**Obrázek 9B**) a indukující blok buněčného cyklu v G1 fázi (**Fig. 2, 3 Přílohy III**). Pro transformovaný fenotyp REFs exprimující c-Ha-ras je tedy nutná současná inaktivace nádorového supresoru p53, jak již bylo pozorováno dříve (Serrano et al., 1997). Tato pozorování podporují teorii multikrokového procesu karcinogeneze, tzn., že přítomnost pouze jednoho onkoproteinu pro transformovaný charakter buněk není dostačující (Vogelstein et Kinzler, 1993; Hahn et Weinberg, 2002). Při porovnání yREFs a oREFs vykazovaly starší klony vyšší proliferacní potenciál podobně jako u předchozí dvojice klonů.

To, že je G1 blok buněčného cyklu při 32 °C způsoben funkčním proteinem p53 dokazují experimenty s primárními REFs s nízkou bazální hladinou p53, u kterých k podobné akumulaci nedocházelo (Schmid et al., 2009). Tento G1 blok je přechodný, při přesunu buněk z 32 °C zpět do 37 °C dochází vlivem indukce mutantní formy p53^{135Val} k opětovnému vstupu do aktivního buněčného cyklu (**Fig. 4 Přílohy III**).

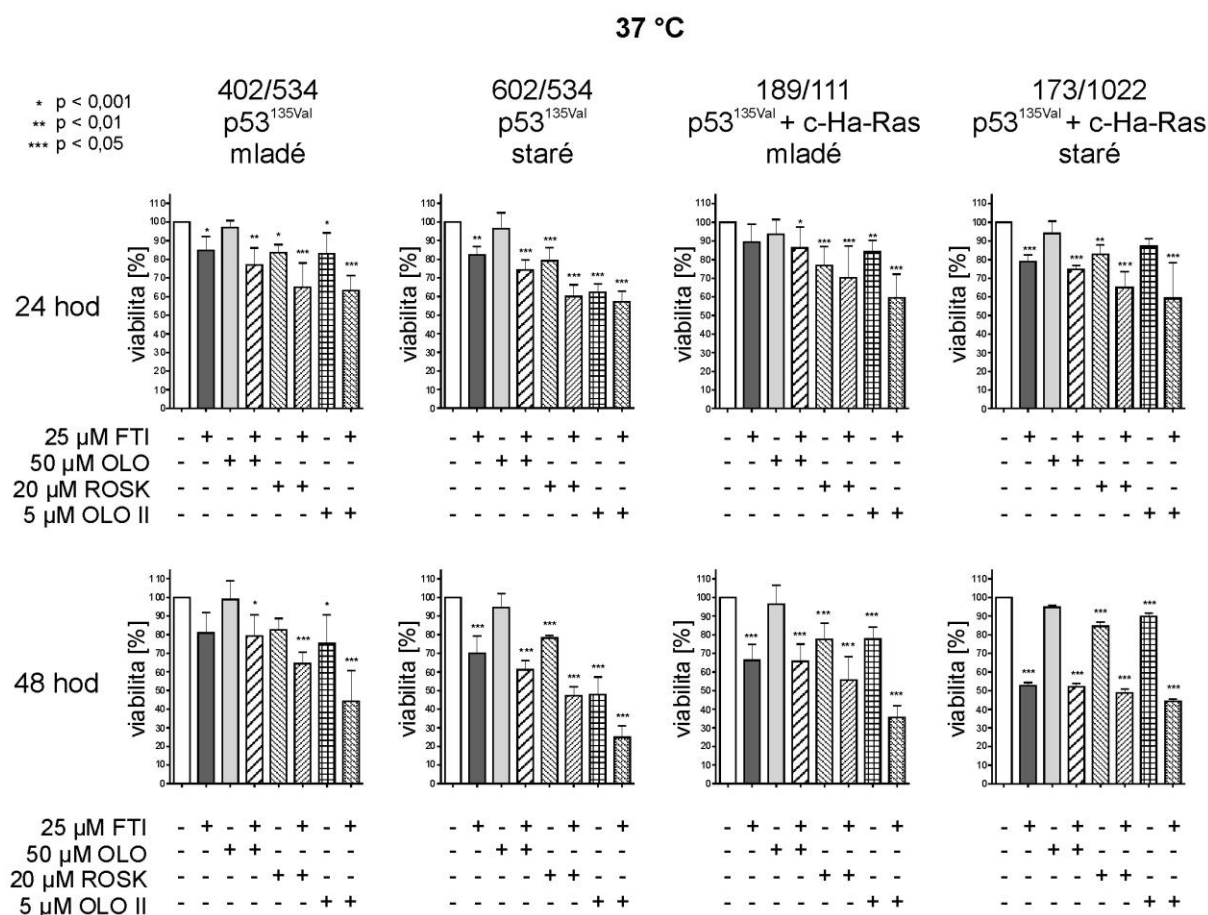


Obrázek 9: Kinetika proliferace teplotně senzitivních (ts) klonů potkaních fibroblastů izolovaných z embrya starého 13,5 dne (402/534, 189/111) nebo 15,5 dne (602/534, 173/1022) po oplození a exprimujících teplotně senzitivní nádorový supresor p53^{135Val} samostatně (klony 402/534, 602/534) anebo v kombinaci s c-Ha-ras (klony 173/1022 a 189/111). Ts p53^{135Val} přepíná mezi nefunkční, mutantní (A; 37 °C) nebo funkční, wild type (B; 32 °C) konformací.

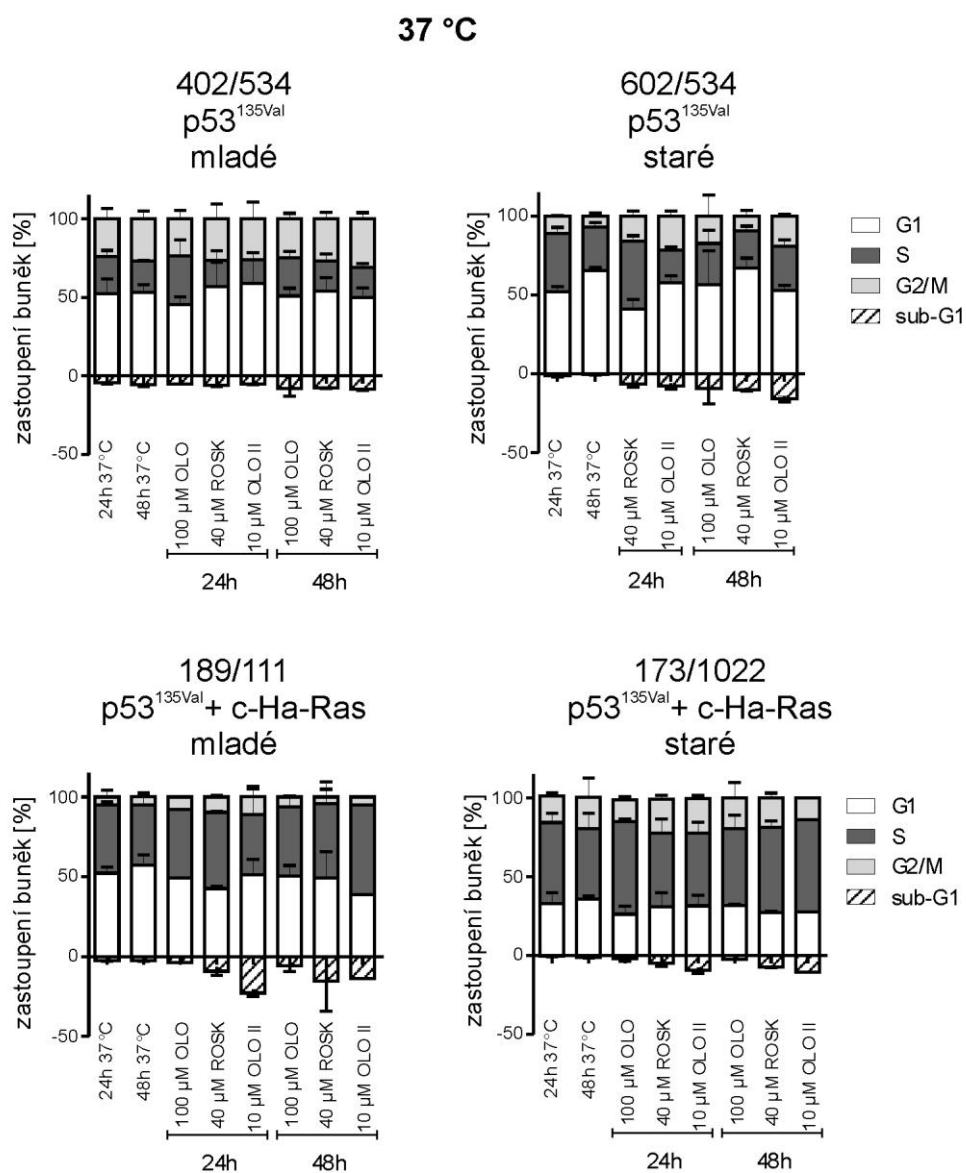
Efekt inhibitorů CDK a inhibitoru farnesyltransferasy na REFs

Pro posouzení vlivu studovaných CDK inhibitorů olomoucínu, roskovitínu a olomoucínu II na immortalizované, popř. transformované buňky jsme sledovali viabilitu klonů kultivovaných při 37 °C a ovlivněných těmito látkami kontinuálně na 24 nebo 48 hod. Dále jsme posuzovali vliv inhibice ras onkoproteinu s využitím inhibitoru farnesyltransferasy L744,832 na citlivost jednotlivých klonů k CDK inhibitorům. Farnesyltransferasa se účastní postranlační modifikace proteinů, zprostředkovává připojení isoprenoidní skupiny farnesylu k nově syntetizovaným proteinům a umožňuje tak jejich asociaci s membránou díky hydrofobnímu charakteru farnesylové skupiny. Jedním z cílů tohoto enzymu jsou právě i členové rodiny proteinů ras, proto i inhibitory farnesyltransferasy (FTI) našly své uplatnění jako potenciální cytostatika. Inhibitory CDK významně snížily viabilitu REFs kultivovaných při 37 °C a exprimujících nefunkční p53^{135Val} (**Obrázek 10**). Při porovnání jednotlivých klonů mezi sebou nebyly pozorovány významné rozdíly, pouze nejpomaleji proliferující linie 402/534 se jevila méně senzitivní k těmto inhibitorům. Inhibitor farnesyltransferasy podle očekávání snížil viabilitu klonů exprimujících c-Ha-ras (189/111, 173/1022), překvapivě však podobným způsobem snížil i viabilitu klonů s nízkou bazální hladinou tohoto proteinu (402/534, 602/534; **Obrázek 10**). Inhibice proteinu ras účinkem FTI zvýšila antiproliferační potenciál použitých CDK inhibitorů

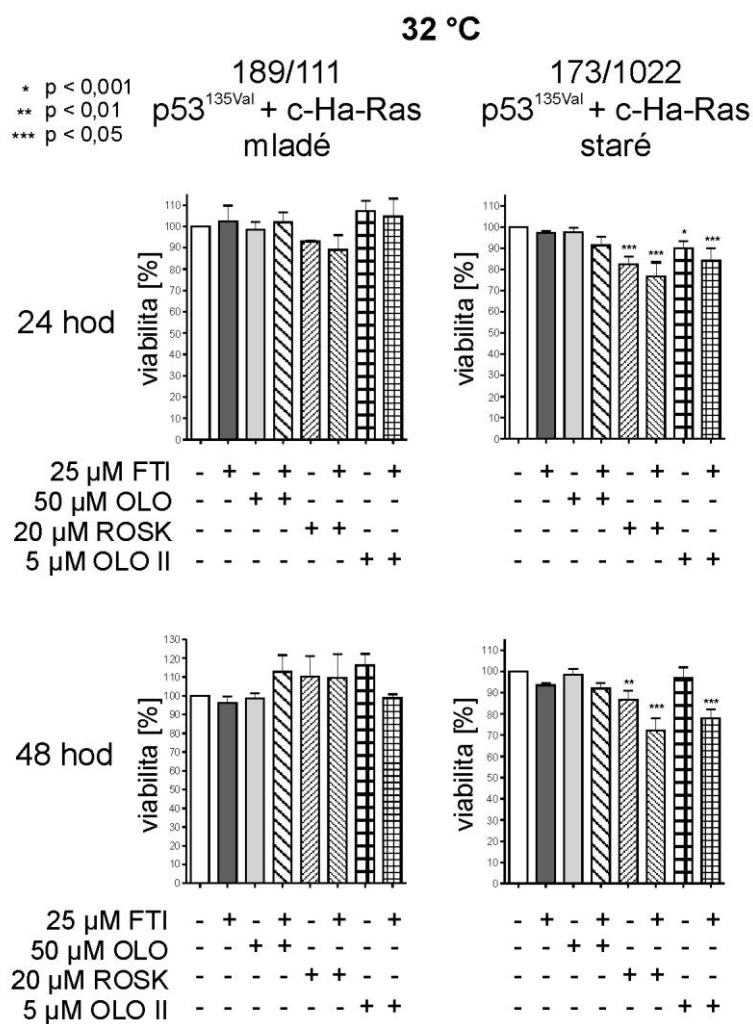
(**Obrázek 10**). Analýza buněčného cyklu neodhalila výrazné změny v distribuci buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu, bylo však možné pozorovat zvýšený podíl sub-G1 oblasti charakteristické pro degradované buňky (**Obrázek 11**). Buňky kultivované při 32 °C a zablokované tedy v G1 fázi buněčného cyklu byly k použitým inhibitorům méně citlivé (**Obrázek 12**) a ani analýza buněčného cyklu neodhalila významné změny (**Obrázek 13**).



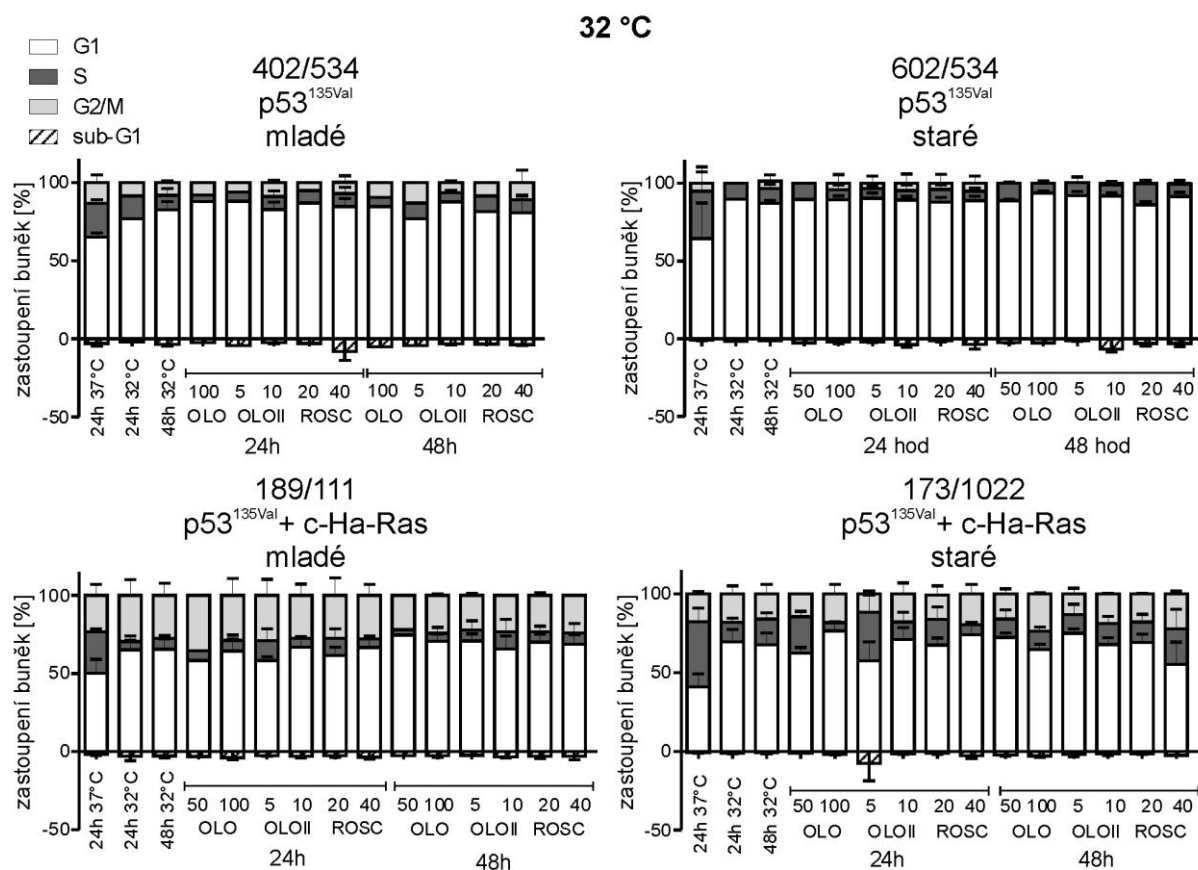
Obrázek 10: Efekt CDK inhibitorů olomoucínu (OLO), roskovitinu (ROSK) a olomoucínu II (OLO II) aplikovaných na 24 nebo 48 hod samostatně anebo v kombinaci s inhibitorem farnesyltransferasy (FTI) na viabilitu klonů potkaních embryonálních fibroblastů kultivovaných při 37 °C a exprimujících mutantní formu p53^{135Val}.



Obrázek 11: Efekt CDK inhibitorů olomoucínu (OLO), roskovitinu (ROSK) a olomoucínu II (OLO II) aplikovaných na 24 nebo 48 hod na buněčný cyklus klonů potkaních embryonálních fibroblastů kultivovaných při 37 °C a exprimujících tedy mutantní formu p53^{135Val}.



Obrázek 12: Efekt CDK inhibitorů olomoucínu (OLO), roskovitínu (ROSK) a olomoucínu II (OLO II) aplikovaných na 24 nebo 48 hod samostatně anebo v kombinaci s inhibitorem farnesyltransferasy (FTI) na viabilitu klonů potkaních embryonálních fibroblastů kultivovaných při 32 °C a exprimujících wild type p53^{135Val}.



Obrázek 13: Efekt CDK inhibitorů olomoucínu (OLO), roskovitinu (ROSK) a olomoucínu II (OLO II) aplikovaných na 24 nebo 48 hod na buněčný cyklus klonů potkaních embryonálních fibroblastů kultivovaných při 32 °C a zablokovaných tedy v G1 fázi buněčného cyklu vlivem exprese wild type p53^{135Val}.

5. Závěr

V první části práce byl studován vztah mezi strukturou a aktivitou nově syntetizované série 6-guanidinopurinů odvozených od struktury olomoucínu či roskovitinu. Všechny připravené deriváty byly testovány na CDK1 a CDK2 inhibiční aktivitu *in vitro*, cytotoxicitu a antiproliferační efekt v nádorové buněčné linii MCF7 odvozené od karcinomu prsu. Nejaktivnější derivát **16g** obsahoval stejný N9- i C2-postranní řetězec jako roskovitin. V porovnání s ním byla jeho aktivita vůči CDK2 přibližně 5x vyšší a v buňkách MCF7 byla tato látka dokonce více než desetinásobně účinnější. Zajímavým zjištěním, které je v kontrastu s předchozími studiemi purinových derivátů, je obecně vyšší aktivita (S)-6-guanidinopurinů v porovnání s jejich (R)-optickými isomery. Testování obou nejúčinnějších (R) a (S)-enantiomerů **16e** a **16g** na panelu proteinkinas odhalilo sníženou selektivitu 6-guanidinopurinů v porovnání s roskovitem vlivem zavedení guanidinoskupiny na pozici C6.

Další část disertační práce byla zaměřena na antiproliferační a anti-angiogenní účinky flavonu eupatorinu, který byl také součástí připraveného chloroformového extraktu z listů rostliny *Orthosiphon stamineus*. Extrakt redukoval viabilitu nádorových buněk a indukoval G2/M blok buněčného cyklu podobně jako čistý, komerčně dodávaný eupatorin odpovídající koncentrace. Z našich experimentů je zřejmé, že eupatorin zásadním způsobem přispívá k celkové aktivitě extraktu. Významnou vlastností eupatorinu je jeho selektivita vůči nádorovým buněčným liniím a naopak nízká aktivita ve zdravých lidských buňkách. Mitotická katastrofa doprovázená apoptózou je pravděpodobně příčinou smrti nádorových buněk ovlivněných tímto flavonem. Eupatorin se ukázal být nespecifickým inhibítozem celé řady kinas včetně CDK. Klíčovou kinasou, jejíž inhibice je nejspíše příčinou antimitotické aktivity eupatorinu, je však pravděpodobně aurora B hrající důležitou úlohu při kondenzaci chromatinu a v kontrolním bodu mitotického vřetenka. Jednou z nejcitlivějších kinas *in vitro* byla i receptorová tyrosinkinasa VEGFR, účastnící se procesu angiogeneze; z tohoto důvodu jsme zkoumali i anti-angiogenní efekt studovaného flavonu. Eupatorin inhiboval jak migraci endoteliálních buněk, tak i jejich schopnost tvorby tubulů, aniž by významně snižoval jejich viabilitu. Potenciální protinádorový efekt eupatorinu tedy nemusí být založen pouze na jeho cytotoxicitě, ale i na schopnosti inhibovat proces nádorové angiogeneze a je tedy vhodným kandidátem pro další *in vivo* testy zaměřené na léčbu solidních nádorů.

Ačkoliv zde zkoumané látky mají zajímavé účinky *in vitro*, teprve po provedení *in vivo* testů bude možné posoudit jejich potenciál jako protinádorová léčiva. V případě eupatorinu bude pravděpodobně klíčová jeho farmakokinetika a farmakodynamika, protože je obecně známým faktem špatná biologická dostupnost flavonoidů i jejich rychlá metabolizace a exkrece z těla. Snížená selektivita 6-guanidinopurinů zase znesnadňuje charakterizaci mechanismu účinků těchto látek, na druhou stranu však představuje dobrý počáteční bod pro vývoj nových inhibitorů zaměřených na různé další proteinkinase cíle.

Posledním tématem bylo posouzení vlivu CDK inhibitorů na mladé a staré potkaní embryonální fibroblasty s různým funkčním statusem proteinů p53 a c-Ha-ras. Všechny studované CDK inhibitory snížily viabilitu klonů s fenotypem imortalizovaných či transformovaných buněk (mutantní p53 samostatně anebo v kombinaci s mutantním c-Ha-ras), naopak ztráta těchto vlastností vlivem exprese funkční, wild type formy p53 s následkem G1 bloku buněčného cyklu vedla ke snížení citlivosti k použitým látkám. FTI snižující aktivitu onkoproteinu c-Ha-ras redukoval podle očekávání viabilitu klonů exprimujících c-Ha-ras, překvapivě však podobným způsobem snížil i viabilitu klonů s nízkou bazální hladinou tohoto proteinu. Současná aplikace FTI s inhibitory CDK vedla k potenciaci jejich účinků. Při porovnání citlivosti mladých a starých klonů vůči použitým inhibitorům nebyl nalezen významný rozdíl.

6. Literatura

- Adam Y, Somchit MN, Sulaiman MR, Nasaruddin AA, Zuraini A, Bustamam AA, Zakaria ZA (2009) Diuretic properties of *Orthosiphon stamineus* Benth. *J Ethnopharmacol* 124: 154–8.
- Adhami VM, Ahmad N, Mukhtar H (2003) Molecular targets for green tea in prostate cancer prevention. *J Nutr* 133: 2417S-2424S.
- Ahamed MB, Aisha AF, Nassar ZD, Siddiqui JM, Ismail Z, Omari SM, Parish CR, Majid AM (2012) Cat's whiskers tea (*Orthosiphon stamineus*) extract inhibits growth of colon tumor in nude mice and angiogenesis in endothelial cells via suppressing VEGFR phosphorylation. *Nutr Cancer* 64: 89-99.
- Akoulitchev S, Chuikov S, Reinberg D (2000) TFIID is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature* 407: 102-6.
- Akowuah GA, Zhari I, Norhayati I, Sadikun A, Khamsah SM (2004) Sinensetin, eupatorin, 3'-hydroxy-5, 6, 7, 4'-tetramethoxyflavone and rosmarinic acid contents and antioxidative effect of *Orthosiphon stamineus* from Malaysia. *Food Chem* 87: 559-566.
- Akowuah GA, Ismail Z, Norhayati I, Sadikun A (2005) The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food Chem* 93: 311–317.
- Aleem E, Kiyokawa H, Kaldis P (2005) Cdc2-cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition. *Nat Cell Biol* 7: 831-6.
- Allen M, Louise Jones J (2011) Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *J Pathol* 223: 162-76.
- Androutsopoulos V, Arrou RR, Hall JF, Surichan S, Potter GA (2008) Antiproliferative and cytostatic effects of the natural product eupatorin on MDA-MB-468 human breast cancer cells due to CYP1-mediated metabolism. *Breast Cancer Res* 10: R39.
- Ausprunk DH, Folkman J (1977) Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 14: 53-65.
- Bach S, Knockaert M, Reinhardt J, Lozach O, Schmitt S, Baratte B, Koken M, Coburn SP, Tang L, Jiang T, Liang DC, Galons H, Dierick JF, Pinna LA, Meggio F, Totzke F, Schachtele C, Lerman AS, Carnero A, Wan YQ, Gray N, Meijer L (2005) Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase. *J Biol Chem* 280: 31208-31219.
- Bailly C (2000) Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs. *Curr Med Chem* 7: 39-58.

- Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur JS, Alessi DR, Cohen P (2007) The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* 408: 297-315.
- Bauer DE, Hatzivassiliou G, Zhao F, Andreadis C, Thompson CB (2005) ATP citrate lyase is an important component of cell growth and trans-formation. *Oncogene* 24: 6314–6322.
- Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D (2000) Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2: 737–744.
- Berlinck RG, Kossuga MH (2005) Natural guanidine derivatives. *Nat Prod Rep* 22: 516-550.
- Berthet C, Aleem E, Coppola V, Tessarollo L, Kaldis P (2003) Cdk2 knockout mice are viable. *Curr Biol* 13: 1775-85.
- Bettayeb K, Oumata N, Echalié A, Ferandin Y, Endicott JA, Galons H, Meijer L (2008) CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Oncogene* 27: 5797-5807.
- Beutler JA, Hamel E, Vlietinck AJ, Haemers A, Rajan P, Roitman JN, Cardellina JH, Boyd MR (1998) Structure-activity requirements for flavone cytotoxicity and binding to tubulin. *J Med Chem* 41: 2333-2338.
- Bianchi G, Oliva L, Cascio P, Pengo N, Fontana F, Cerruti F, Orsi A, Pasqualetto E, Mezghrani A, Calbi V, Palladini G, Giuliani N, Anderson KC, Sitia R, Cenci S (2009) The proteasome load versus capacity balance determines apoptotic sensitivity of multiple myeloma cells to proteasome inhibition. *Blood* 113: 3040-9.
- Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, Lee CT, Lopaschuk GD, Puttagunta L, Harry G, Hashimoto K, Porter CJ, Andrade MA, Thebaud B, Michelakis ED (2007) A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell* 11: 37-51.
- Brandeis M, Rosewell I, Carrington M, Crompton T, Jacobs MA, Kirk J, Gannon J, Hunt T (1998) Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4344-9.
- Brouillard R, Cheminat A (1988) Flavonoids and plant color. *Prog Clin Biol Res* 280: 93-106.
- Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, Kyle S, Meuth M, Curtin NJ, Helleday T (2005) Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 434: 913-917.
- Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 392: 300-303.
- Carpinelli P, Moll J (2008) Aurora kinases and their inhibitors: more than one target and one drug. *Adv Exp Med Biol* 610: 54-73.

- Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Valent A, Raslova H, Yakushijin K, Horne D, Feunteun J, Lenoir G, Medema R, Vainchenker W, Kroemer G (2004) Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. *Oncogene* 23: 4362-4370.
- Cenci S, van Anken E, Sitia R (2011) Proteostenosis and plasma cell pathophysiology. *Curr Opin Cell Biol* 23: 216-22.
- Chang YT, Gray NS, Rosania GR, Sutherlin DP, Kwon S, Norman TC, Sarohia R, Leost M, Meijer L, Schultz PG (1999) Synthesis and application of functionally diverse 2,6,9-trisubstituted purine libraries as CDK inhibitors. *Chem Biol* 6: 361-375.
- Chen Z, Xiao Z, Gu WZ, Xue J, Bui MH, Kovar P, Li G, Wang G, Tao ZF, Tong Y, Lin NH, Sham HL, Wang JY, Sowin TJ, Rosenberg SH, Zhang H (2006) Selective Chk1 inhibitors differentially sensitize p53-deficient cancer cells to cancer therapeutics. *Int J Cancer* 119: 2784-94.
- Chin L, Tam A, Pomerantz J, Wong M, Holash J, Bardeesy N, Shen Q, O'Hagan R, Pantginis J, Zhou H, Horner JW 2nd, Cordon-Cardo C, Yancopoulos GD, DePinho RA (1999) Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature* 400: 468-72.
- Chin JH, Abas HH, Sabariah I (2008) Toxicity study of *Orthosiphon stamineus* Benth (Misai Kucing) on Sprague Dawley rats. *Trop Biomed* 25: 9-16.
- Choi HS, Lee Y, Park KH, Sung JS, Lee JE, Shin ES, Ryu JS, Kim YH (2009) Single-nucleotide polymorphisms in the promoter of the CDK5 gene and lung cancer risk in a Korean population. *J Hum Genet* 54: 298-303.
- Chow SE, Hshu YC, Wang JS, Chen JK (2007) Resveratrol attenuates oxLDL-stimulated NADPH oxidase activity and protects endothelial cells from oxidative functional damages. *J Appl Physiol* 102: 1520-7.
- Chun OK, Chung SJ, Song WO (2007) Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults. *J Nutr* 137: 1244-52.
- Chung JY, Park JO, Phyu H, Dong Z, Yang CS (2001) Mechanisms of inhibition of the Ras-MAP kinase signaling pathway in 30.7b Ras 12 cells by tea polyphenols (-)-epigallocatechin-3-gallate and theaflavin-3,3'-digallate. *FASEB J* 15: 2022-4.
- Ciemerych MA, Sicinski P (2005) Cell cycle in mouse development. *Oncogene* 24: 2877-98.
- Cobrinik D (2005) Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* 24: 2796-809.
- Conde C, Mark M, Oliver FJ, Huber A, de Murcia G, Menissier-de Murcia J (2001) Loss of poly(ADP-ribose) polymerase-1 causes increased tumour latency in p53-deficient mice. *EMBO J* 20: 3535-3543.
- Corcoran MM, Mould SJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Chapman RM, Boright AP, Platt C, Tsui LC, Scherer SW, Oscier DG (1999) Dysregulation of cyclin dependent kinase 6 expression in splenic marginal zone lymphoma through chromosome 7q translocations. *Oncogene* 18: 6271-7.

- Crosio C, Fimia GM, Loury R, Kimura M, Okano Y, Zhou H, Sen S, Allis CD, Sassone-Corsi P (2002) Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. *Mol Cell Biol* 22: 874-885.
- Cruz JC, Tsai LH (2004) A Jekyll and Hyde kinase: roles for Cdk5 in brain development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 14: 390-4.
- DeAzevedo WF, LeClerc S, Meijer L, Havlicek L, Strnad M, Kim SH (1997) Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues - Crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur J Biochem* 243: 518-526.
- DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB (2008) The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7: 11-20.
- Denoyelle C, Abou-Rjaily G, Bezrookove V, Verhaegen M, Johnson TM, Fullen DR, Pointer JN, Gruber SB, Su LD, Nikiforov MA, Kaufman RJ, Bastian BC, Soengas MS (2006) Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nat Cell Biol* 8: 1053-1063.
- Deryugina EI, Quigley JP (2006) Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 25: 9-34.
- Dewhirst MW, Cao Y, Moeller B (2008) Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat Rev Cancer* 8: 425-437.
- Di Pietro A, Conseil G, Pérez-Victoria JM, Dayan G, Baubichon-Cortay H, Trompier D, Steinfels E, Jault JM, de Wet H, Maitrejean M, Comte G, Boumendjel A, Mariotte AM, Dumontet C, McIntosh DB, Goffeau A, Castanys S, Gamarro F, Barron D (2002) Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters. *Cell Mol Life Sci* 59: 307-22.
- Ditchfield C, Johnson VL, Tighe A, Ellston R, Haworth C, Johnson T, Mortlock A, Keen N, Taylor SS (2003) Aurora B couples chromozóme alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J Cell Biol* 161: 267-280.
- Dobberstein RH, Tin-wa M, Fong HH, Crane FA, Farnsworth NR (1977) Flavonoid constituents from *Eupatorium altissimum* L. (Compositae). *J Pharm Sci* 66: 600-2.
- Draviam VM, Orrechia S, Lowe M, Pardi R, Pines J (2001) The localization of human cyclins B1 and B2 determines CDK1 substrate specificity and neither enzyme requires MEK to disassemble the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 152: 945-58.
- Druker BJ (2002) Inhibition of the Bcr-Abl tyrosine kinase as a therapeutic strategy for CML. *Oncogene* 21: 8541-8546.
- Erhart LM, Lankat-Buttgereit B, Schmidt H, Wenzel U, Daniel H, Göke R (2005) Flavone initiates a hierarchical activation of the caspase-cascade in colon cancer cells. *Apoptosis* 10: 611-7.
- Fantin VR, St-Pierre J, Leder P (2006) Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 9: 425-34.

- Fantl V, Stamp G, Andrews A, Rosewell I, Dickson C (1995) Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development. *Genes Dev* 9: 2364-72.
- Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC, Ashworth A (2005) Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434: 917-921.
- Felsher DW, Bishop JM (1999) Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Mol Cell* 4: 199-207.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9: 669–676.
- Ferry DR, Smith A, Malkhandi J, Fyfe DW, deTakats PG, Anderson D, Baker J, Kerr DJ (1996) Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clin Cancer Res* 2: 659-668.
- Fiorentini G, Szasz A (2006) Hyperthermia today: electric energy, a new opportunity in cancer treatment. *J Cancer Res Ther* 2: 41-46.
- Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285: 1182-6.
- Folkman J (2007) Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 6: 273-286.
- Fotsis T, Pepper MS, Aktas E, Breit S, Rasku S, Adlercreutz H, Wähälä K, Montesano R, Schweigerer L (1997) Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res* 57: 2916-21.
- Gallant P, Nigg EA (1994) Identification of a novel vertebrate cyclin: cyclin B3 shares properties with both A- and B-type cyclins. *EMBO J* 13: 595-605.
- Garrido F, Algarra I (2001) MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv Cancer Res* 83: 117-158.
- Garriga J, Graña X (2004) Cellular control of gene expression by T-type cyclin/CDK9 complexes. *Gene* 337: 15-23.
- Geng Y, Whoriskey W, Park MY, Bronson RT, Medema RH, Li T, Weinberg RA, Sicinski P (1999) Rescue of cyclin D1 deficiency by knockin cyclin E. *Cell* 97: 767-77.
- Geng Y, Yu Q, Sicinska E, Das M, Schneider JE, Bhattacharya S, Rideout WM, Bronson RT, Gardner H, Sicinski P (2003) Cyclin E ablation in the mouse. *Cell* 114: 431-43.
- Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B (2008) Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends Cell Biol* 18: 165-173.
- Gray NS, Wodicka L, Thunnissen AM, Norman TC, Kwon S, Espinoza FH, Morgan DO, Barnes G, LeClerc S, Meijer L, Kim SH, Lockhart DJ, Schultz PG (1998) Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors. *Science* 281: 533-538.
- Guppy M, Greiner E, Brand K (1993) The role of the Crabtree effect and an endogenous fuel in the energy metabolism of resting and proliferating thymocytes. *Eur J Biochem* 212: 95-9.

- Hahn WC, Weinberg RA (2002) Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer* 2: 331-41.
- Hansel DE, Dhara S, Huang RC, Ashfaq R, Deasel M, Shimada Y, Bernstein HS, Harmon J, Brock M, Forastiere A, Washington MK, Maitra A, Montgomery E (2005) CDC2/CDK1 expression in esophageal adenocarcinoma and precursor lesions serves as a diagnostic and cancer progression marker and potential novel drug target. *Am J Surg Pathol* 29: 390-9.
- Harper JW, Burton JL, Solomon MJ (2002) The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes Dev* 16: 2179-206.
- Harper JW, Elledge SJ (2007) The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* 28: 739-745.
- Hauf S, Cole RW, LaTerra S, Zimmer C, Schnapp G, Walter R, Heckel A, van Meel J, Rieder CL, Peters JM (2003) The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol* 161: 281-294.
- Havlicek L, Hanus J, Vesely J, LeClerc S, Meijer L, Shaw G, Strnad M (1997) Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *J Med Chem* 40: 408-412.
- Havsteen BH (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther* 96: 67-202.
- Hayette S, Tigaud I, Callet-Bauchu E, Ffrench M, Gazzo S, Wahbi K, Callanan M, Felman P, Dumontet C, Magaud JP, Rimokh R (2003) In B-cell chronic lymphocytic leukemias, 7q21 translocations lead to overexpression of the CDK6 gene. *Blood* 102: 1549-50.
- Hu M, Polyak K (2008) Molecular characterisation of the tumour microenvironment in breast cancer. *Eur J Cancer* 44: 2760-5.
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright W, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F (2004) Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer, *N Engl J Med* 350: 2335–2342.
- Hwang HC, Clurman BE (2005) Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene* 24: 2776-86.
- Igura K, Ohta T, Kuroda Y, Kaji K (2001) Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro. *Cancer Lett* 71: 11-6.
- Ilow R, Regulska-Ilow B, Rozanska D, Misiewicz D, Grajeta H, Kowalisko A, Biernat J (2012) Assessment of Dietary Flavonoid Intake Among 50-year-old Inhabitants of Wroclaw in 2008. *Adv Clin Exp Med* 21: 353-362.
- Jablonska B, Aguirre A, Vandenbosch R, Belachew S, Berthet C, Kaldis P, Gallo V (2007) Cdk2 is critical for proliferation and self-renewal of neural progenitor cells in the adult subventricular zone. *J Cell Biol* 179: 1231-45.

- Jain M, Arvanitis C, Chu K, Dewey W, Leonhardt E, Trinh M, Sundberg CD, Bishop JM, Felsner DW (2002) Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC. *Science* 297: 102-4.
- Jeon S, Choi JY, Lee KM, Park SK, Yoo KY, Noh DY, Ahn SH, Kang D (2010) Combined genetic effect of CDK7 and ESR1 polymorphisms on breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 121: 737-742.
- Jorda R, Havlicek L, Mcnae IW, Walkinshaw MD, Voller J, Sturc A, Navratilova J, Kuzma M, Mistrik M, Bartek J, Strnad M, Krystof V (2011) Pyrazolo[4,3-d]pyrimidine Bioisostere of Roscovitine: Evaluation of a Novel Selective Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases with Antiproliferative Activity. *J Med Chem* 54: 2980-2993.
- Jorda R, Paruch K, Krystof V (2012) Cyclin-dependent kinase inhibitors inspired by roscovitine: purine bioisosteres. *Curr Pharm Des* 18: 2974-2980.
- Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port JL, Altorki N, Port ER, Ruggero D, Shmelkov SV, Jensen KK, Rafii S, Lyden D (2005) VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 438: 820-7.
- Karp JE, Garrett-Mayer EL, Estey EH, Rudek MA, Smith BD, Greer JM, Drye DM, Mackey K, Dorcy KS, Gore SD, Levis MJ, McDevitt MA, Carraway HE, Pratz KW, Gladstone DE, Showell MM, Othus M, Doyle LA, Wright JJ, Pagel JM (2012) Randomized phase II study of two schedules of flavopiridol given as timed sequential therapy with cytosine arabinoside and mitoxantrone for adults with newly diagnosed, poor-risk acute myelogenous leukemia. *Haematologica* 97: 1736-42.
- Kasten M, Giordano A (2001) Cdk10, a Cdc2-related kinase, associates with the Ets2 transcription factor and modulates its transactivation activity. *Oncogene* 20: 1832-8.
- Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M (1999) Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Biosci Biotechnol Biochem* 63: 896-9.
- Kennedy RD, Chen CC, Stuckert P, Archila EM, De la Vega MA, Moreau LA, Shimamura A, D'Andrea AD (2007) Fanconi anemia pathway-deficient tumor cells are hypersensitive to inhibition of ataxia telangiectasia mutated. *J Clin Invest* 117: 1440-1449.
- Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N (1993) Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature* 362: 841-844.
- Kim DO, Lee KW, Lee HJ, Lee CY (2002) Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J Agric Food Chem* 50: 3713-7.
- Kim SJ, Nakayama S, Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki Y, Matsushima T, Torikoshi Y, Tanaka S, Yoshida T, Ishihara H, Noguchi S (2008) Determination of the specific activity of CDK1 and CDK2 as a novel prognostic indicator for early breast cancer. *Ann Oncol* 19: 68-72.

- Kisselev AF, van der Linden WA, Overkleeft HS (2012) Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target. *Chem Biol* 19: 99-115.
- Kozar K, Ciemerych MA, Rebel VI, Shigematsu H, Zagodzón A, Sicinska E, Geng Y, Yu Q, Bhattacharya S, Bronson RT, Akashi K, Sicinski P (2004) Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell* 118: 477-91.
- Krystof V, Lenobel R, Havlíček L, Kuzma M, Strnad M (2002) Synthesis and biological activity of olomoucine II. *Bioorg Med Chem Lett* 12: 3283-6.
- Krystof V, McNae IW, Walkinshaw MD, Fischer PM, Muller P, Vojtesek B, Orsag M, Havlicek L, Strnad M (2005) Antiproliferative activity of olomoucine II, a novel 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cell Mol Life Sci* 62: 1763-1771.
- Kuntz S, Wenzel U, Daniel H (1999) Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Nutr* 38: 133-142.
- Kusume T, Tsuda H, Kawabata M, Inoue T, Umesaki N, Suzuki T, Yamamoto K (1999) The p16-cyclin D1/CDK4-pRb pathway and clinical outcome in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 5: 4152-7.
- Lapenna S, Giordano A (2009) Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Drug Discov* 8: 547-566.
- Lee AC, Fenster BE, Ito H, Takeda K, Bae NS, Hirai T, Yu ZX, Ferrans VJ, Howard BH, Finkel T (1999) Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 274: 7936-7940.
- Lee WR, Shen SC, Lin HY, Hou WC, Yang LL, Chen YC (2002) Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase 3 and Ca(2+)-dependent endonuclease. *Biochem Pharmacol* 63: 225-36.
- Lin JK, Chen PC, Ho CT, Lin-Shiau SY (2000) Inhibition of xanthine oxidase and suppression of intracellular reactive oxygen species in HL-60 cells by theaflavin-3,3'-digallate, (-)-epigallocatechin-3-gallate, and propyl gallate. *J Agric Food Chem* 48: 2736-43.
- Liu D, Matzuk MM, Sung WK, Guo Q, Wang P, Wolgemuth DJ (1998) Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse. *Nat Genet* 20: 377-80.
- Liu JL, Wang XY, Huang BX, Zhu F, Zhang RG, Wu G (2011) Expression of CDK5/p35 in resected patients with non-small cell lung cancer: relation to prognosis. *Med Oncol* 28: 673-8.
- Lock RB, Stribinskiene L (1996) Dual modes of death induced by etoposide in human epithelial tumor cells allow Bcl-2 to inhibit apoptosis without affecting clonogenic survival. *Cancer Res* 56: 4006-4012.
- Lolli G, Johnson LN (2005) CAK-Cyclin-dependent Activating Kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs? *Cell Cycle* 4: 572-7.

- Loon YH, Wong JW, Yap SP, Yuen KH (2005) Determination of flavonoids from *Orthosiphon stamineus* in plasma using a simple HPLC method with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 816: 161–166.
- Loyer P, Trembley JH, Katona R, Kidd VJ, Lahti JM (2005) Role of CDK/cyclin complexes in transcription and RNA splicing. *Cell Signal* 17: 1033-51.
- Malumbres M, Barbacid M (2001) To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 1: 222-31.
- Malumbres M, Sotillo R, Santamaría D, Galán J, Cerezo A, Ortega S, Dubus P, Barbacid M (2004) Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* 118: 493-504.
- Malumbres M, Barbacid M (2005) Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 30: 630-641.
- Malumbres M, Harlow E, Hunt T, Hunter T, Lahti JM, Manning G, Morgan DO, Tsai LH, Wolgemuth DJ (2009) Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nat Cell Biol* 11: 1275-6.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79: 727-47
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81: 230S-242S.
- Mantena SK, Meeran SM, Elmets CA, Katiyar SK (2005) Orally administered green tea polyphenols prevent ultraviolet radiation-induced skin cancer in mice through activation of cytotoxic T cells and inhibition of angiogenesis in tumors. *J Nutr* 135: 2871-7.
- Marone M, Scambia G, Giannitelli C, Ferrandina G, Masciullo V, Bellacosa A, Benedetti-Panici P, Mancuso S (1998) Analysis of cyclin E and CDK2 in ovarian cancer: gene amplification and RNA overexpression. *Int J Cancer* 75: 34-9.
- Meijer L, Borgne A, Mulner O, Chong JP, Blow JJ, Inagaki N, Inagaki M, Delcros JG, Moulinoux JP (1997) Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem* 243: 527-536.
- Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 52: 673-751.
- Mihara M, Shintani S, Nakahara Y, Kiyota A, Ueyama Y, Matsumura T, Wong DT (2001) Overexpression of CDK2 is a prognostic indicator of oral cancer progression. *Jpn J Cancer Res* 92: 352-60.
- Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, Shenkier T, Cella D, Davidson NE (2007) Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 357: 2666–2676.

- Mojzis J, Varinska L, Mojzisova G, Kostova I, Mirossay L (2008) Antiangiogenic effects of flavonoids and chalcones. *Pharmacol Res* 57: 259-265.
- Morris ME, Zhang S (2006) Flavonoid-drug interactions: effects of flavonoids on ABC transporters. *Life Sci* 78: 2116-30.
- Murphy M, Stinnakre MG, Senamaud-Beaufort C, Winston NJ, Sweeney C, Kubelka M, Carrington M, Bréchet C, Sobczak-Thépot J (1997) Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene. *Nat Genet* 15: 83-86.
- Nagao T, Abe F, Kinjo J, Okabe H (2002) Antiproliferative constituents in plants 10. Flavones from the leaves of *Lantana montevidensis* Briq. and consideration of structure-activity relationship. *Biol Pharm Bull* 25: 875-879.
- Nakayama S, Torikoshi Y, Takahashi T, Yoshida T, Sudo T, Matsushima T, Kawasaki Y, Katayama A, Gohda K, Hortobagyi GN, Noguchi S, Sakai T, Ishihara H, Ueno NT (2009) Prediction of paclitaxel sensitivity by CDK1 and CDK2 activity in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 11: R12.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13: 9-22.
- Nguyen TB, Manova K, Capodiceci P, Lindon C, Bottega S, Wang XY, Refik-Rogers J, Pines J, Wolgemuth DJ, Koff A (2002) Characterization and expression of mammalian cyclin b3, a prepachytene meiotic cyclin. *J Biol Chem* 277: 41960-9.
- Oak MH, El Bedoui J, Schini-Kerth VB (2005) Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. *J Nutr Biochem* 16: 1-8.
- Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L (2006) VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 359-371.
- Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA (2005) Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121: 335-48.
- Ortega S, Malumbres M, Barbacid M (2002) Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1602: 73-87.
- Ortega S, Prieto I, Odajima J, Martín A, Dubus P, Sotillo R, Barbero JL, Malumbres M, Barbacid M (2003) Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat Genet* 35: 25-31.
- Oumata N, Bettayeb K, Ferandin Y, Demange L, Lopez-Giral A, Goddard ML, Myrianthopoulos V, Mikros E, Flajolet M, Greengard P, Meijer L, Galons H (2008) Roscovitine-derived, dual-specificity inhibitors of cyclin-dependent kinases and casein kinases 1. *J Med Chem* 51: 5229-5242.

- Papp B, Pal C, Hurst LD (2003) Dosage sensitivity and the evolution of gene families in yeast. *Nature* 424: 194-197.
- Parisi T, Beck AR, Rougier N, McNeil T, Lucian L, Werb Z, Amati B (2003) Cyclins E1 and E2 are required for endoreplication in placental trophoblast giant cells. *EMBO J* 22: 4794-803.
- Pelengaris S, Littlewood T, Khan M, Elia G, Evan G (1999) Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion. *Mol Cell* 5: 565-77.
- Perez-Cadahia B, Drohic B, Davie JR (2009) H3 phosphorylation: dual role in mitosis and interphase. *Biochem Cell Biol* 87: 695-709.
- Pfeiffer T, Schuster S, Bonhoeffer S (2001) Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science* 292: 504-7.
- Pollack JR, Sorlie T, Perou CM, Rees CA, Jeffrey SS, Lonning PE, Tibshirani R, Botstein D, Borresen-Dale AL, Brown PO (2002) Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 12963-12968.
- Poomsawat S, Buajeeb W, Khovidhunkit SO, Punyasingh J (2010) Alteration in the expression of cdk4 and cdk6 proteins in oral cancer and premalignant lesions. *J Oral Pathol Med* 39: 793-9.
- Posy SL, Hermsmeier MA, Vaccaro W, Ott KH, Todderud G, Lippy JS, Trainor GL, Loughney DA, Johnson SR (2011) Trends in Kinase Selectivity Insights for Target Class-Focused Library Screening. *J Med Chem* 54: 54-66.
- Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM (2006) Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 441: 437-443.
- Prigent C, Dimitrov S (2003) Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J Cell Sci* 116: 3677-3685.
- Rajendran P, Ekambaram G, Sakthisekaran D (2008) Cytoprotective effect of mangiferin on benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in swiss albino mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 103: 137-42.
- Ren S, Rollins BJ (2004) Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell* 117: 239-51.
- RiceEvans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20: 933-956.
- Roberts PJ, Der CJ (2007) Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26: 3291-3310.
- Roninson IB, Broude EV, Chang BD (2001) If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat* 4: 303-313.
- Sahib HB, Ismail Z, Othman NH, Majid AMSA (2009) Orthosiphon stamineus Benth. methanolic extract enhances the anti-proliferative effects of tamoxifen on human hormone dependent breast cancer. *Int J Pharm* 5: 273-276.

- Sakagami H, Jiang Y, Kusama K, Atsumi T, Ueha T, Toguchi M, Iwakura I, Satoh K, Fukai T, Nomura T (2000) Induction of apoptosis by flavones, flavonols (3-hydroxyflavones) and isoprenoid-substituted flavonoids in human oral tumor cell lines. *Anticancer Res* 20: 271-7.
- Salmela AL, Pouwels J, Kukkonen-Macchi A, Waris S, Toivonen P, Jaakkola K, Maki-Jouppila J, Kallio L, Kallio MJ (2012) The flavonoid eupatorin inactivates the mitotic checkpoint leading to polyploidy and apoptosis. *Exp Cell Res* 318: 578-92.
- Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, Lilienbaum R, Johnson DH (2006) Paclitaxel–carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 355: 2542–2550.
- Santamaría D, Barrière C, Cerqueira A, Hunt S, Tardy C, Newton K, Cáceres JF, Dubus P, Malumbres M, Barbacid M (2007) Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* 448: 811-5.
- Scalbert A, Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130: 2073S-85S.
- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM (1993) The Hpv-16 E6 and E6-Ap Complex Functions As A Ubiquitin-Protein Ligase in the Ubiquitination of P53. *Cell* 75: 495-505.
- Schiff PB, Fant J, Horwitz SB (1979) Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 277: 665-7.
- Schinella GR, Giner RM, Recio MC, Mordujovich de Buschiazzi P, Ríos JL, Máñez S (1998) Anti-inflammatory effects of South American *Tanacetum vulgare*. *J Pharm Pharmacol* 50: 1069-74.
- Schmid G, Kramer MP, Wesierska-Gadek J (2009) p53-mediated regulation of cell cycle progression: pronounced impact of cellular microenvironment. *J Cell Physiol* 219: 459-69.
- Semczuk A, Miturski R, Skomra D, Jakowicki JA (2004) Expression of the cell-cycle regulatory proteins (pRb, cyclin D1, p16INK4A and cdk4) in human endometrial cancer: correlation with clinicopathological features. *Arch Gynecol Obstet* 269: 104-10.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88: 593-602.
- Sharma S, Yang SC, Zhu L, Reckamp K, Gardner B, Baratelli F, Huang M, Batra RK, Dubinett SM (2005) Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E2-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4+ CD25+ T regulatory cell activities in lung cancer. *Cancer Res* 65: 5211-5220.
- Sharma SV, Settleman J (2007) Oncogene addiction: setting the stage for molecularly targeted cancer therapy. *Genes Dev* 21: 3214-3231.
- Sherr CJ, Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13: 1501-12.
- Shojaei F (2012) Anti-angiogenesis therapy in cancer: current challenges and future perspectives. *Cancer Lett* 320: 130-7.

- Sholley MM, Ferguson GP, Seibel HR, Montour JL, Wilson JD (1984) Mechanisms of neovascularization. Vascular sprouting can occur without proliferation of endothelial cells. *Lab Invest* 51: 624-34.
- Siddiqui IA, Adhami VM, Afaq F, Ahmad N, Mukhtar H (2004) Modulation of phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B- and mitogen-activated protein kinase-pathways by tea polyphenols in human prostate cancer cells. *J Cell Biochem* 91: 232-42.
- Simon R, Struckmann K, Schraml P, Wagner U, Forster T, Moch H, Fijan A, Bruderer J, Wilber K, Mihatsch MJ, Gasser T, Sauter G (2002) Amplification pattern of 12q13-q15 genes (MDM2, CDK4, GLI) in urinary bladder cancer. *Oncogene* 21: 2476-83.
- Simons AL, Ahmad IM, Mattson DM, Dornfeld KJ, Spitz DR (2007) 2-Deoxy-D-glucose combined with cisplatin enhances cytotoxicity via metabolic oxidative stress in human head and neck cancer cells. *Cancer Res* 67: 3364-70.
- Singh RP, Agarwal R (2006) Natural flavonoids targeting deregulated cell cycle progression in cancer cells. *Curr Drug Targets* 7: 345-354.
- Singh RP, Deep G, Chittezhath M, Kaur M, Dwyer-Nield LD, Malkinson AM, Agarwal R (2006) Effect of silibinin on the growth and progression of primary lung tumors in mice. *J Natl Cancer Inst* 98: 846-55.
- Stolina M, Sharma S, Lin Y, Dohadwala M, Gardner B, Luo J, Zhu L, Kronenberg M, Miller PW, Portanova J, Lee JC, Dubinett SM (2000) Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. *J Immunol* 164: 361-370.
- Strebhardt K, Ullrich A (2006) Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 6: 321-330.
- Szatrowski TP, Nathan CF (1991) Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 51: 794-798.
- Teillet F, Boumendjel A, Boutonnat J, Ronot X (2008) Flavonoids as RTK inhibitors and potential anticancer agents. *Med Res Rev* 28: 715-745.
- Terrano DT, Upreti M, Chambers TC (2010) Cyclin-dependent kinase 1-mediated Bcl-xL/Bcl-2 phosphorylation acts as a functional link coupling mitotic arrest and apoptosis. *Mol Cell Biol* 30: 640-656.
- Tezuka Y, Stampoulis P, Banskota AH, Awale S, Tran KQ, Saiki I, Kadota S (2000) Constituents of the Vietnamese medicinal plant *Orthosiphon stamineus*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 48: 1711-1719.
- Thompson SL, Compton DA (2010) Proliferation of aneuploid human cells is limited by a p53-dependent mechanism. *J Cell Biol* 188: 369-81.
- Timberlake CF, Henry BS (1986) Plant pigments as natural food colours. *Endeavour* 10: 31-6.

- Torres K, Horwitz SB (1998) Mechanisms of Taxol-induced cell death are concentration dependent. *Cancer Res* 58: 3620-3626.
- Torres EM, Sokolsky T, Tucker CM, Chan LY, Boselli M, Dunham MJ, Amon A (2007) Effects of aneuploidy on cellular physiology and cell division in haploid yeast. *Science* 317: 916-924.
- Tounekti O, Pron G, Belehradec J, Jr., Mir LM (1993) Bleomycin, an apoptosis-mimetic drug that induces two types of cell death depending on the number of molecules internalized. *Cancer Res* 53: 5462-5469.
- Tran K (1990) *Medicinal Plants in Viet Nam*. Science and Technology Publishing House, Hanoi.
- Trova MP, Barnes KD, Barford C, Benanti T, Bielaska M, Burry L, Lehman JM, Murphy C, O'Grady H, Peace D, Salamone S, Smith J, Snider P, Toporowski J, Tregay S, Wilson A, Wyle M, Zheng X, Friedrich TD (2009) Biaryl purine derivatives as potent antiproliferative agents: inhibitors of cyclin dependent kinases. Part I. *Bioorg Med Chem Lett* 19: 6608-6612.
- Trova MP, Barnes KD, Alicea L, Benanti T, Bielaska M, Bilotta J, Bliss B, Duong TN, Haydar S, Herr RJ, Hui Y, Johnson M, Lehman JM, Peace D, Rainka M, Snider P, Salamone S, Tregay S, Zheng X, Friedrich TD (2009) Heterobiaryl purine derivatives as potent antiproliferative agents: inhibitors of cyclin dependent kinases. Part II. *Bioorg Med Chem Lett* 19: 6613-6617.
- Tsutsui T, Hesabi B, Moons DS, Pandolfi PP, Hansel KS, Koff A, Kiyokawa H (1999) Targeted disruption of CDK4 delays cell cycle entry with enhanced p27(Kip1) activity. *Mol Cell Biol* 19: 7011-9.
- Ubersax JA, Woodbury EL, Quang PN, Paraz M, Blethrow JD, Shah K, Shokat KM, Morgan DO (2003) Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* 425: 859-64.
- van den Heuvel S, Harlow E (1993) Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* 262: 2050-4.
- Vesely J, Havlicek L, Strnad M, Blow JJ, Donella-Deana A, Pinna L, Letham DS, Kato J, Detivaud L, LeClerc S (1994) Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur J Biochem* 224: 771-786.
- Vogelstein B, Kinzler KW (1993) The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9: 138-41.
- Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK (1999) Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur J Cancer* 35: 1517-25.
- Wang HQ, Altomare DA, Skele KL, Poulikakos PI, Kuhajda FP, Di Cristofano A, Testa JR (2005) Positive feedback regulation between AKT activation and fatty acid synthase expression in ovarian carcinoma cells. *Oncogene* 24: 3574-82.
- Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT (1971) Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* 93: 2325-2327.
- Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. *Science* 123: 309-314.

- Weaver BA, Cleveland DW (2005) Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer Cell* 8: 7-12.
- Weinstein IB (2002) Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* 297: 63-4.
- Weng CJ, Yen GC (2012) Flavonoids, a ubiquitous dietary phenolic subclass, exert extensive in vitro anti-invasive and in vivo anti-metastatic activities. *Cancer Metastasis Rev* 31: 323-51.
- Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H (2000) Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 60: 3823-31.
- Whitesell L, Lindquist SL (2005) HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* 5: 761-772.
- Williamson G, Barron D, Shioi K, Terao J (2005) In vitro biological properties of flavonoid conjugates found in vivo. *Free Radical Res* 39: 457-469.
- Williamson DS, Parratt MJ, Bower JF, Moore JD, Richardson CM, Dokurno P, Cansfield AD, Francis GL, Hebden RJ, Howes R, Jackson PS, Lockie AM, Murray JB, Nunns CL, Powles J, Robertson A, Surgenor AE, Torrance CJ (2005) Structure-guided design of pyrazolo[1,5-a]pyrimidines as inhibitors of human cyclin-dependent kinase 2. *Bioorg Med Chem Lett* 15: 863-867.
- Yam MF, Basir R, Asmawi MZ, Ismail Z (2007) Antioxidant and hepatoprotective effects of *Orthosiphon stamineus* Benth. standardized extract. *Am J Chin Med* 35: 115-126.
- Yam MF, Asmawi MZ, Basir R (2008) An investigation of the anti-inflammatory and analgesic effects of *Orthosiphon stamineus* leaf extract. *J Med Food* 11: 362-8.
- Yam MF, Ang LF, Basir R, Salman IM, Ameer OZ, Asmawi MZ (2009) Evaluation of the anti-pyretic potential of *Orthosiphon stamineus* Benth standardized extract. *Inflammopharmacology* 17: 50-4.
- Yam MF, Lim V, Salman IM, Ameer OZ, Ang LF, Rosidah N, Abdulkarim MF, Abdullah GZ, Basir R, Sadikun A, Asmawi MZ (2010) HPLC and anti-inflammatory studies of the flavonoid rich chloroform extract fraction of *Orthosiphon stamineus* leaves. *Molecules* 15: 4452-4466.
- Zhai S, Senderowicz AM, Sausville EA, Figg WD (2002) Flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in clinical development. *Ann Pharmacother* 36: 905-11.
- Zhang Q, Tang X, Lu Q, Zhang Z, Rao J, Le AD (2006) Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibit hypoxia- and serum-induced HIF-1 α protein accumulation and VEGF expression in human cervical carcinoma and hepatoma cells. *Mol Cancer Ther* 5: 1227-38.

7. Seznam použitých zkratek

ABC transportér	ATP-binding cassette transportér
APC	Anaphase-promoting complex
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
CAK	CDK-aktivující kinasa
CDK	Cyclin-dependent kinase
COX2	Cyklooxygenasa 2
CTD	C-terminal domain
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extracelulární matrix
ERK	Extracellular-signal-regulated kinase
FTI	Inhibitor farnesyltransferasy
GSK3- β	Glycogen synthase kinase 3 β
HIF1	Hypoxia-inducible factor 1
IC50	50% inhibitory concentration
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Mcl-1	Myeloid-cell leukemia 1
MCM	Minichromozóme maintenance
Mdm-2	Murine double minute 2
MHC	Major histocompatibility complex
MM	Mnohočetný myelom
MMP	Matrixové metaloproteinasy
mRNA	Messenger ribonucleic acid
OLO	Olomoucín
OLOII	Olomoucín II
P-TEF	Positive transcription elongation factor
PARP	Poly(ADP-ribose)polymerasa
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PDK	Pyruvátdehydrogenasakinasa
PGE2	Prostaglandin 2
pH3 ^{Ser10}	Histon H3 fosforylovaný na serinu 10
PLK	Polo-like kinase
Rb	Retinoblastoma protein
REFs	Potkaní embryonální fibroblasty

ROS	Volné kyslíkové radikály
ROSK	Roskovitin
RTK	Receptor tyrosine kinase
SDF1	Stromal-derived factor 1
TFIIH	Transcription factor II H
ts p53 ^{135Val}	Teplotně senzitivní mutantní p53 se substitucí alaninu 135 valinem a přepínající mezi mutantní konformací při 37 °C a funkční, wilde type konformací při 32 °C
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor

8. Curriculum vitae

Jméno: Iva Dolečková
Narozena: 13.2.1984 v Hradci Králové
Adresa: Formánkova 429, Hradec Králové 11, 500 11
Státní příslušnost: ČR

Vzdělání:

- 2008 -** - Doktorské studium
- Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta
- Obor: Biochemie
- Téma disertační práce: Biologické a biochemické účinky vybraných inhibitorů proliferace
- 2006 - 2008** - Magisterské studium
- Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta
- Obor: Učitelství biologie-chemie pro střední školy
- Téma diplomové práce: Antiproliferační účinky vybraných inhibitorů polymerizace tubulinu
- 2003 - 2006** - Bakalářské studium
- Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta
- Obor: Biologie-chemie se zaměřením na vzdělávání
- Téma bakalářské práce: Mikrotubulární cytoskelet jako cíl pro farmakologicky aktivní sloučeniny

Jazyky:

- Anglický zkouška na úrovni B2 v rámci doktorského studia podle testů IELTS

Výzkumná stáž:

2008 - 2009, 10 měsíců

- Medical University of Vienna, Institute of Cancer Research
Studium vlivu vybraných inhibitorů cyklin-dependentních kinas na klony potkaních embryonálních fibroblastů exprimující teplotně senzitivní nádorový supresor p53 samostatně anebo v kombinaci s mutantním onkoproteinem c-Ha-ras.

Publikace:

- Dolečková, I., Česnek, M., Dračinský, M., Brynda, J., Voller, J., Janeba, Z., Kryštof, V., Synthesis and biological evaluation of guanidino analogues of roscovitine, *European Journal of Medicinal Chemistry* 62C, 443-452, 2013.
- Dolečková, I., Rárová, L., Grúz, J., Vondrusová, M., Strnad, M., Kryštof, V., Antiproliferative and antiangiogenic effects of flavone eupatorin, an active constituent of chloroform extract of *Orthosiphon stamineus* leaves, *Fitoterapia* 83, 1000-7, 2012.
- Węsierska-Gadek, J., Walzi, E., Dolečková, I., Schmidt, G., Oncogenes do not Fully Override Cell-intrinsic Traits: Pronounced Impact of the Cellular Programme, *Cancer Microenvironment* 2, 215-225, 2009.

Účast na konferencích a odborných seminářích:

- | | |
|-------------------------|---|
| 2011 | Trends in natural products research a PSE young scientists' meeting, Kolymbari, Kréta, poster |
| 2011 | Nová léčiva závažných lidských onemocnění, Kouty nad Desnou, ČR, ústní sdělení |
| 2011 | The Student Scientific Conference on Cancer Research, Brno, ČR, poster |
| 2011 | Cell Cycle Regulators/Inhibitors and Cancer, Vídeň, Rakousko, poster |
| 2010 | 22 nd EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Berlín, Německo |
| 2009, 2010, 2011 | Odborný seminář katedry biochemie, ústní sdělení |
| 2009, 2010 | Seminář záměru MŠM 6198959216, ústní sdělení |

Úspěchy v soutěžích

- | | |
|-------------|--|
| 2012 | 1. místo, studentská vědecká soutěž o cenu děkana, kategorie Chemie, doktorandská sekce, Univerzita Palackého v Olomouci |
|-------------|--|

Pedagogická činnost

- | | |
|-------------|--|
| 2010 | Laboratorní cvičení z biochemie (KBC/BCHC), 2 skupiny, 1 semestr |
|-------------|--|

Účast v projektech:

- | | |
|-------------|--|
| 2012 | Datalab – otevřená laboratoř biotechnologických aplikací |
| 2012 | Hlavní řešitelka projektu FRVŠ: Zavedení nových úloh do cvičení z experimentální biologie (sledování apoptosy pomocí průtokové cytometrie, fluorescenční mikroskopie, sledování aktivity enzymů fluorescenčně) |
| 2011 | Hlavní řešitelka projektu FRVŠ: Zavedení nových úloh do cvičení z buněčné biologie (fluorescenční mikroskopie) |

- 2009 - 2011** Aesculab – systematické laboratorní vzdělávání studentů a pracovníků VaV v oblasti Life Sciences s podporou e-learningu
- 2007** MedVěd – Projekt medializace a popularizace vědy PřF UP Olomouc
- 2006** Spoluřešitelka projektu FRVŠ: Indukce apoptosy nádorových buněčných linií myoseverinem a jeho analogy

9. Prohlášení o spoluautorství

Dolečková, I., Česnek, M., Dračinský, M., Brynda, J., Voller, J., Janeba, Z., Kryštof, V., Synthesis and biological evaluation of guanidino analogues of roscovitine, European Journal of Medicinal Chemistry 62C, 443-452, 2013.

Iva Dolečková se podílela na testování biologické aktivity připravených derivátů, vyhodnocování dat, psaní textu, grafické úpravě publikace, odesílala jej do redakce a vyřizovala příslušnou korespondenci.

Souhlasím s uvedenými informacemi

Kryštof, V.

.....

Voller, J.

.....

Dolečková, I., Česnek, M., Dračinský, M., Brynda, J., Voller, J., Janeba, Z., Kryštof, V., Synthesis and biological evaluation of guanidino analogues of roscovitine, European Journal of Medicinal Chemistry 62C, 443-452, 2013.

Iva Dolečková se podílela na testování biologické aktivity připravených derivátů, na vyhodnocování dat, psaní textu, grafické úpravě publikace, odesílala jej do redakce a vyřizovala příslušnou korespondenci.

Souhlasím s uvedenými informacemi:

V Praze dne 26. 3. 2013

.....

Michal Česnek

Dolečková, I., Rárová, L., Grúz, J., Vondrusová, M., Strnad, M., Kryštof, V., Antiproliferative and antiangiogenic effects of flavone eupatorin, an active constituent of chloroform extract of *Orthosiphon stamineus* leaves, *Fitoterapia* 83, 1000-7, 2012.

Iva Dolečková se podílela na většině experimentální části (průtoková cytometrie, fluorescenční mikroskopie, western blotting, měření aktivity enzymů), na vyhodnocování dat, psaní textu, grafické úpravě publikace, odesílala jej do redakce a vyřizovala příslušnou korespondenci.

Souhlasím s uvedenými informacemi

Grúz, J.

Kryštof, V.

Rárová, L.

Strnad, M.

Węsierska-Gadek, J., Walzi, E, Dolečková, I., Schmidt, G., Oncogenes do not Fully Override Cell-intrinsic Traits: Pronounced Impact of the Cellular Programme, *Cancer Microenvironment* 2, 215-225, 2009.



Univ.-Prof. J. Gadek-Wesierski, PhD

Cell Cycle Regulation Group
Borschkegasse 8a
A-1090 Vienna, Austria



Department of Medicine I

Vienna, March 22, 2013

Confirmation of the contribution to the publication

This is to certify that Ms. **Iva Dolečková** essentially contributed to the scientific article entitled: "Oncogenes do not Fully Override Cell-intrinsic Traits: Pronounced Impact of the Cellular Programme" by J. Węsierska-Gadek, E. Walzi, I. Dolečková & G. Schmid published 2009 in *Cancer Microenvironment* 2: 215-225.

Iva Dolečková performed following experiments:

- Determination of the number of viable cells for kinetics of cell proliferation (growth curves)
- Determination of the number of viable cells after treatment with distinct drugs
- Propidium iodide staining of cells for determination of the DNA concentration in single cells by flow cytometry.

Furthermore, Ms. Iva Dolečková analyzed the data, performed the statistic analyses and prepared figures for publication.

Univ.-Prof. Dr. Jozefa Gadek-Wesierski

10. Seznam příloh

- I Dolečková, I., Česnek, M., Dračinský, M., Brynda, J., Voller, J., Janeba, Z., Kryštof, V., Synthesis and biological evaluation of guanidino analogues of roscovitine, *European Journal of Medicinal Chemistry* 62C, 443-452, 2013.
- II Dolečková, I., Rárová, L., Grúz, J., Vondrusová, M., Strnad, M., Kryštof, V., Antiproliferative and antiangiogenic effects of flavone eupatorin, an active constituent of chloroform extract of *Orthosiphon stamineus* leaves, *Fitoterapia* 83, 1000-7, 2012.
- III Węsierska-Gadek, J., Walzi, E, Dolečková, I., Schmidt, G., Oncogenes do not Fully Override Cell-intrinsic Traits: Pronounced Impact of the Cellular Programme, *Cancer Microenvironment* 2, 215-225, 2009.

PŘÍLOHA I



Original article

Synthesis and biological evaluation of guanidino analogues of roscovitine

Iva Dolečková^{a,*}, Michal Česnek^{b,1}, Martin Dračinský^b, Jiří Brynda^b, Jiří Voller^c, Zlatko Janeba^b, Vladimír Kryštof^a^a Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacký University & Institute of Experimental Botany ASCR, Academy of Science, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, Czech Republic^b Institute of Organic Chemistry and Biochemistry ASCR, v.v.i, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, Czech Republic^c Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Department of Growth Regulators, Palacký University, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 September 2012

Received in revised form

11 January 2013

Accepted 13 January 2013

Available online 22 January 2013

Keywords:

6-Guanidinopurine

Olomoucine

Roscovitine

CDK inhibitors

Mitosis

ABSTRACT

A series of 2,9-substituted 6-guanidinopurines, structurally related to the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors olomoucine and roscovitine, has been synthesized and characterized. A new copper-catalyzed method for the synthesis of 2-substituted 6-guanidino-9-isopropylpurines under mild reaction conditions has been developed. All prepared compounds were screened for their CDK1 and CDK2 inhibitory activities, cytotoxicity and antiproliferative effects in the breast cancer-derived cell line MCF7. The most active derivative **16g** possessed an identical side chain in the C2 position to roscovitine; this compound displayed approximately five fold higher inhibitory activity towards CDK2/cyclin E and more than ten fold increase in cytotoxicity in MCF7 cells. Interestingly and in contrast to previously described findings, (S)-6-guanidinopurine derivatives were generally more active than their (R)-counterparts. Kinase selectivity profiling of (R)- and (S)-enantiomers **16e** and **16g**, respectively, revealed that introduction of a guanidino group at the C6 position of the purine moiety decreased selectivity towards protein kinases compared to roscovitine. Nevertheless, increased inhibitory activity and decreased selectivity offer a good starting point for further development of new protein kinase inhibitors.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Cyclin-dependent kinases (CDKs) are specific serine/threonine protein kinases which play a key role in regulation of the cell cycle, transcription, apoptosis and differentiation [1]. Their activity is regulated on multiple levels such as synthesis or degradation of activating subunit cyclins, phosphorylations, inhibition by specific proteins or intracellular localization. Overactivation of CDKs is a frequent feature of human pathologies associated with abnormal

rates of proliferation such as cancer. Although mutations of CDKs have been described in some tumours (CDK4 [2,3], CDK6 [4], CDK9 [5]), more frequent is overexpression of cyclins or inactivation of endogenous CDK inhibitors [4,6]. For these reasons, CDKs have become a promising target in anticancer research and intensive search for small molecule inhibitors of CDKs has been encouraged. Some CDK inhibitors have already been evaluated in clinical trials [6,7].

In spite of large chemical diversity, the vast majority of CDK inhibitors are low molecular weight, flat, hydrophobic heterocyclic molecules that compete with ATP for binding at the kinase ATP-binding site by both hydrophobic interactions and hydrogen bonding [8]. The purine skeleton was the first systematically modified scaffold that led to early discoveries of olomoucine and roscovitine [9–11] (Fig. 1), followed by synthesis of purvalanols [12,13], olomoucine II [14] or CR8 [15], DRF053 [16] and other biaryl derivatives [17,18]. Modification of purine core was another approach to obtain new potent CDK inhibitors such as pyrazolo[1,5-a]pyrimidines, pyrazolo[4,3-d]pyrimidines or pyrazolo[1,5-a]pyridines [19]. Dinaciclib is a pyrazolo[1,5-a]pyrimidine which has

Abbreviations: ATP, adenosine 5'-triphosphate; CDK, cyclin-dependent kinase; DABCO, 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DMF, dimethylformamide; DMSO, dimethyl sulfoxide; DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; K_m , Michaelis constant; NMP, N-methyl-2-pyrrolidone; PEG, polyethylene glycol; $\text{pH}_3^{\text{Ser10}}$, histone H3 phosphorylated on serine 10; RESP, restrained fit to the electrostatic potential; r.m.s.d., root mean square deviation; RT, room temperature; SAR, structure–activity relationship; TEAB, triethylammoniumbicarbonate; THF, tetrahydrofuran; TMS, tetramethylsilane.

* Corresponding author. Tel.: +420 585 634 854; fax: +420 585 634 870.

E-mail address: iva.doleckova@centrum.cz (I. Dolečková).¹ Both authors contributed equally.

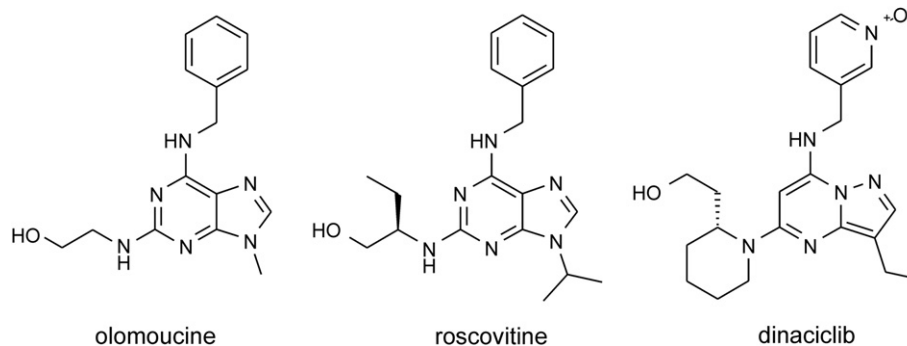


Fig. 1. Some purine and related CDK inhibitors.

already entered phase III clinical trials for the treatment of chronic lymphocytic leukaemia (Fig. 1).

All potent purine and related CDK inhibitors contain an aromatic amine moiety at position 6, such as benzylamino or phenylamino groups, that (i) binds to the hydrophobic pocket near the active site of CDKs (and thus deliver their selectivity) and (ii) forms an essential H-bond to carbonyl of leucine 83 in CDK2 (or to corresponding residues in other CDKs).

Compounds containing the guanidino group such as amino acids or other natural compounds are widespread throughout biological systems with a wide spectrum of biological activities [20]. The ability of the guanidino group to form strong non-covalent interactions at the active site of enzymes is a key factor in their biological activities. For this reason, we decided to explore the influence of the guanidino group at position C6 of the purine and we prepared a library of compounds consisting of 2,9-disubstituted-6-guanidinopurines. These compounds were screened for CDK inhibitory activities and antiproliferative effects in the human breast cancer-derived cell line MCF7.

2. Chemistry

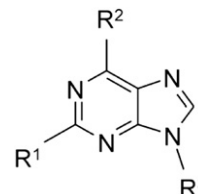
Firstly, various substituted 2-amino-6-guanidino-9-(hetero) alkylpurines (Table 1) were synthesized to evaluate the effect of substitution in the N9 position on the activity of CDKs and to confirm whether the introduction of a methyl or isopropyl group to 6-guanidinopurine derivatives is essential for the activity of the compounds, as in the case of olomoucine and roscovitine, respectively [9,10]. 2-Amino-6-guanidinopurine derivatives **1–5** bearing the nonpolar aliphatic chains and derivatives **6–9** containing the polar functional groups were readily prepared by alkylation of commercially available 2-amino-6-chloropurine with the appropriate alkyl halogenides in the presence of NaH and subsequent guanidinylation of the obtained intermediates [21]. Compound **10** was prepared by the guanidinylation of 6-chloro-9-methylpurine. 9-Alkyl-2,6-diaminopurines **11** and **12** were prepared by ammonolysis of appropriate 2-amino-6-chloropurines and compound **13** was isolated as a side product as described by Česnek and co-workers [21].

The SAR study was continued by the derivatization of the active 6-guanidino derivative **3** at the purine position C2. The synthesis of several 2-*O* and 2-*N* derivatives was achieved. The usual synthetic access to substituted 2-aminopurines was based on the treatment of appropriate 2-halogenopurine with corresponding alkyl or arylamine [10,16,22–24]. The coupling reaction of 2-chloro-6-guanidino-9-isopropylpurine with appropriate amines failed. 6-Guanidino-2-iodo-9-isopropylpurine (**15**), as an excellent starting compound for coupling reactions [25,26], was prepared. The most reactive intermediate **15** was prepared by the diazotization reaction

of starting 2-amino-6-chloro-9-isopropylpurine in the presence of CuI according to published procedure [27] and subsequent guanidinylation of obtained 6-chloro-2-iodo-9-isopropylpurine (**14**) in the presence of 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) and NaH (Scheme 1). A catalyst-free reaction of compound **15** with amines at room temperature (RT) gave no desired products, while at elevated temperature only decomposition of starting material was observed.

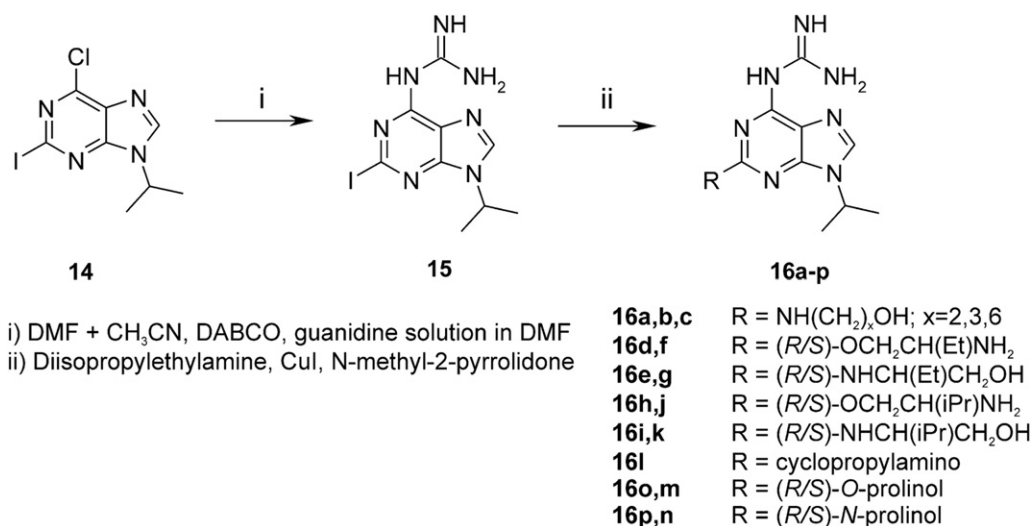
In this way we modified a copper mediated nucleophilic substitution described by Nair and Sells [28] for the introduction of substituted amines into the C2 position of the purine moiety. The

Table 1
Structures of prepared derivatives.



Compound	R ¹	R ²	R ³
1	NH ₂	Guanidino	Me
2	NH ₂	Guanidino	Pr
3	NH ₂	Guanidino	ⁱ Pr
4	NH ₂	Guanidino	ⁱ Bu
5	NH ₂	Guanidino	Et
6	NH ₂	Guanidino	CH ₂ CF ₃
7	NH ₂	Guanidino	CH ₂ CH ₂ OH
8	NH ₂	Guanidino	CH ₂ CH ₂ NH ₂
9	NH ₂	Guanidino	CH ₂ CH ₂ N ₃
10	H	Guanidino	Me
11	NH ₂	NH ₂	ⁱ Pr
12	NH ₂	NH ₂	Et
13	NH ₂	(Me) ₂ N–	CH ₂ CH ₂ N ₃
16a	NH(CH ₂) ₂ OH	Guanidino	ⁱ Pr
16b	NH(CH ₂) ₃ OH	Guanidino	ⁱ Pr
16c	NH(CH ₂) ₆ OH	Guanidino	ⁱ Pr
16d	(<i>R</i>)-OCH ₂ CH(Et)NH ₂	Guanidino	ⁱ Pr
16e	(<i>R</i>)-NHCH(Et)CH ₂ OH	Guanidino	ⁱ Pr
16f	(<i>S</i>)-OCH ₂ CH(Et)NH ₂	Guanidino	ⁱ Pr
16g	(<i>S</i>)-NHCH(Et)CH ₂ OH	Guanidino	ⁱ Pr
16h	(<i>R</i>)-OCH ₂ CH(ⁱ Pr)NH ₂	Guanidino	ⁱ Pr
16i	(<i>R</i>)-NHCH(ⁱ Pr)CH ₂ OH	Guanidino	ⁱ Pr
16j	(<i>S</i>)-OCH ₂ CH(ⁱ Pr)NH ₂	Guanidino	ⁱ Pr
16k	(<i>S</i>)-NHCH(ⁱ Pr)CH ₂ OH	Guanidino	ⁱ Pr
16l	Cyclopropylamino	Guanidino	ⁱ Pr
16m	(<i>S</i>)- <i>O</i> -Prolinol	Guanidino	ⁱ Pr
16n	(<i>S</i>)- <i>N</i> -Prolinol	Guanidino	ⁱ Pr
16o	(<i>R</i>)- <i>O</i> -Prolinol	Guanidino	ⁱ Pr
16p	(<i>R</i>)- <i>N</i> -Prolinol	Guanidino	ⁱ Pr

Synthesis of compounds **1–13** was published by Česnek and co-workers [21].



Scheme 1. Synthesis of 6-guanidino-9-isopropylpurine derivatives **16a–p**.

best results were achieved using 2 equivalents of CuI and 10 equivalents of amine in the presence of *N,N*-diisopropylethylamine at RT.

The desired 2-*N*-substituted purine derivatives were obtained in moderate yield because the reaction with hydroxylamines was accompanied by the formation of the corresponding 2-*O*-substituted purine isomers as side-products. The yields were also influenced by the multistep purification process.

Since there seemed to be problem with the solubility of the starting compounds in tetrahydrofuran (THF), the influence of the solvent on the reaction course was studied. Further, preferential formation of undesired *O*-isomer was observed in THF. On the other hand, 2-(*N,N*-dimethylamino) derivative was isolated as a major by-product of the reactions run in dimethylformamide (DMF). Finally, *N*-methyl-2-pyrrolidone (NMP) proved to be the most convenient solvent for this type of reaction. Compounds **16a–p** were prepared in NMP according to the above mentioned procedure (2 equivalents of CuI and 10 equivalents of amine in the presence of *N,N*-diisopropylethylamine at RT).

We also attempted to use 2-chloro-6-guanidino-9-isopropylpurine (**17**) as a starting material for the above mentioned amination reaction both with and without the copper catalyst. This derivative was prepared by the guanidinolysis [21] of known 2,6-dichloro-9-isopropylpurine [29]. The reaction of the compound **17** with amines at RT failed and elevated reaction temperature again caused only the decomposition of the guanidino group, similar to the previously described observations with the amido [25] and guanidinopyrimidine derivative [30].

Transformation of copper halogenide into the soluble complex caused problems with purification of these reaction mixtures. The guanidino group probably makes a complex with a copper ion. Classical silica gel purification was not efficient due to the high polarity of products. The polarity and equal distribution between organic and water phases also did not allow the application of extraction using EDTA or dithisone (diphenylthiocarbazone). Removal of copper from its complex with amines by H₂S gas bubbled into the reaction mixture was left due to formation of by-products. High affinity of the guanidino group on the purine moiety to the Dowex 50 × 8 was used to overcome this problem. After adsorption of neutralized residue on Dowex 50 × 8, the copper residues were removed very efficiently by washing of the column with aqueous HCl:H₂O (1:10). *N*- and *O*-isomers were subsequently separated on the HPLC column to yield products **16a–p**.

3. Pharmacology

CDK inhibitory activity of the prepared compounds was evaluated using purified recombinant enzymes CDK1/cyclin B and CDK2/cyclin E. Cytotoxicity assays were then performed on MCF7 breast cancer cells. Flow cytometry analysis of the cell cycle showed that several compounds arrested cells in G2 + M phases. In an effort to distinguish between G2 and M phase arrest we examined the intracellular level of histone H3 phosphorylated on serine 10 (pH3^{Ser10}). This phosphorylation, catalyzed by aurora kinases A and B, is essential for chromatin condensation during mitosis and is often detected as a mitotic marker [31,32]. All the data are summarized in Table 2. CDK inhibitor roscovitine (IC₅₀ values: CDK2 = 0.17 μM, CDK1 = 2.4 μM, MCF7 proliferation = 20.2 μM) inducing specifically G2 arrest was used as a positive control throughout the study.

4. Results and discussion

4.1. Structure–activity relationship

Substitution at position 6 is a critical element determining potency and selectivity of purine derivatives towards CDKs [19,33]. Replacement of benzylamine in the roscovitine molecule e.g. with biaryl derivatives improved the biological activity and led to discovery of even more potent compounds such as CR8 [15], DRF053 [16], and others [17,18]. The ability of the guanidino group at position C6 to stabilize binding interaction with the active site of CDKs can be demonstrated by the increased activities of 6-guanidinopurines **3** and **5** (IC₅₀ CDK2 < 2 μM, CDK1 < 15 μM) compared to corresponding 6-amino derivatives (**11**, **12**). Similarly, comparison of inactive compound **13** with a weak CDK2 inhibitor **9** showed that the replacement of 6-dimethylamino substituent (**13**) with the guanidino group (**9**) improved CDK inhibitory activity.

As a result, we prepared and evaluated *N*9-substituted 2-amino-6-guanidinopurines for their biological activity as was previously done with other sets of purine derivatives [10,13,34]. Our results show that the most active compounds of this set in terms of CDK inhibition possess small nonpolar alkyl substituents in sequence from the most active ethyl (**5**) and isopropyl (**3**) as in the roscovitine molecule, then methyl (**1**), propyl (**2**) and the least active was compound **4** with isobutyl. Generally, substitution with polar heteroalkyls led to loss of both CDK inhibitory and cytotoxic activity.

Table 2
Biological activities of prepared compounds.

Compound	IC ₅₀ [μM]			Effects on the cell cycle of MCF7 cells dose 100 μM, 24 h	
	CDK1/cyclin B	CDK2/cyclin E	MCF7	G2 + M ^a (compound/control)	pH3 (Ser10) ^b (compound/control)
1	38.2 ± 5.5	6.8 ± 2.8	>100	1.5 ± 0.7	0.81 ± 0.09
2	55.9 ± 1.5	10.7 ± 4.9	36.5 ± 9.8	4.0 ± 1.0	6.71 ± 2.49
3	14.8 ± 3.3	1.3 ± 0.2	97.2 ± 24.2	2.0 ± 0.8	0.18 ± 0.01
4	>100	66.5 ± 30.0	96.6 ± 38.2	3.5 ± 0.6	7.00 ± 1.00
5	12.6 ± 1.3	1.7 ± 1.0	54.3 ± 25.7	1.6 ± 0.2	0.10 ± 0.03
6	>100	>100	>100	0.8 ± 0.5	ND
7	>100	>100	>100	0.9 ± 0.3	ND
8	>50	>100	>100	1.0 ± 0.6	ND
9	>100	74.9 ± 14.1	>100	1.4 ± 0.8	ND
10	>100	>100	>100	1.0 ± 0.4	ND
11	64.9 ± 17.4	22.2 ± 17.2	>100	0.9 ± 0.4	ND
12	37.5 ± 10.7	7.9 ± 3.7	>100	1.2 ± 0.6	ND
13	>100	>100	>100	1.0 ± 0.4	ND
16a	15.1 ± 9.2	0.82 ± 0.34	12.4 ± 6.4	2.9 ± 1.1	0.15 ± 0.02
16b	4.1 ± 0.3	0.18 ± 0.07	8.8 ± 3.3	2.5 ± 1.2	0.18 ± 0.02
16c	4.2 ± 1.7	1.6 ± 0.1	5.2 ± 3.1	2.0 ± 0.8	0.33 ± 0.01
16d	47.6 ± 11.0	13.3 ± 7.0	>100	0.8 ± 0.4	1.08 ± 0.21
16e	2.1 ± 0.4	0.14 ± 0.06	4.5 ± 1.3	1.8 ± 1.1	0.08 ± 0.06
16f	8.1 ± 5.1	6.2 ± 3.4	16.3 ± 2.9	1.5 ± 0.4	0.07 ± 0.01
16g	0.9 ± 0.5	0.037 ± 0.031	1.6 ± 0.3	1.6 ± 0.8	0.09 ± 0.03
16h	15.6 ± 6.8	8.0 ± 3.3	79.4 ± 22.1	2.1 ± 0.7	0.39 ± 0.06
16i	2.0 ± 1.0	0.14 ± 0.03	10.5 ± 3.8	2.3 ± 1.0	0.13 ± 0.09
16j	1.1 ± 0.3	1.8 ± 0.8	3.4 ± 0.7	1.7 ± 0.4	0.09 ± 0.07
16k	1.1 ± 0.6	0.071 ± 0.046	2.1 ± 0.4	1.8 ± 0.7	0.09 ± 0.08
16l	6.4 ± 1.5	0.50 ± 0.18	5.4 ± 0.2	2.4 ± 0.6	0.17 ± 0.03
16m	>100	25.2 ± 4.8	>100	1.7 ± 0.2	0.80 ± 0.10
16n	1.5 ± 0.1	0.16 ± 0.04	6.2 ± 3.3	1.7 ± 0.8	0.11 ± 0.08
16o	81.5 ± 27.0	23.6 ± 4.9	>100	1.3 ± 0.5	ND
16p	6.2 ± 2.2	0.67 ± 0.44	20.4 ± 16.8	2.0 ± 0.7	0.10 ± 0.07
Roscovitine	2.4 ± 0.94	0.17 ± 0.05	20.2 ± 12.3	1.5 ± 0.1	0.11 ± 0.01

^a Ratio of G2 + M populations in treated cells and G2 + M populations in control cells.

^b Ratio of pH3-positive cells treated and pH3-positive control cells.

In spite of CDK inhibitory activities of several N9-substituted 2-amino-6-guanidinopurines, the majority had no significant cytotoxic effect on MCF7 cells (IC₅₀ > 100 μM) or only moderate (IC₅₀ > 50 μM). Nonetheless, some were still able to accumulate cells in G2 + M phases (compounds **2**–**5**). In comparison with roscovitine, derivatives **3** and **5** were weaker CDK inhibitors with IC₅₀ at least 5-times higher and their cytotoxicity was also lower (4× and 2×, respectively). However, these compounds induced increase in the G2 + M population (2× and 1.6×, respectively) and more than 5-times decrease in mitotic marker pH3^{Ser10} in a similar manner to G2-block induced by roscovitine. On the other hand, propyl (**2**) and isobutyl (**4**) derivatives caused an increase in the mitotic cell subpopulation as evidenced by a strong (7-times) accumulation of pH3^{Ser10}. It is interesting that such a small change in the structure of the N9 substituent apparently leads to alternative mechanisms of action resulting in different responses in biological systems.

Having confirmed isopropyl as one of the most active substituents in the group of various N9 substituents, we synthesized substituted 6-guanidino-9-isopropylpurines and investigated the effects of the introduction of various substituents related to the olomoucine or roscovitine C2 side chain to position C2. The importance of the C2 substituent was demonstrated by comparison of the biological activities of 2-amino-6-guanidino-9-methylpurine (**1**), which inhibited CDKs in micromolar range, and inactive, C2 unsubstituted 6-guanidino-9-methylpurine (**10**). Compound **16a** containing 2-hydroxyethylamino group, the olomoucine C2 side chain, did not significantly improve the CDK inhibitory activity of the corresponding 2-amino derivative (**3**), but it potentiated its antiproliferative properties towards MCF7 almost 8-times. This observation suggests that the increased potency is not due to inhibition of CDKs. Elongation of olomoucine C2 side chain by

a methylene group (**16b**) increased CDK inhibitory activity approximately 4-times, but no significant increase in cytotoxicity was observed (Table 2). Further, elongation by methylene groups (**16c**) did not potentiate the biological activity.

A set of 6-guanidinopurines with various *N*- or *O*-linked C2 substituents was then prepared. Generally, derivatives with the high CDK inhibitory activity tended to be more active against MCF7. This trend was observed for both 2-*N*- and 2-*O*-subgroups. This observation suggests that at least part of the activity is due to CDK inhibition. 2-*O*-Substituted derivatives were several times less potent than their 2-*N*-regioisomers. The only exception was **16j**, one of the most active compounds of our set. Although the 25× less potent CDK2 inhibitor than its *N*-regioisomer **16k**, its effects on CDK1, MCF7 cells and on the cell cycle were surprisingly nearly identical.

Compound **16g** was the most active 6-guanidinopurine bearing the same substituent at position C2 as roscovitine (in addition to the roscovitine N9 substituent). This compound was more active in CDKs (2.7× for CDK1 and 4.6× for CDK2) as well as on MCF7 cells (IC₅₀ more than 10× lower) than roscovitine itself. In contrast to roscovitine, which is a more potent CDK inhibitor as an (*R*)-enantiomer [35], (*S*)-enantiomer (**16g**) seems to be more active than its (*R*)-counterpart **16e**. Similarly, the other guanidinopurines in (*S*)-configuration also proved to be more active in CDK inhibition as well as in the antiproliferative effects in MCF7 cells. We found the same with 2-*N*-enantiomers **16e** and **16g**, **16i** and **16k** as well as 2-*O*-enantiomers **16d** and **16f**, **16h** and **16j**.

The presence of a cyclopropylamino group at position C2 (**16l**) improved both CDK inhibitory (about 2.5-times) and cytotoxic activity (almost 20-times) in comparison with the similar 2-amino derivative **3**. (*S*) and (*R*)-Prolinol were other cyclic C2 substituents tested. In a group of various prolinol isomers and enantiomers at

position C2 (**16m–p**) we observed that the most active compound **16n** possessed *N*-linked (*S*)-prolinol. The biological activity of this derivative was very similar to that of roscovitine.

4.2. Kinase selectivity

The most active compounds **16e** and **16g** were further evaluated for selectivity on a panel of protein kinases. As selectivity and potency are usually inversely correlated for kinase inhibitors [36] it was not surprising that both these derivatives were found to inhibit a broad range of various kinase targets (Table 3). In comparison, roscovitine has been shown to be more selective, inhibiting only a few kinases besides CDKs as CaM Kinase 2, CK1 α , CK1 δ , DYRK1A, EPHB2, ERK1, ERK2, FAK and IRAK4 as published previously [35,37]. The reason for this decreased selectivity is probably the removal of aromatic substitution at C6 that was designed as a key determinant of CDK selectivity [33]. In accordance with our other data, (*S*)-enantiomer **16g** inhibited selected kinases more efficiently than its (*R*)-enantiomer **16e**.

4.3. Docking study

In order to acquire insight into the location and molecular interaction of the most active compounds in the binding site, a docking study was performed. When we compared the X-ray structure of CDK2/roscovitine complex (PDB code 2A4L) with the results of docking of two enantiomer pairs **16e/16g** and **16i/16k**, we found that the position of the purine moiety is conserved as well as the orientation of isopropyl group at position N9 (see Fig. 2A, B). Hydrogen bonding of adenine moiety is also conserved and in comparison to roscovitine is extended by one hydrogen bond donated by a guanidine secondary amino group to the carbonyl oxygen of leucine 83. Interestingly, the docking study of compounds **16e**, **16g**, **16i** and **16k** showed that modification on C2 by [1-(1*S*)-(hydroxymethyl)propyl]amino (compound **16g**) gave a superior binding due to the two hydrogen bonds of the hydroxyl, one donated to the carboxy group of aspartate 145 and one accepted from side chain amino group of lysine 33 (Fig. 3).

5. Conclusion

In this study we evaluated a library of 2,9-disubstituted-6-guanidinopurines, structurally related to the CDK inhibitors olomoucine and roscovitine. From this series, 2-substituted 6-guanidino-9-isopropylpurines were newly synthesized. SAR analysis proved that small changes in the structure of the N9 substituent yielded compounds with a different mode of action. Although the majority of the compounds arrested cells in the G2 phase of the cell cycle in a similar manner to roscovitine, a few of them induced significant accumulation of mitotic cells. Moreover, in contrast to roscovitine, our compounds were more active in (*S*)-configuration as supported by our docking study. The introduction of the guanidino group at position C6 increased the inhibitory potential towards protein kinase targets several times more than with roscovitine but with a concomitant decrease in selectivity. Nevertheless increased potency and decreased selectivity offer a good starting point for further development of new, more selective protein kinase inhibitors.

6. Experimental protocols

6.1. General chemical procedures

Unless otherwise stated, solvents were evaporated at 40 °C/2 kPa, and the compounds were dried over P₂O₅ at 2 kPa. NMR spectra were

Table 3

Selectivity of compounds **16e** and **16g** against a panel of recombinant protein kinases. The compounds were screened at 1 μ M concentration in duplicate.

Kinase	Remaining activity [%]		Kinase	Remaining activity [%]	
	16e	16g		16e	16g
ABL	5 $\pm$ 0	6 $\pm$ 3	MINK1	64 $\pm$ 0	75 $\pm$ 4
AMPK	29 $\pm$ 1	22 $\pm$ 1	MKK1	41 $\pm$ 0	28 $\pm$ 9
ASK1	100 $\pm$ 6	81 $\pm$ 7	MKK2	53 $\pm$ 4	39 $\pm$ 8
AURA	39 $\pm$ 1	30 $\pm$ 4	MKK6	72 $\pm$ 12	88 $\pm$ 2
AURB	47 $\pm$ 12	70 $\pm$ 3	MLK1	25 $\pm$ 5	31 $\pm$ 10
BRK	50 $\pm$ 15	44 $\pm$ 9	MLK3	37 $\pm$ 7	37 $\pm$ 14
BRSK1	44 $\pm$ 2	45 $\pm$ 18	MNK1	173 $\pm$ 15	178 $\pm$ 10
BRSK2	77 $\pm$ 12	67 $\pm$ 12	MNK2	119 $\pm$ 8	122 $\pm$ 7
BTk	53 $\pm$ 1	48 $\pm$ 11	MPSK1	36 $\pm$ 2	28 $\pm$ 9
CAMK1	35 $\pm$ 6	24 $\pm$ 5	MSK1	46 $\pm$ 1	38 $\pm$ 3
CAMKKb	17 $\pm$ 0	13 $\pm$ 1	MST2	35 $\pm$ 5	43 $\pm$ 8
CDK2/cyclin A	5 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1	MST4	42 $\pm$ 19	40 $\pm$ 18
CK1	15 $\pm$ 6	21 $\pm$ 2	NEK2a	73 $\pm$ 11	57 $\pm$ 6
CK2	43 $\pm$ 1	33 $\pm$ 4	NEK6	95 $\pm$ 4	85 $\pm$ 4
CLK2	4 $\pm$ 2	4 $\pm$ 2	NUAK1	8 $\pm$ 1	7 $\pm$ 3
CSK	58 $\pm$ 6	59 $\pm$ 0	OSR1	16 $\pm$ 2	16 $\pm$ 1
DAPK1	54 $\pm$ 8	36 $\pm$ 5	p38a MAPK	87 $\pm$ 14	82 $\pm$ 17
DYRK1A	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	p38b MAPK	64 $\pm$ 3	66 $\pm$ 9
DYRK2	27 $\pm$ 3	16 $\pm$ 1	p38d MAPK	37 $\pm$ 9	23 $\pm$ 2
DYRK3	18 $\pm$ 2	11 $\pm$ 3	p38g MAPK	77 $\pm$ 2	71 $\pm$ 7
EF2K	94 $\pm$ 1	94 $\pm$ 6	PAK2	45 $\pm$ 1	38 $\pm$ 5
EIF2AK3	17 $\pm$ 1	11 $\pm$ 0	PAK4	15 $\pm$ 2	12 $\pm$ 0
EPH-A2	22 $\pm$ 5	17 $\pm$ 8	PAK5	18 $\pm$ 1	15 $\pm$ 3
EPH-A4	22 $\pm$ 6	41 $\pm$ 13	PAK6	26 $\pm$ 3	17 $\pm$ 5
EPH-B1	8 $\pm$ 0	7 $\pm$ 2	PDK1	68 $\pm$ 10	62 $\pm$ 18
EPH-B2	2 $\pm$ 2	2 $\pm$ 1	PHK	14 $\pm$ 2	12 $\pm$ 0
EPH-B4	6 $\pm$ 2	6 $\pm$ 4	PIM1	85 $\pm$ 10	71 $\pm$ 20
ERK1	50 $\pm$ 3	28 $\pm$ 7	PIM2	88 $\pm$ 7	91 $\pm$ 5
ERK2	32 $\pm$ 4	15 $\pm$ 3	PIM3	64 $\pm$ 10	44 $\pm$ 9
ERK8	16 $\pm$ 8	18 $\pm$ 6	PKA	90 $\pm$ 3	83 $\pm$ 6
FGF-R1	4 $\pm$ 0	5 $\pm$ 0	PKBa	99 $\pm$ 8	107 $\pm$ 24
GCK	15 $\pm$ 2	10 $\pm$ 1	PKBb	111 $\pm$ 19	103 $\pm$ 8
GSK3b	37 $\pm$ 1	28 $\pm$ 12	PKCa	71 $\pm$ 1	68 $\pm$ 14
HER4	27 $\pm$ 2	29 $\pm$ 12	PKCz	68 $\pm$ 2	61 $\pm$ 10
HIPK1	15 $\pm$ 1	11 $\pm$ 2	PKCy	73 $\pm$ 1	61 $\pm$ 7
HIPK2	8 $\pm$ 0	6 $\pm$ 1	PKD1	17 $\pm$ 1	18 $\pm$ 1
HIPK3	38 $\pm$ 6	24 $\pm$ 0	PLK1	108 $\pm$ 4	108 $\pm$ 19
CHK1	58 $\pm$ 8	46 $\pm$ 16	PRAK	76 $\pm$ 16	74 $\pm$ 23
CHK2	59 $\pm$ 8	42 $\pm$ 15	PRK2	85 $\pm$ 22	84 $\pm$ 34
IGF-1R	10 $\pm$ 2	5 $\pm$ 0	RIPK2	72 $\pm$ 5	76 $\pm$ 15
IKKb	74 $\pm$ 6	76 $\pm$ 12	ROCK 2	61 $\pm$ 23	65 $\pm$ 18
IKKe	66 $\pm$ 8	52 $\pm$ 14	RSK1	18 $\pm$ 1	12 $\pm$ 4
IR	5 $\pm$ 0	3 $\pm$ 0	RSK2	35 $\pm$ 7	17 $\pm$ 1
IRAK1	26 $\pm$ 1	17 $\pm$ 6	S6K1	49 $\pm$ 2	36 $\pm$ 3
IRAK4	21 $\pm$ 1	11 $\pm$ 0	SGK1	60 $\pm$ 1	51 $\pm$ 15
IRR	19 $\pm$ 2	16 $\pm$ 2	SMMMLCK	49 $\pm$ 3	32 $\pm$ 2
JAK2	16 $\pm$ 3	16 $\pm$ 8	SRC	22 $\pm$ 22	6 $\pm$ 3
JNK1	88 $\pm$ 8	78 $\pm$ 7	SRPK1	22 $\pm$ 1	14 $\pm$ 1
JNK2	85 $\pm$ 4	73 $\pm$ 19	STK33	11 $\pm$ 0	9 $\pm$ 3
JNK3	96 $\pm$ 20	80 $\pm$ 19	SYK	58 $\pm$ 6	50 $\pm$ 4
LCK	13 $\pm$ 2	12 $\pm$ 3	TAK1	7 $\pm$ 2	13 $\pm$ 10
LKB1	13 $\pm$ 4	16 $\pm$ 9	TAO1	9 $\pm$ 2	9 $\pm$ 3
MAPKAP-K2	41 $\pm$ 9	48 $\pm$ 27	TBK1	92 $\pm$ 1	90 $\pm$ 45
MAPKAP-K3	80 $\pm$ 18	78 $\pm$ 4	TIE2	39 $\pm$ 12	40 $\pm$ 14
MARK1	31 $\pm$ 7	39 $\pm$ 0	TLK1	9 $\pm$ 1	9 $\pm$ 5
MARK2	45 $\pm$ 16	62 $\pm$ 24	TRKA	24 $\pm$ 5	28 $\pm$ 14
MARK3	24 $\pm$ 3	17 $\pm$ 7	TTK	40 $\pm$ 1	32 $\pm$ 4
MARK4	38 $\pm$ 3	29 $\pm$ 8	VEGFR	6 $\pm$ 1	4 $\pm$ 0
MEKK1	91 $\pm$ 12	96 $\pm$ 5	YES1	13 $\pm$ 2	11 $\pm$ 4
MELK	27 $\pm$ 2	19 $\pm$ 2	ZAP70	86 $\pm$ 15	109 $\pm$ 54

recorded on Bruker Avance 500 (¹H at 500 MHz, ¹³C at 125.8 MHz) and Bruker Avance 400 (¹H at 400 MHz, ¹³C at 100.6 MHz) spectrometers with TMS as internal standard or referenced to the residual solvent signal. Mass spectra were measured on a ZAB-EQ (VG Analytical) spectrometer. The chemicals were obtained from commercial sources (Sigma–Aldrich) or prepared according to published

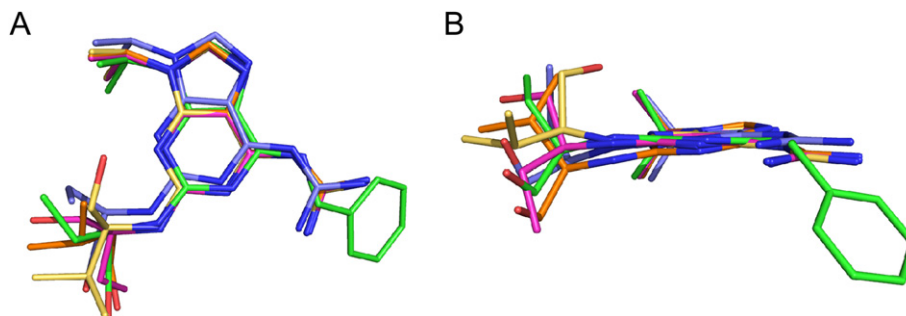


Fig. 2. Overlay of ligands poses and X-ray structure of CDK2–roscovitine complex, based on CDK2 superposition: (A) view perpendicular and (B) parallel to purine plane. Colour coding: carbon atoms green for roscovitine, magenta for **16g**, light-blue for **16e**, orange for **16k** and light-yellow for **16i**; nitrogen atoms blue, oxygen atoms red.

procedures. DMF and acetonitrile were distilled from P_2O_5 and stored over molecular sieves (4 Å). Preparative HPLC purifications were performed on columns packed with 7 μ m C18 reversed phase resin (Waters Delta 600 chromatograph column), 17 $\times$ 250 mm; in ca. 200 mg batches of mixtures using gradient MeOH/H₂O as eluent or using a 0.1 mol triethylammoniumbicarbonate (TEAB) as a buffer. Deionization was performed on Dowex 50 $\times$ 8 (H⁺-form) columns by the following procedure: after application of crude product the column was washed with water until the UV absorption dropped. Thereafter, the column was eluted with 2.5% aqueous NH₃. Chromatography on Dowex 1 $\times$ 2 (acetate form) was as follows: after application of the aqueous solution of the crude product onto the column, it was washed with water until the UV absorption dropped. The column was then eluted with a gradient of dilute acetic or formic acid (0–1 M). All tested compounds were characterized by ¹H NMR, ¹³C NMR and mass spectrometry. Representative examples of ¹H and ¹³C spectra are provided as supplementary material (Figs. S1–S12).

6.1.1. 6-Guanidino-2-iodo-9-isopropyl-9H-purine (**15**)

A filtered solution of guanidine [38] in NMP (15.5 ml, 15.5 mmol) was added to a mixture of 6-chloro-2-iodo-isopropyl-9H-purine [27] (1 g, 3.1 mmol) and DABCO (0.35 g, 3.1 mmol). The reaction mixture was stirred at RT for 4 h. The resulting mixture was neutralized with aqueous HCl, the solids were removed by filtration. The filtrate was evaporated *in vacuo*, co-distilled with DMF (3 $\times$ 50 ml) and subsequently with toluene (3 $\times$ 50 ml). The

residue was dissolved in MeOH (150 ml) and filtered through the Celite pad once again. The filtrate was adsorbed on SiO₂ and purified with column chromatography (HUB III); yield 0.7 g, 65%. FABMS: 345.9 [MH⁺] (50). ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 1.48 (d, 6H, J(CH₃, CH) = 6.8, CH₃); 4.65 (sept, 1H, J(CH, CH₃) = 6.8, N–CH); 7.40 (br, 4H, NH); 8.13 (s, 1H, H-8). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 22.36 (2C, CH₃); 46.45 (N–CH); 118.32 (C-5); 125.28 (C-2); 138.91 (C-8); 150.24 (C-4); 159.16 and 159.74 (N–C and C-6). For C₉H₁₂IN₇ (345.14) calcd: C, 31.32; H, 3.50; I, 36.77; N, 28.41. Found: C, 31.55; H, 3.59; I, 36.67; N, 28.46.

6.1.2. General procedure for preparation of 2-substituted 6-guanidino-9-isopropyl-9H-purines

N,N-Diisopropylethylamine (0.48 ml; 2.8 mmol) and appropriate amine (14 mmol) were added to a mixture of compound **15** (0.5 g; 1.4 mmol) and CuI (0.52 g; 2.8 mmol) in NMP (7 ml) under Ar. The reaction mixture was stirred at RT by the time until the starting compound disappeared. The reaction mixture was neutralized with a solution of HCl in DMF and evaporated, co-distilled by DMF and subsequently with toluene. The residue was dissolved in 20% aqueous MeOH (25 ml), applied on column of Dowex (50 $\times$ 8) and washed subsequently with 20% aqueous MeOH and water. Impurities (mainly copper salts) were eluted with 10% aqueous HCl and the column was then washed with water to remove the acid. The elution was made with 10% aqueous Et₃N (20% MeOH in H₂O). The collected UV absorbing fractions were evaporated and purified by HPLC column chromatography to give desired products in moderate yields.

6.1.3. 6-Guanidino-2-[(2-hydroxyethyl)amino]-9-isopropyl-9H-purine (**16a**)

General procedure; ethanolamine (1.5 ml, 24 mmol); 2 h, RT; yield 0.41 g, 69%; FABMS: 279.1 [MH⁺] (100). ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 1.43 (d, 6H, J(CH₃, CH) = 6.7, CH₃); 3.32 (brq, 2H, O–CH₂); 3.55 (t, 2H, J(CH₂, CH₂) = 5.7, N–CH₂); 4.56 (sept, 1H, J(CH, CH₃) = 6.7, N–CH); 4.70 (brt, 1H, OH); 6.60 (brs, 1H, NH) and 7.80 (br, 4H, NH); 7.81 (s, 1H, H-8). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 22.21 (2C, CH₃); 44.20 (N–CH₂); 45.75 (N–CH); 60.39 (O–CH₂); 118.90 (C-5); 136.02 (C-8); 151.88 (C-4); 158.09, 2C, (C-6; C-2); 159.25 (N–C). For C₁₁H₁₈N₈O·EtOH·HCl (278.31) calcd: C, 43.27; H, 6.98; N, 31.05; Cl, 9.81. Found: C, 43.29; H, 6.75; N, 30.85; Cl, 10.12.

6.1.4. 6-Guanidino-2-[(3-hydroxypropyl)amino]-9-isopropyl-9H-purine (**16b**)

General procedure; 3-aminopropan-1-ol (2.48 ml, 32.6 mmol); 5 h; RT; yield 0.46 g, 57%; FABMS: 293.2 [MH⁺] (100). ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 1.42 (d, 6H, J(CH₃, CH) = 6.8, CH₃); 1.50 (m, 2H, CH₂–2'); 3.19 (bq, 2H, J(1'–2') = J(1'–NH) = 6.7 CH₂–1'); 3.32 (m, 2H,

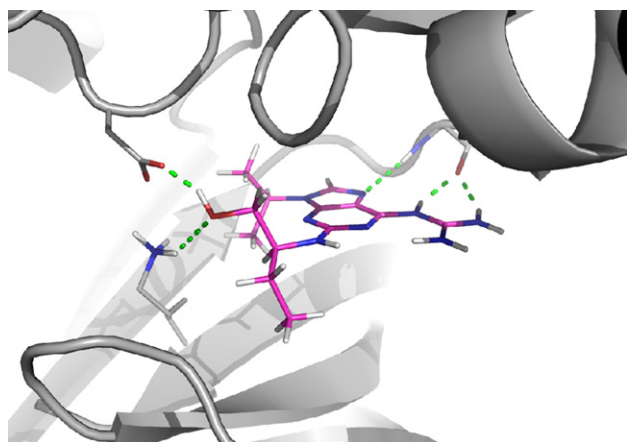


Fig. 3. Complex of CDK2 with compound **16g**, detail of active site. CDK2 shown in cartoon representation, ligand in stick representation. Colour coding: nitrogen atoms blue, oxygen atoms red, hydrogen atoms white, carbon atoms grey for CDK2 and magenta for **16g**. Hydrogen bonds are depicted by green dash-line.

O–CH₂); 4.50 (br, 1H, J(CH, CH₃) = 6.8, N–CH); 4.60 (brs, 1H, OH); 6.40 (br, 1H, NH); 7.31 (vbs, 4H, NH); 7.75 (s, 1H, H-8). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 22.25 (2C, CH₃); 29.85 (C-2'); 42.45 (C-1'); 45.60 (N–CH); 60.50 (C-3'); 119.45 (C-5); 135.90 (C-8); 151.80 (C-4); 158.10 (C-2); 159.50 (N–C); 159.70 (C-6). For C₁₂H₂₀N₈O · 1/3 H₂O · 1/3 HCl (292.34) calcd: C, 46.42; H, 6.82; N, 36.09; Cl 3.81. Found: C, 46.37; H, 6.71; N, 35.92; Cl 4.18.

6.1.5. 6-Guanidino-2-[(6-hydroxyhexyl)amino]-9-isopropyl-9H-purine (**16c**)

General procedure; 6-amino-1-hexanol (1.99 g, 17 mmol); 24 h; not fully converted, RT; yield 0.13 g, 25%; FABMS: 335 [MH⁺] (100). ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 1.32 (m, 4H, CH₂-3',4'); 1.42 (m, 2H, CH₂-5'); 1.45 (d, 6H, J(CH₃, CH) = 6.8, CH₃); 1.53 (m, 2H, CH₂-2'); 3.20 (bq, 2H, J(1'-2') = J(1'-NH) = 6.6 CH₂-1'); 3.37 (m, 2H, CH₂-6'); 4.36 (brs, 1H, OH); 4.54 (br, 1H, J(CH, CH₃) = 6.8, N–CH); 6.46 (brt, 1H, J(NH-1') = 5.3, NH); 7.3 (vbs, 4H, NH); 7.73 (s, 1H, H-8). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 22.30 (2C, CH₃); 25.65 (C-4'); 26.84 (C-3'); 29.54 (C-2'); 32.80 (C-5'); 41.36 (C-1'); 45.62 (N–CH); 60.94 (C-6'); 119.62 (C-5); 135.47 (C-8); 151.88 (C-4); 158.17 (C-2); 159.74 (N–C); 159.84 (C-6). For C₁₅H₂₆N₈O · MeOH (334.42) calcd: C, 52.44; H, 8.25; N, 30.58. Found: C, 52.84; H, 7.88; N, 30.63.

6.1.6. 2-[2-(2R)-(Aminomethyl)propoxy]-6-guanidino-9-isopropyl-9H-purine (**16d**) and 6-guanidino-2-[[1-(1R)-(hydroxymethyl)propyl]amino]-9-isopropyl-9H-purine (**16e**)

General procedure; R-(–)-2-amino-1-butanol (1.32 ml, 14 mmol); 6 h; RT; compound **16d**: yield 0.2 g, 45%; FABMS: 307.0 [MH⁺] (20). [α]_D –5.4° (c 0.34, methanol); ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 0.93 (t, 3H, J(4', 3') = 7.5, CH₃-4'); 1.28 (m, 1H, CH₂-3'b); 1.48 (d, 6H, J(CH₃, CH) = 6.8, CH₃); 1.52 (m, 1H, 3'a); 2.90 (m, 1H, CH-2'); 3.98 (dd, 1H, J(1'b-2') = 6.6, J_{gem} = 10.2, 1'b); 4.07 (dd, 1H, J(1'a-2') = 5.4, J_{gem} = 10.2, 1'a); 4.61 (br, 1H, J(CH, CH₃) = 6.7, N–CH); 7.3 (vbs, 4H, NH); 7.96 (s, 1H, H-8). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 10.60 (C-4'); 22.31 (2C, CH₃); 26.97 (C-3'); 46.11 (N–CH); 51.63 (C-2'); 71.71 (C-1'); 122.07 (C-5); 137.58 (C-8); 151.08 (C-4); 159.93 (N–C); 160.20 (C-2); 160.75 (C-6). For C₁₃H₂₂N₈O · MeOH (306.37) calcd: C, 49.69; H, 7.74; N, 33.11. Found: C, 49.82; H, 7.39; N, 33.53.

Compound **16e**: yield 0.15 g, 33%; FABMS: 307.0 [MH⁺] (100). [α]_D +32.3° (c 0.38, methanol); ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 0.89 (t, 3H, J(4', 3') = 7.4, CH₃-4'); 1.45 (d, 3H, J(CH₃, CH) = 6.8, CH₃); 1.46 (d, 3H, J(CH₃, CH) = 6.8, CH₃); 1.46 (m, 1H, 3'b); 1.65 (m, 1H, 3'a); 3.38 (dd, 1H, J(1'b-2') = 5.9, J_{gem} = 10.6, 1'b); 3.49 (dd, 1H, J(1'a-2') = 5.0, J_{gem} = 10.5, 1'a); 4.52 (br, 1H, J(CH, CH₃) = 6.8, N–CH); 4.63 (brs, 1H, OH); 6.12 (brs, 1H, NH); 7.25 (vbs, 4H, NH); 7.71 (s, 1H, H-8). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 10.87 (C-4'); 22.21 and 22.27 (2C, CH₃); 24.18 (C-3'); 45.63 (N–CH); 54.37 (C-2'); 63.30 (C-1'); 119.84 (C-5); 135.32 (C-8); 151.67 (C-4); 158.06 (C-2); 159.82 (N–C); 160.17 (C-6). For C₁₂H₂₀N₈O · 2/3 MeOH (306.37) calcd: C, 50.09; H, 7.59; N, 34.19. Found: C, 49.90; H, 7.29; N, 34.19.

6.1.7. 2-[2-(2S)-(Aminomethyl)propoxy]-6-guanidino-9-isopropyl-9H-purine (**16f**) and 6-guanidino-2-[[1-(1S)-(hydroxymethyl)propyl]amino]-9-isopropyl-9H-purine (**16g**)

General procedure; S-(+)-2-amino-1-butanol (1.32 ml, 14 mmol); 6 h; RT; compound **16f**: yield 0.3 g, 44%; FABMS: 307.0 [MH⁺] (100). [α]_D +15.6° (c 0.39, methanol); ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 0.93 (t, 3H, J(4', 3') = 7.5, CH₃-4'); 1.28 (m, 1H, CH₂-3'b); 1.48 (d, 6H, J(CH₃, CH) = 6.8, CH₃); 1.52 (m, 1H, 3'a); 2.90 (m, 1H, CH₂-2'); 3.98 (dd, 1H, J(1'b-2') = 6.6, J_{gem} = 10.2, 1'b); 4.07 (dd, 1H, J(1'a-2') = 5.4, J_{gem} = 10.2, 1'a); 4.61 (br, 1H, J(CH, CH₃) = 6.7, N–CH); 7.3 (vbs, 4H, NH); 7.96 (s, 1H, H-8). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 10.60 (C-4'); 22.31 (2C, CH₃); 26.97 (C-3'); 46.11 (N–CH); 51.63 (C-2'); 71.71 (C-1'); 122.07 (C-5); 137.58 (C-8); 151.08 (C-4); 159.93 (N–C); 160.20 (C-2); 160.75 (C-6).

Compound **16g**: yield 0.2 g, 29%; FABMS: 307 [MH⁺] (100). [α]_D –33.3° (c 0.21, methanol); ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 0.89 (t, 3H, J(4', 3') = 7.4, CH₃-4'); 1.45 (d, 3H, J(CH₃, CH) = 6.8, CH₃); 1.46 (d, 3H, J(CH₃, CH) = 6.8, CH₃); 1.46 (m, 1H, 3'b); 1.65 (m, 1H, 3'a); 3.38 (dd, 1H, J(1'b-2') = 5.9, J_{gem} = 10.6, 1'b); 3.49 (dd, 1H, J(1'a-2') = 5.0, J_{gem} = 10.5, 1'a); 4.52 (br, 1H, J(CH, CH₃) = 6.8, N–CH); 4.63 (brs, 1H, OH); 6.12 (brs, 1H, NH); 7.25 (vbs, 4H, NH); 7.71 (s, 1H, H-8). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 10.87 (C-4'); 22.21 and 22.27 (2C, CH₃); 24.18 (C-3'); 45.63 (N–CH); 54.37 (C-2'); 63.30 (C-1'); 119.84 (C-5); 135.32 (C-8); 151.67 (C-4); 158.06 (C-2); 159.82 (N–C); 160.17 (C-6). For C₁₂H₂₀N₈O · 1/2 HCl (306.37) calcd: C, 48.10; H, 6.99; N, 34.52. Found: C, 48.40; H, 7.01; N, 34.29.

6.1.8. 2-[(2R)-2-Amino-3-methylbutyl]oxy]-6-guanidino-9-isopropyl-9H-purine (**16h**) and 6-guanidino-2-[(1R)-1-(hydroxymethyl)-2-methylpropyl]amino]-9-isopropyl-9H-purine (**16i**)

General procedure; (2R)-(–)-2-amino-3-methyl-1-butanol (1 g, 10 mmol); 10 h; RT; compound **16h**: yield 0.09 g, 28%; FABMS: 321.0 [MH⁺] (40). [α]_D –9.4° (c 0.19, methanol); ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 0.89 (d, 3H, J(4', 3') = 6.8, CH₃); 0.93 (d, 3H, J(4', 3') = 6.8, CH₃); 1.48 (d, 6H, J(CH₃, CH) = 6.8, CH₃); 1.72 (m, 1H, CH-3'); 2.83 (m, 1H, CH-2'); 3.99 (dd, 1H, J(1'b-2') = 7.1, J_{gem} = 10.4, 1'b); 4.19 (dd, 1H, J(1'a-2') = 5.2, J_{gem} = 10.4, 1'a); 4.61 (br, 1H, J(CH, CH₃) = 6.8, N–CH); 7.30 (vbs, 4H, NH); 7.96 (s, 1H, H-8). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 17.52 and 19.74 (C-4'); 22.29 (2C, CH₃); 30.34 (C-3'); 46.15 (N–CH); 55.07 (C-2'); 70.10 (C-1'); 122.08 (C-5); 137.60 (C-8); 151.08 (C-4); 159.92 (N–C); 160.21 (C-2); 160.75 (C-6). For C₁₆H₂₄N₈O · 2/3 MeOH (320.39) calcd: C, 51.54; H, 7.86; N, 32.79. Found: C, 51.35; H, 7.59; N, 33.09.

Compound **16i**: yield 0.1 g, 31%; FABMS: 321.0 [MH⁺] (100). [α]_D +37.5° (c 0.35, methanol); ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 0.90 (d, 3H, J(4', 3') = 6.9, CH₃); 0.91 (d, 3H, J(4', 3') = 6.9, CH₃); 1.45 (d, 3H, J(CH₃, CH) = 6.9, CH₃); 1.46 (d, 3H, J(CH₃, CH) = 6.8, CH₃); 1.97 (m, 1H, CH-3'); 3.49 (m, 2H, CH₂-1'); 3.75 (brs, 1H, CH₂-2'); 4.52 (br, J(CH–CH₃) = 6.8, CH–N); 4.58 (brs, 1H, OH); 6.13 (br, 1H, NH); 7.4 (vbs, 4H, NH); 7.71 (s, 1H, H-8). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 18.55 and 19.83 (C-4'); 22.18 and 22.33 (2C, CH₃); 28.82 (C-3'); 45.71 (N–CH); 57.71 (C-2'); 61.67 (C-1'); 119.74 (C-5); 135.38 (C-8); 151.67 (C-4); 158.42 (C-2); 159.76 (N–C); 159.97 (C-6). For C₁₆H₂₄N₈O · 1/3 EtOH · 1/3 HCl (320.39) calcd: C, 50.63; H, 7.63; N, 32.21. Found: C, 50.61; H, 7.50; N, 32.55.

6.1.9. 2-[(2S)-2-Amino-3-methylbutyl]oxy]-6-guanidino-9-isopropyl-9H-purine (**16j**) and 6-guanidino-2-[(1S)-1-(hydroxymethyl)-2-methylpropyl]amino]-9-isopropyl-9H-purine (**16k**)

General procedure; (2S)-(–)-2-amino-3-methyl-1-butanol (1 g, 10 mmol); 10 h; RT; compound **16j**: yield 0.12 g, 38%; FABMS: 321.0 [MH⁺] (100). [α]_D +12.6° (c 0.17, methanol); ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 0.89 (d, 3H, J(4', 3') = 6.8, CH₃); 0.93 (d, 3H, J(4', 3') = 6.8, CH₃); 1.48 (d, 6H, J(CH₃, CH) = 6.8, CH₃); 1.72 (m, 1H, CH-3'); 2.83 (m, 1H, CH-2'); 3.99 (dd, 1H, J(1'b-2') = 7.1, J_{gem} = 10.4, 1'b); 4.19 (dd, 1H, J(1'a-2') = 5.2, J_{gem} = 10.4, 1'a); 4.61 (br, 1H, J(CH, CH₃) = 6.8, N–CH); 7.30 (vbs, 4H, NH); 7.96 (s, 1H, H-8). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 17.52 and 19.74 (C-4'); 22.29 (2C, CH₃); 30.34 (C-3'); 46.15 (N–CH); 55.07 (C-2'); 70.10 (C-1'); 122.08 (C-5); 137.60 (C-8); 151.08 (C-4); 159.92 (N–C); 160.21 (C-2); 160.75 (C-6).

Compound **16k**: yield 0.12 g, 28%; FABMS: 321.0 [MH⁺] (100). [α]_D –35.6° (c 0.24, methanol); ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 0.90 (d, 3H, J(4', 3') = 6.9, CH₃); 0.91 (d, 3H, J(4', 3') = 6.9, CH₃); 1.45 (d, 3H, J(CH₃, CH) = 6.9, CH₃); 1.46 (d, 3H, J(CH₃, CH) = 6.8, CH₃); 1.97 (m, 1H, CH-3'); 3.49 (m, 2H, CH₂-1'); 3.75 (brs, 1H, CH₂-2'); 4.52 (br, J(CH–CH₃) = 6.8, CH–N); 4.58 (brs, 1H, OH); 6.13 (br, 1H, NH); 7.4 (vbs, 4H, NH); 7.71 (s, 1H, H-8). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 18.55 and 19.83 (C-4'); 22.18 and 22.33 (2C, CH₃); 28.82 (C-3'); 45.71 (N–CH); 57.71 (C-2'); 61.67 (C-1'); 119.74 (C-5); 135.38 (C-8); 151.67 (C-4); 158.42

(C-2); 159.76 (N-C); 159.97 (C-6). For $C_{16}H_{24}N_8O \cdot 4/5$ MeOH (320.39) calcd: C, 51.37; H, 7.92; N, 32.38. Found: C, 51.23; H, 7.41; N, 32.31.

6.1.10. 2-Cyclopropylamino-6-guanidino-9-isopropyl-9H-purine (**16l**)

General procedure; cyclopropylamine (2.3 ml, 32.6 mmol); 4 h, RT; yield 0.25 g, 25%; FABMS: 275.1 $[MH^+]$ (100). 1H NMR (DMSO- d_6): 0.43 and 0.62 (m, 2H, $2 \times CH_2$); 1.48 (d, 6H, $J(CH_3, CH) = 6.7$, CH₃); 2.60 (m, 1H, N-CH); 4.55 (sept, 1H, $J(CH, CH_3) = 6.7$, N-CH); 6.72 (brs, 1H, NH); 7.50 (brs, 4H, NH); 7.77 (s, 1H, H-8). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 6.68, 2C, (CH₂); 22.27 (2C, CH₃); 24.20 (N-CH); 45.50 (N-CH); 119.79 (C-5); 135.70 (C-8); 151.86 (C-4); 158.75 (C-6); 159.68 and 160.02 (N-C and C-2). For $C_{12}H_{18}N_8 \cdot 0.5H_2O \cdot HCl$ (274.32) calcd: C, 45.37; H, 6.26; N, 32.66; Cl 11.09. Found: C, 45.07; H, 6.30; N, 35.04; Cl 10.92.

6.1.11. 6-Guanidino-9-isopropyl-2-(2S)-(pyrrolidin-2-ylmethoxy)-9H-purine (**16m**) and 6-guanidino-2-[2-(2S)-(hydroxymethyl)pyrrolidin-1-yl]-9-isopropyl-9H-purine (**16n**)

General procedure; (S)-(+)-2-(hydroxymethyl)pyrrolidine (1.43 ml, 14 mmol); 10 h; RT; compound **16m**: yield 0.07 g, 16%; FABMS: 318.0 $[MH^+]$ (10). $[\alpha]_D^{+5.0^\circ}$ (c 0.28, methanol); 1H NMR (DMSO- d_6): 1.43 (m, 1H, 3'b); 1.48 (d, 6H, $J(CH_3, CH) = 6.8$, CH₃); 1.65 (m, 2H, CH-4'); 1.82 (m, 1H, 3'a); 2.79 (m, 2H, CH₂-5'); 3.68 (m, 1H, CH-2'); 4.02 (dd, 1H, $J(CH_2-2') = 6.1$, $J_{gem} = 10.3$, O-CH₂b); 4.06 (dd, 1H, $J(CH_2-2') = 6.7$, $J_{gem} = 10.3$, O-CH₂a); 4.61 (br, 1H, $J(CH, CH_3) = 6.8$, N-CH); 7.40 (vbs, 4H, NH); 7.95 (s, 1H, H-8). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 22.27 (2C, CH₃); 25.24 (C-4'); 28.65 (C-3'); 46.09 (N-CH); 46.25 (C-5'); 56.70 (C-2'); 70.32 (O-CH₂); 122.05 (C-5); 137.49 (C-8); 151.06 (C-4); 159.89 (N-C); 160.23 (C-2); 160.72 (C-6).

Compound **16n**: yield 0.22 g, 48%; FABMS: 319 $[MH^+]$ (100). $[\alpha]_D -83.4^\circ$ (c 0.33, methanol); 1H NMR (DMSO- d_6): 1.47 (d, 6H, $J(CH_3, CH) = 6.8$, CH₃); 1.83–1.99 (m, 4H, CH₂-3', 4'); 3.37 (m, 1H, 5'b, CH₂-O); 3.49 (m, 1H, 5'a); 3.66 (bdt, $J(CH_2-OH) = J(CH_2-2') = 4.1$, $J_{gem} = 10.2$, CH₂-O); 4.04 (brs, CH₂-2'); 4.54 (br, 1H, $J(CH, CH_3) = 6.8$, N-CH); 4.90 (brs, 1H, OH); 7.3 (vbs, 4H, NH); 7.74 (s, 1H, H-8). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 22.01 (2C, CH₃); 23.21 (C-4'); 28.00 (C-3'); 45.85 (N-CH); 47.83 (C-5'); 59.46 (C-2'); 62.48 (O-CH₂); 119.73 (C-5); 135.81 (C-8); 151.64 (C-4); 156.48 (C-2); 159.95 (N-C); 160.09 (C-6). For $C_{12}H_{20}N_8O \cdot 1/3$ MeOH (292.34) calcd: C, 52.32; H, 7.15; N, 34.05. Found: C, 52.45; H, 6.97; N, 34.15.

6.1.12. 6-Guanidino-9-isopropyl-2-(2R)-(pyrrolidin-2-ylmethoxy)-9H-purine (**16o**) and 6-guanidino-2-[2-(2R)-(hydroxymethyl)pyrrolidin-1-yl]-9-isopropyl-9H-purine (**16p**)

General procedure; (R)-(-)-2-(hydroxymethyl)pyrrolidine (1.43 ml, 14 mmol); 10 h; RT; compound **16o**: yield 0.07 g, 15%; FABMS: 319.0 $[MH^+]$ (40). $[\alpha]_D -8.6^\circ$ (c 0.21, methanol); 1H NMR (DMSO- d_6): 1.43 (m, 1H, 3'b); 1.48 (d, 6H, $J(CH_3, CH) = 6.8$, CH₃); 1.65 (m, 2H, CH-4'); 1.82 (m, 1H, 3'a); 2.79 (m, 2H, CH₂-5'); 3.68 (m, 1H, CH-2'); 4.02 (dd, 1H, $J(CH_2-2') = 6.1$, $J_{gem} = 10.3$, O-CH₂b); 4.06 (dd, 1H, $J(CH_2-2') = 6.7$, $J_{gem} = 10.3$, O-CH₂a); 4.61 (br, 1H, $J(CH, CH_3) = 6.8$, N-CH); 7.40 (vbs, 4H, NH); 7.95 (s, 1H, H-8). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 22.27 (2C, CH₃); 25.24 (C-4'); 28.65 (C-3'); 46.09 (N-CH); 46.25 (C-5'); 56.70 (C-2'); 70.32 (O-CH₂); 122.05 (C-5); 137.49 (C-8); 151.06 (C-4); 159.89 (N-C); 160.23 (C-2); 160.72 (C-6).

Compound **16p**: yield 0.23 g, 50%; FABMS: 319.0 $[MH^+]$ (50). $[\alpha]_D +94.3^\circ$ (c 0.53, methanol); 1H NMR (DMSO- d_6): 1.47 (d, 6H, $J(CH_3, CH) = 6.8$, CH₃); 1.83–1.99 (m, 4H, CH₂-3', 4'); 3.37 (m, 1H, 5'b, CH₂-O); 3.49 (m, 1H, 5'a); 3.66 (bdt, $J(CH_2-OH) = J(CH_2-2') = 4.1$, $J_{gem} = 10.2$, CH₂-O); 4.04 (brs, CH₂-2'); 4.54 (br, 1H, $J(CH, CH_3) = 6.8$, N-CH); 4.90 (brs, 1H, OH); 7.3 (vbs, 4H, NH); 7.74 (s, 1H, H-8). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 22.01 (2C, CH₃); 23.21 (C-4'); 28.00 (C-3'); 45.85 (N-CH); 47.83 (C-5'); 59.46 (C-2'); 62.48 (O-CH₂); 119.73 (C-5); 135.81 (C-8); 151.64 (C-4); 156.48 (C-2);

159.95 (N-C); 160.09 (C-6). For $C_{16}H_{22}N_8O \cdot 1/2$ EtOH (318.38) calcd: C, 52.77; H, 7.38; N, 32.82. Found: C, 52.75; H, 7.06; N, 32.98.

6.1.13. 2-Chloro-6-guanidino-9-isopropyl-9H-purine (**17**)

2,6-Dichloro-9-isopropyl-9H-purine [29] was treated with a solution of guanidine [21] at RT. The precipitate was filtered and filtrate was purified by column chromatography (5–15% ethanolic:EtOAc followed by EtOAc:acetone:EtOH:H₂O, 6:1:1:0.5). Yield 3.21 g, 75%. FABMS: 254.0 $[MH^+]$ (100). 1H NMR (DMSO- d_6): 1.49 (d, 6H, $J(CH_3, CH) = 6.8$, CH₃); 4.67 (sept, 1H, $J(CH, CH_3) = 6.8$, N-CH); 7.40 (br, 4H, NH); 8.19 (s, 1H, H-8). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 22.30 (2C, CH₃); 46.56 (N-CH); 124.50 (C-5); 139.36 (C-8); 150.57 (C-2); 150.87 (C-4); 160.16 (C-6); 160.34 (N-C). For $C_9H_{12}ClN_7 \cdot 1/4H_2O$ (253.69) calcd: C, 41.87; H, 4.88; N, 37.97; Cl, 13.73. Found: C, 42.16; H, 4.68; N, 37.82 Cl, 14.05.

6.2. Enzyme inhibition assay

CDK1/cyclin B and CDK2/cyclin E kinases were produced using the baculoviral expression system and purified on a Ni²⁺-NTA column (Qiagen). The kinase reaction was performed with 1 mg/ml histone H1 in the presence of 15 μ M ATP, 0.05 μ M $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$, and with a test compound in a final volume of 10 μ l, all in the reaction buffer (60 mM HEPES–NaOH, pH 7.5, 3 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂, 3 μ M sodium orthovanadate, 1.2 mM DTT, 2.5 μ g/50 μ l PEG_{20,000}). The reaction was stopped by adding 5 μ l of 3% aqueous H₃PO₄. Aliquots were spotted onto P-81 phosphocellulose paper (Whatman), washed 3 $\times$ with 0.5% aqueous H₃PO₄, and finally air-dried. Kinase inhibition was quantified using digital image analyzer FLA-7000 (Fujifilm). The IC₅₀ values were determined from dose–response curves.

Kinase selectivity profiling was carried out under the conditions used as described previously [37]. Compounds **16e** and **16g** were screened at a concentration of 1 μ M in duplicate. The assays were initiated with ATP (800 cpm/pmol $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ at 5, 20 or 50 μ M in order to be at or below the K_m for ATP for each enzyme), stopped by the addition of phosphoric acid and spotted onto P81 filter plates. Inhibition was expressed as residual kinase activity.

6.3. Cytotoxicity assay

The cytotoxicity of the studied compounds was determined on MCF7 breast cancer cell line. The cells were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 IU/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin and maintained at 37 $^\circ$ C, in a humidified environment with 5% CO₂. Approximately 10,000 cells were seeded into a well of a 96-well microtiter plate. After 4 h stabilization, a tested compound in various concentrations was added in triplicates. The final concentration of DMSO never exceeded 0.5%. After 72 h incubation, calcein AM solution (Molecular Probes) was added to the final concentration of 1 μ g/ml for 1 h and the fluorescence of free calcein was measured at 485/538 nm (excitation/emission) using Fluoroskan Ascent reader (Labsystem). The viability was expressed as a percentage of the fluorescence of the control cells and the IC₅₀ values (the concentration of an inhibitor that is required for 50% decrease of the intracellular esterase activity) were determined by graphical analysis from dose–response curves. The IC₅₀ values represent averages of at least three independent experiments.

6.4. Cell cycle analysis

Approximately million cells were fixed with 90% methanol. After rehydration the cells were incubated with primary antibody

against pH^{3Ser10} and then with secondary antibody conjugated with Alexa Fluor 488. DNA was stained with propidium iodide and the fluorescence signal was measured at 488/575 nm (ex/em) for propidium iodide and 488/525 nm (ex/em) for Alexa Fluor 488 using Cell Lab QuantaTM SC flow cytometer (Beckman Coulter). The data were analyzed using the program Multicycle AV for Windows.

6.5. Docking study

The human CDK2, roscovitine and inhibitors **16e/16g** and **16i/16k** were prepared for docking in the YASARA modelling package [39] on the basis of deposited structure 2A4L [33]. H atoms were added to the protein to mimic neutral pH and their positions were optimized. The glycerol and water molecules were removed from the model. The parameter set used for the protein was AMBER ff03 [40]. The ligand was optimized in a vacuum and partial charges on its atoms were obtained by a restrained fit to the electrostatic potential (RESP) at the AM1BCC level [41]. The ligand was then docked to the protein using the AutoDock program [42]. 1000 poses were obtained using a local search protocol, these were subsequently clustered based on similarity (r.m.s.d. < 5 Å) and then scored.

Contributions

ID, MC, MD, VK and ZJ conceived and designed the experiments. MC performed organic syntheses. ID performed biological assays and ID, VK and JV analyzed biological data set. ID, MC, VK, JV and ZJ wrote the paper. JB performed the docking study. All authors have approved the article.

Acknowledgements

This work is a part of the research project #AVOZ40550506. It was supported by the “Centre for New Antivirals and Antineoplastics” (1M0508) and by Gilead Sciences, Inc. (Foster City, CA, USA). The authors from Palacky University were supported by grant P305/12/0783 from the Czech Science Foundation and Ministry of Education, Youth and Sports, Czech Republic (ED0007/01/01 Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research). The authors thank Dita Parobková from Palacky University for the technical assistance and the staff of the mass spectrometry and analytical departments of the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry ASCR.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.01.021>.

References

- [1] M. Malumbres, M. Barbacid, Mammalian cyclin-dependent kinases, *Trends Biochem. Sci.* 30 (2005) 630–641.
- [2] L. Zuo, J. Weger, Q. Yang, A.M. Goldstein, M.A. Tucker, G.J. Walker, N. Hayward, N.C. Dracopoli, Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma, *Nat. Genet.* 12 (1996) 97–99.
- [3] K.S. Smalley, R. Contractor, T.K. Nguyen, M. Xiao, R. Edwards, V. Muthusamy, A.J. King, K.T. Flaherty, M. Bosenberg, M. Herlyn, K.L. Nathanson, Identification of a novel subgroup of melanomas with KIT/cyclin-dependent kinase-4 overexpression, *Cancer Res.* 68 (2008) 5743–5752.
- [4] S. Ortega, M. Malumbres, M. Barbacid, Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer, *Biochim. Biophys. Acta* 1602 (2002) 73–87.
- [5] G. Romano, A. Giordano, Role of the cyclin-dependent kinase 9-related pathway in mammalian gene expression and human diseases, *Cell Cycle* 7 (2008) 3664–3668.
- [6] S. Lapenna, A. Giordano, Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer, *Nat. Rev. Drug Discov.* 8 (2009) 547–566.
- [7] V. Krystof, S. Uldrian, Cyclin-dependent kinase inhibitors as anticancer drugs, *Curr. Drug Targets* 11 (2010) 291–302.
- [8] M. Knockaert, P. Greengard, L. Meijer, Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases, *Trends Pharmacol. Sci.* 23 (2002) 417–425.
- [9] J. Vesely, L. Havlicek, M. Strnad, J.J. Blow, A. Donella-Deana, L. Pinna, D.S. Letham, J. Kato, L. Detivaud, S. LeClerc, Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues, *Eur. J. Biochem.* 224 (1994) 771–786.
- [10] L. Havlicek, J. Hanus, J. Vesely, S. LeClerc, L. Meijer, G. Shaw, M. Strnad, Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds, *J. Med. Chem.* 40 (1997) 408–412.
- [11] L. Meijer, A. Borgne, O. Mulner, J.P. Chong, J.J. Blow, N. Inagaki, M. Inagaki, J.G. Delcros, J.P. Moulinoux, Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5, *Eur. J. Biochem.* 243 (1997) 527–536.
- [12] N.S. Gray, L. Wodicka, A.M. Thunnissen, T.C. Norman, S. Kwon, F.H. Espinoza, D.O. Morgan, G. Barnes, S. LeClerc, L. Meijer, S.H. Kim, D.J. Lockhart, P.G. Schultz, Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors, *Science* 281 (1998) 533–538.
- [13] Y.T. Chang, N.S. Gray, G.R. Rosania, D.P. Sutherlin, S. Kwon, T.C. Norman, R. Sarohia, M. Leost, L. Meijer, P.G. Schultz, Synthesis and application of functionally diverse 2,6,9-trisubstituted purine libraries as CDK inhibitors, *Chem. Biol.* 6 (1999) 361–375.
- [14] V. Krystof, I.W. McNaie, M.D. Walkinshaw, P.M. Fischer, P. Muller, B. Vojtesek, M. Orsag, L. Havlicek, M. Strnad, Antiproliferative activity of olomoucine II, a novel 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor, *Cell. Mol. Life Sci.* 62 (2005) 1763–1771.
- [15] K. Bettayeb, N. Oumata, A. Echalié, Y. Ferandin, J.A. Endicott, H. Galons, L. Meijer, CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases, *Oncogene* 27 (2008) 5797–5807.
- [16] N. Oumata, K. Bettayeb, Y. Ferandin, L. Demange, A. Lopez-Giral, M.L. Goddard, V. Myrianthopoulos, E. Mikros, M. Flajolet, P. Greengard, L. Meijer, H. Galons, Roscovitine-derived, dual-specificity inhibitors of cyclin-dependent kinases and casein kinases 1, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 5229–5242.
- [17] M.P. Trova, K.D. Barnes, C. Barford, T. Benanti, M. Bielaska, L. Burry, J.M. Lehman, C. Murphy, H. O'Grady, D. Peace, S. Salamone, J. Smith, P. Snider, J. Toporowski, S. Tregay, A. Wilson, M. Wyle, X. Zheng, T.D. Friedrich, Biaryl purine derivatives as potent antiproliferative agents: inhibitors of cyclin dependent kinases. Part I, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 6608–6612.
- [18] M.P. Trova, K.D. Barnes, L. Alicea, T. Benanti, M. Bielaska, J. Bilotta, B. Bliss, T.N. Duong, S. Haydar, R.J. Herr, Y. Hui, M. Johnson, J.M. Lehman, D. Peace, M. Rainka, P. Snider, S. Salamone, S. Tregay, X. Zheng, T.D. Friedrich, Heterobiaryl purine derivatives as potent antiproliferative agents: inhibitors of cyclin dependent kinases. Part II, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 6613–6617.
- [19] R. Jorda, K. Paruch, V. Krystof, Cyclin-dependent kinase inhibitors inspired by roscovitine: purine bioisosteres, *Curr. Pharm. Des.* 18 (2012) 2974–2980.
- [20] R.G. Berlinkin, M.H. Kossuga, Natural guanidine derivatives, *Nat. Prod. Rep.* 22 (2005) 516–550.
- [21] M. Cesnek, A. Holy, M. Masojdikova, Z. Zidek, Synthesis of 9-alkyl and 9-heteroalkyl substituted 2-amino-6-guanidinopurines and their influence on the NO-production in macrophages, *Bioorg. Med. Chem.* 13 (2005) 2917–2926.
- [22] A.J. Hutchison, M. Williams, J.R. de, R. Yokoyama, H.H. Oei, G.R. Ghai, R.L. Webb, H.C. Zoganas, G.A. Stone, M.F. Jarvis, 2-(Arylalkylamino)adenosine-5'-uronamides: a new class of highly selective adenosine A2 receptor ligands, *J. Med. Chem.* 33 (1990) 1919–1924.
- [23] C.H. Hocart, D.S. Letham, C.W. Parker, Inhibitors of cytokinin metabolism 4. Substituted xanthines and cytokinin analogs as inhibitors of cytokinin N-glucosylation, *Phytochemistry* 30 (1991) 2477–2486.
- [24] V. Brun, M. Legraverend, D.S. Grierson, Traceless solid-phase synthesis of 2,6,9-trisubstituted purines from resin bound 6-thiopurines, *Tetrahedron* 58 (2002) 7911–7923.
- [25] S. Piguel, M. Legraverend, Selective amidation of 2,6-dihalogenopurines: application to the synthesis of new 2,6,9-trisubstituted purines, *J. Org. Chem.* 72 (2007) 7026–7029.
- [26] N. Boudet, S.R. Dubbaka, P. Knochel, Oxidative amination of cuprated pyrimidine and purine derivatives, *Org. Lett.* 10 (2008) 1715–1718.
- [27] M. Legraverend, O. Ludwig, S. LeClerc, L. Meijer, Synthesis of a new series of purine derivatives and their anti-cyclin-dependent kinase activities, *J. Heterocycl. Chem.* 38 (2001) 299–303.
- [28] V. Nair, T.B. Sells, Copper mediated reactions in nucleoside synthesis, *Tetrahedron Lett.* 31 (1990) 807–810.
- [29] M. Rypka, J. Vesely, Z. Chmela, D. Riegrova, K. Cervenková, L. Havlicek, K. Lemr, J. Hanus, B. Cerny, J. Lukes, K. Michalikova, In vitro biotransformation of 2,6,9-trisubstituted purine-derived cyclin-dependent kinase inhibitor bohemin by mouse liver microsomes, *Xenobiotica* 32 (2002) 1017–1031.
- [30] D.L. Ladd, Synthesis of some substituted guanidinopyrimidines and their structural assignment by C-13 and H-1-NMR, *J. Heterocycl. Chem.* 19 (1982) 917–921.
- [31] C. Crosio, G.M. Fimia, R. Loury, M. Kimura, Y. Okano, H.Y. Zhou, S. Sen, C.D. Allis, P. Sassone-Corsi, Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian aurora kinases, *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002) 874–885.
- [32] B. Perez-Cadahia, B. Drobnic, J.R. Davie, H3 phosphorylation: dual role in mitosis and interphase, *Biochem. Cell. Biol.* 87 (2009) 695–709.
- [33] W.F. DeZevedo, S. LeClerc, L. Meijer, L. Havlicek, M. Strnad, S.H. Kim, Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues – crystal structure

- of human cdk2 complexed with roscovitine, *Eur. J. Biochem.* 243 (1997) 518–526.
- [34] D.S. Williamson, M.J. Parratt, J.F. Bower, J.D. Moore, C.M. Richardson, P. Dokurno, A.D. Cansfield, G.L. Francis, R.J. Hebdon, R. Howes, P.S. Jackson, A.M. Lockie, J.B. Murray, C.L. Nunns, J. Powles, A. Robertson, A.E. Surgenor, C.J. Torrance, Structure-guided design of pyrazolo[1,5-a]pyrimidines as inhibitors of human cyclin-dependent kinase 2, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (2005) 863–867.
- [35] S. Bach, M. Knockaert, J. Reinhardt, O. Lozach, S. Schmitt, B. Baratte, M. Koken, S.P. Coburn, L. Tang, T. Jiang, D.C. Liang, H. Galons, J.F. Dierick, L.A. Pinna, F. Meggio, F. Totzke, C. Schachtele, A.S. Lerman, A. Carnero, Y.Q. Wan, N. Gray, L. Meijer, Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 31208–31219.
- [36] S.L. Posy, M.A. Hermsmeier, W. Vaccaro, K.H. Ott, G. Todderud, J.S. Lippy, G.L. Trainor, D.A. Loughney, S.R. Johnson, Trends in kinase selectivity insights for target class-focused library screening, *J. Med. Chem.* 54 (2011) 54–66.
- [37] J. Bain, L. Plater, M. Elliott, N. Shpiro, C.J. Hastie, H. Mclauchlan, I. Klevernic, J.S.C. Arthur, D.R. Alessi, P. Cohen, The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update, *Biochem. J.* 408 (2007) 297–315.
- [38] M. Cesnek, M. Masojidkova, A. Holy, V. Solinova, D. Koval, V. Kasicka, Synthesis and properties of 2-guanidinopurines, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 71 (2006) 1303–1319.
- [39] E. Krieger, K. Joo, J. Lee, J. Lee, S. Raman, J. Thompson, M. Tyka, D. Baker, K. Karplus, Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: four approaches that performed well in CASP8, *Proteins* 77 (2009) 114–122.
- [40] Y. Duan, C. Wu, S. Chowdhury, M.C. Lee, G.M. Xiong, W. Zhang, R. Yang, P. Cieplak, R. Luo, T. Lee, J. Caldwell, J.M. Wang, P. Kollman, A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations, *J. Comput. Chem.* 24 (2003) 1999–2012.
- [41] A. Jakalian, D.B. Jack, C.I. Bayly, Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation, *J. Comput. Chem.* 23 (2002) 1623–1641.
- [42] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility, *J. Comput. Chem.* 30 (2009) 2785–2791.

PŘÍLOHA II



Antiproliferative and antiangiogenic effects of flavone eupatorin, an active constituent of chloroform extract of *Orthosiphon stamineus* leaves

Iva Dolečková^{a,*}, Lucie Rárová^b, Jiří Grúz^{a,b}, Magdaléna Vondrusová^a,
Miroslav Strnad^{a,b}, Vladimír Kryštof^a

^a Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacký University & Institute of Experimental Botany, Academy of Science, Šlechtitelů 11, 783 71, Olomouc, Czech Republic

^b Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 April 2012

Received in revised form 28 May 2012

Accepted 2 June 2012

Available online 12 June 2012

Keywords:

Eupatorin

Orthosiphon stamineus

Flavonoids

Kinase inhibitor

Antiproliferative

Antiangiogenic

ABSTRACT

Flavone eupatorin is one of the constituents of *Orthosiphon stamineus*, a medicinal herb used in folk medicine in South East Asia for treatment of various disorders. In our study, we investigated the antiproliferative properties of a chloroform extract of the leaves of *O. stamineus* and of pure eupatorin. The compound was able to reduce the number of viable cancer cells to the same extent as the extract, with IC₅₀ values in micromolar range. Moreover, both the eupatorin standard and the extract caused cells to arrest in the G2/M phase of the cell cycle. This clearly demonstrates that eupatorin contributes significantly to the overall extract activity. Induction of mitotic catastrophe, accompanied by key molecular events defining apoptosis, is the mechanism of eupatorin-induced cell death. Importantly, eupatorin (at the doses cytotoxic to cancer cells) did not kill normal cells; it only limited migration of HUVEC endothelial cells and their ability to create tubes. The ability of eupatorin to nonspecifically inhibit many protein kinases was proven and is the probable cause of its cellular effects. In summary, eupatorin emerges as a promising agent in anticancer research.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Orthosiphon stamineus Benth. (Lamiaceae) is a medicinal herb widely used for many centuries in folk medicine in South East Asia for treatment of various disorders including

urinary lithiasis, edema, eruptive fever, influenza, rheumatism, hepatitis, jaundice and biliary lithiasis [1]. Leaves of the plant are consumed as Java tea to facilitate body detoxification [2]. Tablets or capsules containing dried leaves are also available as a dietary supplement. For its demonstrated efficacy the extracts from *O. stamineus* have been more closely examined and the results confirmed its diuretic, uricosuric [3], antioxidant, hepatoprotective [4], anti-inflammatory [5] and other properties. Extracts of *O. stamineus* leaves consist of a wide range of compounds, including flavonoids, terpenoids or organic acids such as rosmarinic or caffeic acid [6]. The polymethoxylated flavonoids sinensetin, eupatorin and 3'-hydroxy-5,6,7,4'-tetramethoxyflavone, found as dominant compounds in the chloroform fraction of such extracts, are among the most therapeutically important constituents [5].

Flavonoids are secondary metabolites widely distributed throughout the plant kingdom with well known and proven

Abbreviations: AIF, apoptosis inducing factor; CDK, cyclin-dependent kinase; EGFR, epidermal growth factor receptor; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; PARP, poly(ADP-ribose)polymerase; PDGFR, platelet derived growth factor receptor; pH3^{Ser10}, phosphorylated histone H3 on serine 10; SAC, spindle assembly checkpoint; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor

* Corresponding author at: Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacký University & Institute of Experimental Botany, Academy of Science, Šlechtitelů 11, Olomouc 783 71, Czech Republic. Tel.: +420 585 634 854; fax: +420 585 634 870.

E-mail addresses: iva.doleckova@centrum.cz (I. Dolečková), lucie.rarova@upol.cz (L. Rárová), jiri.gruz@gmail.com (J. Grúz), majda.snow@seznam.cz (M. Vondrusová), miroslav.strnad@upol.cz (M. Strnad), vladimir.krystof@upol.cz (V. Kryštof).

antioxidant, anti-inflammatory, antitumor and other biological activities [7]. The ability of some of these compounds to block the cell cycle, induce apoptosis [8], disrupt mitotic spindle [9] or inhibit angiogenesis [10] makes them promising agents in anticancer research and some of them, such as quercetin, genistein or flavopiridol (a synthetic analogue of a natural alkaloid rohitukin), have already entered clinical trials for several oncological indications [11–13]. On the molecular level flavonoids exert a broad spectrum of action: they inhibit several kinases including epidermal growth factor receptors (EGFRs), platelet derived growth factor receptors (PDGFRs), vascular endothelial growth factor receptors (VEGFRs), c-Met [14] or cyclin-dependent kinases (CDKs) [15]. The latter are all important enzymes that drive development of many cancer types. Interaction with tubulin, leading to depolymerization of microtubules and disruption of the mitotic spindle, has also been reported for some flavonoids [9].

Screen of a library of flavonoids and related natural compounds yielded eupatorin to be a cytotoxic agent able to weakly inhibit cyclin-dependent kinases. This observation led us to study the antiproliferative and antiangiogenic effects of the compound in detail and in an effort to explain the mechanism of its action. We also tried to evaluate the contribution of eupatorin to the overall activity of the chloroform extract of *O. stamineus* leaves where eupatorin is among the main constituents [5].

The flavone eupatorin (Fig. 1) has been already shown to be an antiproliferative agent active against several cancer cell lines, including human cervical adenocarcinoma (HeLa), human gastric adenocarcinoma (MK-1), murine melanoma (B16F10), murine colon carcinoma (26-L5), or human breast cancer cell line (MDA-MB-468), but it has no cytostatic effects in normal human breast cell line (MCF-10A) [6,16,17]. These observations suggest that eupatorin could become an anticancer agent with desired selectivity between cancer and normal cells. In a recently published study [18], eupatorin was found in a high-throughput screen of 2000 bioactive compounds as a new spindle assembly checkpoint (SAC) inhibitor.

2. Materials and methods

2.1. Chloroform extract of *O. stamineus* leaves

Dried leaves of *O. stamineus* were purchased from Expharma (Prague, Czech Republic), homogenized with chloroform (40 mL per 2 g) using an oscillation ball mill (MM 301, Retsch, Haan, Germany). The crude extract was centrifuged for 10 min at 20,000 g, the supernatant was filtered through a 0.45- μ m Nylon membrane filter (Alltech, Breda, Netherlands) and evaporated using a rotary vacuum evaporator (Buchi, Flawil,

Switzerland). The dried isolate was dissolved in DMSO and the solution was used for cell culture assays.

2.2. Quantification of eupatorin in the extract

Eupatorin was quantified using an ACQUITY Ultra Performance LC™ system (Waters, Milford, MA, USA) linked to a PDA 2996 diode array detector and Micromass Quattro micro™ API benchtop triple quadrupole mass spectrometer (Waters MS Technologies, Manchester, UK), equipped with a Z-spray electrospray ionization (ESI) source operating in positive mode. Diluted sample solutions were injected onto a reversed phase column (BEH C8, 1.7 μ m, 150 $\times$ 2.1 mm, Waters, Milford, MA, USA), which was maintained at 30 °C. The mobile phase consisted of the following sequence of linear gradients and isocratic flows of solvent A (water) and solvent B (acetonitrile with 7.5 mM HCOOH) at a flow rate of 0.25 mL/min: 50–100% B over 3 min, 100% B for 1.5 min, and finally 100–50% B over 1 min. Eupatorin was detected in multiple reaction monitoring (MRM) mode using mass-to-charge (m/z) transitions of precursor (m/z 345) and product (m/z 284) ions. Quantification was performed by the method of external calibration ($R^2 > 0.995$) with authentic standard of eupatorin (Suppl. 1).

2.3. Antibodies and reagents

Eupatorin standard (purity 94.1% determined by HPLC by supplier) was purchased from Phytolab (Vestenbergsgreuth, Germany) and solubilized in DMSO to give a 100 mM solution. Specific antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) (anti-caspase 3), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) (anti- α -tubulin, clone DM1A; peroxidase-labeled secondary antibodies), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) (anti-Mcl-1, clone S-19; anti-PARP, clone F-2; anti-Mdm-2, clone SMP14; VEGFR1, clone C-17), Millipore (Billerica, MA, USA) (anti-pH3^{Ser10}), Jackson ImmunoResearch Laboratory (Suffolk, UK) (FITC-conjugated goat anti-mouse IgG), Exbio (Vestec, Czech Republic) (anti- γ -tubulin conjugated with Dyomics 647), Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) (Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG) or were a generous gift from B. Vojtěšek (Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic) (anti-p53, clone DO-1). All antibodies were diluted into 5% nonfat dry milk in PBS with 0.1% Tween 20.

2.4. Cell cultures and cell viability assay

MCF7 breast adenocarcinoma, RPMI8226 multiple myeloma, HL-60 acute promyelocytic leukemia, MOLT-4 acute lymphoblastic leukemia, K562 chronic myelogenous leukemia, HeLa cervical adenocarcinoma cell lines and BJ foreskin fibroblasts were purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) or the European Collection of Cell Cultures (Salisbury, UK). HUVEC endothelial cells were a kind gift from J. Ulrichová (Palacký University Olomouc, Olomouc, Czech Republic). The cells were cultivated according to the instructions provided by suppliers. Cell viability assay was performed using calcein AM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), the fluorescence of viable cells was measured at 485/538 nm (ex/em) using a Fluoroskan Ascent Plate Reader (Thermo Labsystems, Waltham, MA, USA) according to Jorda et al. [19].

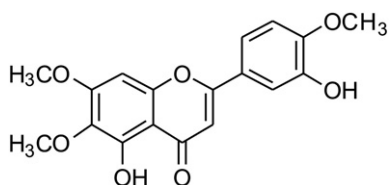


Fig. 1. Structure of eupatorin.

2.5. Cell cycle analysis

The cells were harvested and fixed with 90% methanol. After rehydration the cells were incubated with primary antibody against pH3^{Ser10} and then with secondary antibody conjugated with Alexa Fluor 488. DNA was stained with propidium iodide and the fluorescence signal was measured at 488/575 nm (ex/em) for propidium iodide and 488/525 nm (ex/em) for Alexa Fluor 488 using Cell Lab QuantaTM SC flow cytometer (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA). The data were analyzed using the program Multicycle AV for Windows.

2.6. SDS-PAGE and immunoblotting

The cells were harvested, lysed and proteins in the lysates were quantified by the Bradford method. The samples were separated on SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blocked and probed with primary and appropriate secondary antibody. Protein-antibody complexes were visualized using ECL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) as described previously [19].

2.7. Caspase 3/7 assay

The assay was performed as described previously [19]. Briefly, the cells were harvested, lysed and the protein concentration was determined by the Bradford method. 15 µg of the proteins were mixed with 100 µL of the assay buffer containing 100 µM Ac-DEVD-AMC as a substrate. The fluorescence signal was measured using a Fluoroskan Ascent reader (Thermo LabSystems, Waltham, MA, USA) at 346/442 nm (ex/em).

2.8. Immunofluorescence staining

HeLa cells were cultivated on glass cover slips in six-well plates. The cells were then washed, fixed with methanol-acetone (1:1) and blocked with 10% fetal bovine serum. The slips were incubated with primary antibodies and after washing with secondary antibodies. DNA was stained with DAPI. Images were captured using a fluorescence microscope BX50 (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with digital camera Cool Snap (Photometrics, Tucson, AZ, USA).

2.9. Protein kinase assays

Kinase selectivity profiling was carried out under the conditions used as described previously [20]. Eupatorin was screened at a concentration of 1 µM in duplicate. The assays were initiated with ATP (800 cpm/pmol [γ -³³P]ATP at 5, 20 or 50 µM in order to be at or below the K_m for ATP for each enzyme), stopped by the addition of phosphoric acid and spotted onto P81 filter plates. Inhibition was expressed as residual kinase activities.

2.10. Migration scratch assay

A scratch by tip was made in a layer of confluent growing HUVEC cells. The cells were treated with eupatorin for 20 h and then fixed with 3% formalin. Images were

captured using microscope BX50 (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with digital camera Cool Snap (Photometrics, Tucson, AZ, USA) and analyzed using S.CORE Image Analysis software (S.CO LifeScience, Munich, Germany). Migration was expressed as the ratio of pixels non-covered by cells and the total number of pixels in the wound area.

2.11. Tube formation assay

The method was performed according to Zahler et al., 2010 [21]. Briefly, HUVEC cells were seeded on Matrigel (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) in Ibidi µ-slides (15-well, Ibidi GmbH, Munich, Germany) and treated with eupatorin for 20 h. Images were captured with a BX50 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with digital camera Cool Snap (Photometrics, Tucson, AZ, USA). The total length of tubes and the number of nodes was quantified using the MATLAB based image analysis program developed in house.

2.12. Statistical analysis

Statistical calculations were carried out with the GraphPad Prism 5.0 for Windows software package. Results are expressed as the mean $\pm$ S.D. of at least 3 independent experiments. One-way ANOVA with Dunnett's post test was used for statistical analyses.

3. Results and discussion

3.1. Eupatorin is the active constituent of chloroform extract of *O. stamineus* leaves

A chloroform extract of *O. stamineus* leaves was prepared as described in the Materials and Methods section. The extract reduced cell viability of cancer cells tested as shown in Table 1. It was reported previously that eupatorin is one of the most biologically active constituents of *O. stamineus* leaves [5]. To evaluate its contribution to the antiproliferative activity of the extract found in this study, the concentration of eupatorin in the extract was determined by using UPLC-MS/MS (0.53 ± 0.08 mg/g DW; Suppl. 1) and the activity of the extract was compared to that of the eupatorin standard. Pure eupatorin was able to reduce the number of viable cancer cells in a similar manner to the extract, with IC₅₀ values in micromolar range (Table 2). This clearly demonstrates that eupatorin contributes significantly to the overall extract activity. Moreover pure eupatorin was selectively active against a broad spectrum of cancer cells and was much less effective against normal cells (Table 2). The dose response curves of both the extract and the eupatorin standard are attached as Suppl. 2.

3.2. The extract as well as the eupatorin standard induces G2/M arrest of the cell cycle

After 24 h the extract (6.48 mg DW/mL, final concentration of eupatorin in culture medium was 10 µM; Fig. 2A) as well as pure eupatorin (Fig. 2B) induced G2/M arrest of the cell cycle of HeLa cells. In an effort to distinguish between G2 and M phase we examined the intracellular levels of histone H3 phosphorylated on serine 10 (pH3^{Ser10}) by flow

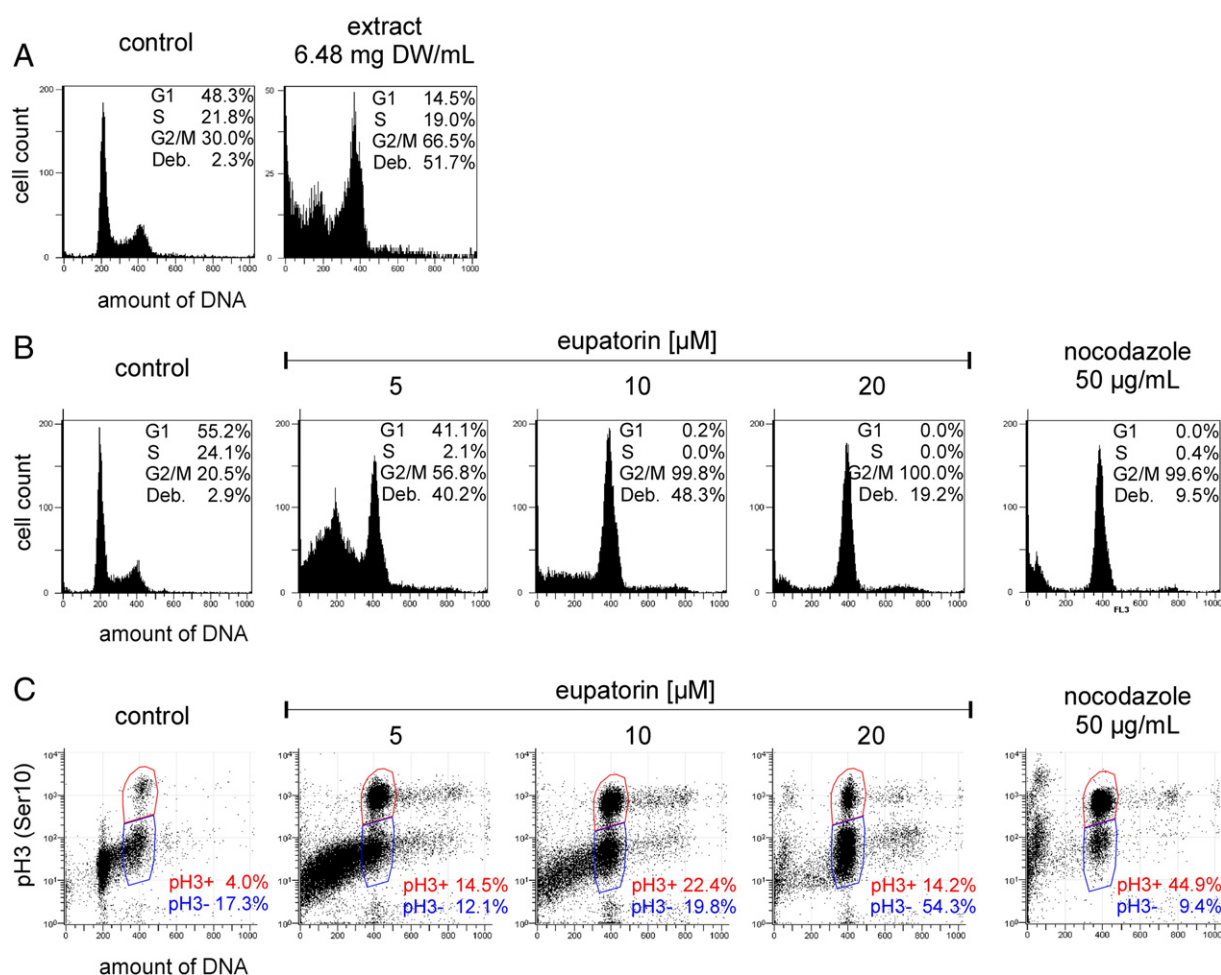


Fig. 2. Chloroform extract of *Orthosiphon stamineus* leaves as well as pure eupatorin induces G2/M arrest of the cell cycle in HeLa cells. Flow cytometry analysis: (A) propidium iodide staining of HeLa cells treated with the extract (6.48 mg DW/mL, concentration of eupatorin in culture medium was 10 μM) for 24 h, (B) propidium iodide staining of HeLa cells treated with pure eupatorin (5, 10, 20 μM) or nocodazole (50 μg/mL) for 24 h, (C) combined staining with propidium iodide and antibody against phospho-histone H3 on serine 10 (pH3) of HeLa cells treated with pure eupatorin (5, 10, 20 μM) or nocodazole (50 μg/mL) for 24 h. Each picture shows a representative example of at least 3 independent experiments. Nocodazole was used as a positive control. Deb. Debris.

cytometry (Fig. 2C) and immunofluorescent microscopy (Suppl. 3). This phosphorylation, catalyzed by aurora kinases A and B, is essential for chromatin condensation during mitosis and is often detected as a mitotic marker [22,23]. Its inhibition leads to late G2 phase arrest [24]. Aurora B is also a part of SAC and sustains activated when kinetochores are attached to microtubules but are not under tension [25,26]. Inhibition of its function in mitotic cells causes inactivation of SAC and forced exit from mitosis with perturbed cytokinesis [18]. High concentrations of eupatorin inhibit aurora kinases in cells as well as *in vitro* with purified enzyme as shown in

Table 1

The antiproliferative effects of chloroform extract of *Orthosiphon stamineus* leaves on cancer cells.

Cell line	Extract IC ₅₀ [mg DW/mL] ^a	Eupatorin in culture medium [μM]
HeLa	6.81 ± 1.11	10.52 ± 1.71
K562	2.25 ± 0.33	3.47 ± 0.51

^a mg of dried leaves per mL of culture medium.

recent study by Salmela and coworkers [18]. In asynchronous population of HeLa cells only a part of them is present in mitosis and only these cells override mitotic checkpoint upon treatment with high doses of eupatorin, they do not undergo cytokinesis and exit mitosis in tetraploid, polynucleated state. Presence of a small population of polyploid cells after

Table 2

The antiproliferative effects of eupatorin on cancer and normal cells. Flavopiridol was used as a positive control.

Cell line	Eupatorin IC ₅₀ [μM]	Flavopiridol IC ₅₀ [μM]
HeLa	11.72 ± 2.86	0.54 ± 0.04
K562	4.29 ± 1.35	0.81 ± 0.07
MCF7	16.61 ± 5.56	0.22 ± 0.04
RPMI8226	4.77 ± 0.51	0.27 ± 0.02
HL-60	14.09 ± 0.55	ND
MOLT-4	4.74 ± 0.43	ND
BJ	> 50	0.14 ± 0.01
HUVEC	> 50	ND

ND not determined.

treatment with eupatorin confirms such assumptions (Fig. 2B,C). However, more than 75% of asynchronously growing cells are present in interphase when eupatorin is added. Inhibition of aurora kinases in this case leads to a block of phosphorylation of histone H3 on serine 10 (Fig. 2C) with concomitant late G2 arrest due to inability to condense chromatin.

Lower doses of eupatorin are not sufficient to block the activity of aurora B; the number of HeLa cells positive to pH3^{Ser10} increases in this case (Fig. 2C). Moreover, cells treated with lower doses of eupatorin are evidently more susceptible to induction of the cell death as the percentage of disintegrated cells (Debris) is higher than in the case of higher doses (Fig. 2B, C). Similar results were observed in the K562 cell line (data not shown). From our findings we concluded that eupatorin acts as a biphasic agent being more cytotoxic at lower concentrations and rather cytostatic at higher in short incubations (24 h). However, the arrested cells, although not dying immediately, are affected at large extent and die later as shown by typical shape of dose response curves from 3 days experiments we made (Suppl. 2).

3.3. Eupatorin induces mitotic catastrophe accompanied by apoptosis

Cell cycle analysis of cells treated with lower doses of eupatorin revealed a large number of dying cells, but further experiments were necessary to investigate whether cell death was due to apoptosis. For this purpose we treated HeLa cells with eupatorin for 24 h after which they were harvested and lysed. The lysates were analyzed by immunoblotting to detect some markers of apoptosis, such as the 89 kDa fragment of poly(ADP-ribose)polymerase (PARP), the active fragment of caspase 3, antiapoptotic mitochondrial proteins Bcl-2 and Mcl-1 or tumor suppressor p53 and its negative regulator Mdm2 (Fig. 3A). The level of p53 is diminished in untreated HeLa cells due to association with viral E6 oncoprotein leading to its degradation by proteasome [27]. Stabilization of p53 was observed after treatment with eupatorin in correlation with reduction of Mdm2. The intracellular levels

of proteins Bcl-2 and Mcl-1 showed a modest decrease. Moreover, we observed the appearance of a slowly migrating, phosphorylated form of Bcl-2 connected with G2/M arrest of the cell cycle and inactivation of its antiapoptotic function [28]. In the cells treated with eupatorin we also detected the increased activity of caspases 3 and 7, the effector proteases which cleave various intracellular proteins including lamins and PARP and play a key role in the execution phase of apoptosis (Fig. 3B). Detected marks of apoptosis were again weak at the highest tested concentration.

Because of previously reported negative effects of related flavonoids on the tubulin polymerization [9] we inspected microtubular system in HeLa cells using immunofluorescence staining of α -tubulin and γ -tubulin, a well-characterized component of microtubules and centrosomes, respectively. No significant depolymerization of microtubules was observed, but a substantial number of mitotic cells containing multipolar mitotic spindles with γ -positive centrosomal poles was present as well as large cells with multiple micronuclei and decondensed chromatin (Fig. 4A, B). These marks have been described as typical morphological characteristics of a mitotic catastrophe [29] and have already been reported as a prominent response to some anticancer drugs such as bleomycin [30], etoposide [31] or taxol [32]. Mitotic catastrophe, a type of death following aberrant mitosis, is in some cases accompanied by key molecular events that define apoptosis such as caspase activation, mitochondrial release of proapoptotic proteins such as cytochrome c and apoptosis inducing factor (AIF) and DNA degradation [33]. Therefore we suggest that mitotic catastrophe accompanied by apoptosis is the mechanism of eupatorin-induced cell death.

3.4. Eupatorin is a nonspecific kinase inhibitor

In an attempt to identify primary targets of eupatorin, and due to its structural similarity to known protein kinase inhibitors [14,15], we examined the ability of 1 μ M eupatorin to inhibit the activity of kinases on a representative panel of one fifth of known human protein kinases. The results show that eupatorin is a nonspecific inhibitor of protein kinases (Suppl. 4). Among the most sensitive kinases are RPK2, VEGFR1 and MLK3 with residual activities below 33%. Both aurora A and B were inhibited approximately to the same extent (70% and 79% of residual activity, respectively). Similarly, Salmela and coworkers [18] observed significant inhibition of aurora B activity *in vitro* with recombinant enzyme (IC₅₀ approx. 20 μ M) as well as downregulation of the activating autophosphorylation on T232 in cell lysates. On the other hand, they observed only a slight decrease of activating autophosphorylation on T288 of aurora A in cell lysates although according to our experiments both aurora A and B are sensitive to eupatorin to the similar extent. However, our *in vitro* experiments with purified enzymes do not always reflect the real situation in the cells and also the reduction of autophosphorylation of aurora A on T288 is only indirect proof of its inhibition by eupatorin.

3.5. Eupatorin inhibits angiogenesis *in vitro*

Due to the strong inhibition of VEGFR1 by eupatorin *in vitro* and the fact that some flavonoids structurally close to

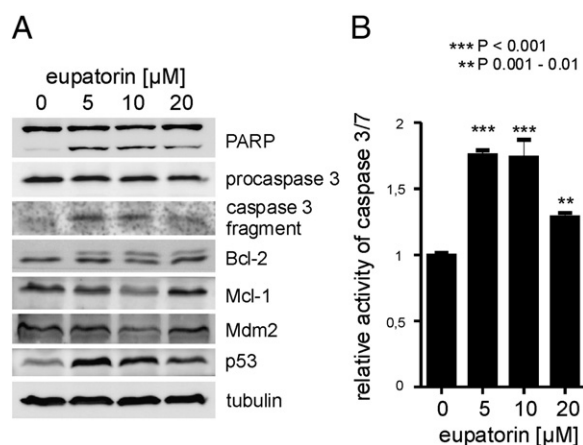


Fig. 3. Induction of apoptosis in HeLa cells after treatment with eupatorin for 24 h. (A) Detection of some markers of apoptosis by immunoblotting. (B) Relative activity of caspase 3/7 in lysed cells. The data represent mean $\pm$ SD of 3 independent experiments.

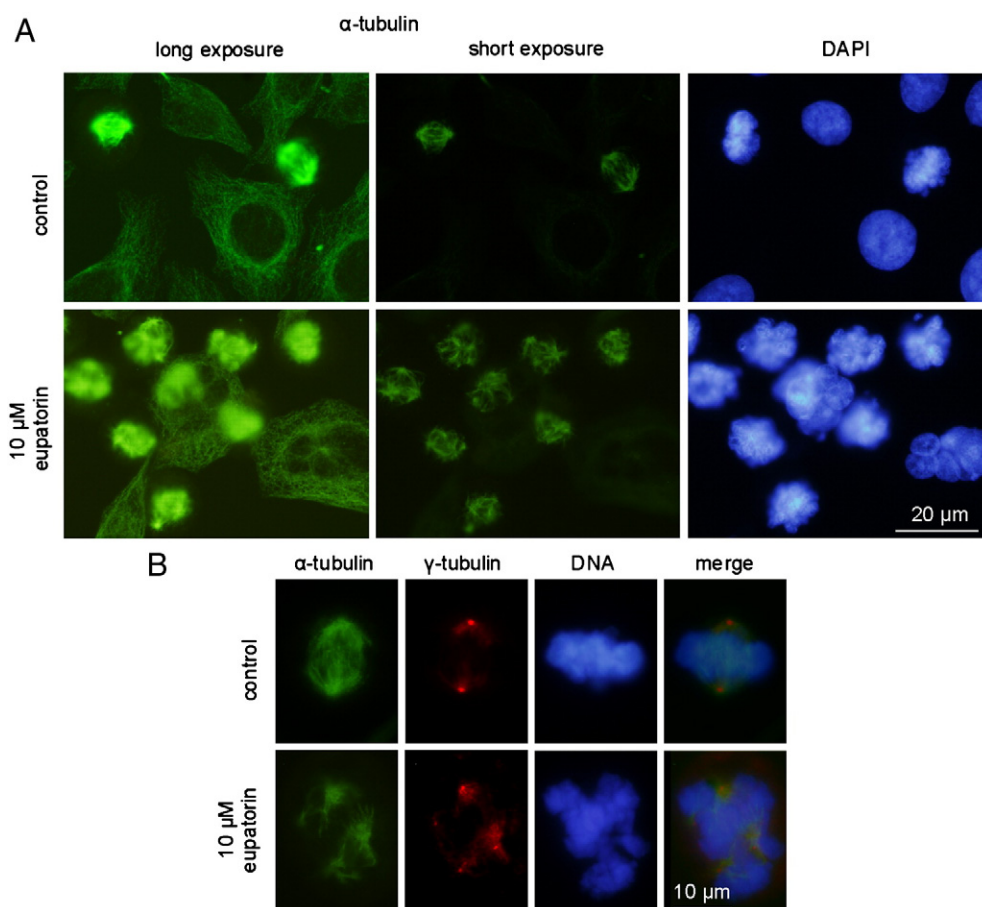


Fig. 4. Eupatorin disrupts the process of mitosis. (A) Visualization of microtubular system in HeLa cells treated with 10 μM eupatorin for 24 h by immunofluorescent staining of α-tubulin, DNA was stained with DAPI. (B) Mitotic spindles and centrosomes visualized using immunofluorescent staining of α-tubulin and γ-tubulin, respectively. DNA was stained with DAPI.

eupatorin as well as extracts from *O. stamineus* limit this process [10,34,35], we tested the antiangiogenic properties of eupatorin. We used HUVEC cells for modeling of angiogenesis *in vitro* and examined their ability to migrate and to form tubes in the presence of the compound. In a migration scratch assay the cells exposed to eupatorin for 20 h migrated to a lesser extent into the scratch than untreated cells (Fig. 5). Also the number of tubes and nodes created by HUVEC cells was significantly reduced by eupatorin (Fig. 6). In both cases the effects were dose dependent. Although *in vitro* assays with isolated endothelial cells in culture are simplified, they provide basic information that are useful not only for the design of *in vivo* experiments, but also for interpretation of data obtained from them.

Vascular endothelial growth factor receptors (VEGFRs) are among the most important components in molecular pathway of the process of angiogenesis and they include three types of receptor tyrosine kinases: VEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (KDR, Flk-2) and VEGFR3 [36]. We determined the intracellular level of VEGFR1 in HUVEC cells and observed its decrease after only two hours of treatment with eupatorin at the highest concentration (Fig. 7). Due to the structural similarity of VEGFRs [37] and the nonspecific inhibitory

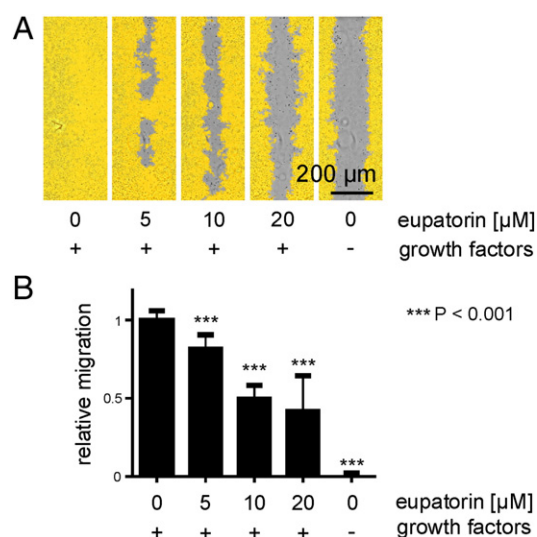


Fig. 5. Eupatorin inhibits migration of HUVEC cells into the scratch after 20 h treatment: (A) image analysis, (B) quantification. The data represent mean ± SD of 3 independent experiments.

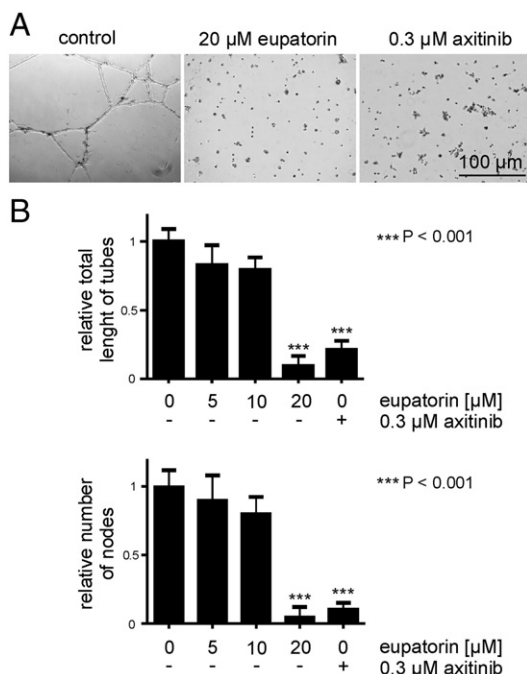


Fig. 6. Eupatorin inhibits tube formation of HUVEC cells after 20 h treatment: (A) image analysis, (B) quantification. The data represent mean $\pm$ SD of 3 independent experiments.

potential of eupatorin, inhibition of VEGFR2 and VEGFR3 is expected, but was not determined. Reduction of VEGFRs levels therefore may contribute to the insensitivity of HUVEC cells to VEGF stimuli and by this means to the more effective suppression of angiogenesis. Our conclusions are supported by recent results by Ahamed and coworkers [35] who showed that 50% ethanolic extract of *O. stamineus* containing eupatorin inhibits angiogenesis *in vitro* as well as *in vivo* in colon tumors in nude mice via suppressing VEGFR2 function.

4. Conclusion

Eupatorin exhibited cell growth inhibition and apoptosis induction preferentially in cancer cells despite being a nonspecific inhibitor of several protein kinases. Our study demonstrates that the anticancer effect of eupatorin can be based not only on its cytotoxicity, but also on the ability to interfere with angiogenesis perhaps through inhibition of VEGFRs. Therefore we suggest it can be further evaluated in solid cancers *in vivo* with a view to its development as an anticancer drug.

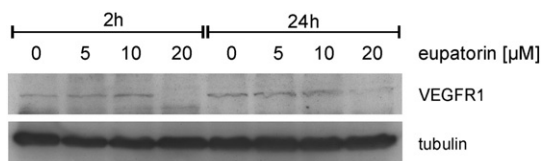


Fig. 7. The effects of eupatorin on the intracellular level of VEGFR1 in HUVEC cells after 2 or 24 h treatment.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2012.06.002>.

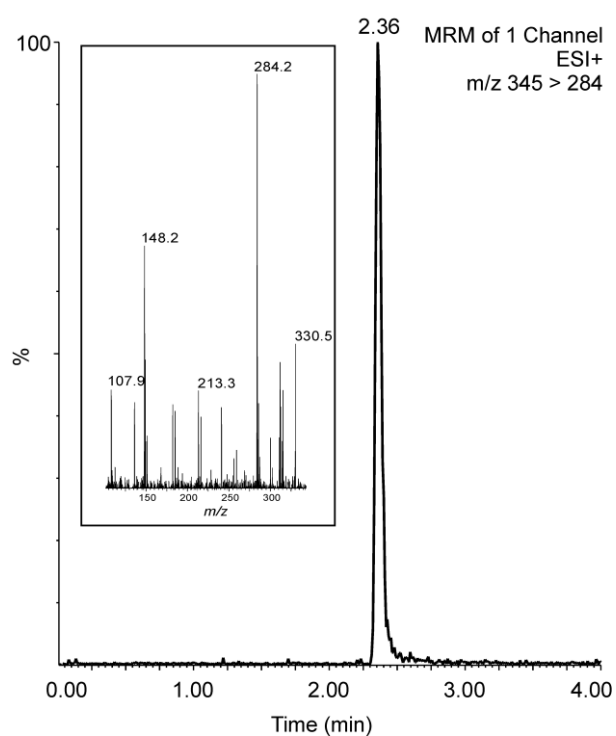
Acknowledgments

We thank J. Ulrichová (Palacký University Olomouc, Czech Republic) for providing the HUVEC cells and B. Vojtěšek (Masaryk Memorial Cancer Institute, Czech Republic) for providing antibody anti-p53, clone DO-1. We also thank T. Fürst for development of MATLAB based image analysis software and O. Hustáková and D. Parobková for technical assistance. Finally we thank D. A. Morris for critical revision of the manuscript and Rosanna Leung for providing the picture of *O. stamineus*. This work was supported by grant MSM6198959216 from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and grant ED0007/01/01 from the Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research.

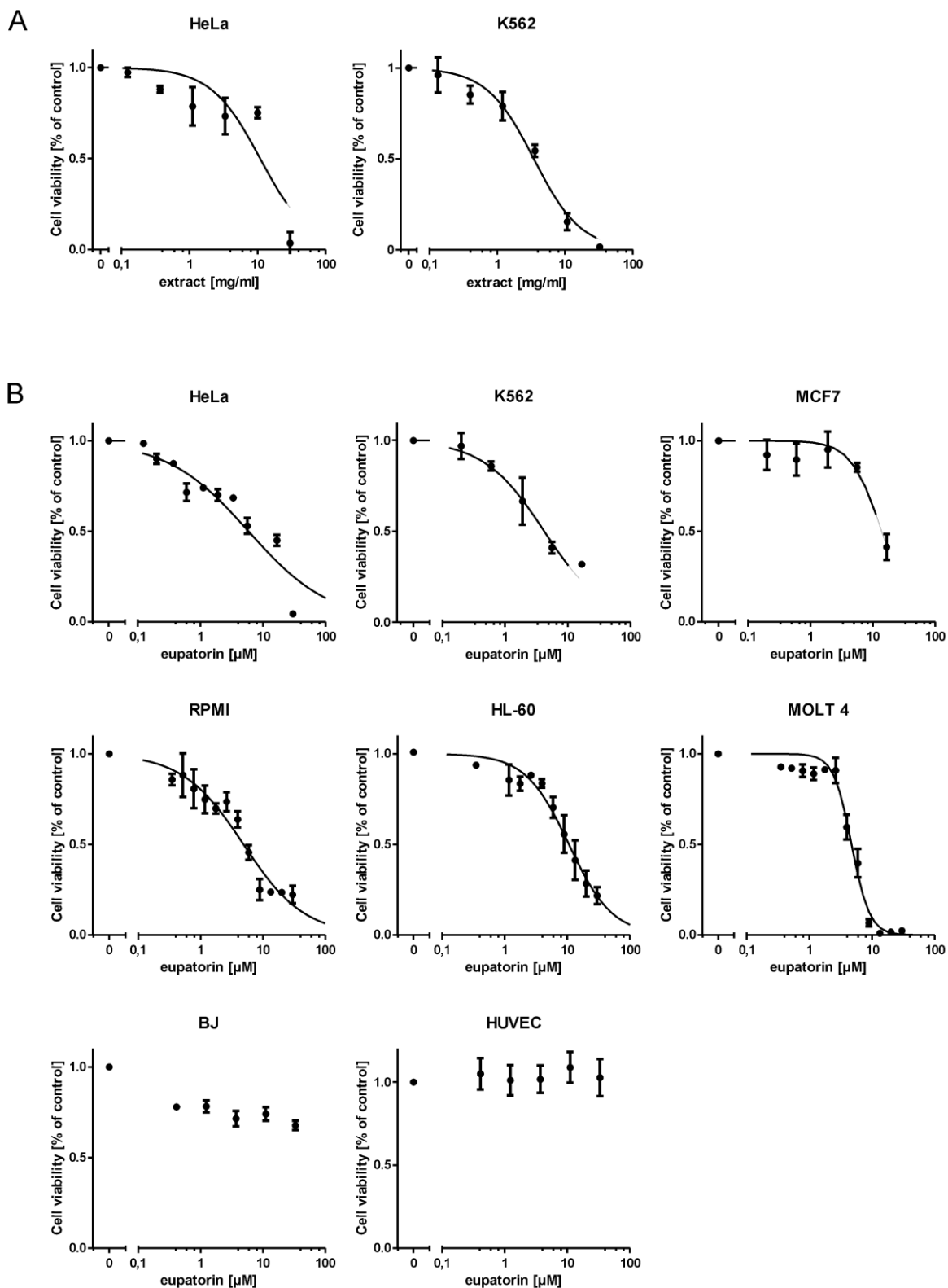
References

- [1] Tran K. Medicinal plants in Viet Nam. Hanoi: Science and Technology Publishing House; 1990.
- [2] Chin JH, Abas HH, Sabariah I. Toxicity study of *Orthosiphon stamineus* Benth. (Misai Kucing) on Sprague Dawley rats. Trop Biomed 2008;25: 9–16.
- [3] Olah NK, Radu L, Mogosan C, Hanganu D, Gocan S. Phytochemical and pharmacological studies on *Orthosiphon stamineus* Benth. (Lamiaceae) hydroalcoholic extracts. J Pharm Biomed Anal 2003;33:117–23.
- [4] Yam MF, Basir R, Asmawi MZ, Ismail Z. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Orthosiphon stamineus* Benth. standardized extract. Am J Chin Med 2007;35:115–26.
- [5] Yam MF, Lim V, Salaman IM, Ameer OZ, Ang LF, Rosidah N, et al. HPLC and anti-inflammatory studies of the flavonoid rich chloroform extract fraction of *Orthosiphon stamineus* leaves. Molecules 2010;15:4452–66.
- [6] Tezuka Y, Stampoulis P, Banskota AH, Awale S, Tran KQ, Saiki I, et al. Constituents of the Vietnamese medicinal plant *Orthosiphon stamineus*. Chem Pharm Bull (Tokyo) 2000;48:1711–9.
- [7] Nijveldt RJ, van NE, van Hoorn DE, Boelens PG, van NK, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. Am J Clin Nutr 2001;74:418–25.
- [8] Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. Eur J Nutr 1999;38:133–42.
- [9] Beutler JA, Hamel E, Vlietinck AJ, Haemers A, Rajan P, Roitman JN, et al. Structure-activity requirements for flavone cytotoxicity and binding to tubulin. J Med Chem 1998;41:2333–8.
- [10] Mojzis J, Varinska L, Mojzisoava G, Kostova I, Mirossay L. Antiangiogenic effects of flavonoids and chalcones. Pharmacol Res 2008;57:259–65.
- [11] Ferry DR, Smith A, Malkhandi J, Fyfe DW, deTakats PG, Anderson D, et al. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for *in vivo* tyrosine kinase inhibition. Clin Cancer Res 1996;2:659–68.
- [12] Lin TS, Ruppert AS, Johnson AJ, Fischer B, Heerema NA, Andritsos LA, et al. Phase II study of flavopiridol in relapsed chronic lymphocytic leukemia demonstrating high response rates in genetically high-risk disease. J Clin Oncol 2009;27:6012–8.
- [13] Lazarevic B, Boezelijn G, Diep LM, Kvernrod K, Ogren O, Ramberg H, et al. Efficacy and safety of short-term genistein intervention in patients with localized prostate cancer prior to radical prostatectomy: a randomized, placebo-controlled, double-blind phase 2 clinical trial. Nutr Cancer 2011;63:889–98.
- [14] Teillet F, Boumendjel A, Boutonnat J, Ronot X. Flavonoids as RTK inhibitors and potential anticancer agents. Med Res Rev 2008;28: 715–45.
- [15] Singh RP, Agarwal R. Natural flavonoids targeting deregulated cell cycle progression in cancer cells. Curr Drug Targets 2006;7:345–54.
- [16] Nagao T, Abe F, Kinjo J, Okabe H. Antiproliferative constituents in plants 10. Flavones from the leaves of *Lantana montevidensis* Briq. and consideration of structure-activity relationship. Biol Pharm Bull 2002;25:875–9.
- [17] Androutsopoulos V, Arzoo RR, Hall JF, Surichan S, Potter GA. Antiproliferative and cytostatic effects of the natural product eupatorin on

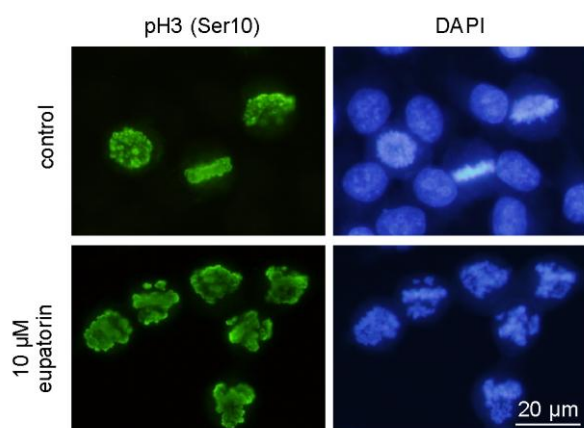
- MDA-MB-468 human breast cancer cells due to CYP1-mediated metabolism. *Breast Cancer Res* 2008;10:R39.
- [18] Salmela AL, Pouwels J, Kukkonen-Macchi A, Waris S, Toivonen P, Jaakkola K, et al. The flavonoid eupatorin inactivates the mitotic checkpoint leading to polyploidy and apoptosis. *Exp Cell Res* 2012;318:578–92.
- [19] Jorda R, Havlicek L, Mcnae IW, Walkinshaw MD, Voller J, Sturc A, et al. Pyrazolo[4,3-d]pyrimidine bioisostere of roscovitine: evaluation of a novel selective inhibitor of cyclin-dependent kinases with antiproliferative activity. *J Med Chem* 2011;54:2980–93.
- [20] Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, et al. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* 2007;408:297–315.
- [21] Zahler S, Liebl J, Furst R, Vollmar AM. Anti-angiogenic potential of small molecular inhibitors of cyclin dependent kinases in vitro. *Angiogenesis* 2010;13:239–49.
- [22] Crosio C, Fimia GM, Loury R, Kimura M, Okano Y, Zhou H, et al. Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. *Mol Cell Biol* 2002;22:874–85.
- [23] Perez-Cadahia B, Drobic B, Davie JR. H3 phosphorylation: dual role in mitosis and interphase. *Biochem Cell Biol* 2009;87:695–709.
- [24] Prigent C, Dimitrov S. Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J Cell Sci* 2003;116:3677–85.
- [25] Hauf S, Cole RW, LaTerra S, Zimmer C, Schnapp G, Walter R, et al. The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol* 2003;161:281–94.
- [26] Ditchfield C, Johnson VL, Tighe A, Ellston R, Haworth C, Johnson T, et al. Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J Cell Biol* 2003;161:267–80.
- [27] Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The Hpv-16 E6 and E6-Ap complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of P53. *Cell* 1993;75:495–505.
- [28] Terrano DT, Upreti M, Chambers TC. Cyclin-dependent kinase 1-mediated Bcl-xL/Bcl-2 phosphorylation acts as a functional link coupling mitotic arrest and apoptosis. *Mol Cell Biol* 2010;30:640–56.
- [29] Roninson IB, Broude EV, Chang BD. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat* 2001;4:303–13.
- [30] Tounekti O, Pron G, Belehradek Jr J, Mir LM. Bleomycin, an apoptosis-mimetic drug that induces two types of cell death depending on the number of molecules internalized. *Cancer Res* 1993;53:5462–9.
- [31] Lock RB, Stribinskiene L. Dual modes of death induced by etoposide in human epithelial tumor cells allow Bcl-2 to inhibit apoptosis without affecting clonogenic survival. *Cancer Res* 1996;56:4006–12.
- [32] Torres K, Horwitz SB. Mechanisms of Taxol-induced cell death are concentration dependent. *Cancer Res* 1998;58:3620–6.
- [33] Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Valent A, Raslova H, Yakushiji K, et al. Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. *Oncogene* 2004;23:4362–70.
- [34] Sahib HB, Aisha AF, Yam MF, Asmawi MZ, Ismail Z, Salhimi SM, et al. Anti-angiogenic and anti oxidant properties of *Orthosiphon stamineus* Benth. methanolic leaves extract. *Int J Pharmacol* 2009;5:162–7.
- [35] Ahamed MBK, Aisha AFA, Nassar ZD, Siddiqui JM, Ismail Z, Omani SMS, et al. Cat's whiskers tea (*Orthosiphon stamineus*) extract inhibits growth of colon tumor in nude mice and angiogenesis in endothelial cells via suppressing VEGFR phosphorylation. *Nutr Cancer* 2012;64:89–99.
- [36] Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling—in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:359–71.
- [37] Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999;13:9–22.



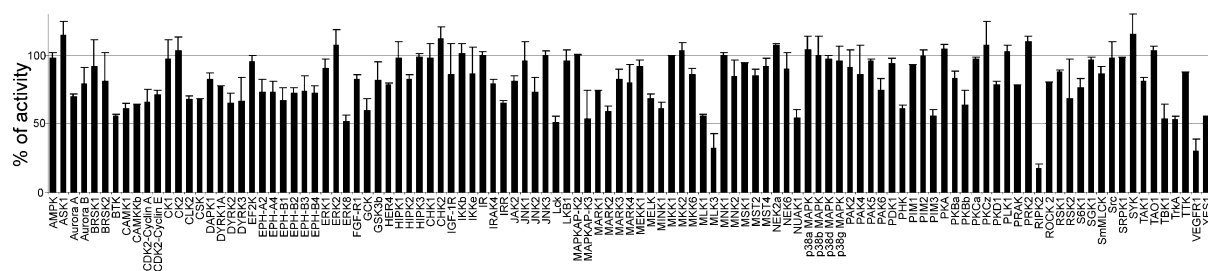
Suppl. 1. UPLC-MS/MS chromatogram of the chloroform extract from *Orthosiphon stamineus* leaves. Eupatorin (RT 2.36 min) was detected in multiple reaction monitoring mode (m/z 344.5 > 284.2). The product ion spectrum of the eupatorin molecular ion is shown in the inset.



Suppl. 2. The antiproliferative effects of chloroform extract of *Orthosiphon stamineus* leaves (A) or pure eupatorin (B) on various cancer or normal cells.



Suppl. 3. Immunofluorescent staining of histone H3 phosphorylated on serine 10 in HeLa cells treated with 10 μ M eupatorin for 24 h.



Suppl. 4. Selectivity of 1 μ M eupatorin against a panel of recombinant protein kinases.

PŘÍLOHA III

Oncogenes do not Fully Override Cell-intrinsic Traits: Pronounced Impact of the Cellular Programme

Józefa Węsierska-Gądek · Eva Walzi · Iva Dolečková ·
Gerald Schmid

Received: 11 June 2009 / Accepted: 29 July 2009
© The Author(s) 2009. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract Overexpression of p53 tumor suppressor protein in malignant cells induces cell cycle arrest, or alternatively, apoptosis thereby indicating that additional factors may contribute to the p53-mediated outcome. Comparison of the experimental protocols revealed that the construct encoding wild-type (wt) p53 was expressed in cells of different origin. Therefore, we decided to determine whether the intrinsic cellular program of primary cells of the same genetic background could have any effect on the oncogenic potential of mutated *c-Ha-RAS* and *TP53*. Primary rat cells (RECs) isolated from rat embryos of different age: at 13.5 gd (y) and 15.5 gd (o), were used for transfection. Immortalized rat cell clones overexpressing temperature-sensitive (ts) p53^{135val} mutant and transformed cell clones after co-transfection with oncogenic *c-Ha-Ras*, were generated. The ts p53^{135val} mutant, switching between wt and mutant conformation, offers the possibility to study the role of p53 in cell cycle control in a model of malignant transformation in cells with the same genetic background. Surprisingly, the kinetics of cell proliferation at non-permissive temperature and that of cell cycle arrest at 32°C strongly differed between cell clones established from yRECs and oRECs. Furthermore, the kinetics of the re-enter

of G₁-arrested cells in the active cell cycle strongly differed between distinct cell clones. Finally, the susceptibility of immortalized and transformed cells to the pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases (CDKs) considerably differed. Our results clearly show that overexpression of genes such as mutated *TP53* and oncogenic *c-Ha-RAS* is not able to fully override the intrinsic cellular programme.

Keywords p53 tumor suppressor · Cell cycle arrest · Cell synchronization · Signal transduction · *c-Ha-Ras* · FPTase · FTI

Abbreviations

CDKs	cyclin-dependent kinases
FPTase	farnesylproteintransferase
FTI	inhibitors of FPTase
HH	Hedgehog
MDM-2	mouse double minute-2
OLO	olomoucine
PARP-1	poly(ADP-ribose) polymerase-1
PD	Petri dish
PDT	population doubling time
PI	propidium iodide
REC	rat embryonal cell
ROSC	roscovitine
SD	standard deviation
ts	temperature-sensitive
wt	wild-type

J. Węsierska-Gądek (✉) · E. Walzi · I. Dolečková · G. Schmid
Cell Cycle Regulation Group, Div. Institute of Cancer Research,
Dept. of Medicine I, Medical University of Vienna,
Borschkegasse 8 a,
Vienna A-1090, Austria
e-mail: Jozefa.Gadek-Wesierski@meduniwien.ac.at

Present Address:

G. Schmid
Christian Doppler Laboratory on Molecular Cancer
Chemoprevention, Department of Medicine III,
Medical University of Vienna,
Währinger Gürtel 18-20,
Vienna A-1090, Austria

Introduction

The decision of a cell to stop cell cycle progression and to initiate the repair of (mildly) damaged DNA, or to induce

apoptosis as a consequence of rather severely damaged DNA, bears fundamental implications on the future development, well-being, and fate of the whole organism. In case repair does not function properly or the induction of apoptosis is impaired, neoplastic transformations arising from damaged DNA, might culminate in the death of the whole organism. Consequently, in the case of apoptosis a single cell is sacrificed to facilitate the survival of the being. Therefore, an extremely sophisticated cellular network protects the integrity of the genome and induces the necessary steps once this integrity is disrupted.

At the interface between the incoming intra- and extracellular signals and the downstream induction and execution of cell cycle arrest and apoptosis, higher eukaryotic cells have a molecule of paramount importance: the p53 tumor suppressor protein. In most cases of cellular damage p53 is involved in the decision to trigger cell cycle arrest or apoptosis. Additionally, p53 is involved in all 5 major pathways for DNA repair [2, 20, 26, 35]. The fact that p53 is inactivated in a wide variety of tumors, underscores its importance and makes it an outstanding candidate for cancer therapy [3, 34].

p53 transmits its signals through transactivation of target genes but also through direct binding to other proteins. In the cell, p53 levels rise as a result of certain stress stimuli but are otherwise kept low due to the action of a negative feedback loop with MDM2. If the action of p53 is needed, a variety of proteins disrupt the interaction between p53 and MDM2 [29]. A protein strongly contributing to the stability of p53 is poly(ADP-ribosyl) polymerase-1 (PARP-1) [38, 42, 43], a protein that enzymatically modifies p53 [19, 41] thereby preventing its nuclear export [19, 39] by impeding the binding to CRM1 [19]. A protein that retains p53 in the cytoplasm preventing its nuclear functions, is mortalin, a member of the heat shock protein 70 (HSP70) family. Mortalin binds p53 [31] and inhibits its pro-apoptotic functions what leads to increased tumor development [31, 37].

The constitutive overexpression of p53 in cells or animals is not feasible because this would trigger apoptosis or at least cell cycle arrest, making a functional study of the proteins' features impossible. Fortunately, a temperature-sensitive (ts) mutant of p53 that displays wt properties at 32°C but mutant character at elevated temperature [25], can be used to perform experiments aimed to elucidate its functions. This ts mutant demonstrates clear properties of mutant p53 at 39°C. At 37°C the cells also behave like mutant cells although a small portion of p53 protein is in wt conformation. However, mutated p53 protein localized in the cytoplasm impedes the action of the wt protein. Thereby, the conformation and activity of p53 can be changed at will by simply growing the cells at 37 or 39°C.

The decision of p53 to trigger cell cycle arrest or apoptosis depends on the severity of the damage and is also regulated on the transactivational level by the use of p53 responsive elements to which the protein has different

binding affinity [16]. In general, p53 binds to targets mediating cell cycle arrest with a higher affinity than to those which induce apoptosis [16]. A recent publication also showed that p53 is capable of inducing anti-apoptotic targets [17], adding further complexity to the functions and activities of the tumor suppressor protein.

Also the Ras proteins are important for tumor development. In their active form they reside in the cytoplasmic membrane and transmit signals from growth factor stimulation and downstream targets involve Raf-1 and PI3-kinase. Gain of function mutations lead to a constitutively active Ras protein that sustains growth-promoting signals, irrespective of extracellular stimulation, resulting in uncontrolled proliferation. For its proper anchoring in the cytoplasmic membrane and activity, Ras has to be isoprenylated by farnesyl protein transferases (FPTases) or/and geranylgeranyl protein transferases. Therefore, inhibitors of farnesylation have been used for treatment of cancers with constitutively activated *RAS*. Interestingly, tumor cells with constitutively activated *RAS* are rendered prone to treatment with pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases (CDKs) like roscovitine (ROSC) and olomoucine (OLO) when they are pre-treated with FTIs [45].

To test the responsiveness of cells overexpressing c-Ha-Ras and ts p53, we used primary rat embryonal cells (RECs) isolated at 13.5 or 15.5 gestation days. Importantly, the age of the embryos seems to have an effect on the properties of the cells [30]. In the present work we investigated the effect of the cellular microenvironment in young vs old RECs in response to combined treatment with FPTase inhibitors and CDK inhibitors.

Material and Methods

Plasmids

pLTRp53cGval135, comprising a chimera of mouse p53 cDNA and genomic DNA (generous gift of Dr. M. Oren), has been previously referred to as pLTRp53cG [6]. It encodes a mutant protein harboring a substitution from alanine to valine at the amino acid in position 135. The plasmids pVV2, bearing the neomycin resistance sequence, and pVEJB coding for a mutated human c-Ha-Ras gene cloned into pVVJ were used.

Cell Clones

The transformed rat cell clones were established as previously described in detail [40] using primary Fisher rat embryo cells (RECs). RECs were obtained from embryos isolated at 13.5 (y) and 15.5 (o) gestation days. Cells were grown at basal temperature (37°C) in DMEM supplemented with 10% FCS

in an atmosphere of 7.5% CO₂. For experiments dealing with a change of the conformational state of p53 protein, cells grown at basal temperature, were shifted to 32°C for indicated periods of time.

Drugs

Olomoucine (OLO) and roscovitine (ROSC) were prepared as 50 mM stock solution in DMSO according to the published procedure [14]. Aliquots of the stock solution were stored until use at -20°C. Furthermore, L-744,832 [(2 S)-2-[(2 S)-2-[(2 S,3 S)-2-[(2R)-2-amino-3-mercaptopropyl]amino]-3-methylpentyl]oxy]-1-oxo-3-phenylpropyl]amino]-4-(methylsulfonyl)-butanoic acid 1-methylethyl ester] an inhibitor of protein farnesyltransferase (FTI) from Alexis Biochemicals (Lausen, Switzerland) was used. The stock solution of L-774,832 was prepared in DMSO. Aliquots of stock solutions were protected from light and stored until use at -20°C.

Cell Treatment

After plating, cells were cultivated at a basal temperature of 37°C for 24 h. Then drugs were added to a final concentration as indicated. Cells were incubated continuously for 24 h or 48 h, or alternatively, after 24 h treatment medium was changed and cells were post-incubated (p. i.) in a drug-free medium for a further 24 h or 48 h. In some experiments cells were shifted to 32°C and kept there for at least 24 h prior to the onset of treatment to allow p53 to adopt wt conformation.

Determination of Population Doubling Time

To determine the kinetics of the proliferation of distinct cell clones, cells were plated into PD of 6 cm diameter. For each time point two PDs were used. Immortalized cells were plated at a medium density (2×10^5) and transformed cells at a lower density (0.5×10^5 /PD). Cells were cultivated at a basal temperature for 5 days. PDs were collected in 12 h intervals, suspended in a defined volume of medium and were counted in a cell counter (CASY). Cell number was determined in at least two distinct aliquots of cell suspension collected from each PD.

Determination of the Number of Viable Cells

Proliferation of immortalized and transformed control rat cells and their sensitivity to increasing concentrations of the CDK inhibitor ROSC were determined by the CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay (Promega Corporation, Madison, WI). As described recently in more detail [44], the CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, generating a luminescent signal, is based on

quantification of the cellular ATP levels. Tests were performed at least in quadruplicates. Luminescence was measured in the Wallac 1420 Victor, a microplate luminescence reader. Each point represents the mean $\pm$ SD (bars) of replicates from at least four experiments.

Determination of Caspase-3/7 Activity

The activity of both caspases was determined using the APO-ONE Homogenous Caspase-3/7 Assay (Promega, Madison, WI) which uses the caspase-3/7 substrate rhodamine 110, bis-(N-CBZ-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-aspartic acid amide) (Z-DEVD-R100) as described previously [44]. Briefly, rat cells were plated in 96-well microtiter plates. One day after plating the cells were exposed for 24 h to increasing drug concentrations. Thereafter, culture supernatant was transferred into another microtiter plate to separately determine the caspase activity in cells and in culture medium. Then an equal volume of caspase substrate was added and samples were incubated at 37°C for different periods of time to assess the best signal-to-background ratio. The fluorescence was measured at 485 nm. Luminescence and fluorescence were measured in the Wallac 1420 Victor, a microplate luminescence reader. Each point represents the mean $\pm$ SD (bars) of replicates from at least three experiments.

Measurement of the DNA Content of Single Cells by Flow Cytometry

The measurement of DNA content was performed by flow cytometric analysis based on a slightly modified method [38] described previously [36]. The cells were detached from substratum by trypsinization, and then all cells were harvested by centrifugation and washed in PBS. Aliquots of 1×10^6 cells were used for further analysis. Cells were stained with propidium iodide (PI) as described, previously [39]. Fluorescence was measured using the Becton Dickinson FACScan after at least 2 h incubation of the cells at +4°C in the dark.

Results

Differential Proliferation Rate of y and o Immortalized Rat Cells

In the first step the proliferation rate of primary rat cells and four studied cell clones were determined. Cells plated in the defined cell density were cultivated for 5 days at a basal temperature. Cell numbers were determined in 12 h intervals by two different methods. First, cells were counted using an automatic cell counter and in parallel numbers of living cells were determined by the CellTiter-Glo™

Luminescent Cell Viability Assay (Promega Corporation, Madison, WI). As described recently in more detail [44], the CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, generating a luminescent signal, is based on quantification of the cellular ATP levels. Both methods gave comparable results within the first 3 days; later CellTiter-Glo underestimated the numbers of transformed cells. The primary cells isolated from rat embryos (RECs) at gestation day 13.5 (y) grew much slower than those isolated at day 15.5 (o) [30]. The population doubling time (PDT) calculated from growth curves for the oRECs was approximately 2-fold shorter than that for yRECs (Table 1).

RECs transfected with ts p53^{135Val} mutant alone, or simultaneously with human *c-Ha-RAS*, generated immortalized and transformed cells, respectively. As described previously [30], the phenotype of immortalized cells resembled that of primary cells. However, in contrast to RECs, cells expressing ts p53^{135Val} got over the Hayflick limit and did not undergo senescence. Cotransfection with *c-Ha-RAS* resulted in a clear change of cell morphology to spindle-shaped [30] and conferred the generated cell lines a high mitotic potential. The features of transformed cells were also functionally proved. After subcutaneous injection of cells overexpressing p53^{135Val} + c-Ha-Ras into rats large tumors appeared within approximately 2 weeks [30].

As shown in Fig. 1, the transformed cells divided very rapidly. Interestingly, the immortalized and transformed cell lines originated from oRECs (clone 602/534 and 173/1022), divided at 37°C much more rapidly than those from yRECs (clone 402/534 and 189/111). The population doubling time (PDT) was calculated for each cell clone from the growth curves. As depicted in Table 1, even immortalization of yRECs with ts p53^{135Val} mutant (clone 402/534) did not confer them high mitotic potential at non-permissive temperature. On the other hand, the proliferative potential of their counterparts generated from oRECs was markedly higher. Interestingly, the same trend was observed

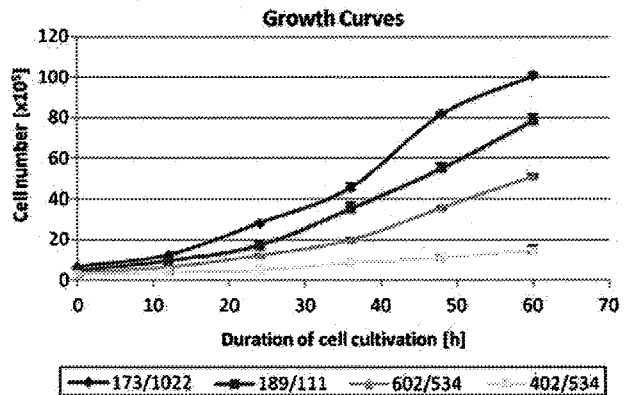


Fig. 1 Kinetics of proliferation of immortalized and transformed rat cells. Immortalized (402/534 and 602/534) and transformed (189/111 and 173/1022) cell clones established in RECs from embryos at 13.5 (y) and 15.5 (o) gestation days were examined. The growth curves of immortalized and transformed RECs from young (402/534 and 189/111) and old (602/534 and 173/1022) embryos at basal temperature are shown. Cells were counted in a cell counter (CASY). Each point represents the mean of four cell aliquots $\pm$ SD. Transformed cells grow faster than primary cells. The cells originating from older embryos always grow faster than their counterparts from young embryos. Population doubling time (PDT) for each cell line is shown in Table 1. 402/534 - yRECs p53^{135Val}; 602/534 - oRECs p53^{135Val}; 189/111 - yRECs p53^{135Val} + c-Ha-Ras; 173/1022 - oRECs p53^{135Val} + c-Ha-Ras

in transformed cell lines after co-transfection with *c-Ha-RAS*. However, during the time period between 24 h and 48 h after cell plating, the transformed cells did not gain the full dividing capacity. The difference in the proliferation rate between transformed y and o cell clones became evident 48 h after cell plating (Fig. 1).

Kinetics of wt p53-Mediated Cell Cycle Arrest Differs Between Cell Clones Generated in y and o Embryonal Rat Cells

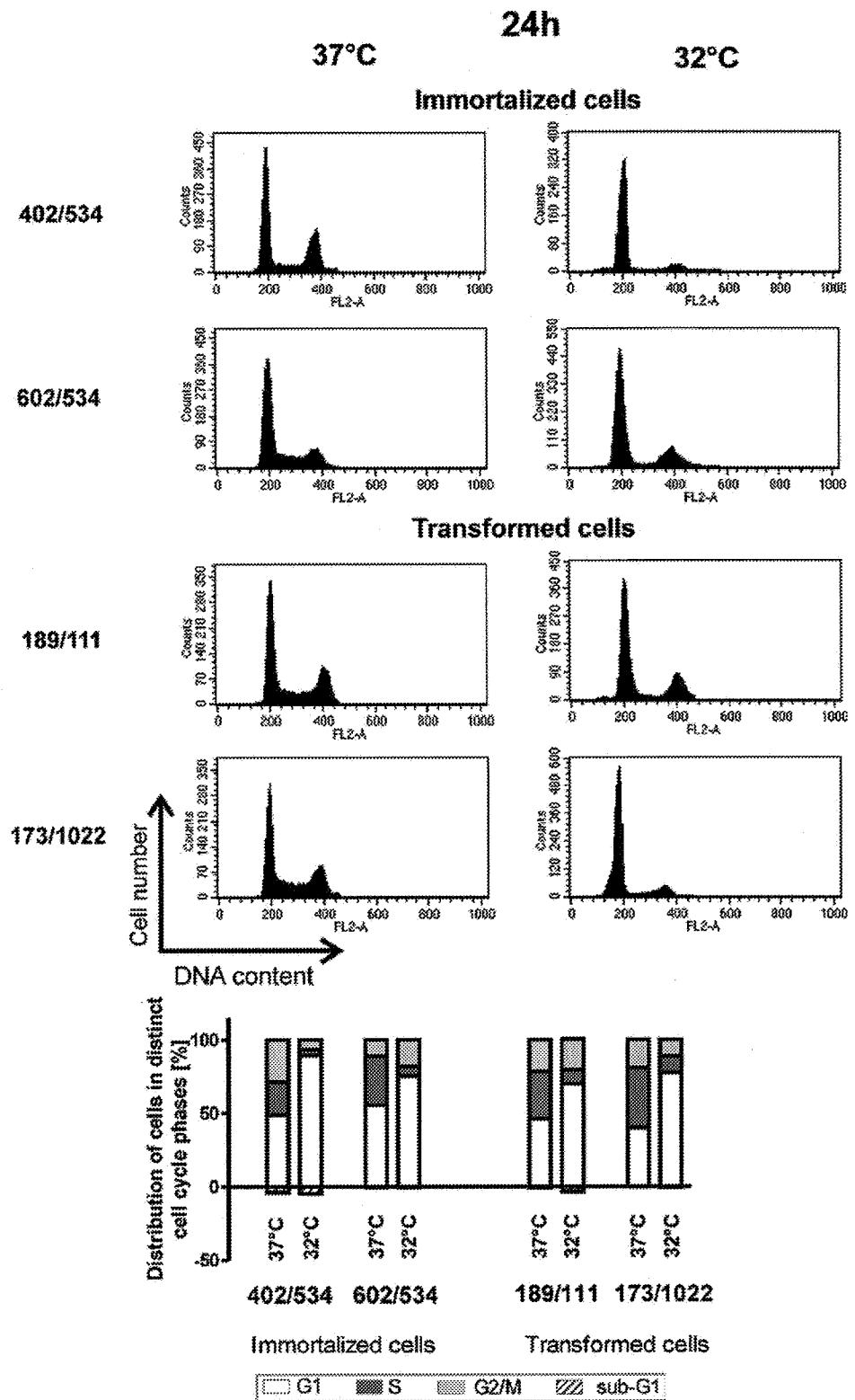
In accordance with previous reports, in cells overexpressing ts mutant p53^{135Val}, the protein switches conformation after temperature shift to 32°C and as a consequence, cells start to accumulate in G₁ phase of the cell cycle (Fig. 2). The induction of cell cycle arrest after temperature shift to 32°C was observed solely in cells expressing ts mutant p53^{135Val} but not in cells overexpressing c-myc + c-Ha-Ras (our unpublished data) and was associated with the translocation of p53 protein from the cytosol to the nucleus [30, 37, 41]. Moreover, primary yRECs and oRECs lacking the ts mutant and expressing endogenous p53 at low concentrations failed to accumulate in G₁ phase after maintenance at 32°C [30]. These observations substantiate the assumption that the temperature-dependent block of cell proliferation and of the cell cycle progression at permissive temperature is attributable to ts p53 mutant and evidence that the experimental system functions properly.

Table 1 Comparison of the values of the population doubling times (PDTs)

Cells	Age of RECs	Overexpressed proteins	PDT [h]
Rat embryonal cells (RECs)			
yRECs	13.5 gd	-	85.8
oRECs	15.5 gd	-	44.8
Cell clones			
402/534	13.5 gd	p53 ^{135Val}	32.07
602/534	15.5 gd	p53 ^{135Val}	14.20
189/111	13.5 gd	p53 ^{135Val} c-Ha-Ras	11.52
173/1022	15.5 gd	p53 ^{135Val} c-Ha-Ras	11.16

The increase of the cell numbers within the time period between 24 h and 48 h after plating was used for determination of the PDT

Fig. 2 Intrinsic features of RECs determine the p53-mediated cell cycle regulation. DNA profile obtained from one representative experiment. Young immortalized (*first horizontal row*), old immortalized (*second horizontal row*), young transformed (*third horizontal row*) and old transformed cells (*fourth horizontal row*) were cultivated at 37°C for 24 h and then shifted to 32°C for 24 h. DNA concentration in single cells was determined by flow cytometric analysis of PI-stained cells. DNA histograms were prepared using the CellQuest evaluation program (*upper panel*). The frequency of diploid cells in the distinct cell cycle phases was determined using the ModFit evaluation program (*lower panel*)



After maintenance for 24 h at permissive temperature, the population of S-phase cells was strongly reduced in all four cell lines. However, the frequency of the G₂/M population varied between them. The comparison of the time course of the cell cycle changes revealed considerable differences in the kinetics of the cell cycle arrest at permissive temperature as shown in Fig. 3. The immortalized 402/534 cells were almost completely arrested in G₁ after 24 h at 32°C,

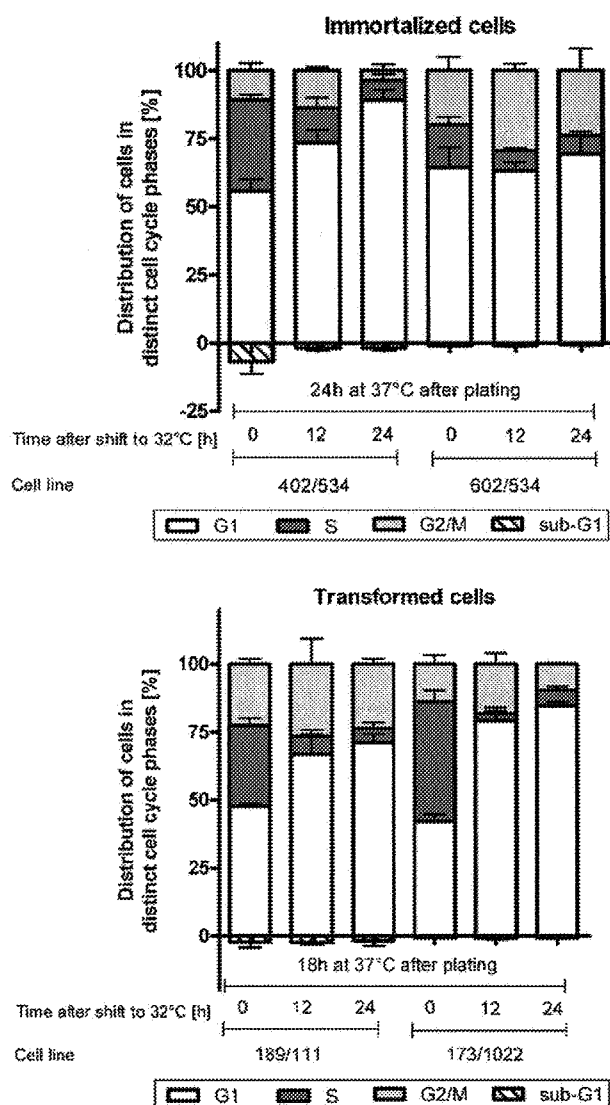


Fig. 3 Kinetics of the cell cycle arrest in the permissive (32°C) temperature. The FACS analyses show the cell cycle distribution of immortalized, and transformed cells originating from young (*left panels*) and old (*right panels*) RECs at 32 and 37°C. oRECs more efficiently evade cell cycle arrest than yRECs in all groups. As expected, immortalized cells show stronger growth than primary cells and transformed cells exhibit the strongest growth. The frequency of diploid cells in the distinct cell cycle phases was determined using the ModFit evaluation program. The values represent the means of three independent experiments $\pm$ SD (*bars*)

whereas in 602/534 cells only S-phase, but not G₂ phase was diminished (Fig. 3, upper panel). In contrast, transformed cells (clone 173/1022) generated from oRECs, showed a stronger response to the temperature shift.

G₁-arrested, Transformed Rat Cells Re-enter more Rapidly the Active Cell Cycle than their Immortalized Counterparts

In the next series of experiments we addressed the question whether the endogenous features of primary cells used for establishment of cell lines might display any effect on the recovery of G₁-synchronized cells in the active cell cycle. We maintained all cell clones for 24 h at permissive temperature and then shifted them back to the basal temperature. As depicted in Fig. 4, transformed cells entered the active cell cycle more rapidly than the immortalized cells. Surprisingly, the kinetics of cell cycle recovery strongly differed between cell lines derived from y and o RECs. In the latter a pronounced increase of S-phase cells was observed 6 h after elevation of temperature and after a further 6 h the ratio of DNA-replicating cells was approximately 70%. Moreover, maintenance of examined rat cells at permissive temperature slightly increased the ratio of sub-G₁ cells indicating that this subset of cells represents apoptotic cells. To check it, the activity of caspase-3/7 was determined. A moderate elevation of the activity of effector caspases was observed in 402/534 and 189/111 cells (data not shown) confirming the assumption that at permissive temperature wt p53 may induce apoptosis.

The Pharmacological Inhibitors of CDKs Stronger Affect Transformed Rat Cells Established from Primary Cells Isolated at 13.5 gd than Cells Isolated at 15.5 gd

To determine the effect of both examined CDK inhibitors on the proliferation of exponentially growing transformed rat cells, the cells were continuously exposed to the drugs for 24 h or 48 h. Then the cell number was determined using the CellTiterLumiGlo viability assay immediately upon termination of the treatment, or alternatively the medium was changed, cells were post-incubated in a drug-free medium for further 1 or 2 days, and then the assay was performed. OLO is a weaker inhibitor of CDKs than ROSC [14] and therefore we used it at a higher dosage. As expected, ROSC stronger reduced the number of living cells than OLO. Moreover, transformed cells established from primary rat cells isolated at 13.5 gd (189/111 cells) were more sensitive to the inhibition of CDKs than their counterparts generated from 15.5 gd RECs (173/1022) (Fig. 5). Exposure of 189/111 cells to ROSC at a final concentration of 20 μ M reduced the number of living cells by approximately 30% and the number of 173/1022 cells by approximately 15%. The anti-proliferative effect of ROSC at higher

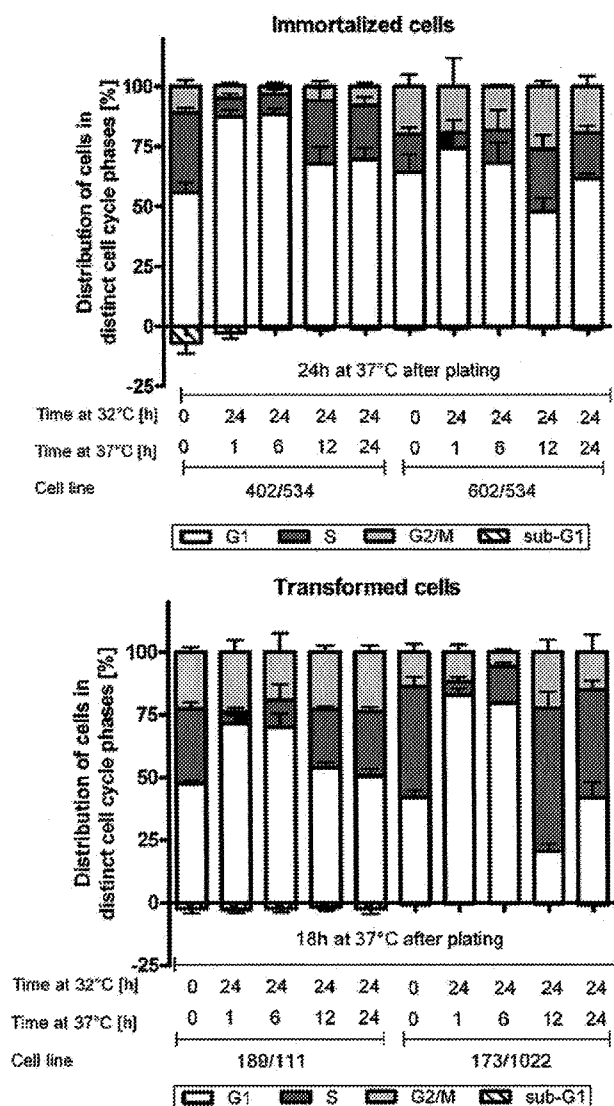


Fig. 4 Temperature-dependent kinetics of proliferation of primary, immortalized, and transformed rat cells. RECs were isolated from embryos at 13.5 (y) and 15.5 (o) gestation days. The growth curves of primary, immortalized, and transformed RECs from young (left vertical row) and old (right vertical row) embryos at three different temperatures are shown. Immortalized cells grow faster than primary cells and transformed cells grow fastest. The cells originating from older embryos always grow faster than their counterparts from young embryos. The values represent the means of three independent experiments $\pm$ SD (bars)

dosage was very highly significant in both cell lines after treatment for 24 h (Fig. 5) and 48 h (data not shown).

Inhibition of c-Ha-Ras Processing Sensitizes Transformed Rat Cells Established from oRECs to CDK Inhibitors

Further, we addressed the question whether the activity status of overexpressed oncogenic c-Ha-Ras might have

any effect on the susceptibility of transformed rat cells to tested CDKs inhibitors. To gain full biological activity, Ras proteins after *de novo* synthesis have to be stepwise modified. Isoprenylation, catalyzed by farnesyl protein transferase (FPTase), is the first reaction in this series of events. Both cell lines were treated for 24 h with L-744,832, a pharmacological inhibitor of FPTase (FTI) alone or in combination with OLO or ROSC. Then the number of living cells was determined immediately or alternatively, medium was changed and cells were post-incubated for 24 h in a drug-free medium or with FTI. The inhibition of isoprenylation had a stronger anti-proliferative effect on 173/1022 than on 189/111 cells (Fig. 6). Addition of FTI to ROSC enhanced its inhibitory effect on 173/1022 cells. The strongest reduction of the number of viable 173/1022 cells occurred after post-incubation for 24 h in the presence of FTI (Fig. 6).

Taken together, our above results show that immortalized and transformed cell lines established from primary cells isolated from older embryos (15.5 gd) had a proliferation advantage over their counterparts isolated from younger embryos (13.5 gd) associated with less susceptibility to therapy. It seems that c-Ha-Ras, when overexpressed in oRECs, contributes to their lower susceptibility to synthetic CDK inhibitors.

Discussion

For investigations concerning tumor development and also the treatment of cancer, the analysis of properties from tumor suppressor proteins as well as from oncogenes is of paramount importance. Since the *TP53* and *RAS* genes are two of the most frequently affected targets during neoplastic transformation in a wide variety of cells and tissues [11, 13], we focused our research presented here, on these two molecules. The *RAS* proto-oncogene is often mutated, leading to a constitutively active form and p53 is usually inactivated or expressed as a dominant negative protein in tumors.

Most importantly, inactivated *TP53* and mutated *c-Ha-RAS* act synergistically in making cells vulnerable to chemically induced carcinogenesis *in vitro* and also *in vivo* [47, 48]. The ts p53 used in our work was shown to synergistically induce malignant transformation together with c-Ha-Ras in primary RECs [12]. Hemizygoty in p53 leads to clear signs of haploinsufficiency [10, 15] and germ line mutations in humans are known as Li-Fraumeni syndrome [23] leading to multiple cancers with poor prognosis [7]. The synergistic action of mutated *TP53* and *c-Ha-RAS* in tumor development and progression [32, 47] is not surprising, considering that p53 protein usually arrests the cell cycle of damaged cells or induces apoptosis, and Ras is able to transmit extracellular,

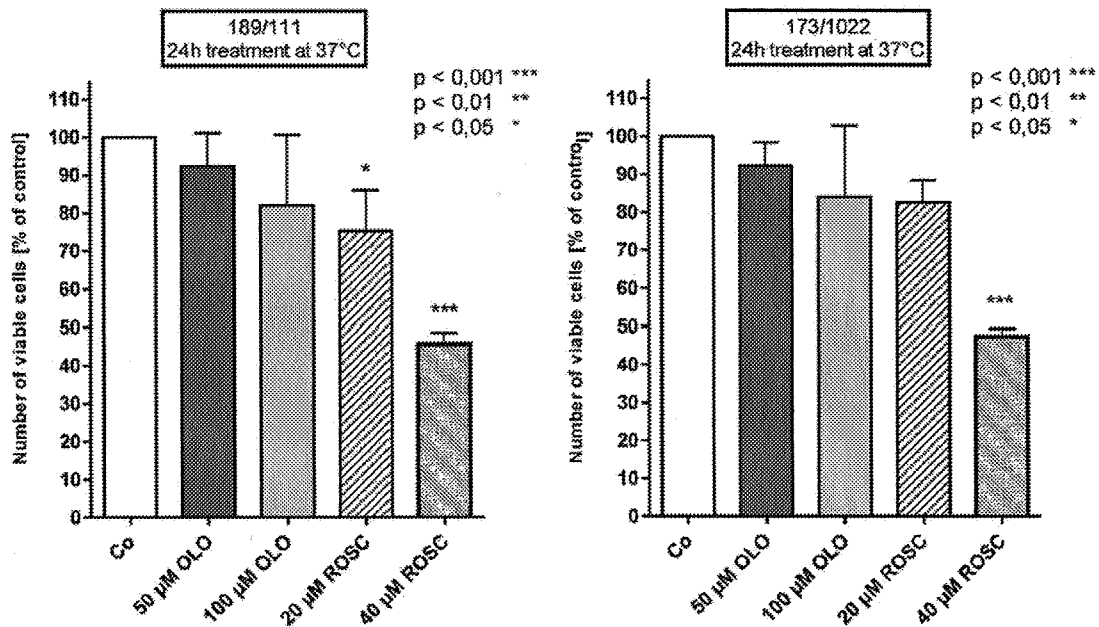


Fig. 5 The pharmacological inhibitors of CDKs stronger affect transformed rat cells established from primary cells isolated at 13.5 gd than from cells isolated at 15.5 gd. Transformed cells were plated into 96 well microtiter plates (two plates for each condition). One day after plating, cells were exposed to drugs for 24 h or for 48 h (not shown). Thereafter, the number of viable cells was determined

using CellTiterGlo. Tests were performed at least in quadruplicate. Luminescence was measured in the Wallac 1420 Victor, a multilabel, multitask plate counter. Each point represents the mean $\pm$ SD (bars) of replicates from three independent experiments. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism and significance levels were evaluated using T test

growth-promoting signals via the Ras/Raf/MEK/ERK pathway [21].

Several isoforms of the two other members of the p53 family, p63 [46] and p73 [4], have overlapping functions with p53 and some isoforms have rather opposing functions. Therefore, these proteins are important for fine-tuning and play additional roles in early development, but they are not able to take over the functions of inactivated p53.

In the present work we used primary, immortalized (ts p53), and transformed (ts p53 and c-Ha-Ras) RECs from young (13.5 gd) and old (15.5 gd) embryos to compare their growth potential and their susceptibility to treatment with FPTase inhibitors and CDK inhibitors. At the basal temperature (37°C; p53 inactive) the immortalized and transformed cell lines originating from oRECs (clones 602/534 and 173/1022, respectively) showed a clearly elevated growth potential as compared to their counterparts from yRECs (402/534 and 189/111, respectively). Not surprisingly, transformed cells in both cases grew faster than immortalized cells from the same kind of embryos (y vs o). Apparently, epigenetic changes take place between 13.5 and 15.5 gestation days, leading to an elevated potential of cells from older embryos to overcome growth arrest.

Next we tested the effect of the CDK inhibitors roscovitine and olomoucine on transformed cells from young and old embryos. The transformed cells from young

embryos were more sensitive to treatment with CDK inhibitors than their counterparts from older embryos. Most importantly, following prior treatment with an FPTase inhibitor that inactivates c-Ha-Ras, also transformed cells from older embryos were strongly susceptible to the growth-inhibiting effect of CDK inhibitors. These results show, that c-Ha-Ras contributes to the partial resistance of transformed cells from oRECs to the action of CDK inhibitors. A thorough scrutiny of the exact mechanistic background for the differences in the behaviour of the mentioned cell types should shed additional light on the cellular basis for the described effects.

In distinct stages of embryonic development tissue homeostasis is modulated by a balance between proliferation and programmed cell death. A temporally and spatially regulated apoptosis is essential for differentiation and maturation of different tissues and plays an important role, especially in neurogenesis. The increase of apoptotic events occurs in mid stages of embryonic development. Analyses of rat fetuses from the biologically most interesting stages revealed differences in the expression of some important proteins including CDK5 [5, 27] or alpha-fetoprotein [24].

The epigenetic changes between 13.5 and 15.5 gestation days seem to allow a synergistic action of mutated p53 and c-Ha-Ras to overcome cell cycle arrest and facilitate the cell to pass through the whole cell cycle. Presumably, the

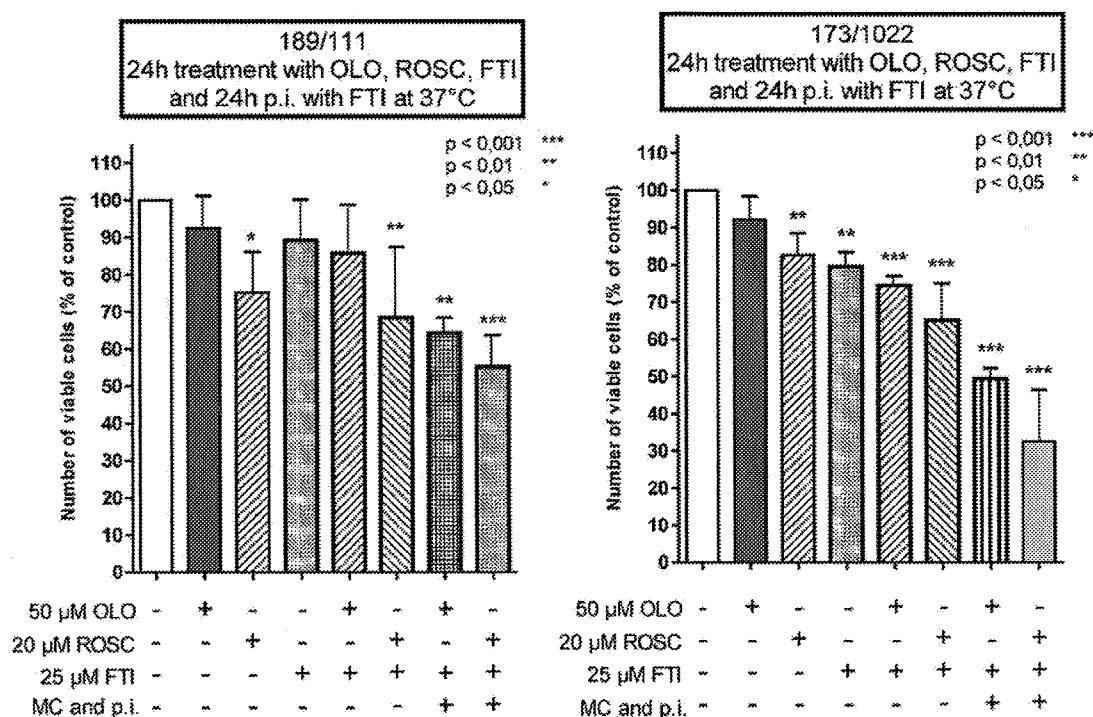


Fig. 6 Inhibition of c-Ha-Ras processing sensitizes transformed rat cells established from oRECs to CDK inhibitors. Transformed cells were plated into 96 well microtiter plates (two plates for each condition). One day after plating, cells were exposed to indicated drugs for 24 h. Thereafter, the number of viable cells was determined in the first microtiter plate. In the second microtiter plate medium was changed (MC) and cells were post-incubated (p.i.) for a further 24 h in a drug-free medium or with FTI. The measurement of the number of viable cells immediately after treatment for 24 h provided information

on the direct cytotoxic effect of the drug. On the other hand, post-incubation of cells treated for 24 h, for another 48 h in a drug-free medium, allowed the evaluation of the long-term effects of the treatment. Tests were performed at least in quadruplicate. Luminescence was measured in the Wallac 1420 Victor, a multilabel, multitask plate counter. Each point represents the mean $\pm$ SD (bars) of replicates from three experiments. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism and significance levels were evaluated using T test

epigenetic changes might comprise pathways involved in chromatin remodelling and/or the Ras/Raf/MEK/ERK pathway. Two of the candidates that are also important in embryonal development are the Wnt/catenin and the Hedgehog (HH) pathways. Since the HH pathway is also connected to the K-Ras pathway [18, 28] and plays a central role in the embryonal patterning during the phase under scrutiny, it is our prime candidate. HH regulates embryonal patterning through gradients of its 3 isoforms, however, in some adult tissues HH is also responsible for homeostasis and has effects on cell proliferation and apoptosis. Most importantly, deregulated HH can also lead to cancer development [1, 22, 33] and cyclopamine, an inhibitor of the HH pathway, is able to reduce metastasis [8, 9].

At 32°C ts p53 adopts wt conformation and cells accumulate in G₁ phase of the cell cycle. The ratio of cells in S phase was strongly reduced in all tested cells. The immortalized cells from young embryos (402/534) were nearly completely arrested in G₁ phase after 24 h at 32°C, whereas the immortalized cells from older embryos (602/534) showed a reduction in S phase, but not in G₂ phase

pointing to a different regulation in both cell types. However, transformed cells from oRECs showed a stronger response to the temperature shift. After shifting the cells back to 37°C, transformed cells from oRECs re-entered the cell cycle much faster than transformed cells from yRECs. As expected, transformed cells entered the cell cycle more quickly than their immortalized counterparts.

The most salient finding of our present work is the strong impact of the endogenous cell traits in o vs y RECs. Our results show that even strong oncogenes such as mutated *c-Ha-RAS* and mutated *TP53* are not able to override the intrinsic cellular program. Taken together, our results show that transformed RECs from older embryos show a higher growth potential than their counterparts from yRECs and are less susceptible to the action of CDK inhibitors. However, after inactivation of c-Ha-Ras with an inhibitor of farnesylation, also the transformed oRECs are strongly susceptible to growth inhibition by CDK inhibitors. If the phenotype of a certain tumor is known, this knowledge might help to develop a customized treatment for tumors with constitutively activated Ras.

Acknowledgements The paper was partially supported by a grant from the Austrian Funding Agency FWF (P19894-B11).

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

References

- Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN, Beachy PA (2003) Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature*. 425(6960):846–851
- Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Garewal H (2002) DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat. Res.* 511(2):145–178
- Blagosklonny MV (2002) p53: an ubiquitous target of anticancer drugs. *Int. J. Cancer* 98(2):161–166
- De Laurenzi V, Costanzo A, Barcaroli D, Terrinoni A, Falco M, Annicchiarico-Petruzzelli M, Levrero M, Melino G (1998) Two new p73 splice variants, gamma and delta, with different transcriptional activity. *J Exp Med* 188(9):1763–1768
- Dhavan R, Tsai LH (2001) A decade of CDK5. *Nat. Rev.* 2(10):749–759
- Eliyah D, Michalovitz D, Oren M (1985) Overproduction of p53 antigen makes established cells highly tumorigenic. *Nature*. 316(6024):158–160
- Evans SC, Lozano G (1997) The Li-Fraumeni syndrome: an inherited susceptibility to cancer. *Mol Med Today* 3(9):390–395
- Feldmann G, Dhara S, Fendrich V, Bedja D, Beaty R, Mullendore M, Karikari C, Alvarez H, Iacobuzio-Donahue C, Jimeno A, Gabrielson KL, Matsui W, Maitra A (2007) Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers. *Cancer Res.* 67(5):2187–2196
- Feldmann G, Habbe N, Dhara S, Bisht S, Alvarez H, Fendrich V, Beaty R, Mullendore M, Karikari C, Bardeesy N, Ouellette MM, Yu W, Maitra A (2008) Hedgehog inhibition prolongs survival in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer. *Gut* 57(10):1420–1430
- Gottlieb E, Haffner R, King A, Asher G, Gruss P, Lonai P, Oren M (1997) Transgenic mouse model for studying the transcriptional activity of the p53 protein: age- and tissue-dependent changes in radiation-induced activation during embryogenesis. *Embo J* 16(6):1381–1390
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 54(18):4855–4878
- Halevy O, Michalovitz D, Oren M (1990) Different tumor-derived p53 mutants exhibit distinct biological activities. *Science*. 250(4977):113–116
- Harris CC (1996) p53 tumor suppressor gene: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology, and cancer risk assessment. *Environ. Health Perspect.* 104(Suppl 3):435–439
- Havlicek L, Hanus J, Vesely J, Leclerc S, Meijer L, Shaw G, Strnad M (1997) Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *J. of Med. Chem.* 40(4):408–412
- Ide F, Kitada M, Sakashita H, Kusama K, Tanaka K, Ishikawa T (2003) p53 haploinsufficiency profoundly accelerates the onset of tongue tumors in mice lacking the xeroderma pigmentosum group A gene. *Am. J. Pathol.* 163(5):1729–1733
- Inga A, Storici F, Darden TA, Resnick MA (2002) Differential transactivation by the p53 transcription factor is highly dependent on p53 level and promoter target sequence. *Mol. Cell. Biol.* 22(24):8612–8625
- Janicke RU, Sohn D, Schulze-Osthoff K (2008) The dark side of a tumor suppressor: anti-apoptotic p53. *Cell Death Differ.* 15(6):959–976
- Ji Z, Mei FC, Xie J, Cheng X (2007) Oncogenic KRAS activates hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* 282(19):14048–14055
- Kanai M, Hanashiro K, Kim SH, Hanai S, Boulares AH, Miwa M, Fukasawa K (2007) Inhibition of Crml-p53 interaction and nuclear export of p53 by poly(ADP-ribosylation). *Nat. Cell Biol.* 9(10):1175–1183
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 51(23 Pt 1):6304–6311
- Kolch W (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem. J.* 351(Pt 2):289–305
- Lau J, Kawahira H, Hebrok M (2006) Hedgehog signaling in pancreas development and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 63(6):642–652
- Li FP, Fraumeni JF Jr (1969) Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann. Intern. Med.* 71(4):747–752
- Liu L, Guo J, Yuan L, Cheng M, Cao L, Shi H, Tong H, Wang N, De W (2007) Alpha-fetoprotein is dynamically expressed in rat pancreas during development. *Dev. Growth Differ.* 49(8):669–681
- Michalovitz D, Halevy O, Oren M (1990) Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53. *Cell* 62(4):671–680
- Offer H, Wolkowicz R, Matas D, Blumenstein S, Livneh Z, Rotter V (1999) Direct involvement of p53 in the base excision repair pathway of the DNA repair machinery. *FEBS Lett.* 450(3):197–204
- Paglini G, Caceres A (2001) The role of the Cdk5-p35 kinase in neuronal development. *European journal of biochemistry / FEBS* 268(6):1528–1533
- Pasca di Magliano M, Sekine S, Ermilov A, Ferris J, Dlugosz AA, Hebrok M (2006) Hedgehog/Ras interactions regulate early stages of pancreatic cancer. *Genes Dev.* 20(22):3161–3173
- Schmid G, Kramer MP, Maurer M, Wandl S, Węsierska-Gądek J (2007) Cellular and organismal ageing: Role of the p53 tumor suppressor protein in the induction of transient and terminal senescence. *J. Cell. Biochem.* 101(6):1355–1369
- Schmid G, Kramer MP, Węsierska-Gądek J (2009) p53-mediated regulation of cell cycle progression: pronounced impact of cellular microenvironment. *J. Cell. Physiol.* 219(2):459–469
- Taurin S, Seyrantepe V, Orlov SN, Tremblay TL, Thibault P, Bennett MR, Hamet P, Pshezhetsky AV (2002) Proteome analysis and functional expression identify mortalin as an antiapoptotic gene induced by elevation of [Na⁺]/[K⁺] ratio in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 91(10):915–922
- Taylor WR, Egan SE, Mowat M, Greenberg AH, Wright JA (1992) Evidence for synergistic interactions between ras, myc and a mutant form of p53 in cellular transformation and tumor dissemination. *Oncogene* 7(7):1383–1390
- Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernandez-del Castillo C, Jainik V, Antoniu B, McMahon M, Warshaw AL, Hebrok M (2003) Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature*. 425(6960):851–856

34. Toledo F, Wahl GM (2006) Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* 6(12):909–923
35. Viktorsson K, De Petris L, Lewensohn R (2005) The role of p53 in treatment responses of lung cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331(3):868–880
36. Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI (1983) A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 3(5):323–327
37. Wadhwa R, Takano S, Kaur K, Deocaris CC, Pereira-Smith OM, Reddel RR, Kaul SC (2006) Upregulation of mortalin/mthsp70/Grp75 contributes to human carcinogenesis. *Int. J. Cancer* 118(12):2973–2980
38. Wesierska-Gadek J, Schmid G (2000) Overexpressed poly(ADP-ribose) polymerase delays the release of rat cells from p53-mediated G(1) checkpoint. *J. Cell. Biochem.* 80(1):85–103
39. Wesierska-Gadek J, Schmid G (2001) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates the stability of the wild-type p53 protein. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 6(2):117–140
40. Wesierska-Gadek J, Bugajska-Schretter A, Cerni C (1996a) ADP-ribosylation of p53 tumor suppressor protein: mutant but not wild-type p53 is modified. *J Cell Biochem* 62(1):90–101
41. Wesierska-Gadek J, Schmid G, Cerni C (1996b) ADP-ribosylation of wild-type p53 in vitro: binding of p53 protein to specific p53 consensus sequence prevents its modification. *Biochemical and biophysical research communications* 224(1):96–102
42. Wesierska-Gadek J, Wojciechowski J, Schmid G (2003) Central and carboxy-terminal regions of human p53 protein are essential for interaction and complex formation with PARP-1. *J. Cell. Biochem.* 89(2):220–232
43. Wesierska-Gadek J, Wojciechowski J, Schmid G (2003) Phosphorylation regulates the interaction and complex formation between wt p53 protein and PARP-1. *J. Cell. Biochem.* 89(6):1260–1284
44. Wesierska-Gadek J, Gueorguieva M, Ranflier C, Zerza-Schnitzhofer G (2005) A new multiplex assay allowing simultaneous detection of the inhibition of cell proliferation and induction of cell death. *J. Cell. Biochem.* 96(1):1–7
45. Wesierska-Gadek J, Kramer M, Schmid G (2006) Prevention of farnesylation of c-Ha-Ras protein enhances synergistically the cytotoxic action of doxorubicin in cycling but not in quiescent cells. *J. Cell. Biochem.* 99(6):1664–1676
46. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dotsch V, Andrews NC, Caput D, McKeon F (1998) p63, a p53 homolog at 3q27–29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 2(3):305–316
47. Zhang Z, Yao R, Li J, Wang Y, Boone CW, Lubet RA, You M (2005) Induction of invasive mouse skin carcinomas in transgenic mice with mutations in both H-ras and p53. *Mol Cancer Res* 3(10):563–574
48. Zhang Z, Wang Y, Yao R, Li J, Lubet RA, You M (2006) p53 Transgenic mice are highly susceptible to 4-nitroquinoline-1-oxide-induced oral cancer. *Mol Cancer Res* 4(6):401–410

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Autoreferát k disertační práci

Biologické a biochemické účinky inhibitorů proliferace

Mgr. Iva Dolečková

Tato disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního studia doktorského studijního programu oboru biochemie P1406 Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období 2008 - 2013. Školícím pracovištěm byla Laboratoř růstových regulátorů Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci & Ústavu experimentální botaniky AVČR, v.v.i.

Uchazeč: **Mgr. Iva Dolečková**
Laboratoř růstových regulátorů
Přírodovědecká fakulta
Univerzita Palackého v Olomouci

Školitel: **doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.**
Laboratoř růstových regulátorů
Přírodovědecká fakulta
Univerzita Palackého v Olomouci

Oponenti **prof. RNDr. Jiří Patočka, DrSc.**
Katedra radiologie a toxikologie
Fakulta zdravotně sociální
Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích

prof. RNDr. Eva Tábořská, CSc.
Lékařská fakulta
Biochemický ústav, Brno

doc. Pharm.Dr. Petr Babula, Ph.D.
Ústav přírodních léčiv
Farmaceutická fakulta
Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

Obhajoba se koná dne 27.6.2013 před komisí pro obhajoby disertačních prací v oboru biochemie v místnosti Přírodovědecké fakulty UP v Olomouci-Holici, Šlechtitelů 11. S disertační prací je možno se seznámit v knihovně biologických kateder PřF UP v Olomouci-Holici.

prof. RNDr. Ivo Frébort, CSc., Ph.D.
předseda oborové rady doktorského studijního programu biochemie

Abstrakt

Cyklin-dependentní kinasy (CDK) jsou specifické serin/threoninové proteinkinasy, které hrají klíčovou roli v regulaci buněčného cyklu, transkripci, apoptóze a diferenciaci. Nadměrná aktivita CDK bývá častým znakem různých lidských onemocnění spojených s abnormální mírou proliferace jako je rakovina. Z tohoto důvodu se CDK staly slibným terčem cílených protinádorových léčiv. První část práce využívá racionálního přístupu při hledání nových inhibitorů CDK. Struktury známých inhibitorů olomoucinu a roskovitinu zde byly použity jako výchozí strukturní motiv, na jehož základě byla syntetizována série 2,9-substituovaných 6-guanidinopurinů. Všechny připravené deriváty byly testovány na CDK1 a CDK2 inhibiční aktivitu *in vitro*, cytotoxicitu a efekt na buněčný cyklus v nádorové buněčné linii MCF7 odvozené od karcinomu prsu a byl u nich studován vztah mezi strukturou a biologickou aktivitou. Další část práce je zaměřena na hledání inhibitorů CDK mezi přírodními látkami. Studovány byly antiproliferační a anti-angiogenní účinky flavonu eupatorinu a mechanismus jeho biologické aktivity. Eupatorin je také jednou z hlavních složek extraktů z listů léčivé rostliny *Orthosiphon stamineus* používané v jihovýchodní Asii k léčbě různých onemocnění. Její sušené, drcené listy byly v této práci využity pro vytvoření chloroformového extraktu, který byl poté testován na buněčných kulturách a jeho účinky byly srovnávány s aktivitou samotného eupatorinu.

Abstract

Cyclin-dependent kinases (CDKs) are specific serine/threonine protein kinases which play a key role in regulation of the cell cycle, transcription, apoptosis and differentiation. Overactivation of CDKs is a frequent feature of human pathologies associated with abnormal rates of proliferation such as cancer. For these reasons, CDKs have become a promising target in anticancer research. In the first part of the thesis, a series of 2,9-substituted 6-guanidinopurines, structurally related to the CDK inhibitors olomoucine and roscovitine, has been synthesized and characterized. All prepared compounds were screened for their CDK1 and CDK2 inhibitory activities, cytotoxicity, effects on the cell cycle in the breast cancer-derived cell line MCF7 and the structure-activity relationship was evaluated. The second part is focused on CDK inhibitors of the natural origin. We investigated the antiproliferative and anti-angiogenic properties of flavone eupatorin and the mechanisms of its biological action. Eupatorin is also one of the constituents of the medicinal herb *Orthosiphon stamineus* used in folk medicine in South East Asia for treatment of various disorders. We prepared a chloroform extract of dried, crushed leaves of this plant, tested it on the cell cultures and its activity was then compared to that of the eupatorin standard.

Obsah

1. Cíle disertační práce.....	4
2. Teoretický úvod	5
2.1 Nízkomolekulární inhibitory CDK	5
2.1.1 Úvod.....	5
2.1.2 Guanidinopurinové deriváty jako inhibitory CDK.....	5
2.2 Flavonoidy jako nízkomolekulární inhibitory procesu karcinogeneze	6
2.2.1 Úvod.....	6
2.2.2 Eupatorin	7
3. Materiál a metody	8
4. Komentované výsledky a diskuse.....	10
4.1 Biologická aktivita guanidinových analogů roskovitinu.....	10
4.2 Antiproliferační a anti-angiogenní účinky flavonu eupatorinu	13
5. Závěr.....	18
6. Literatura	19
7. Přehled publikační činnosti	21

1. Cíle disertační práce

Cyklin-dependentní kinasy (CDK) jsou specifické serin/threoninové proteinkinasy, které hrají klíčovou roli v regulaci buněčného cyklu, transkripci, apoptóze a diferenciaci. Nadměrná aktivita CDK bývá častým znakem různých lidských onemocnění spojených s abnormální mírou proliferace, jako je rakovina. Z tohoto důvodu se CDK staly slibným terčem cílených protinádorových léčiv.

Cílem této práce byla jednak literární rešerše na téma protinádorových léčiv se zaměřením na CDK, dále v experimentální části hledání nových inhibitorů CDK a ověření mechanismu jejich účinku. Využity přitom byly dva přístupy. První, racionální přístup, byl založen na obměňování struktur již známých inhibitorů CDK ve snaze zvýšit jejich biologickou aktivitu, druhý poté využíval jako zdroj látky přírodního původu.

2. Teoretický úvod

Rostoucí počet případů nádorových onemocnění obvykle doprovázených drastickou léčbou s řadou závažných vedlejších účinků s sebou přináší potřebu vyvíjet stále nová léčiva s menšími negativními dopady na lidský organismus. Současné pokroky v molekulární biologii a stále hlubší znalosti v oblasti nádorové transformace nyní obrací pozornost vědců na cílenou terapii a molekulárně cílená léčiva. Hlavní myšlenkou této strategie je individualizovaný přístup k pacientům a co nejpřesnější charakterizace nádoru, na jejímž základě je poté zvolen určitý typ terapie. Cílená léčiva jsou zaměřena na inhibici/modifikaci určité vybrané molekulární dráhy považované za klíčovou pro vznik rakoviny či její rozvoj a metastazování. Nová cílená léčiva mohou být hledána pomocí high-throughput screeningu různých přírodních produktů či chemických knihoven za účelem modifikace konkrétní molekulární dráhy nebo jsou pro tuto modifikaci přímo navrhována a syntetizována. Aktivní látky ovšem nemusí mít vhodné vlastnosti z hlediska farmakokinetiky, farmakodynamiky, vedlejších účinků a stávají se poté výchozím strukturním motivem pro vývoj derivátů s lepšími biologickými vlastnostmi.

2.1 Nízkomolekulární inhibitory CDK

2.1.1 Úvod

Cyklin-dependentní kinasy (CDK) jsou specifické serin/threoninové proteinkinasy, které hrají klíčovou roli v regulaci buněčného cyklu, transkripci, apoptóze a diferenciaci. Nadměrná aktivita CDK bývá častým znakem různých lidských onemocnění spojených s abnormální mírou proliferace jako je rakovina. Z tohoto důvodu se CDK staly slibným terčem cílených protinádorových léčiv. Nízkomolekulární inhibitory CDK jsou nyní předmětem intenzivního výzkumu a řada z nich se v současnosti nachází v různých stádiích klinického testování. Navzdory značné chemické diverzitě tvoří většina inhibitorů CDK nízkomolekulární, ploché, hydrofobní, heterocyklické molekuly, které kompetují s ATP v aktivním místě kinasy. Vývoj těchto látek často čerpal inspiraci v přírodních látkách. Flavopiridol, semisyntetický analog alkaloidu rohitukinu, se stal prvním inhibitorem CDK, který vstoupil do klinického testování pod názvem alvocidib a nyní se nachází ve fázích I a II pro léčbu různých typů nádorových onemocnění. Inhibitor ZK304709 svou strukturou zase nápadně připomíná přírodní indigoidní barvivo indirubin. Dalším příkladem mohou být rostlinné hormony cytokininy, od kterých se odvíjel výzkum purinových inhibitorů CDK. Purinový skelet byl vůbec prvním strukturním motivem systematicky modifikovaným za účelem nalezení účinných CDK inhibitorů, který vedl k objevům známého olomoucínu a roskovitínu (Havlíček et al., 1997; Meijer et al., 1997) následovaných syntézou purvalanolů (Chang et al., 1999), olomoucínu II (Krystof et al., 2005) či různých biarylových derivátů (Bettayeb et al., 2008).

2.1.2 Guanidinopurinové deriváty jako inhibitory CDK

Látky obsahující guanidinoskupinu jako např. aminokyseliny jsou široce rozšířené v různých biologických systémech a vykazují celé spektrum biologických aktivit (Berlinck et Kossuga, 2005). Schopnost guanidinoskupiny formovat silné, nekovalentní interakce v aktivních místech enzymů hraje klíčovou roli pro

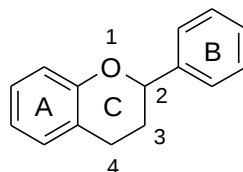
jejich biologické efekty. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli vytvořit sérii 2,9-disubstituovaných-6-guanidinopurinů odvozených od struktury olomouciny nebo roskovitinu a studovat vliv zavedení guanidinoskupiny na CDK-inhibiční a antiproliferační vlastnosti v porovnání s roskovitinem.

2.2 Flavonoidy jako nízkomolekulární inhibitory procesu karcinogeneze

2.2.1 Úvod

Flavonoidy zahrnují skupinu polyfenolických látek běžně se vyskytující jako sekundární metabolity v rostlinách s různými fyziologickými funkcemi jako je ochrana před fotosyntetickým stresem, UV zářením, volnými radikály či herbivory. Ze strukturního hlediska jsou flavonoidy nízkomolekulární látky, jejichž základem jsou dva aromatické cykly (A a B) propojené O-heterocyklem (**Obrázek 1**). Další dělení do skupin je založeno na přítomnosti oxoskupiny na pozici 4, dvojité vazby mezi atomy uhlíku 2 a 3 C kruhu a na přítomnosti hydroxylových skupin.

Příjem flavonoidů v lidské stravě byl již předmětem řady výzkumů v různých zemích a bývá odhadován na desítky až stovky mg/den (Chun et al., 2007). Je však důležité si uvědomit, že ačkoliv patří flavonoidy k běžným látkám v lidské stravě, nepatří mezi biologicky neaktivnější. Nízká aktivita je způsobena špatnou absorpcí ve střevě, vysokou mírou metabolizace a rychlou eliminací z těla.



Obrázek 1: Obecná struktura flavonoidů

U řady flavonoidů byl potvrzen antiproliferační efekt na různých nádorových buněčných liniích (Kawaii et al., 1999). Výzkumy ukázaly schopnost těchto látek ovlivňovat aktivitu různých regulátorů buněčného cyklu a indukovat tak jeho zastavení. Flavopiridol, semisyntetický analog flavonu rohitukinu, se stal prvním inhibitorem CDK, který vstoupil do klinického testování pro léčbu různých typů nádorových onemocnění (Zhai et al., 2002). Mezi další molekulární cíle flavonoidů inhibujících proliferaci patří i receptorové tyrosinkinasy (EGFR, IGF-1R, PDGFR, VEGFR, c-Met; Teillet et al., 2008) nebo Ras/MAP-kinasová (Chung et al., 2001) či PI3-kinasová/Akt signální dráha (Siddiqui et al., 2004). Významným způsobem likvidace nádorových buněk je indukce buněčné smrti – apoptózy. Flavonoidy již opakovaně prokázaly schopnost vyvolat apoptózu v různých nádorových buněčných liniích (Wenzel et al., 2000; Erhart et al., 2005). Řada flavonoidů také prokázala svůj inhibiční efekt na nádorovou angiogenezi (Mojzis et al., 2008).

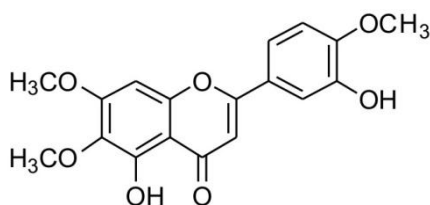
2.2.2 Eupatorin

Část práce je zaměřena na antiproliferační potenciál flavonu eupatorinu. Tato látka byla vybrána z důvodu zajímavých biologických efektů, kterými vynikala nad ostatními látkami z naší testované série potenciálních CDK inhibitorů přírodního původu. Navíc v té době nebylo známo nic o jejím mechanismu účinku.

Eupatorin je jednou ze složek rostlin *Orthosiphon stamineus* (JV Asie; Yam et al., 2010), *Lantana Montevidentis* (tropy J Ameriky; Nagao et al., 2002), *Tanacetum vulgare* (mírné pásmo Evropy, Asie; Schinella et al., 1998) či zástupců rodu *Eupatorium* (Dobberstein et al., 1977). Mezi rostliny vyskytující se v našich středoevropských podmínkách patří *Eupatorium cannabinum* (sadec konopáč), v jejímž extraktu z listů jsme ovšem přítomnost eupatorinu neprokázali (nepublikovaná data). V České republice je však komerčně dostupná i rostlina *Orthosiphon stamineus* v podobě čaje nebo ve formě kapslí jako potravinový doplněk, kde se nám eupatorin podařilo prokázat a které jsme proto využili pro naše další experimenty.

Orthosiphon stamineus Benth. (Lamiaceae) je léčivá rostlina používaná již po několik století v přírodní medicíně v jihovýchodní Asii pro léčbu řady onemocnění (Tran, 1990). Známé pozitivní účinky na lidský organismus se staly podnětem pro bližší studium extraktů z této rostliny a výsledky potvrdily její diuretické (Adam et al., 2009), antioxidační (Yam et al., 2007), hepatoprotektivní (Yam et al., 2007), protizánětlivé (Yam et al., 2008; Yam et al., 2010), analgetické (Yam et al., 2008) či antipyretické účinky (Yam et al., 2009). Extrakty z listů *Orthosiphon stamineus* obsahují široké spektrum látek: flavonoidy, terpenoidy, saponiny, hexosy, organické kyseliny atd. (Tezuka et al., 2000; Akowuah et al., 2004; Loon et al., 2005). Polymethoxylované flavonoidy sinensetin, eupatorin a 3'-hydroxy-5,6,7,4'-tetramethoxyflavon, patří k dominantním složkám chloroformových frakcí těchto extraktů a zároveň i k terapeuticky nejzajímavějším (Yam et al., 2010). Sušené, drcené listy obsažené v kapslích byly v této práci využity pro vytvoření chloroformového extraktu, v němž byla stanovena koncentrace eupatorinu a který byl dále testován na buněčných kulturách. Výsledky poté byly porovnávány s účinky samotného eupatorinu odpovídající koncentrace.

Eupatorin, 3',5-dihydroxy-4',6,7-trimethoxyflavone (**Obrázek 2**), již v minulosti prokázal své antiproliferační účinky na buněčných liniích HeLa odvozených od rakoviny děložního čípku (Csapi et al., 2010), na buňkách MK-1 karcinomu žaludku (Tezuka et al., 2000) či MDA-MB-468 prsního karcinomu (Androutsopoulos et al., 2008). V jedné z nejnovějších studií byl eupatorin nalezen v sérii přírodních látek jako inhibitor kontrolního bodu mitotického vřetenka (Salmela et al., 2012).



Obrázek 2: Struktura eupatorinu

3. Materiál a metody

Chemikálie a protilátky

Olomoucín, *R*-roskovitin a *R*-olomoucín II byly syntetizovány dle publikované metodiky (Havlicek et al., 1997; Krystof et al., 2002). Eupatorin standard (čistota 94.1 % determinována pomocí HPLC dodavatelem) byl zakoupen z firmy Phytolab (Německo) a inhibitor farnesyltransferasy L744,832 z firmy Alexis Biochemicals (Švýcarsko). Látky byly rozpuštěny v DMSO na koncentraci 100 mM a použity pro testy na buněčných kulturách. Specifické protilátky byly zakoupeny z firem Cell Signaling Technology (USA; anti-caspasa 3), Sigma-Aldrich (USA; anti- α -tubulin, klon DM1A; peroxidasou značené sekundární protilátky), Santa Cruz Biotechnology (USA; anti-Mcl-1, klon S-19; anti-PARP, klon F-2; anti-Mdm-2, klon SMP14; VEGFR1, klon C-17), Millipore (USA; anti-pH3^{Ser10}), Jackson ImmunoResearch Laboratory (VB; koží protilátka proti myším IgG značená FITC), Exbio (Česká republika; anti- γ -tubulin značený Dyomics 647), Invitrogen (USA; koží sekundární protilátka proti králíčímu IgG značená Alexa Fluor 488) nebo byly poskytnuty jako dar od B. Vojtěška (Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Česká republika; anti-p53, klon DO-1). Všechny protilátky byly rozpuštěny v roztoku 5% nízkotučného mléka a 0.1% Tweenu 20 v PBS.

Příprava extraktu z listů *Orthosiphon stamineus*

Suché, drcené listy *O. stamineus* byly zakoupeny z firmy Expharma (Česká republika), homogenizovány chloroformem (40 ml na 2 g) pomocí vibračního kulového mlýnku (MM 301, Retsch, Německo). Surový extrakt byl centrifugován 10 min při 20 000 g, supernatant byl zfiltrován přes 0,45 μ m nylonový membránový filtr (Alltech, Nizozemí) a odpařen pomocí rotační vakuové odparky (Buchi, Švýcarsko). Suchý isolát byl rozpuštěn v DMSO a roztok byl použit pro testy na buněčných kulturách.

Buněčné kultury a test viability

Buněčné linie MCF7 (prsní adenokarcinom), RPMI8226 (mnohočetný myelom), HL-60 (akutní promyelocytická leukémie), MOLT-4 (akutní lymfoblastická leukémie), K562 (chronická myelogenní leukémie), HeLa (adenokarcinom děložního čípku) a BJ (předkožkové fibroblasty) byly zakoupeny z firmy American Type Culture Collection (USA) nebo European Collection of Cell Cultures (VB). HUVEC endoteliální buňky byly poskytnuty prof. J. Ulrichovou (Univerzita Palackého, Olomouc, Česká republika). Buňky byly kultivovány podle pokynů dodavatele. Klony potkaních embryonálních fibroblastů byly připraveny dle publikované metodiky (Schmid et al., 2009). Testy buněčné viability byly prováděny pomocí kalceinu AM (Invitrogen, USA), fluorescence živých buněk byla měřena při 485/538 nm (ex/em) pomocí Fluoroskan Ascent Plate Reader (Thermo Labsystems, USA) podle zavedené metodiky (Jorda et al., 2011).

Analýza buněčného cyklu

Přibližně 10^6 buněk bylo sklizeno a zafixováno 90% methanolem. Po rehydrataci byly buňky inkubovány s primární protilátkou proti pH3^{Ser10} a poté s příslušnou sekundární protilátkou značenou Alexa Fluor 488. DNA byla značena propidium jodidem. Fluorescence byla měřena při 488/575 (ex/em) pro propidium jodid a 488/525 (ex/em) pro Alexa Fluor 488 pomocí průtokového cytometru Cell Lab QuantaTM SC (Beckman Coulter, USA). Buněčný cyklus byl analyzován pomocí programu Multicycle AV for Windows.

SDS–PAGE a imunodetekce

Po sklizení buněk a jejich lýzi se koncentrace proteinů v lyzátech stanovila Bradfordovou metodou. Vzorky byly separovány pomocí SDS-polyakrylamidové gelové elektroforézy a přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Následovalo blokování membrán a jejich inkubace s primárními a příslušnými sekundárními protilátkami. Komplexy protein-protilátka byly vizualizovány pomocí ECL (Thermo Fisher Scientific, USA), jak již bylo popsáno dříve (Jorda et al., 2011).

Měření aktivity caspasy 3/7

Metoda byla provedena podle Jordy et al., 2011. Ve stručnosti, buňky byly sklizeny, lyzovány a koncentrace proteinů se stanovila Bradfordovou metodou. 15 µg proteinů se smíchalo se 100 µl reakční směsí obsahující 100 µM Ac-DEVD-AMC jako substrát. Fluorescence byla měřena pomocí Fluoroskan Ascent reader (Thermo Labsystems, USA) při 346/442 nm (ex/em).

Imunofluorescenční značení

Buňky byly kultivovány na krycích sklíčkách v šestijamkových panelech. Po promytí PBS následovala fixace směsí methanol : aceton (1:1) a blokování 10% fetálním hovězím sérem. V dalším kroku proběhla inkubace s primárními a příslušnými sekundárními protilátkami. DNA byla značena DAPI. K pořizování fotografií byl použit fluorescenční mikroskop BX50 (Olympus, Japan) vybavený digitální kamerou Cool Snap (Photometrics, USA).

Měření inhibice proteinkinas

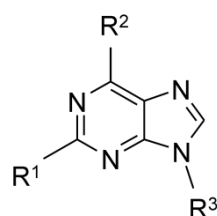
CDK1/cyklin B a CDK2/cyklin E byly produkovány pomocí bakulovirového expresního systému a purifikovány pomocí Ni^{2+} -NTA kolony (Qiagen, Německo). Reakční směs obsahovala enzym, 1 mg/ml histon H1, 15 µM ATP, 0,05 µCi [γ - ^{33}P]ATP a testovanou látku, vše v reakčním pufru (60 mM HEPES-NaOH, pH 7,5, 3 mM MgCl_2 , 3 mM MnCl_2 , 3 µM orthovanadát sodný, 1,2 mM DTT, 2,5 µg/50 µl $\text{PEG}_{20.000}$). Reakce byla po inkubaci zastavena přidávkem 3% H_3PO_4 . Podíl reakční směsi se nanese na P-81 fosfocelulózový papír (Whatman, VB), který se poté 3x promyje 0,5% vodným roztokem H_3PO_4 a nechá na vzduchu uschnout. Radioaktivita byla měřena pomocí digitálního obrazového analyzátoru FLA-7000 (Fujifilm, Japonsko). Hodnoty IC_{50} byly získány z grafické analýzy.

4. Komentované výsledky a diskuse

4.1 Biologická aktivita guanidinových analogů roskovitinu

Všechny připravené 2,9-disubstituované-6-guanidinopuriny (**Tabulka 1**) byly testovány na CDK1 a CDK2 inhibiční aktivitu *in vitro*, cytotoxicitu a antiproliferační efekt v nádorové buněčné linii MCF7 odvozené od karcinomu prsu. Detekce histonu H3 fosforylovaného na serinu 10 (pH3^{Ser10}) byla využita jako mitotický marker. CDK inhibitor roskovitin vyvolávající specifický G2 blok byl použit jako pozitivní kontrola (IC₅₀: CDK2 = 0,17 μM, CDK1 = 2,4 μM, MCF7 = 20,2 μM). Všechna data jsou shrnuta v **Tabulce 2**.

Tabulka 1: Struktury připravených derivátů



Látka	R ¹	R ²	R ³
1	NH ₂	guanidino	Me
2	NH ₂	guanidino	Pr
3	NH ₂	guanidino	iPr
4	NH ₂	guanidino	iBu
5	NH ₂	guanidino	Et
6	NH ₂	guanidino	CH ₂ CF ₃
7	NH ₂	guanidino	CH ₂ CH ₂ OH
8	NH ₂	guanidino	CH ₂ CH ₂ NH ₂
9	NH ₂	guanidino	CH ₂ CH ₂ N ₃
10	H	guanidino	Me
11	NH ₂	NH ₂	iPr
12	NH ₂	NH ₂	Et
13	NH ₂	(Me) ₂ N-	CH ₂ CH ₂ N ₃
16a	NH(CH ₂) ₂ OH	guanidino	iPr
16b	NH(CH ₂) ₃ OH	guanidino	iPr
16c	NH(CH ₂) ₆ OH	guanidino	iPr
16d	(R)- OCH ₂ CH(Et)NH ₂	guanidino	iPr
16e	(R)- NHCH(Et)CH ₂ OH	guanidino	iPr
16f	(S)- OCH ₂ CH(Et)NH ₂	guanidino	iPr
16g	(S)- NHCH(Et)CH ₂ OH	guanidino	iPr
16h	(R)- OCH ₂ CH(iPr)NH ₂	guanidino	iPr
16i	(R)- NHCH(iPr)CH ₂ OH	guanidino	iPr
16j	(S)- OCH ₂ CH(iPr)NH ₂	guanidino	iPr
16k	(S)- NHCH(iPr)CH ₂ OH	guanidino	iPr
16l	cyclopropylamino	guanidino	iPr
16m	(S)-O-prolinol	guanidino	iPr
16n	(S)-N-prolinol	guanidino	iPr
16o	(R)-O-prolinol	guanidino	iPr
16p	(R)-N-prolinol	guanidino	iPr

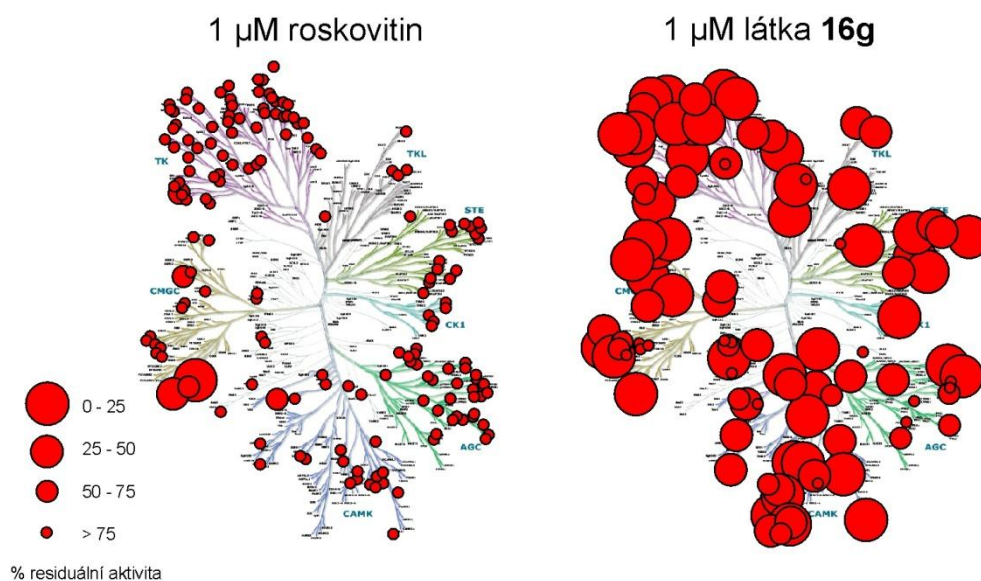
Tabulka 2. Biologická aktivita připravených derivátů

Látka	IC ₅₀ [μM]			buněčný cyklus MCF7 buněk dávka 100 μM, 24 h	
	CDK1/cyklin B	CDK2/cyklin E	MCF7	G2+M ^a	pH3(Ser10) ^b
1	38.2 ± 5.5	6.8 ± 2.8	>100	1.5 ± 0.7	0.81 ± 0.09
2	55.9 ± 1.5	10.7 ± 4.9	36.5 ± 9.8	4.0 ± 1.0	6.71 ± 2.49
3	14.8 ± 3.3	1.3 ± 0.2	97.2 ± 24.2	2.0 ± 0.8	0.18 ± 0.01
4	>100	66.5 ± 30.0	96.6 ± 38.2	3.5 ± 0.6	7.00 ± 1.00
5	12.6 ± 1.3	1.7 ± 1.0	54.3 ± 25.7	1.6 ± 0.2	0.10 ± 0.03
6	>100	>100	>100	0.8 ± 0.5	ND
7	>100	>100	>100	0.9 ± 0.3	ND
8	>50	>100	>100	1.0 ± 0.6	ND
9	>100	74.9 ± 14.1	>100	1.4 ± 0.8	ND
10	>100	>100	>100	1.0 ± 0.4	ND
11	64.9 ± 17.4	22.2 ± 17.2	>100	0.9 ± 0.4	ND
12	37.5 ± 10.7	7.9 ± 3.7	>100	1.2 ± 0.6	ND
13	>100	>100	>100	1.0 ± 0.4	ND
16a	15.1 ± 9.2	0.82 ± 0.34	12.4 ± 6.4	2.9 ± 1.1	0.15 ± 0.02
16b	4.1 ± 0.3	0.18 ± 0.07	8.8 ± 3.3	2.5 ± 1.2	0.18 ± 0.02
16c	4.2 ± 1.7	1.6 ± 0.1	5.2 ± 3.1	2.0 ± 0.8	0.33 ± 0.01
16d	47.6 ± 11.0	13.3 ± 7.0	>100	0.8 ± 0.4	1.08 ± 0.21
16e	2.1 ± 0.4	0.14 ± 0.06	4.5 ± 1.3	1.8 ± 1.1	0.08 ± 0.06
16f	8.1 ± 5.1	6.2 ± 3.4	16.3 ± 2.9	1.5 ± 0.4	0.07 ± 0.01
16g	0.9 ± 0.5	0.037 ± 0.031	1.6 ± 0.3	1.6 ± 0.8	0.09 ± 0.03
16h	15.6 ± 6.8	8.0 ± 3.3	79.4 ± 22.1	2.1 ± 0.7	0.39 ± 0.06
16i	2.0 ± 1.0	0.14 ± 0.03	10.5 ± 3.8	2.3 ± 1.0	0.13 ± 0.09
16j	1.1 ± 0.3	1.8 ± 0.8	3.4 ± 0.7	1.7 ± 0.4	0.09 ± 0.07
16k	1.1 ± 0.6	0.071 ± 0.046	2.1 ± 0.4	1.8 ± 0.7	0.09 ± 0.08
16l	6.4 ± 1.5	0.50 ± 0.18	5.4 ± 0.2	2.4 ± 0.6	0.17 ± 0.03
16m	>100	25.2 ± 4.8	>100	1.7 ± 0.2	0.80 ± 0.10
16n	1.5 ± 0.1	0.16 ± 0.04	6.2 ± 3.3	1.7 ± 0.8	0.11 ± 0.08
16o	81.5 ± 27.0	23.6 ± 4.9	>100	1.3 ± 0.5	ND
16p	6.2 ± 2.2	0.67 ± 0.44	20.4 ± 16.8	2.0 ± 0.7	0.10 ± 0.07
roskovitin	2.4 ± 0.94	0.17 ± 0.05	20.2 ± 12.3	1.5 ± 0.1	0.11 ± 0.01

^a poměr G2+M populace ovlivněných a kontrolních buněk

^b poměr pH3-pozitivní populace ovlivněných a kontrolních buněk

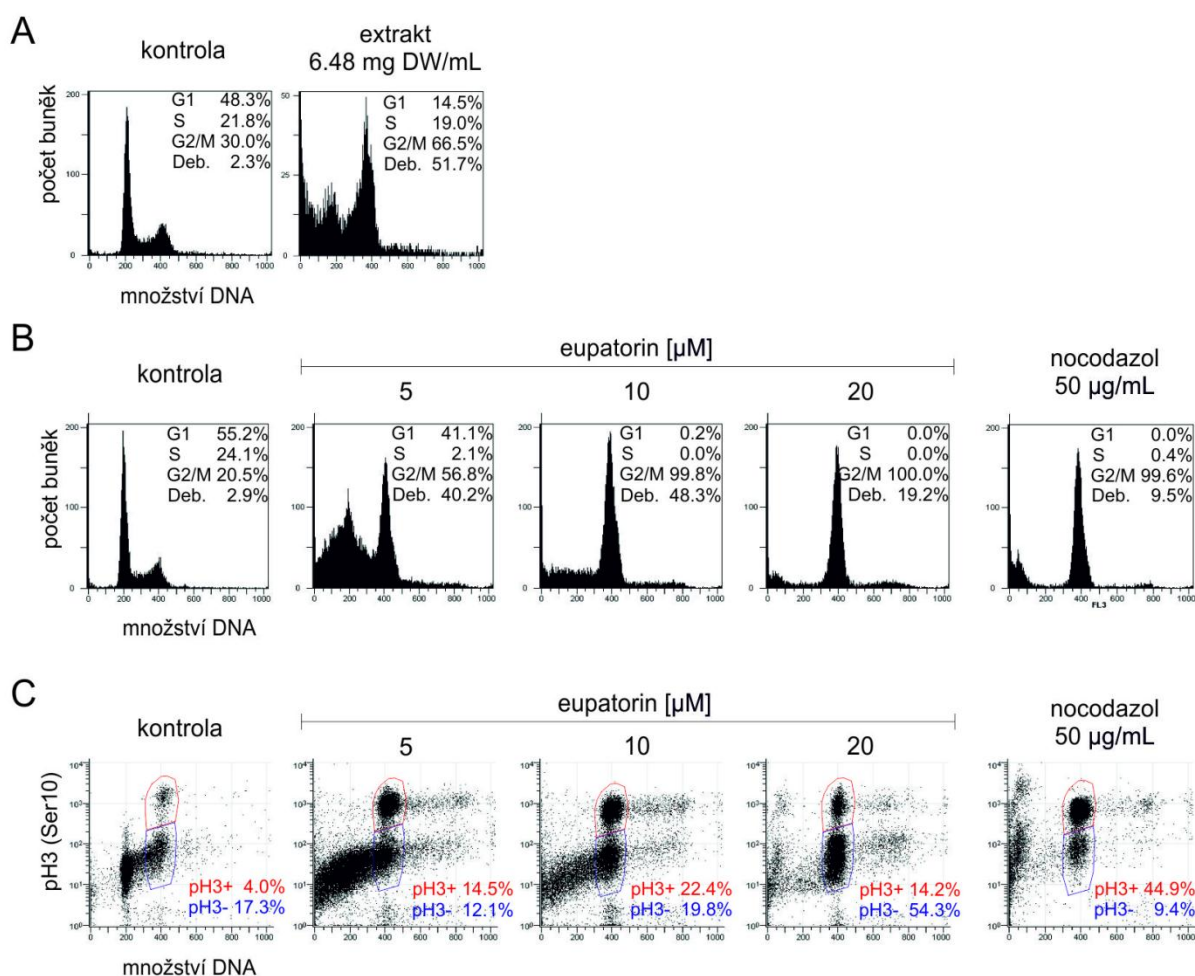
Nejaktivnější derivát **16g** obsahoval stejný N9 i C2-postranní řetězec jako roskovitin. V porovnání s ním byla jeho aktivita vůči CDK2 přibližně 5x vyšší a v buňkách MCF7 byla tato látka dokonce více než desetinásobně účinnější. Zajímavým zjištěním, které je v kontrastu s předchozími studiemi purinových derivátů, je obecně vyšší aktivita (S)-6-guanidinopurinů v porovnání s jejich (R)-optickými isomery. Testování obou nejúčinnějších (R) a (S)-enantiomerů **16e** a **16g** na panelu přibližně 100 kinas odhalilo sníženou selektivitu 6-guanidinopurinů v porovnání s roskovitem vlivem zavedení guanidinoskupiny na pozici C6 (**Obrázek 3**).



Obrázek 3: Porovnání specificity 1 μ M roskovitinu (zdroj www.invitrogen.com) a 1 μ M látky **16g** na reprezentativním panelu proteinkinas.

4.2 Antiproliferační a anti-angiogenní účinky flavonu eupatorinu

Extrakt o známé koncentraci eupatorinu redukoval viabilitu nádorových buněk podobně jako čistý, komerčně dodávaný eupatorin odpovídající koncentrace s hodnotami IC_{50} řádově v mikromolech. Významnou vlastností eupatorinu je jeho selektivita vůči nádorovým buněčným liniím a naopak nízká aktivita ve zdravých lidských buňkách ($IC_{50} > 100 \mu M$). Extrakt i eupatorin standard indukovaly G2/M blok buněčného cyklu (**Obrázek 4A,B**). Z našich experimentů je zřejmé, že eupatorin významným způsobem přispívá k celkové aktivitě extraktu.



Obrázek 4: Chloroformový extrakt z listů *Orthosiphon stamineus* i čistý eupatorin indukují G2/M blok buněčného cyklu HeLa buněk. Analýza průtokovou cytometrií: (A) značení DNA v buňkách ovlivněných extraktem na 24 h (konečná koncentrace eupatorinu v médiu byla 10 μM), (B) značení DNA buněk ovlivněných čistým eupatorinem nebo nocodazolem na 24 h. (C) Značení DNA a histonu H3 fosforylovaného na serinu 10 ($pH3^{Ser10}$) v buňkách ovlivněných čistým eupatorinem nebo nocodazolem na 24 h. Pro značení DNA byl použit propidium jodid, pro $pH3^{Ser10}$ imunodetekce. Nocodazol byl využit jako pozitivní kontrola.

Pro odlišení G2 fáze od mitózy jsme pomocí průtokové cytometrie sledovali intracelulární hladinu histonu H3 fosforylovaného na serinu 10 (pH3^{Ser10}). Po aplikaci 5 a 10 μM eupatorinu jsme pozorovali akumulaci mitotických buněk (pH3^{Ser10}-pozitivních); 20 μM eupatorin naopak způsobil enormní nárůst pH3^{Ser10}-negativní populace buněk odpovídající pozdní G2 fázi či tetraploidní G1 fázi (**Obrázek 4C**). Porovnáním hodnot Debris (mrtvé, degradované buňky) je patrné, že eupatorin má v nižších dávkách cytotoxické účinky a při vyšších spíše cytostatické. Uvedené tvrzení je ovšem platné pouze v případě kratších, 24-hodinových inkubací, při dlouhodobých kultivacích je cytotoxický účinek koncentračně závislý, jak je možné pozorovat u třídních testů viability. Klíčovou kinasou, jejíž inhibice je nejspíše příčinou těchto odlišných účinků různých koncentrací eupatorinu, je pravděpodobně aurora B hrající důležitou úlohu při kondenzaci chromatinu a v kontrolním bodu mitotického vřeténka a jejímž substrátem je mimo jiné právě histon H3. Inhibice aurory B eupatorinem byla také potvrzena v jedné z nejnovějších studií *in vitro* i v buněčných lyzátech (Salmela et al., 2012). Navrhovaný mechanismus duálního chování eupatorinu je znázorněn na **Schématu 1**.

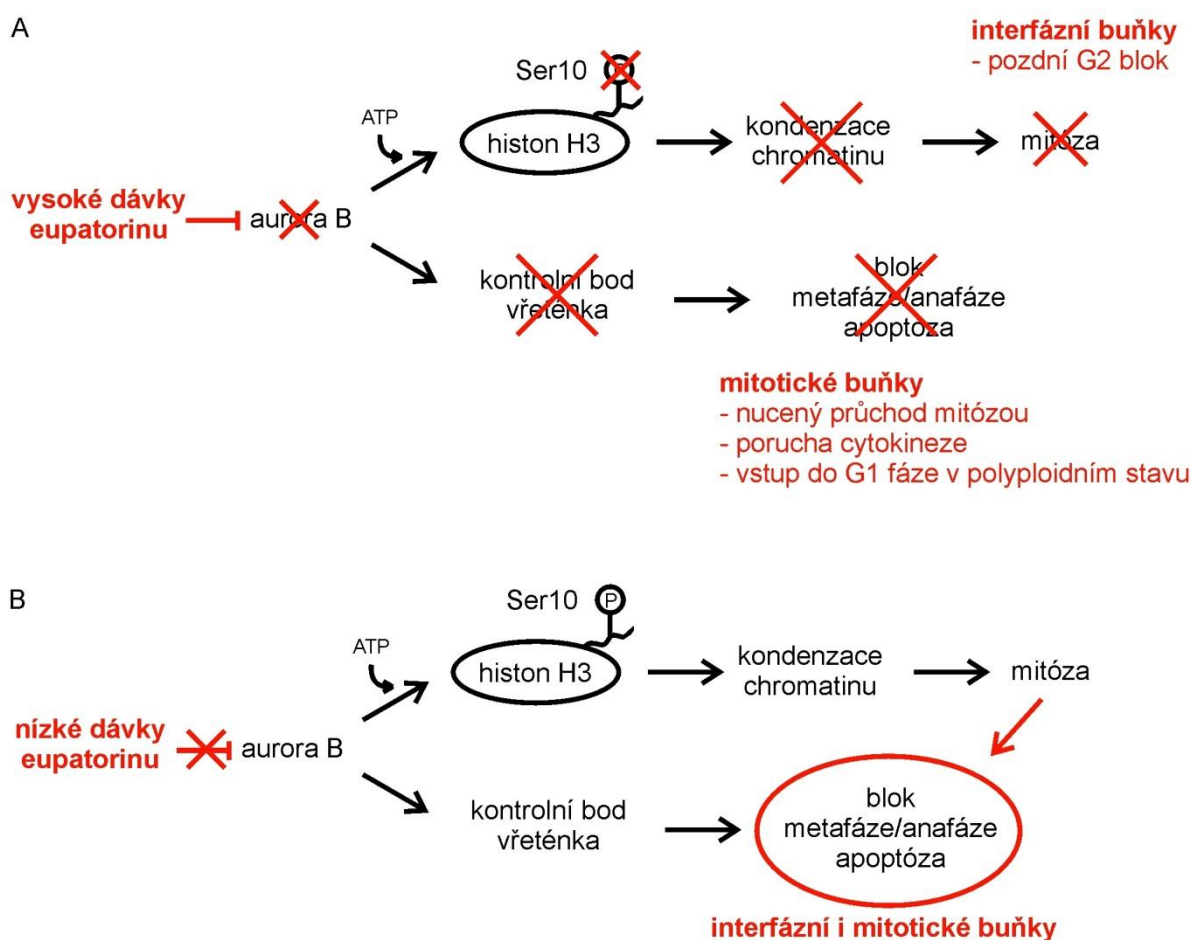
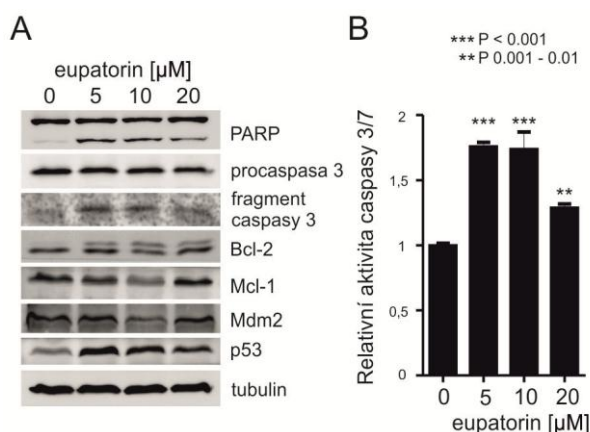


Schéma 1: Navrhovaný mechanismus působení vysokých (A) a nízkých (B) dávek eupatorinu na průchod buněčným cyklem.

Experimenty prokázaly schopnost eupatorinu vyvolat buněčnou smrt nádorových buněk, avšak její mechanismus bylo nutné ještě dále potvrdit. Detekcí vybraných markerů apoptózy a zvýšenou aktivitou caspasy 3 a 7 jsme potvrdili apoptózu jako mechanismus buněčné smrti (**Obrázek 5**). Vybrané markery byly zřetelnější při nižších koncentracích eupatorinu (5 a 10 μM) a naopak slabší v případě vyšší dávky (20 μM). Tyto výsledky jsou v souladu s předchozími experimenty, které poukazovaly na duální chování (cytotoxické vs. cytostatické) eupatorinu při 24-hodinové inkubaci.

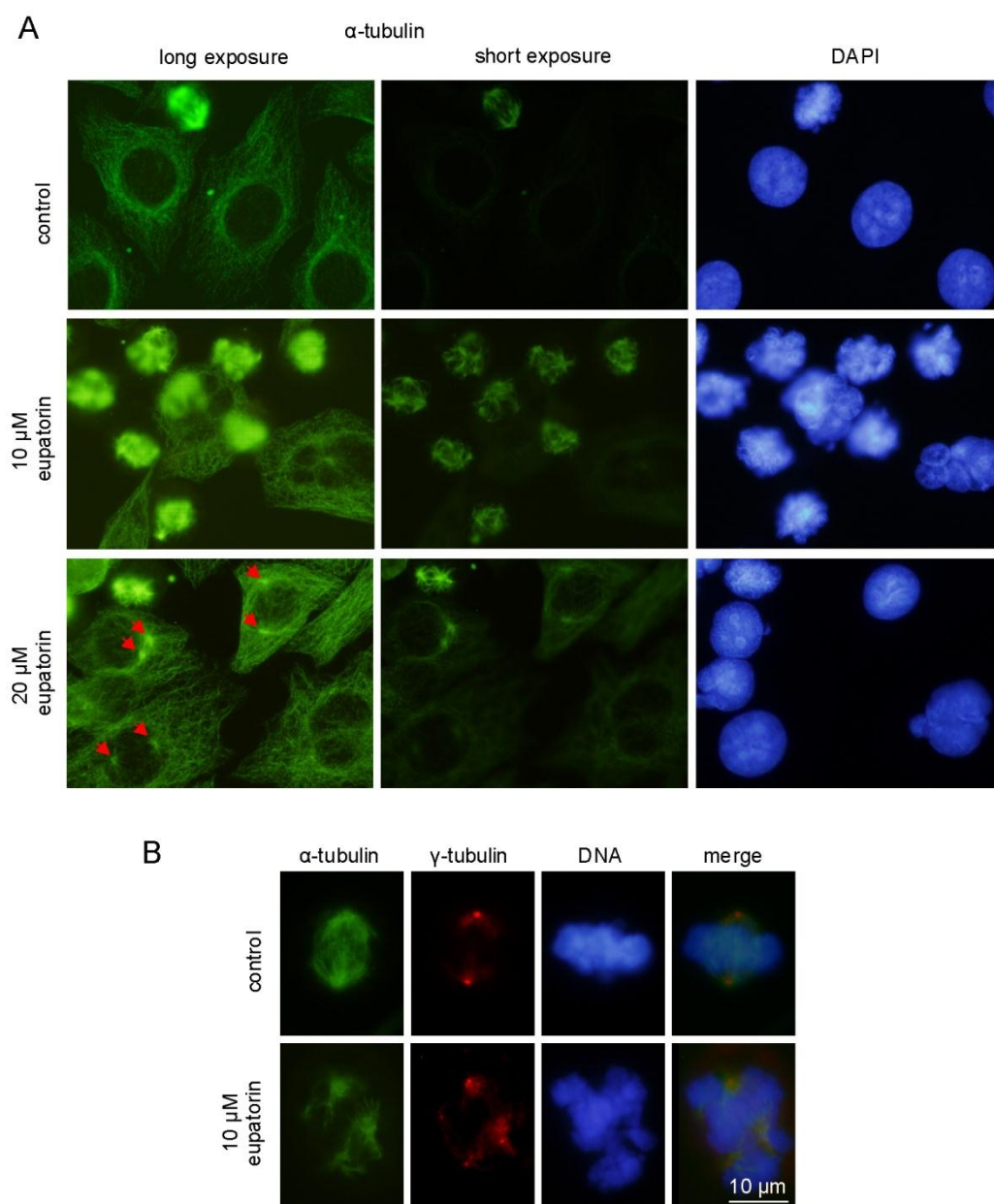


Obrázek 5: Indukce apoptózy v buňkách HeLa po ovlivnění eupatorinem na 24 h. (A) Detekce vybraných markerů apoptózy pomocí western blottingu, (B) relativní aktivita caspasy 3/7 v buněčných lyzátech.

Jelikož byla u řady flavonoidů strukturně blízkých eupatorinu prokázána schopnost inhibice polymerizace mikrotubulů (Beutler et al., 1998), bylo naším dalším cílem posoudit vliv eupatorinu na mikrotubulární systém. Pomocí imunofluorescenčního značení α - a γ -tubulinu jsme vizualizovali mikrotubuly, resp. centrosomy HeLa buněk ovlivněných eupatorinem. Žádnou významnou depolymerizaci mikrotubulů jsme nepozorovali, avšak po aplikaci 10 μM eupatorinu bylo možné pozorovat nárůst mitotických buněk obsahující multipolární dělicí vřeténka s γ -pozitivními centrosomálními póly a také velké, mnohojaderné buňky s dekonzenzovaným chromatinem (**Obrázek 6A, B**). Tyto znaky jsou charakteristické pro mitotickou katastrofu (Roninson et al., 2001). Z tohoto důvodu usuzujeme, že mitotická katastrofa následovaná apoptózou je mechanismem buněčné smrti indukované 10 μM eupatorinem. Účinkem vyšší dávky eupatorinu (20 μM) dochází pravděpodobně vlivem inhibice aurory B k bloku interfázních buněk v pozdní G2 fázi. Tomu nasvědčuje přítomnost řady buněk s velkým jádrem, dekonzenzovaným chromatinem a často i se zřetelně oddělenými centrosomy (**Obrázek 6A**; separované centrosomy označeny šipkami). Kromě těchto buněk byly pozorovány i buňky mnohojaderné podporující teorii nuceného průchodu mitózou vlivem nefunkčního kontrolního bodu vřeténka v případě mitotických buněk (**Obrázek 6A**).

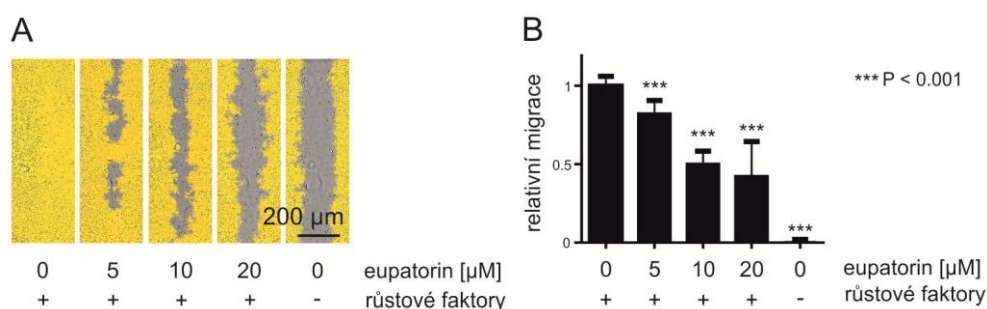
Vzhledem ke strukturní podobnosti eupatorinu a známých inhibitorů proteinkin (Teillet et al., 2008) jsme zkoumali schopnost 1 μM eupatorinu redukovat aktivitu přibližně 110 lidských proteinkin. Eupatorin se ukázal být nespecifickým inhibitorem snižující nejvýznamněji aktivitu kinas RIPK2, VEGFR1 a MLK3 s residuálními aktivitami pod 33 %. Ačkoliv byla inhibice aurory B prokázána jinými autory *in vitro* i v buněčných lyzátech (Salmela et al., 2012), v našich testech nepatřila aurora B s residuální aktivitou 79 % k těm nejcitlivějším. Avšak *in vitro* testy s rekombinantními enzymy nemusí nutně odrážet reálnou situaci v buňkách a

navíc k významnému buněčnému efektu, který je pravděpodobně způsoben inhibicí aurory B, docházelo právě až při vyšších koncentracích eupatorinu (20 μ M).

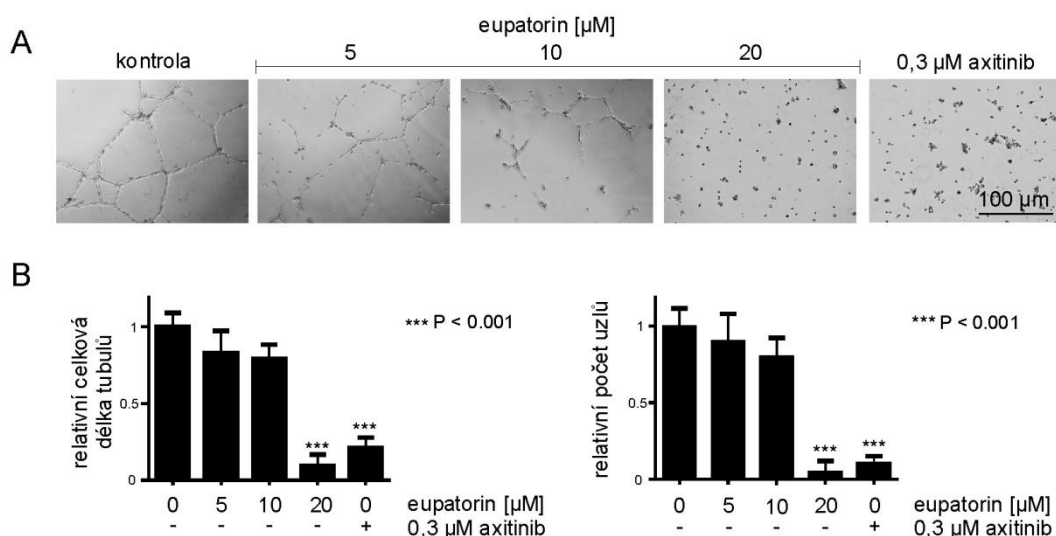


Obrázek 6: (A) Imunofluorescenčního značení α -tubulinu v buňkách HeLa kultivovaných s eupatorinem na 24 h. (B) Imunofluorescenční značení α -tubulinu (dělicí vřeténka), resp. γ -tubulinu (centrosomy) v buňkách HeLa kultivovaných s eupatorinem 24 h. DNA byla značena DAPI. Červené šipky označují separované centrosomy.

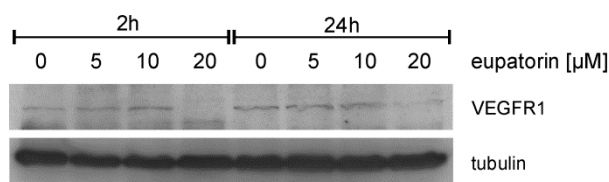
Silná inhibice VEGFR1 eupatorinem *in vitro* a také fakt, že řada flavonoidů i extrakty z *O. stamineus* negativně ovlivňují proces angiogeneze, nás inspiroval ke studiu anti-angiogenních vlastností eupatorinu. Jako *in vitro* model angiogeneze jsme použili endoteliální buňky HUVEC a sledovali jejich schopnost migrovat a tvořit tubuly v přítomnosti flavonu. Eupatorin potvrdil schopnost oba tyto procesy významně inhibovat (**Obrázek 7 a 8**). Redukce intracelulární hladiny VEGFR1 byla kromě *in vitro* testů s purifikovaným enzymem prokázána i v buněčných lyzátech pomocí imunodetekce (**Obrázek 9**). Vzhledem ke strukturní podobnosti VEGF receptorů (Neufeld et al., 1999) a také nespecifickému inhibičnímu potenciálu eupatorinu lze očekávat i inhibici VEGFR2 a VEGFR3, kterou jsme ovšem neprokazovali. Inhibice VEGF receptorů je tedy pravděpodobně mechanismem anti-angiogenních účinků eupatorinu.



Obrázek 7: Schopnost endoteliálních buněk HUVEC migrovat do vytvořené rýhy po ovlivnění eupatorinem na 20 h. (A) Obrazová analýza, (B) kvantifikace. Médium bez růstových faktorů bylo použito jako pozitivní kontrola.



Obrázek 8: Schopnost endoteliálních buněk HUVEC tvořit tubuly *in vitro* po inkubaci s eupatorinem na 20 h. (A) Obrazová analýza, (B) kvantifikace. Axitinib byl použit jako pozitivní kontrola.



Obrázek 9: Imunodetekce VEGFR1 v endoteliálních buňkách HUVEC po ovlivnění eupatorinem na 2 a 24 h.

5. Závěr

Ačkoliv zde zkoumané látky mají zajímavé účinky *in vitro*, teprve po provedení *in vivo* testů bude možné posoudit jejich potenciál jako protinádorová léčiva. V případě eupatorinu bude pravděpodobně klíčová jeho farmakokinetika a farmakodynamika, protože je obecně známým faktem špatná biologická dostupnost flavonoidů i jejich rychlá metabolizace a exkrece z těla. Snížená selektivita 6-guanidinopurinů zase znesnadňuje charakterizaci mechanismu účinků těchto látek, na druhou stranu však představuje dobrý počáteční bod pro vývoj nových inhibitorů zaměřených na různé další proteinkinasové cíle.

6. Literatura

- Adam Y, Somchit MN, Sulaiman MR, Nasaruddin AA, Zuraini A, Bustamam AA, Zakaria ZA (2009) Diuretic properties of *Orthosiphon stamineus* Benth. *J Ethnopharmacol* 124: 154–8.
- Akowuah GA, Zhari I, Norhayati I, Sadikun A, Khamsah SM (2004) Sinensetin, eupatorin, 3'-hydroxy-5, 6, 7, 4'-tetramethoxyflavone and rosmarinic acid contents and antioxidative effect of *Orthosiphon stamineus* from Malaysia. *Food Chem* 87: 559-566.
- Androutsopoulos V, Arroo RR, Hall JF, Surichan S, Potter GA (2008) Antiproliferative and cytostatic effects of the natural product eupatorin on MDA-MB-468 human breast cancer cells due to CYP1-mediated metabolism. *Breast Cancer Res* 10: R39.
- Berlinck RG, Kossuga MH (2005) Natural guanidine derivatives. *Nat Prod Rep* 22: 516-550.
- Bettayeb K, Oumata N, Echalié A, Ferandin Y, Endicott JA, Galons H, Meijer L (2008) CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Oncogene* 27: 5797-5807.
- Beutler JA, Hamel E, Vlietinck AJ, Haemers A, Rajan P, Roitman JN, Cardellina JH, Boyd MR (1998) Structure-activity requirements for flavone cytotoxicity and binding to tubulin. *J Med Chem* 41: 2333-2338.
- Chang YT, Gray NS, Rosania GR, Sutherlin DP, Kwon S, Norman TC, Sarohia R, Leost M, Meijer L, Schultz PG (1999) Synthesis and application of functionally diverse 2,6,9-trisubstituted purine libraries as CDK inhibitors. *Chem Biol* 6: 361-375.
- Chun OK, Chung SJ, Song WO (2007) Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults. *J Nutr* 137: 1244-52.
- Chung JY, Park JO, Phyu H, Dong Z, Yang CS (2001) Mechanisms of inhibition of the Ras-MAP kinase signaling pathway in 30.7b Ras 12 cells by tea polyphenols (-)-epigallocatechin-3-gallate and theaflavin-3,3'-digallate. *FASEB J* 15: 2022-4.
- Csapi B, Hajdú Z, Zupkó I, Berényi A, Forgo P, Szabó P, Hohmann J. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea arenaria*. *Phytother Res.* 2010 24: 1664-9.
- Dobberstein RH, Tin-wa M, Fong HH, Crane FA, Farnsworth NR (1977) Flavonoid constituents from *Eupatorium altissimum* L. (Compositae). *J Pharm Sci* 66: 600-2.
- Erhart LM, Lankat-Buttgereit B, Schmidt H, Wenzel U, Daniel H, Göke R (2005) Flavone initiates a hierarchical activation of the caspase-cascade in colon cancer cells. *Apoptosis* 10: 611-7.
- Havlicek L, Hanus J, Vesely J, LeClerc S, Meijer L, Shaw G, Strnad M (1997) Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *J Med Chem* 40: 408-412.
- Jorda R, Havlicek L, Mcnae IW, Walkinshaw MD, Voller J, Sturc A, Navratilova J, Kuzma M, Mistrik M, Bartek J, Strnad M, Krystof V (2011) Pyrazolo[4,3-d]pyrimidine Bioisostere of Roscovitine: Evaluation of a Novel Selective Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases with Antiproliferative Activity. *J Med Chem* 54: 2980-2993.
- Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M (1999) Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Biosci Biotechnol Biochem* 63: 896-9.
- Krystof V, McNaie IW, Walkinshaw MD, Fischer PM, Muller P, Vojtesek B, Orsag M, Havlicek L, Strnad M (2005) Antiproliferative activity of olomoucine II, a novel 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cell Mol Life Sci* 62: 1763-1771.
- Loon YH, Wong JW, Yap SP, Yuen KH (2005) Determination of flavonoids from *Orthosiphon stamineus* in plasma using a simple HPLC method with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 816: 161–166.
- Meijer L, Borgne A, Mulner O, Chong JP, Blow JJ, Inagaki N, Inagaki M, Delcros JG, Moulinoux JP (1997) Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem* 243: 527-536.

- Mojzis J, Varinska L, Mojzisova G, Kostova I, Mirossay L (2008) Antiangiogenic effects of flavonoids and chalcones. *Pharmacol Res* 57: 259-265.
- Nagao T, Abe F, Kinjo J, Okabe H (2002) Antiproliferative constituents in plants 10. Flavones from the leaves of *Lantana montevidensis* Briq. and consideration of structure-activity relationship. *Biol Pharm Bull* 25: 875-879.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13: 9-22.
- Roninson IB, Broude EV, Chang BD (2001) If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat* 4: 303-313.
- Salmela AL, Pouwels J, Kukkonen-Macchi A, Waris S, Toivonen P, Jaakkola K, Maki-Jouppila J, Kallio L, Kallio MJ (2012) The flavonoid eupatorin inactivates the mitotic checkpoint leading to polyploidy and apoptosis. *Exp Cell Res* 318: 578-92.
- Schinella GR, Giner RM, Recio MC, Mordujovich de Buschiazso P, Ríos JL, Máñez S (1998) Anti-inflammatory effects of South American *Tanacetum vulgare*. *J Pharm Pharmacol* 50: 1069-74.
- Siddiqui IA, Adhami VM, Afaq F, Ahmad N, Mukhtar H (2004) Modulation of phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B- and mitogen-activated protein kinase-pathways by tea polyphenols in human prostate cancer cells. *J Cell Biochem* 91: 232-42.
- Teillet F, Boumendjel A, Boutonnat J, Ronot X (2008) Flavonoids as RTK inhibitors and potential anticancer agents. *Med Res Rev* 28: 715-745.
- Tezuka Y, Stampoulis P, Banskota AH, Awale S, Tran KQ, Saiki I, Kadota S (2000) Constituents of the Vietnamese medicinal plant *Orthosiphon stamineus*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 48: 1711-1719.
- Tran K (1990) *Medicinal Plants in Viet Nam*. Science and Technology Publishing House, Hanoi.
- Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H (2000) Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 60: 3823-31.
- Yam MF, Basir R, Asmawi MZ, Ismail Z (2007) Antioxidant and hepatoprotective effects of *Orthosiphon stamineus* Benth. standardized extract. *Am J Chin Med* 35: 115-126.
- Yam MF, Asmawi MZ, Basir R (2008) An investigation of the anti-inflammatory and analgesic effects of *Orthosiphon stamineus* leaf extract. *J Med Food* 11: 362-8.
- Yam MF, Ang LF, Basir R, Salman IM, Ameer OZ, Asmawi MZ (2009) Evaluation of the anti-pyretic potential of *Orthosiphon stamineus* Benth standardized extract. *Inflammopharmacology* 17: 50-4.
- Yam MF, Lim V, Salman IM, Ameer OZ, Ang LF, Rosidah N, Abdulkarim MF, Abdullah GZ, Basir R, Sadikun A, Asmawi MZ (2010) HPLC and anti-inflammatory studies of the flavonoid rich chloroform extract fraction of *Orthosiphon stamineus* leaves. *Molecules* 15: 4452-4466.
- Zhai S, Senderowicz AM, Sausville EA, Figg WD (2002) Flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in clinical development. *Ann Pharmacother* 36: 905-11.

7. Přehled publikační činnosti

Publikace:

Dolečková, I., Česnek, M., Dračinský, M., Brynda, J., Voller, J., Janeba, Z., Kryštof, V., Synthesis and biological evaluation of guanidino analogues of roscovitine, *European Journal of Medicinal Chemistry* 62C, 443-452, 2013.

Dolečková, I., Rárová, L., Grúz, J., Vondrusová, M., Strnad, M., Kryštof, V., Antiproliferative and antiangiogenic effects of flavone eupatorin, an active constituent of chloroform extract of *Orthosiphon stamineus* leaves, *Fitoterapia* 83, 1000-7, 2012.

Węsierska-Gadek, J., Walzi, E, **Dolečková, I.**, Schmidt, G., Oncogenes do not Fully Override Cell-intrinsic Traits: Pronounced Impact of the Cellular Programme, *Cancer Microenvironment* 2, 215-225, 2009.

Účast na konferencích a odborných seminářích:

- | | |
|-------------------------|---|
| 2011 | Trends in natural products research a PSE young scientists' meeting, Kolymbari, Kréta, poster |
| 2011 | Nová léčiva závažných lidských onemocnění, Kouty nad Desnou, ČR, ústní sdělení |
| 2011 | The Student Scientific Conference on Cancer Research, Brno, ČR, poster |
| 2011 | Cell Cycle Regulators/Inhibitors and Cancer, Vídeň, Rakousko, poster |
| 2010 | 22 nd EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Berlín, Německo |
| 2009, 2010, 2011 | Odborný seminář katedry biochemie, ústní sdělení |
| 2009, 2010 | Seminář záměru MŠM 6198959216, ústní sdělení |

Úspěchy v soutěžích

- | | |
|-------------|---|
| 2012 | 1. místo, studentská vědecká soutěž o cenu děkana, kategorie Chemie, doktorandská sekce, Univerzita Palackého v Olomouci, Antiproliferative and antiangiogenic effects of flavone eupatorin from <i>Orthosiphon stamineus</i> . |
|-------------|---|