

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Katedra organické chemie



**Identifikácia kinázových inhibítorov pomocou
hmotnostnej spektrometrie**

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Autor:	Bc. Andrea Danišková
Vedúci práce:	Mgr. Lenka Hrubá
Študijný program:	B 1407 Chémia
Študijný odbor:	Bioorganická chémia a chemická biológia
Forma štúdia:	Prezenčná
Rok:	2022

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Bc. Andrea Danišková
Názov práce	Identifikácia kinázových inhibítorov pomocou hmotnostnej spektrometrie
Typ práce	Diplomová
Katedra	Katedra organickej chémie Ústav molekulárnej a translačnej medicíny
Vedúci práce	Mgr. Lenka Hrubá
Rok obhajoby práce	2022

Abstrakt

Diplomová práca je zameraná na optimalizáciu assay-e pre MARK 1–3 enzýmy na základe optimalizovanej assay-e pre MARK4 enzým. Metodika pozostávala z priamej detekcie enzymatickej aktivity pomocou hmotnostného spektrometra MALDI-TOF. MARK assay bola aplikovaná na 16 potenciálnych inhibítorov nukleozidovej povahy, u ktorých boli vyhodnotené farmakokinetické vlastnosti a zhotovený tzv. „BOILED EGG“ diagram prostredníctvom programu SwissADME.

Kľúčové slová	MARK kinázy, MALDI-TOF MS, Alzheimerova choroba, hyperfosforylácia, tau proteín, Ser ²⁶² , SwissADME, BOILED-EGG
Počet strán	78
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Author	Bc. Andrea Daniskova
Title	Identification of kinase inhibitors using mass spectrometry
Type of thesis	Master
Department	Department of Organic chemistry The Institute of Molecular and Translational Medicine
Supervisor	Mgr. Lenka Hrubá
The year of presentation	2022

Abstract

The thesis focuses on the optimization of the assay for MARK 1–3 enzymes, based on the optimized assay for MARK4 enzyme. The methodology consisted of direct detection of enzyme activity using a MALDI-TOF mass spectrometer. The MARK assay was applied to 16 potential inhibitors with a nucleoside skeleton, for which the pharmacokinetic properties were evaluated, and a so-called "BOILED EGG" diagram was produced by SwissADME.

Keywords	MARK kinases, MALDI-TOF MS, Alzheimer' disease, hyperphosphorylation, tau protein, Ser ²⁶² , SwissADME, BOILED-EGG
Number of pages	78
Language	Slovak

Prehlásenie

Prehlasujem, že som diplomovú prácu „*Identifikácia kinázových inhibítorov pomocou hmotnostnej spektrometrie*“ vypracovala samostatne pod vedením Mgr. Lenky Hrubej, s použitím odbornej literatúry a ďalších zdrojov, ktoré sú uvedené v zozname použitej literatúry.

V Olomouci dňa

.....

Bc. Andrea Danišková

Pod'akovanie

Predovšetkým by som chcela poďakovať vedúcej mojej diplomovej práce Mgr. Lenke Hrubej za odborné vedenie, neustály prísun nových informácií, cenné rady, trpezlivosť a pomoc, ako pri práci v laboratóriu, tak pri spracovaní záverečnej práce.

Osobitné poďakovanie patrí mojej rodine a priateľovi za nekonečnú podporu počas štúdia.

Obsah

Zoznam skratiek	9
Úvod	11
Teoretická časť	13
1 Enzýmy ako biologické katalyzátory	13
1.1 Enzymatická katalýza	13
1.2 Klasifikácia enzýmov	14
1.3 Molekulárna štruktúra enzýmov	16
1.3.1 Primárna štruktúra	16
1.3.2 Sekundárna štruktúra	16
1.3.3 Terciárna štruktúra	17
1.3.4 Kvartérna štruktúra	17
1.3.5 Predikcia štruktúry proteínov	18
1.3.6 Kofaktory enzýmov	18
1.4 Katalýza	19
1.4.1 Mechanizmus enzymatickej katalýzy	20
1.4.2 Vplyv prostredia na funkciu enzýmov	21
1.4.3 Regulácia enzymatickej aktivity	23
1.4.4 Alosterická regulácia	24
1.5 Enzýmová kinetika	24
1.5.1 Kinetika ustáleného stavu	24
1.5.2 Kinetika prechodného stavu	26
1.5.3 Kinetika rýchlych rovnováh	26
2 Kinázy	26
2.1.1 Fosforylácia	26
2.1.2 Cyklín-dependentné kinázy	28
2.1.3 Inhibícia CDK4/6 pri nádorových ochoreniach	30

2.2	MARK enzýmy	31
2.2.1	MARK4	33
2.3	Inhibítory MARK enzýmov	34
2.4	Transport liečiv cez hematoencefalickú bariéru	36
2.5	Bunkový cyklus	39
2.6	Kontrola bunkového cyklu	39
Experimentálna časť		42
3	Materiál a metódy	42
3.1	Biologický materiál	42
3.2	Chemikálie	42
3.3	Roztoky a ich príprava	43
3.4	Prístroje a zariadenia	43
3.5	Softvéry	44
3.6	Experimentálne a vyhodnocovacie postupy	44
3.6.1	MALDI-TOF MS assay	44
3.6.2	ECHO [®] 550	45
3.6.3	Optimalizácia assay-e	45
3.6.4	Koncentrácia enzýmov MARK 1–3	45
3.6.5	Koncentrácia ATP, teplota, pH	46
3.6.6	Analýza dát	46
3.6.7	Screening látok	47
3.6.8	Analýza farmakokinetických parametrov	47
3.6.9	Vývoj metodiky pre CDK4/6	48
4	Výsledky	49
4.1	MARK assay	49
4.2	Optimalizácia koncentrácie enzýmov MARK 1–3	50
4.3	Optimalizácia koncentrácie ATP	52
4.4	Optimalizácia teploty reakcie	52
4.5	Optimalizácia pH reakcie	54

4.6	Inhibícia enzýmovej aktivity	54
4.7	Screening látok knižnice UMTM.....	55
4.8	Analýza farmakokinetických parametrov látok	56
4.9	Metodika pre CDK4/CycD3.....	58
5	Diskusia.....	61
6	Záver	67
Zoznam obrázkov		68
Zoznam grafov.....		69
Referencie.....		70
Prílohy.....		76

Zoznam skratiek

4-HCCA	α -kyano-4-hydroxyškoricová kyselina, z angl. <i>α-cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>
ABC transportér	ATP-viažuce kazetové transportéry, z angl. <i>ATP-binding cassette</i>
ACN	acetonitril
AD	Alzheimerova choroba, z angl. <i>Alzheimer' disease</i>
AMPK	adenozín-monofosfátom aktivované proteínkinázy
ATP	adenozíntrifosfát
BBB	hematoencefalická bariéra, z angl. <i>blood brain barrier</i>
CAK	CDK aktivačná kináza
CAMK	kalcium/kalmodulín-dependentná proteínkináza
CDK	cyklín-dependentné kinázy
CIP/KIP	z angl. <i>CDK interacting protein / kinase inhibitory protein</i>
CKI	inhibítory CDK
CNS	centrálny nervový systém
dsDNA	dvojvláknová DNA, z angl. <i>double-stranded DNA</i>
DTT	ditiotreitol
E2F	transkripčný faktor
E_A	aktivačná energia
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EC₅₀	oblasť polovičnej aktivity enzýmu
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
„en zume“	„vnútri kvasiniek“
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GMP-AMP	guanozínmonofosfát-adenozínmonofosfát
HBA	akceptor vodíkovej väzby, z angl. <i>hydrogen bond acceptor</i>
HBD	donor vodíkovej väzby, z angl. <i>hydrogen bond donor</i>
HEPES	kyselina 2-[4-(2-hydroxyetyl)piperazín-1-yl]etánsulfónová, z angl. <i>(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)</i>
HTS	z angl. <i>high-throughput screening</i>
IC₅₀	polovica maximálnej inhibičnej koncentrácie

IUBMB	<i>International Union for Biochemistry and Molecular Biology</i>
K, K_A	rovnovážna konštanta, kyslá disociačná konštanta,
K_{cat}	katalytická konštanta enzýmovej reakcie
K_m	Michaelisova konštanta
komplex ES, EI, ESI	komplex enzým-substrát; enzým-inhibítor; enzým-substrát-inhibítor
MAP	s mikrotubulmi asociované proteíny, z angl. <i>microtubule-associated proteins</i>
MARK	s mikrotubulmi-asociované proteín kinázy, z angl. <i>microtubule-associated protein kinases</i>
MARKK	MARK aktivačná kináza
MM rovnica	Michaelis-Menten rovnica
MT	mikrotubuly
NAD	nikotínamid adenín dinukleotid
NADP	nikotínamid adenín dinukleotidfosfát
ND	neurodegeneratívne ochorenie, z angl. <i>neurodegenerative disease</i>
pan-CDK	CDK prvej generácie
PD, PK	farmakodynamika, farmakokinetika, z angl. <i>pharmacodynamics, pharmacokinetics</i>
PD-1	proteín 1 programovanej smrti, z angl. <i>programed cell death 1</i>
PDB	proteínová databanka, z angl. <i>protein databank</i>
PTM	posttranslačné modifikácie
RAD51	DNA opravný proteín
Rb, Rb1	retinoblastómový proteín
RNA	ribonukleová kyselina
STK11	serín/treonínové proteínkináza 11
STS	staurosporín
TAO	tisíc a jedna aminokyselina, z angl. <i>thousand-and-one aminoacid</i>
TFA	kyselina trifluóroctová, z angl. <i>trifluoroacetic acid</i>
T_{reg}	regulačné T bunky, z angl. <i>regulatory T cells</i>
UBA	doména spojená s ubikvitínom
ÚOCHB	Ústav organické chemie a chemické biochemie AV ČR
α-M	α-mangostín

Úvod

Kinázy sú v súčasnom farmakologickom výskume intenzívne študovanou triedou liečiv, čo dokazuje veľký počet kinázových inhibítorov, ktoré sú hodnotené v klinických štúdiách. Práve terapie zameriavajúce sa na kinázy majú potenciál v liečbe širokého spektra indikácií, vrátane porúch centrálného nervového systému (CNS). Okrem mnohých premenných, ktoré prispievajú ku identifikácii úspešnej terapeutickej molekuly, je pri objavovaní liečiv určených na poruchy súvisiace s CNS žiaduce zváženie prístupu látky k cieľovému orgánu a špecifický prechod cez hematoencefalickú bariéru (BBB). V súčasnosti je známy len malý počet inhibítorov kináz, ktoré sú špecificky navrhnuté tak, aby boli priepustné pre BBB.^{1,2} Donepezil a rivastigmínartrát sú inhibítormi acetylcholinesterázy a používajú sa na liečbu symptomatických pacientov s miernou až stredne ťažkou formou Alzheimerovej demencie. Tieto látky boli tiež identifikované ako inhibítory MARK4.³

Neurodegeneratívne ochorenia (ND) predstavujú pre ľudské zdravie v súčasnosti vážny problém. V súčasnosti žije na celom svete viac ako 55 miliónov ľudí s demenciou a každý rok pribudne takmer 10 miliónov nových prípadov. Demencia vzniká v dôsledku rôznych chorôb a zranení, ktoré primárne alebo sekundárne postihujú mozog. Alzheimerova choroba (AD) je považovaná za najbežnejšie sa vyskytujúcu formu demencie a môže prispieť k 60–70 % prípadov. Demencia je v súčasnosti siedmou najčastejšou príčinou smrti medzi všetkými chorobami a jednou z hlavných príčin invalidity a závislosti medzi staršími ľuďmi na celom svete.⁴

Alzheimerova choroba je komplexná, a preto je nepravdepodobné, že by ju nejaký liek alebo iná intervencia úspešne vyliečila u všetkých ľudí, ktorí s touto chorobou žijú. Napriek tomu urobili vedci v posledných rokoch obrovský pokrok v lepšom porozumení AD a vo vývoji a testovaní nových liečebných postupov, vrátane niekoľkých liekov, ktoré sú v poslednom štádiu klinických skúšok.⁵

Syndróm AD je výsledkom dysfunkcie a smrti neurónov v špecifických oblastiach, ktoré zodpovedajú za pamäť a kogníciu. Charakteristika neuropatológie AD zahŕňa akumuláciu intracelulárnych a extracelulárnych proteínových agregátov. Abnormálne fosforylovaný tau proteín sa zhromažďuje do špirálových vlákien, ktoré ďalej agregujú a vytvárajú neurofibrilárne kľbká. Druhým patologickým znakom je extracelulárne ukladanie zoskupení β -amyloidu, ktoré tvoria difúzne a neuritické senilné plaky.⁶

MAP / s mikrotubulmi-asociované proteín kinázy (MARK) boli identifikované ako potenciálne biologické ciele liečiv pre AD kvôli úlohe, ktorú zohrávajú pri patologickej hyperfosforylácii proteínu tau.⁷ Dráhy MAP kináz sú spojené so základnými procesmi ako je synaptická plasticita, učenie a pamäť, ktorých narušenie je častým znakom neurodegeneratívnych patológií. Upregulácia MAP kináz zvyšuje ukladanie β -amyloidu, nadmernú fosforyláciu tau a zhoršenie pamäti.⁸ Mnoho fosforylačných miest tau proteínu bolo identifikovaných, avšak fosforylácia na Ser²⁶², ktorú nájdeme v skorých štádiách AD, zohráva kritickú úlohu v jeho hyperfosforylácii. Bolo dokázané, že Ser²⁶² je fosforylovaný MARK4 enzýmom, ktorý je v súčasnosti v plnej miere študovaným cieľom pre liečbu AD a ďalších ND.⁷

Teoretická časť

1 Enzýmy ako biologické katalyzátory

Enzýmy predstavujú zložité bielkovinové molekuly, často nazývané biokatalyzátory, produkované živými bunkami. Enzýmy sú nevyhnutnou súčasťou všetkých živých organizmov, v ktorých urýchľujú biochemické reakcie. Sú vysoko špecifické pri reakciách, ktoré katalyzujú a zároveň pri výbere reaktantov, známych ako substráty. Enzým zvyčajne katalyzuje jednu chemickú reakciu alebo skupinu úzko súvisiacich reakcií, ktoré spočívajú v tvorbe a rozpade kovalentných väzieb.^{9,10,11}

Termín „enzým“ prvýkrát použil nemecký fyziológ Wilhelm Kühne v roku 1877, kedy popisoval schopnosť kvasiniek produkovať alkohol z cukrov. Slovo enzým pochádza z gréckej terminológie, a v preklade znamená „vnútri kvasiniek“ (*en zyme*).⁹

Na prelome 19. a 20. storočia došlo ku výraznému pokroku v extrakcii, charakterizácii a využití mnohých enzýmov. V 20. rokoch 20. storočia bola prevedená kryštalizácia enzýmov, ktorá odhalila spojitosť medzi katalytickou aktivitou a molekulami proteínov. Po dobu nasledujúcich 60 rokov sa verilo, že enzýmy sú proteíny, pričom až v 80. rokoch sa zistilo, že niektoré molekuly ribonukleovej kyseliny (RNA) vykazujú taktiež katalytické účinky. Takéto molekuly sú označované ako ribozýmy a zohrávajú dôležitú úlohu pri génovej expresii.^{9,12,13}

1.1 Enzymatická katalýza

Všetky živé organizmy sú budované a udržiavané enzýmami, ktoré disponujú schopnosťou premieňať špecifické zlúčeniny na produkty pri vyšších reakčných rýchlostiach. Enzýmy fungujú rovnako ako chemické katalyzátory, zvyšujú reakčnú rýchlosť a znižujú aktivačnú energiu (E_A) reakcie.^{10,14,15} Tým dochádza ku rýchlejšej tvorbe produktov a ustáleniu rovnovážneho stavu, čo však platí len u chemických reakcií. Chemické reakcie prebiehajú v uzatvorenom priestore, čo znamená že po určitej dobe nastáva rovnovážny stav, ktorý sa nezmení, pokiaľ sa systém nenaruší vonkajším faktorom. Naopak reakcie prebiehajúce v živých systémoch nedosahujú tento stav, ale udržiavajú organizmus v rovnováhe. V tomto prípade hovoríme o otvorenom systéme, u ktorého dochádza ku neustálemu prísunu a úbytku hmoty a energie. Konštantný stav

vnútorného prostredia, homeostáza, pretrváva v živom organizme dovtedy, kým nenastane smrť, čím dôjde k ustáleniu rovnovážneho stavu.¹⁶

Rýchlosť väčšiny reakcií katalyzovaných enzýmami je miliónkrát vyššia ako rýchlosť reakcií nekatalyzovaných. Takéto reakcie prebiehajú rádovo v minútach, či dokonca sekundách, zatiaľ čo reakcie bez využitia enzýmov môžu trvať až stovky rokov. Pri absencii enzymatickej katalýzy je väčšina biochemických reakcií príliš pomalá na to, aby prebiehala za fyziologických podmienok.^{10,14,15}

1.2 Klasifikácia enzýmov

V súčasnosti sa využíva klasifikačný systém zavedený Medzinárodnou Komisiou pre enzýmy (*International Commission on Enzymes, Enzyme Commission, EC*), ktorá bola založená v roku 1955 v Bruseli Medzinárodnou Úniou pre Biochémiu a Molekulárnu Biológiu (*International Union for Biochemistry and Molecular Biology, IUBMB*).¹⁷ Cieľom bolo systematicky klasifikovať a pomenovať enzýmy a koenzýmy, ich jednotky aktivity a štandardné metódy stanovenia, spolu so symbolmi využitými v popise kinetiky enzýmov.¹⁸

Enzýmy sú rozdelené do siedmych kategórií podľa reakcie, ktorú katalyzujú:

Oxidoreduktázy sú enzýmy, ktoré katalyzujú výmenu elektrónov medzi molekulou donora a akceptoru pri reakciách zahŕňajúcich prenos elektrónov, extrakciu protónu/vodíka, hydridový prenos, inzerciu kyslíka, či iné dôležité kroky. Svojimi vlastnosťami sú všadeprítomné a katalyzujú širokú škálu chemických reakcií s vysokou špecifitou, účinnosťou a selektivitou. Väčšinu oxidoreduktáz tvoria enzýmy závislé na nikotínamide, s vysokou preferenciou ku nikotínamid adenín dinukleotidu (NAD) alebo nikotínamid adenín dinukleotid fosfátu (NADP).¹⁹

Transferázy sú triedou enzýmov, ktoré prenášajú špecifické funkčné skupiny z donora, ktorým je často koenzým, na akceptor. Sú zapojené do stoviek rôznych biochemických dráh, zúčastňujú sa na nespočetnom množstve bunkových reakcií a sú nevyhnutné pre niektoré z najdôležitejších procesov ako je aj translácia.^{20,21} Medzi transferázy možno zaradiť napr. metyltransferázy, teda enzýmy prenášajúce jednoduchú skupinu; ďalej aminotransferázy, ktoré zodpovedajú za prenos dusíkatej skupiny. Širokú skupinu transferáz tvoria fosfotransferázy, enzýmy zodpovedné za katalýzu fosforylačných reakcií. Prenášajú skupiny obsahujúce fosfor, kde akceptorom môže byť alkohol, karboxyl, dusíkatá skupina, fosfátová skupina a ďalšie.²²

Hydrolázy tvoria zložitý súbor enzýmov, ktoré katalyzujú hydrolytické štiepenie väzieb uhlík-uhlík, uhlík-kyslík, uhlík-dusík, a niektorých ďalších väzieb, vrátane fosfoanhydridovej väzby, reakciou s vodou. Sú nevyhnutné pre štiepenie väčších molekúl na menšie jednotky. Ako príklad možno uviesť proteázy, ktoré hydrolyzujú proteíny na menšie peptidy a následne na aminokyseliny; lipázy, ktoré hydrolyzujú lipidy na glycerol a mastné kyseliny. Z dôvodu potreby odbúravania širokého spektra živín majú hydrolázy zvyčajne širokú substrátovú špecificitu.^{20,21,23}

Lyázy predstavujú skupinu enzýmov, ktoré katalyticky štiepia väzby uhlík-uhlík, uhlík-kyslík, uhlík-dusík prostredníctvom eliminačnej reakcie, pričom nedochádza ku hydrolytickému štiepeniu ani ku oxidácii. Táto reakcia často vedie ku vzniku násobných väzieb alebo tvorbe cyklickej zlúčeniny. Lyázy sa líšia od ostatných tried enzýmov, a to reakciou v jednom smere, kde je potrebný len jeden substrát za vzniku dvoch produktov. Naopak pre reverznú reakciu sú potrebné dva substráty. Lyázy možno bežne pozorovať pri reakciách citrátového cyklu a pri glykolýze.^{20,21}

Izomerázy sú enzýmy zodpovedné za prevedenie molekuly z jedného izoméru na druhý. Molekula má rovnaký sumárny vzorec, avšak odlišnú priestorovú štruktúru. Rôzne typy izomeráz majú rôzne spôsoby pôsobenia, ktoré zahŕňajú najmä expanziu, či kontrakciu cyklických zlúčenín prostredníctvom tautomerov, epimerizáciu, intramolekulárny prenos alebo intramolekulárnu oxidačno-redukčnú reakciu.²⁴

Ligázy, tiež syntetázy, katalyzujú syntézu dvoch molekulárnych substrátov za vzniku novej chemickej väzby. Reakcia je spojená s hydrolýzou energeticky bohatej fosfátovej väzby adenosíntrifosfátu (ATP) alebo iného trifosfátu.^{20,21}

Translokázy predstavujú všeobecný pojem pre proteíny, ktorých úlohou je transport inej molekuly z jednej strany na druhú, zvyčajne cez bunkovú membránu. Táto skupina enzýmov katalyzuje pohyb iónov alebo molekúl cez membrány, či ich separáciu v membránach. Sú najbežnejším sekrečným systémom u gram-pozitívnych baktérií a hrajú dôležitú úlohu v biologických procesoch. Rôzne transportné enzýmy hrajú v organizmoch rôzne funkcie, čím udržiavajú stabilitu vnútorného prostredia, čo je nevyhnutné pre správne fungovanie organizmu.²⁰

1.3 Molekulárna štruktúra enzýmov

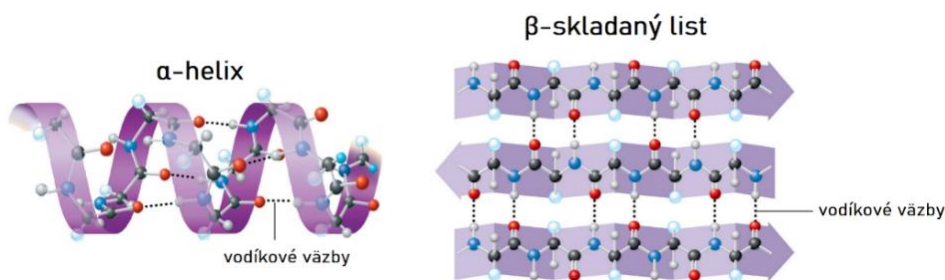
Štruktúra proteínov je riadená vzájomnou interakciou vedľajších reťazcov aminokyselín s ich okolím. Proteíny majú primárnu štruktúru, lineárne poradie aminokyselín; sekundárnu štruktúru, skladanie alebo stáčanie aminokyselín pomocou vodíkovej väzby; terciárnu štruktúru, kedy sa špirály alebo listy skladajú do trojrozmernej štruktúry. Až trojrozmerná štruktúra enzýmov určuje ich funkciu a zodpovedá za ich aktivitu. Kvartérnu štruktúrou disponujú len niektoré zložité enzýmy, kde vznikajú komplexy zložené z polypeptidových reťazcov^{25,26}

1.3.1 Primárna štruktúra

Enzýmy sú molekuly proteínovej povahy tvorené reťazcom aminokyselín. V ľudskom tele sa bežne vyskytuje 23 rôznych aminokyselín, ktoré podliehajú kondenzácii a tvoria tak polypeptidový reťazec. Prvá aminokyselina poskytuje do reakcie α -karboxylovú skupinu, druhá aminokyselina poskytuje α -aminoskupinu, čím za odstúpenia vody vzniká peptidová väzba. Začiatok polypeptidového reťazca je označovaný ako N-koniec kvôli voľnej α -aminoskupine, zatiaľ čo na konci reťazca nájdeme voľnú α -karboxylovú skupinu, a teda hovoríme o C-konci. Aj napriek obmedzenému počtu aminokyselinových monomérov neexistuje nijaké obmedzenie v poradí jednotlivých aminokyselín a je možné ich usporiadať rôznymi spôsobmi, pomocou ktorých možno meniť trojrozmernú štruktúru a samotnú funkciu enzýmov.^{22,26}

1.3.2 Sekundárna štruktúra

Štruktúra sekundárneho enzýmu závisí od lokálnych interakcií medzi časťami polypeptidového reťazca, ktoré silno ovplyvňujú skladanie proteínu do trojrozmerného tvaru. Najčastejšie sa vyskytujú α -hélix a β -skladaný list (obr. 1), ako typ sekundárnej interakcie. α -hélix je typ skrútkovice, ktorá je stabilizovaná vodíkovými väzbami vznikajúcimi medzi CO skupinou a NH skupinou, ktorá sa nachádza o 4 aminokyseliny skôr v hélixu. Postranné reťazce smerujú smerom von z hélixu. β -skladaný list tvorí vodíkové väzby rovnako ako α -hélix, teda medzi CO a NH skupinou, avšak nevytvára skrútkovicu pozdĺž osy, ale vyskytuje sa v plne rozvinutej forme. K interakciám dochádza medzi dvoma alebo viacerými polypeptidovými reťazcami umiestnenými vedľa seba, pričom môžu byť umiestnené buď paralelne alebo antiparalelne, tie sa vyskytujú častejšie.^{22,26}



obr. 1- Sekundárna štruktúra enzýmov (prevzaté a upravené)²⁷

1.3.3 Terciárna štruktúra

Terciárna štruktúra odpovedá celkovému usporiadaniu polypeptidového reťazca a vzťahuje sa na celkový trojrozmerný tvar po sekundárnych interakciách. Primárne sú za ňu zodpovedné nekovalentné interakcie medzi postrannými reťazcami jednotlivých aminokyselín, ktoré tvoria polypeptidovú kostru.^{22,26} Nekovalentné interakcie tvoria:

- vodíkové väzby, ktoré vznikajú medzi peptidovými väzbami alebo medzi neutrálnymi a nabitými časťami
- elektrostatické interakcie, ktoré vznikajú medzi dvoma iónmi alebo dvoma permanentnými dipólmi
- Londonove disperzné interakcie, ktoré vznikajú medzi dvoma alifatickými atómami uhlíka
- poschodové interakcie, ktoré vznikajú medzi dvoma aromatickými kruhmi umiestnenými nad sebou
- hydrofóbne interakcie, ktoré vznikajú medzi nepolárnymi molekulami alebo ich časťami²²

Taktiež existuje jeden špeciálny typ kovalentnej väzby, ktorý môže prispieť k terciárnej štruktúre, a tým je disulfidová väzba. Kovalentné väzby medzi postrannými reťazcami cysteínu sú oveľa pevnejšie než iné typy väzieb a udržujú tak časti polypeptidu pevne spojené.²⁸

1.3.4 Kvartérna štruktúra

Kvartérna štruktúra odpovedá niekoľkým proteínovým reťazcom alebo podjednotkám zabaleným do tesného usporiadania. Každá z podjednotiek má svoju primárnu, sekundárnu a terciárnu štruktúru, ktoré sú držané vodíkovými väzbami a van der Waalsovými silami medzi nepolárnymi vedľajšími reťazcami. Tieto podjednotky

musia byť špecificky usporiadané, aby celý enzým správne fungoval. Akákoľvek zmena v štruktúre podjednotiek a ich spojení má za následok výrazné zmeny v ich biologickej aktivite.²⁹

1.3.5 Predikcia štruktúry proteínov

Najpoužívanejšou databázou molekulárnych dát je proteínová databanka (*protein databank*, PDB), ktorá od roku 1971 slúži ako jediné úložisko informácií o 3D štruktúrach makromolekúl ako sú nukleové kyseliny, proteíny a iné komplexné biopolymery.³⁰ Nedeliteľnou súčasťou je softvér PyMOL, ktorý nachádza svoje využitie pri získavaní štruktúr biopolymérov, vzájomných interakcií, grafického zobrazenia a analýze dát.³¹

Štruktúra enzýmov sa ideálne získava kryštalizáciou proteínov alebo, pokiaľ nie je možné získať kryštály enzýmov, molekulárnym modelovaním. Znalosť štruktúry enzýmov je nevyhnutným predpokladom na vytvorenie kvantovo-chemického modelu a poskytuje tak možnosť preskúmať reakčný mechanizmus. Existujú samozrejme prípady, kedy je možné reakčné mechanizmy vyhodnotiť štúdiom jednotlivých krokov bez informácií o samotných štruktúrach.^{32,33}

Dôležitou informáciou je tiež spôsob, akým sa substrát viaže na aktívne miesto. Túto informáciu možno získať pomocou röntgenových kryštálových štruktúr určených v prítomnosti substrátových analógov alebo inhibítorov, prípadne z mutantných štruktúr so skutočnými substrátmi. Touto cestou sa odhaľujú len polohy ťažkých atómov, zatiaľ čo atómy vodíka sa musia do modelu pridávať manuálne.^{33,34}

Štruktúra enzýmu viazaného na ligand je rozhodujúca pre racionálny dizajn enzýmu so zlepšenou substrátovou špecifitou a katalytickou účinnosťou. Akumulované proteínové štruktúry poskytujú značné množstvo informácií o väzbe ligandu na enzým. Avšak enzýmové štruktúry v komplexe s ligandom, ktorým je substrát, kofaktor, produkt alebo inhibítor, nemusia byť vždy dostupné. V určitých prípadoch je nutné získať štruktúru tohto komplexu, čo zaisťuje metóda namáčania ligandu ku kryštálu enzýmu, avšak nie je zaručené, že sa tým štruktúra naozaj získa.³⁴

1.3.6 Kofaktory enzýmov

Hoci sú niektoré enzýmy zložené čisto z bielkovín, väčšina z nich sú komplexné bielkoviny; to znamená, že sú zložené z proteínovej zložky a kofaktoru. Enzýmy, ktoré vyžadujú prítomnosť nebielkovinovej zložky na to, aby boli aktívne, sa nazývajú holoenzýmy. Ak sa kofaktor odstráni, proteín stráca svoju enzymatickú aktivitu a nazýva sa apoenzým.³⁵ Kofaktory, ktoré sú vo všeobecnosti prítomné ako malé organické

zlúčeniny alebo kovové ióny, umožňujú enzýmom fungovať pri maximálnej katalytickej účinnosti alebo odolnosti. Príbuzný pojem, koenzýmy, označuje podskupinu kofaktorov. Často sú to vitamíny alebo deriváty vitamínov.³⁶ Niekedy môžu pôsobiť ako katalyzátory v neprítomnosti enzýmov, ale nie tak efektívne ako v spojení s nimi. Rovnako ako v prípade väzby kov-enzým, existuje celé rozmedzie síl pre koenzým-enzým spojenie, pričom bod rozlíšenia medzi pevne viazaným kofaktorom (prostetická skupina) a voľne viazaným kofaktorom je ľubovoľný. Koenzýmy, ktoré sú prostetickými skupinami, tvoria integrálnu súčasť aktívneho miesta enzýmu a nepodliehajú žiadnym zmenám v dôsledku pôsobenia ako katalyzátory.^{37,38}

1.4 Katalýza

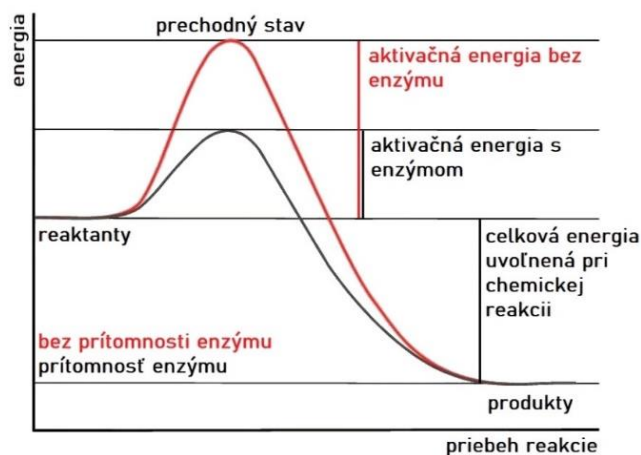
Úlohou katalyzátora je zvýšiť rýchlosť chemickej reakcie. Pokiaľ je rýchlosť riadená rozpustným katalyzátorom, čo môže mať za následok ďalšie zvýšenie rýchlosti chemickej reakcie, prebieha katalýza homogénna. V tomto prípade dochádza ku katalýze v roztoku. Ak je katalyzátor v oddelenej fáze od reaktantov alebo nastáva katalýza na nerozpustnom povrchu, prípadne imobilizovanej matici, prebieha heterogénna katalýza. Biologické katalyzátory majú všeobecne vlastnosti homogénnych katalyzátorov, avšak množstvo enzýmov prítomných v membránach je nerozpustných, a preto sa radia medzi heterogénne.¹¹

Ako katalyzátory sú enzýmy potrebné vo veľmi nízkych koncentráciách. Rovnako ako všetky ostatné katalyzátory, aj enzýmy sa vyznačujú dvoma základnými vlastnosťami. Zvyšujú rýchlosť chemickej reakcie bez toho, aby boli reakciou spotrebované, či pozmenené, a zároveň zvyšujú reakčnú rýchlosť bez zmeny chemickej rovnováhy medzi reaktantami a produktami.^{9,14}

Chemická rovnováha medzi substrátom (S) a produktom (P) je určená zákonmi termodynamiky. Predstavuje ju pomer rýchlosti priamej a spätnej reakcie. V prítomnosti vhodného enzýmu sa premena substrátu na produkt urýchľuje, pričom rovnováha zostáva bezo zmeny. Enzým preto musí zvyšovať rýchlosť priamej a reverznej reakcie rovnako. Rovnováha reakcie je daná konečnými energetickými stavmi substrátu a produktu, ktoré nie sú nijako ovplyvnené enzymatickou katalýzou. Na to, aby mohla reakcia pokračovať je nutný prechod substrátu do stavu s vyššou energiou, čím vzniká prechodný stav.¹⁴

Prechodný stav je vysoko energetický nestabilný stav, ktorému je potrebné dodať určité množstvo aktivačnej energie. Molekula preto vyžaduje aktivačnú energiu, teda minimálnu energiu potrebnú pre prekročenie energetickej bariéry, aby mohla chemická reakcia prebehnúť a prejsť do stabilného stavu.³⁹ Výlučne platí, čím vyššia aktivačná

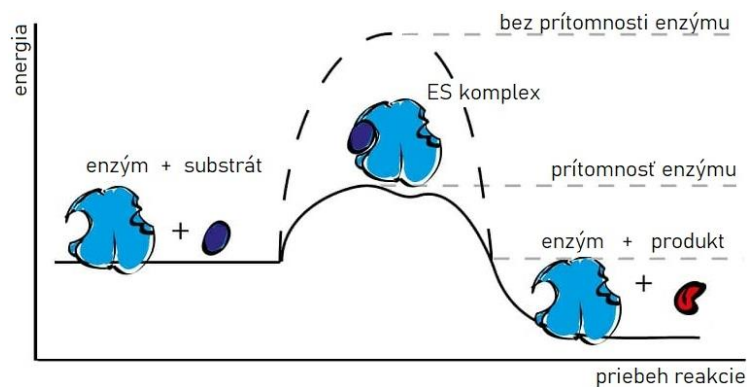
energia je, tým pomalšie bude chemická reakcia prebiehať. Je tomu tak preto, že molekuly sú schopné dokončiť reakciu až po dosiahnutí maxima bariéry aktivačnej energie. Čím vyššie bude maximum, tým menej molekúl bude mať dostatok energie na to, aby ju v danom okamihu prekonal. Práve enzýmy, a ďalšie katalyzátory pôsobia tak, že znižujú aktivačnú energiu, čím zvyšujú rýchlosť reakcie. (obr. 2) ^{14,40}



obr. 2- Aktivačná energia bez prítomnosti enzýmu, v prítomnosti enzýmu (obrázok autor)

1.4.1 Mechanizmus enzymatickej katalýzy

Katalytická aktivita enzýmov je založená na tvorbe väzby enzýmu so substrátom, vzniká komplex enzým-substrát (ES) (obr. 3). Substrát sa viaže na špecifické miesto enzýmu, táto oblasť molekuly sa nazýva aktívne miesto, aktívne centrum, katalytické miesto, či miesto substrátu. ES komplex predstavuje polohu, v ktorej je substrát naviazaný na enzým tak, aby reakcia prebiehala priaznivejšie. V určitom okamihu chemickej reakcie sa substrát prevedie na medziprodukt, prechodný stav, a následne na produkt. Ihneď po skončení reakcie sa molekula produktu disociuje z enzýmu.^{9,14} Rovnako ako všetky katalyzátory, aj enzýmy zostávajú nezmenené po účasti v chemickej reakcii, a preto môžu fungovať opakovane.³⁹



obr. 3- Tvorba ES komplexu (prevzaté a upravené)⁴¹

Väzba substrátu na aktívne miesto enzýmu je veľmi špecifická interakcia. Aktívne centrá majú väzbové a katalytické miesta, pričom substrát sa umiestni do väzbového miesta takým spôsobom, že miesto, ktoré sa bude modifikovať v substráte, sa umiestni presne na katalytické miesto. Substráty sa spoiatku viažu na aktívne miesto nekovalentnými interakciami, vrátane vodíkových väzieb, iónových väzieb a hydrofóbných interakcií.¹⁴ Väzbové a katalytické pôsobenie vyžaduje vysoko špecifickú trojrozmernú konformáciu na úrovni aktívneho miesta, kde reaktívne vedľajšie reťazce aminokyselinových zbytkov, ako sú reťazce cysteínu, glutamátu, aspartátu, lyzínu, arginínu, histidínu, serínu, treonínu, či hydrofóbne zvyšky zohrávajú zásadnú úlohu.^{4,14}

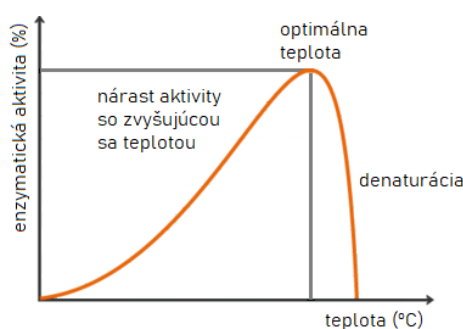
Aktívne miesto je zložené z aminokyselín, ktoré majú danú presnú polohu. Túto priestorovú distribúciu zaisťujú primárne, sekundárne, terciárne a kvartérne štruktúry enzýmu.¹³ Zbytky aminokyselín, ktoré sa podieľajú na vzniku aktívneho miesta, sú niekedy umiestnené vo vzdialených pozíciách a zbiehajú sa do obmedzenej oblasti na základe skladania polypeptidového reťazca. Zloženie aminokyselín v aktívnom centre poskytuje aktívnemu miestu určitú špecifickosť.

1.4.2 Vplyv prostredia na funkciu enzýmov

Enzýmy sú špecifické organické molekuly s vysokou selektivitou. Každý enzým zvyčajne katalyzuje konkrétnu reakciu, čiže selektívne znižuje aktivačnú energiu jednej z niekoľkých chemických reakcií, ktoré môžu jeho viazané molekuly substrátu podstúpiť. Na základe selektivity usmerňujú enzýmy každú z mnohých rôznych molekúl v bunke špecifickými reakčnými cestami. Každý enzým má jedinečný tvar obsahujúci aktívne miesto, do ktorého zapadnú iba konkrétne substráty.³⁹

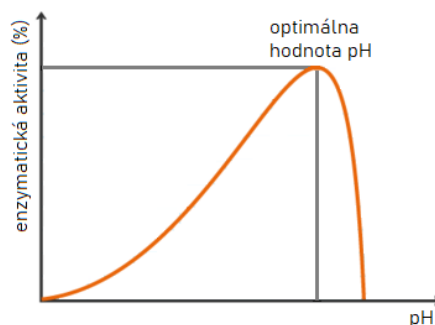
Aktívne miesta sú vyladené tak, aby napomáhali chemickej reakcii, a preto sú veľmi citlivé na zmeny v prostredí enzýmu. Medzi faktory, ktoré ovplyvňujú aktívne miesto a funkciu enzýmu patrí teplota a zmena pH.³⁹

Rovnako ako väčšina chemických reakcií, aj rýchlosť reakcie katalyzovanej enzýmom rastie s nárastom teploty, čo vedie k rýchlejšiemu priebehu. Zvýšenie teploty o 10°C môže viesť ku zvýšeniu aktivity enzýmov až o 50–100 %.⁴² Avšak pokiaľ dôjde ku výraznému nárastu, či poklesu teploty mimo prípustný rozsah, môžu byť ovplyvnené chemické väzby v aktívnom mieste, čím sa stávajú menej vhodnými pre väzbu substrátov (obr. 4). Veľmi vysoké teploty, v prípade živočíšnych enzýmov teploty vyššie než 40°C, môžu spôsobiť nevratné zmeny, denaturáciu enzýmu a stratu tvaru a aktivity. Po istom čase strácajú enzýmy svoju aktivitu aj pri miernych teplotách. V prípade iných enzýmov je zas nutné dbať na to, aby nedošlo ku výraznému poklesu teploty, pretože zmrazením strácajú svoju enzymatickú aktivitu.^{42,43}



obr. 4- Vplyv teploty na aktivitu enzýmu (obrázok autor)

Zásadný vplyv na funkciu enzýmov má tiež pH. Najpriaznivejšia hodnota pH je bod, v ktorom vykazuje enzým najvyššiu aktivitu, a táto optimálna hodnota sa medzi jednotlivými enzýmami líši (obr. 5). Zvyšky aminokyselín na aktívnom mieste majú často acidické alebo bázické vlastnosti, ktoré sú dôležité pre katalýzu a práve zmeny pH môžu ovplyvniť väzbu substrátov. Extrémne vysoké a naopak nízke hodnoty pH vedú k úplnej strate aktivity väčšiny enzýmov.^{43,44} Enzýmy v tele fungujú iba pri určitom rozsahu pH, pričom ich preferencia závisí od toho, kde sa v tele nachádzajú. Väčšia časť enzýmov pracuje najlepšie blízko hodnoty pH 7. Enzýmy v črevách fungujú najlepšie pri pH 7–8, naopak enzýmy v žalúdku potrebujú pre správne fungovanie pH v rozmedzí 1,3–3,8.²²



obr. 5- Vplyv pH na aktivitu enzýmu (obrázok autor)

1.4.3 Regulácia enzymatickej aktivity

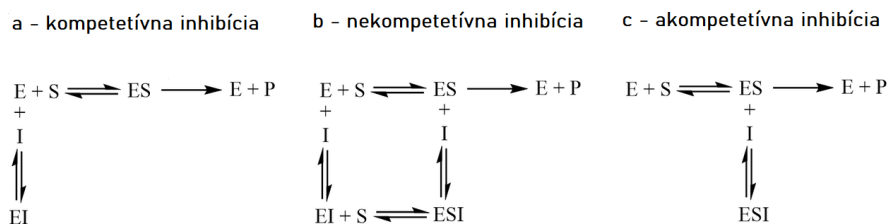
Dôležitou vlastnosťou väčšiny enzýmov je to, že ich aktivity nie sú konštantné, ale naopak, je možné ich prispôbovať. To znamená, že aktivita enzýmov môže byť rôzne regulovaná, aby vyhovovala fyziologickým potrebám, ktoré vznikajú počas života bunky.¹⁴

Enzýmy možno spomaliť, či dokonca pozastaviť mnohými spôsobmi, a to zamedzením substrátu vstúpiť do aktívneho miesta, či zabránením enzýmu zmeniť svoju konformáciu tak, aby katalyzoval reakciu. Za to sú zodpovedné inhibítory, ktoré sa rozdeľujú na reverzibilné a ireverzibilné. Ireverzibilné inhibítory, inaktívatory, sa viažu na enzým s vysokou afinitou kovalentnými väzbami, čím sa stávajú nevratnými. Reverzibilné, teda vratné, sa ďalej delia na kompetetívne, nekompetetívne a akompetetívne.⁴⁵

V prípade kompetetívnej inhibície (obr. 6 – a) molekula inhibítora súťaží priamo s molekulou substrátu o aktívne centrum enzýmu. Pokiaľ dôjde ku väzbe inhibítora na toto miesto, substrát sa naň už následne nedokáže naviazať a musí teda počkať, kým sa inhibítor z aktívneho miesta neuvoľní. Kompetetívnu inhibíciu je možné zvrátiť práve zvýšením koncentrácie substrátu. Pokiaľ v zmesi prevažuje substrát, bude mať tendenciu vytláčať inhibítor naviazaný na enzým.^{13,45}

Naopak nekompetetívnu inhibíciu (obr. 6 – b) nemožno prekonať zvýšenou koncentráciou substrátu. Pri nekompetetívnej inhibícii sa inhibítor viaže na samostatné miesto na enzýme (EI), čím sa stáva komplex enzým-substrát nefunkčný.⁴⁶ Ako sa inhibítor naviaže na enzým, nastáva zvyčajne konformačná zmena, ktorá buď zabráni tvorbe väzby medzi enzýmom a substrátom alebo zabráni pôsobeniu enzýmu na viazanom podklade.⁴⁵

Akompetetívna inhibícia (obr. 6 – c) nastáva vtedy, keď sa inhibítor viaže len na komplex enzým-substrát, vzniká komplex ESI (enzým-substrát-inhibítor).⁴⁶ V tomto type inhibície nesúťaží inhibítor so substrátom o rovnaké väzbové miesto, takže inhibíciu nemožno prekonať zvýšením koncentrácie substrátu.⁴⁷



obr. 6- Schéma kompetetívnej inhibície (a), nekompetetívnej inhibície (b), akompetetívnej inhibície (c) (prevzaté a upravené)⁴⁸

1.4.4 Alosterická regulácia

Alosterické enzýmy sú kľúčové regulačné enzýmy, ktoré riadia aktivity metabolických dráh reakciou na inhibítory a aktivátory.⁹ Nekompetetívna inhibícia je jedným príkladom alosterickej regulácie enzýmov. Alosterické interakcie nastávajú vtedy, keď väzba ligandu, ktorým nemusí byť nevyhnutne substrát, na proteín ovplyvňuje väzbu iného ligandu na proteín v samotnom väzbovom mieste. Tieto druhy interakcií môžu byť buď pozitívne, vtedy sa jedná o aktivačné reakcie, či negatívne, teda inhibičné. Pokiaľ sú oba ligandy v reakcii identické, hovoríme o homotrofných ligandoch, pokiaľ odlišné, jedná sa o heterotrofné ligandy. V niektorých prípadoch môže byť dokonca regulátor samotným produktom katalyzovanej reakcie. V tomto druhu mechanizmu spätnej väzby je priebeh reakcie samoregulačný.⁴⁵

Väčšina alosterických proteínov sú metabolické enzýmy, ktoré kontrolujú zmeny toku v metabolických dráhach. Enzýmy sú regulované najmä heterotrofnými molekulami, ktoré pozitívnym alebo negatívnym spôsobom modulujú rýchlosti katalytickej premeny. Pozitívne efekty často rušia kooperativitu, čo vedie ku Michaelis-Mentenovej kinetike, zatiaľ čo negatívne pôsobiace ligandy znižujú katalytickú účinnosť buď znížením afinity substrátu alebo zmenou vnútorných hodnôt turnerovho čísla K_{cat} .⁴⁹

1.5 Enzymová kinetika

Kinetika enzýmov sa všeobecne definuje ako štúdium väzbových afínit substrátov a inhibítorov, maximálnych katalytických rýchlosti reakcií, ktoré je možné dosiahnuť a rovnako tak ako štúdium spôsobu, akým koncentrácia substrátu ovplyvňuje rýchlosť reakcie. Kinetika enzýmov spočíva tiež v optimalizácii biokatalytických reakcií.¹¹

1.5.1 Kinetika ustáleného stavu

Fáza, v ktorej rýchlosť tvorby medziproduktov a rýchlosť rozkladu zostáva rovnaká, a teda koncentrácie reaktívnych medziproduktov sa nemenia, sa nazýva ustálený stav. Počas tejto reakcie je koncentrácia substrátu vyššia ako koncentrácia enzýmu.¹¹ Bežne používaným modelom pre enzymatické reakcie je Michaelis-Menten (MM) rovnica (1), ktorá približuje pôvodnú dynamiku za predpokladu, že koncentrácia enzýmu zostáva konštantná. Enzým interaguje so substrátom za vzniku komplexu enzým-substrát, čo vedie ku syntéze produktu a uvoľneniu enzýmu.⁵⁰ Kinetika vychádza z predpokladu, že sa rovnováha medzi enzýmom a substrátom, a medzi komplexom enzým-substrát uštaluje pomerne rýchlo, pričom kľúčovým dejom je tvorba produktu zo substrátu.²²

$$v_0 = \frac{v_{lim} [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

v_0 počiatočná reakčná rýchlosť

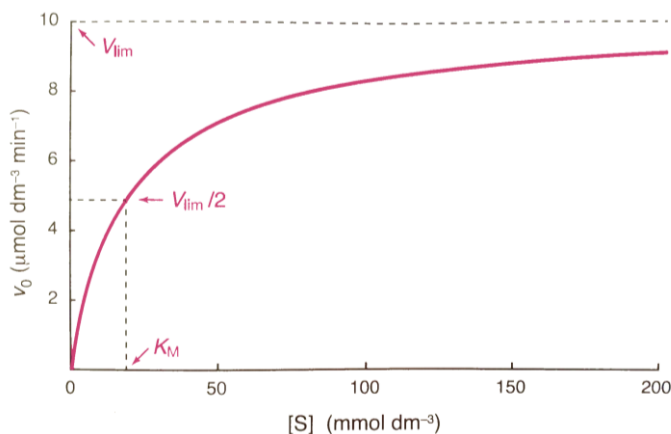
v_{lim} limitná rýchlosť

$[S]$ koncentrácia substrátu

K_m Michaelisova konštanta

Kinetická schéma Michaelis-Menten (obr. 7), ktorá zahŕňa jeden substrát a jeden produkt, je zjavne najjednoduchším typom enzýmovej katalýzy. Rovnica MM (1) môže platiť pre mnoho mechanizmov, ale mechanizmy sa môžu navzájom líšiť a líši sa aj vyjadrenie kinetických parametrov. Pokiaľ dôjde ku inhibícii alebo aktivácii substrátu v dôsledku naviazania druhej molekuly substrátu, MM rovnica neplatí.⁵¹

Akonáhle enzým s vysokou koncentráciou substrátu dosiahne maximálnu rýchlosť reakcie (kinetika prvého radu), nastáva okamih, v ktorom sú všetky miesta enzýmu obsadené substrátom, a po ktorom ďalšie pridanie substrátu už rýchlosť nezvýši (kinetika nultého radu). Nastáva ustálený stav, teda fáza, v ktorej nie je možné určiť koncentráciu enzýmu a substrátu pomocou disociačnej konštanty. Kinetika enzýmov v ustálenom stave je založená na teórii, že katalytická reakcia zostáva konštantná pokiaľ nie je reakcia vystavená nepretržitým zmenám.^{11,22}



obr. 7- Michaelis-Menten enzýmová kinetika²²

Kinetika ustáleného stavu a rýchlej rovnováhy neposkytuje informácie o existencii viacerých medziproduktov ani o ich životnosti. Takéto informácie poskytuje kinetika prechodného stavu alebo rýchla kinetika.⁵¹

1.5.2 Kinetika prechodného stavu

Štádium reakcie pred ustáleným alebo rýchlym rovnovážnym stavom, ktoré zahŕňa rýchle reakcie medzi enzýmami a substrátom. Tieto náhle zmeny v reakčnej zmesi si vyžadujú sledovanie reakcie predtým ako prejde do ustáleného stavu. Mechanizmy reakcie sú spojené so štrukturálnou konfiguráciou enzýmu. Pri tomto type reakcie sa využíva dostatočná koncentrácia enzýmov nevyhnutná pre sledovanie medziproduktov a tvorby produktu.¹¹

1.5.3 Kinetika rýchlych rovnováh

Štádium reakcie, v ktorom je možné určiť koncentráciu enzýmu a substrátu pomocou disociačnej konštanty. Počas tejto reakcie zostáva celková koncentrácia enzýmu konštantná a v porovnaní s množstvom substrátu veľmi nízka. Pred rýchlosť určujúcou reakciou sú reakcie v tejto fáze v rovnováhe so svojimi komponentmi, a teda sa hovorí o rýchlej rovnovážnej kinetike.¹¹

2 Kinázy

Kinázy sú všadeprítomná skupina enzýmov, ktoré katalyzujú reakciu prenosu fosfátovej skupiny (PO_4^{3-}) z vysoko energetických molekúl (donor) na receptorový substrát (akceptor).⁵² V dôsledku pridania PO_4^{3-} je proteín modifikovaný z hydrofóbnej nepolárnej molekuly na hydrofilnú polárnu, čo umožňuje proteínu meniť konformáciu pri interakcii s inými molekulami.⁵³

Aj keď všetky kinázy katalyzujú v podstate rovnakú reakciu prenosu fosfátovej skupiny, vykazujú pozoruhodnú rozmanitosť v substrátovej špecifickosti, štruktúre a dráhach, na ktorých sa podieľajú.⁵⁴ Medzi cieľové molekuly týchto enzýmov pre adíciu fosfátových skupín (fosforyláciu) patria proteíny, lipidy a nukleové kyseliny.⁵² Spomedzi všetkých druhov kináz sú proteínkinázy najväčšou skupinou enzýmov. Katalyzujú kovalentné pridávanie fosfátu ku cieľovým proteínom a táto udalosť predstavuje centrálny mechanizmus regulácie bunkových a enzymatických funkcií.⁵⁵

2.1.1 Fosforylácia

Fosforylácia proteínov je jednou z najbežnejších posttranslačných modifikácií (PTM) a zároveň jedným z počiatočných krokov, ktoré sú nevyhnutné pre koordináciu bunkových a organických funkcií.^{53 56}

Existuje niekoľko možností akými fosforylácia plní svoju úlohu. Prvým spôsobom je, že aktivita fosforylácie/defosforylácie pôsobí ako molekulárny prepínač. Ďalšou možnosťou fosforylácie je dočasná interakcia proteín-proteín, ktorá umožňuje nastavenie mnohých signálnych dráh. Fosforylácia proteínu môže navyše regulovať proces signálnej transdukcie, pretože je schopná spustiť subcelulárnu translokáciu proteínu fosforylovaného samotným mechanizmom. V niektorých prípadoch sa môže stať, že práve fosforylácia proteínov bude zodpovedná za tvorbu alebo naopak odstránenie druhej PTM.^{53,57}

Procesy fosforylácie a defosforylácie môžu byť veľmi zložité, pretože jedna kináza alebo fosfatáza môže mať súčasne viac substrátov, a tým pádom fungovať v rôznych signálnych dráhach bunky. Fosfo-signalizačné dráhy preto predstavujú základ mnohých bunkových pochodov. Skladajú sa najmä z proteínkináz, fosfatáz a ich príslušných substrátov fosfo-väzbových proteínov. Z toho dôvodu možno fosforyláciu klasifikovať do dvoch kategórií; prvej, týkajúcej sa funkčných zmien (stabilná) a druhej, ktorá nemá žiaden vplyv na regulačné funkcie (prechodná). Na základe toho sa predpokladá, že všetky stabilné reakcie fosforylácie sú funkčné a naopak prechodné reakcie sú nefunkčné. Funkčné reakcie sú navyše závislé na mieste reakcie, teda sú funkčné len v prípade, že prebiehajú na konkrétnom bode a fosforylácia nie je náhodná.^{53,56}

Fosforylácia sa môže vyskytnúť za menej ako sekundu, čo je dôležité pre zmenu metabolickej rýchlosti. Na druhej strane môže mať kinetiku pokrývajúcu hodiny, ktorá je reverzibilná a zároveň vysoko koordinovaná. Táto kinetika je nevyhnutná pre organizáciu zložitých fyziologických procesov a môže pôsobiť ako prostriedok na zosilnenie signálu, teda aktiváciu jednej molekuly kinázy, čo bude viesť ku fosforylácii mnohých proteínov. Tieto vlastnosti sa spolu podieľajú na regulácii enzymatických a bunkových funkcií fosforyláciou, ideálnym prostriedkom, ktorý reaguje primerane na extra- a intracelulárne signály.⁵⁵

Reverzibilná fosforylácia proteínov prostredníctvom antagonistického pôsobenia kináz a fosfatáz je dôležitou súčasťou bunkovej signalizácie, a to z dôvodu rozdielnej úrovne aktivity fosforylovaných a nefosforylovaných stavov cieľového proteínu. Za tento objav týkajúci sa reverzibilnej fosforylácie proteínov ako biologického regulačného mechanizmu získali Edmond H. Fischer a Edwin G. Krebs v roku 1992 Nobelovu cenu za fyziológiu a medicínu.⁵²

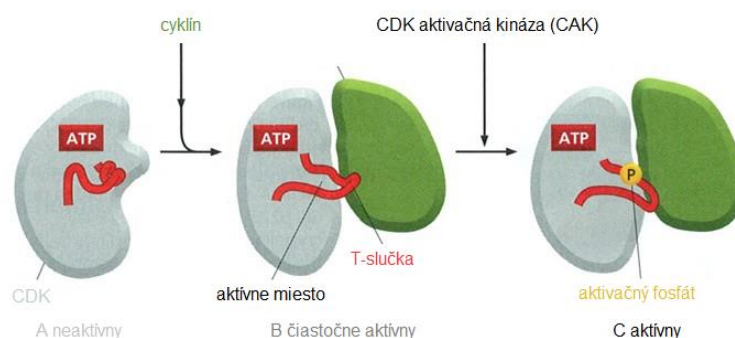
Fosforylácia pomocou proteínkináz sa považuje za kritický mechanizmus, ktorým sa reguluje každá aktivita eukaryotických buniek, vrátane proliferácie, génovej expresie, metabolizmu, motility, membránového transportu a apoptózy. Eukaryotické organizmy majú dve všeobecné triedy proteínkináz, a to tie, ktoré katalyzujú fosforyláciu

na serínových (Ser, S) a treonínových (Thr, T) zvyškoch a tie, ktoré prenášajú fosfáty na tyrozínové (Tyr, Y) zvyšky. Práve tieto 3 aminokyseliny obsahujú správnu funkčnú skupinu (hydroxylová skupina, -OH) schopnú prispôbiť sa fosforylácii.^{55,56}

2.1.2 Cyklín-dependentné kinázy

Cyklín-dependentné kinázy (CDK), pôvodne identifikované v kvasinkách, sú rodinou heterodimérnych serín/treonínových proteínkináz, z ktorých každá pozostáva z katalytickej podjednotky CDK a aktivačnej podjednotky cyklínu.⁵⁸ Katalytická podjednotka je aktívna ako proteínkináza len vtedy, keď sa viaže na regulačný cyklínový proteín a aktivitu CDK je možné inhibovať väzbou inhibítorov CDK (CKI). Zatiaľ čo sa hladina CDK významne nemení počas bunkového cyklu, množstvo cyklínov a inhibítorov je prísne kontrolované, čím je zabezpečená presná regulácia udalostí bunkového cyklu.⁵⁹

CDK sú regulované niekoľkými rôznymi procesmi, čo odráža rozmanitosť na nich prebiehajúcich signálnych dráh. Pri prvotnej syntéze nemá izolovaná podjednotka CDK žiadnu detekovateľnú aktivitu. Ku jej aktivácii dochádza v dvojkrokovom procese. Prvým krokom je väzba cyklínovej podjednotky, ktorá dodáva čiastočnú aktivitu. Tento krok je kľúčovým, a to z dôvodu prísne kontrolovaných hladín cyklínov transkripciou a ubikvitínom sprostredkovanou degradáciou. Ďalším krokom je fosforylácia CDK-cyklínového komplexu CDK aktivačnou kinázou (CAK), ktorá výrazne zvyšuje celkovú aktivitu (obr. 8).⁶⁰



obr. 8- Aktivácia CDK: A – T-slučka blokuje väzbové miesto pre ATP, CDK nulová aktivita; B – T-slučka uvoľňuje väzbové miesto pre ATP, väzba cyklínu na CDK, čiastočná aktivita; C – fosforylácia komplexu CDK-cyklín pomocou CAK, P-T-slučka zlepšuje väzbu substrátu, úplná aktivita (prevzaté a upravené)³⁹

U väčšiny eukaryotov existujú rôzne CDK riadiace rozličné fázy bunkového cyklu. Koordinujú bunkový cyklus na princípe vypínača; pokiaľ je CDK zapnutá, bunkový cyklus postupuje fázou, ktorú riadi konkrétna CDK. Naopak keď je CDK vypnutá, bunkový cyklus sa zastaví, akonáhle dosiahne stupeň riadený touto konkrétnou CDK.⁶⁰

CDK fosforylujú širokú škálu proteínov, ktoré iniciujú a regulujú rôzne deje, ktoré charakterizujú každú fázu bunkového cyklu. Pretože aktivita CDK osciluje počas bunkového cyklu, aktivita CDK substrátov sa mení cyklickým spôsobom, čím je umožnená správna a usporiadaná postupnosť udalostí vedúcich ku progresii bunkového cyklu. Cyklická aktivita CDK je regulovaná komplexnou sieťou proteínov a enzýmov a najmä prechodnou asociáciou CDK s cyklínmi, ktoré včas aktivujú a nasmerujú CDK na špecifické substráty. Hladiny rôznych CDK sú v bunkovom cykle celkom konštantné, zatiaľ čo hladiny rôznych cyklínov oscilujú vďaka ich periodickej syntéze a riadenej degradácii.⁶¹

CDK sú rozhodujúcimi regulátormi progresie bunkového cyklu a transkripcie RNA. Rôzne genetické a epigenetické príhody sú zodpovedné za nadmernú aktivitu CDK v bunkovom cykle v prípade rakoviny, pričom ich inhibícia môže viesť ku zastaveniu cyklu a následnej apoptóze. Avšak zabudovaná redundancia môže do istej miery obmedziť účinky vysoko selektívnej inhibície CDK.⁵⁸

CDK a ich špecifické funkcie pri nádoroch boli komplexne preskúmané; podieľajú sa na regulácii bunkového cyklu interakciou so špecifickými regulačnými cyklínmi bunkového cyklu. Rodina CDK pozostáva z 20 členov (CDK-1 až CDK-20), pričom bola rozdelená do 3 skupín⁶² na základe ich účasti na tvorbe nádoru prostredníctvom regulácie bunkového cyklu alebo transkripcie. CDK-1, CDK-4 a CDK-5 spadajú do kategórie súvisiacej s bunkovým cyklom, zatiaľ čo CDK-7, CDK-8, CDK-9, CDK-11 a CDK-20 sú zaradené do transkripčnej kategórie.⁶³ Tretiu skupinu tvoria atypické CDK. Nadmerná expresia a/alebo dysfunkcia CDK alebo cyklínov bola identifikovaná u veľkého počtu ľudských nádorov a iných rôznorodých patológií. Tieto proteínkinázy sa preto považujú za cenné terapeutické ciele pre vývoj liečiv.⁶²

Dysregulované delenie buniek, ktoré vedie k aberantnej proliferácii buniek, je jedným z kľúčových znakov rakoviny. Z toho dôvodu sú terapeutické ciele, ktoré blokujú delenie buniek, účinné pri liečbe rakoviny. Bunkové delenie je riadené hlavne komplexom zloženým z cyklínov a CDK. Dôposiaľ boli CKI, konkrétne tie, ktoré blokujú enzýmovú aktivitu CDK-4 a CDK-6 (CDK4/6), schválené na liečbu rakoviny prsníka s pozitívnym receptorom metastatických hormónov. Vzhľadom na neselektivitu a toxicitu však väčšina inhibítorov CDK prvej generácie, tzv. inhibítory pan-CDK, nebola schválená na klinickú aplikáciu. Vývoj stratégií kombinovanej terapie v posledných rokoch umožnil predovšetkým znížiť toxicitu a vedľajšie účinky inhibítorov pan-CDK.^{64,65}

2.1.3 Inhibícia CDK4/6 pri nádorových ochoreniach

Inhibítory CDK4/6 sú prvé, ktoré boli schválené FDA na klinickú liečbu. Tieto inhibítory špecificky inhibujú CDK4/6 a vykazujú obmedzenú toxicitu pre normálne bunky. V súčasnosti existujú tri inhibítory CDK4/6, ktoré sú schválené Food and Drug Administration (FDA) a European Medicines Agency (EMA): palbociclib (Ibrance, Pfizer, USA), ribociclib (Kisqali, Novartis, Switzerland) a abemaciclib (Verzenio, Lilly, USA).^{64,66}

Všetky tri inhibítory CDK4/6 môžu účinne zastaviť bunkový cyklus od G1 do S fázy blokovaním fosforylácie retinoblastómového proteínu (Rb), a tak inhibovať proliferáciu Rb-pozitívnych nádorových buniek. Tieto inhibítory sú v súčasnosti schválené pre liečbu prvej línie pokročilého hormonálne dependentného karcinómu prsníka (HR+), ktorá môže účinne znížiť rezistenciu na monoendokrinnú terapiu a výrazne predĺžiť život u žien s rakovinou prsníka HR+/HER2-. Nedávne štúdie ukázali, že okrem blokovania bunkového cyklu potláčajú inhibítory CDK4/6 tiež rast nádoru prostredníctvom mnohých ďalších mechanizmov, vrátane zvýšenia cytostázy spôsobenej inhibítormi signálnych dráh, indukcie starnutia, regulácie bunkového metabolizmu a dokonca podpory protinádorovej imunity reakcie. Tieto nové molekulárne mechanizmy poskytujú teoretický základ pre kombinovanú terapiu s inhibítormi CDK4/6. V prípade liečby rakoviny prsníka sa použili inhibítory CDK4/6 v kombinácii s antagonistom hormonálnych receptorov letrozolom. Mnoho ďalších kombinovaných terapií zahŕňajúcich inhibítory CDK4/6 je v súčasnej dobe klinicky testovaných na rôzne ochorenia vrátane protirakovinovej terapie.^{64,65,67}

V súčasnej dobe dosiahla endokrinná terapia v kombinácii s inhibítormi CDK4/6 v mnohých klinických štúdiách významné terapeutické účinky a kontrolovateľnú toxicitu, čím sa stala táto kombinovaná terapia najslubnejšou terapeutickou stratégiou pri liečbe rakoviny prsníka HR+/HER2-.⁶⁵

Inhibítory CDK4/6 nielen zastavujú nádorový bunkový cyklus, ale tiež spúšťajú protinádorovú imunitu. Znižujú génovú expresiu súvisiacu s transkripčným faktorom E2F a zvyšujú expresiu molekúl hlavného histokompatibilného komplexu triedy I v bunkových líniiach rakoviny prsníka.⁶⁸ Inhibítory CDK4/6 aktivujú endogénne retrovírusové zložky v nádorových bunkách a stimulujú produkciu interferónov typu III na podporu prezentácie nádorového antigénu. Inhibítory CDK4/6 ďalej inhibujú proliferáciu regulačných T buniek (T_{reg}) a expresiu DNA metyltransferázy 1 v T_{reg} , čo vedie ku hypometylácii promótoru a potlačeniu uvoľňovania E2F.⁶⁸ Inhibítory CDK4/6 môžu down-regulovať proliferáciu týchto buniek inhibíciou CDK6⁶⁹ a navyše podporujú klírens nádorových buniek zvýšením cytotoxických T buniek. Tieto synergické mechanizmy poskytujú teoretický základ pre kombinovanú terapiu CDK4/6 inhibítorov s inhibítormi

imunitného kontrolného bodu. Inhibítor CDK4/6 kombinovaný s proteínom 1 programovanej smrti (PD-1) významne znižuje proliferáciu nádorových buniek a zlepšuje mieru prežitie karcinogénnych myší⁷⁰, čo ilustruje synergický protinádorový účinok inhibítora CDK4/6 a inhibítora súvisiaceho s imunitným kontrolným bodom. Synergizmus, antagonizmus a interakcie týchto príbuzných génov si preto vyžadujú ďalšie štúdie.⁶⁸

2.2 MARK enzýmy

MARK (s mikrotubulmi-asociované proteín kinázy) patria do AMPK (adenozín-monofosfátom aktivované proteínkinázy) vetvy CAMK (kalcium/kalmodulín-dependentná proteínkináza) skupiny kináz.^{71,72}

MARK enzýmy patria rovnako ako CDK medzi serín/treonínové proteínkinázy, ktoré fosforylujú mikrotubulmi asociované proteíny (MAP) tau, MAP2, MAP4 na ich doméne viažucej mikrotubuly, čo spôsobuje ich disociáciu z mikrotubulov a zvýšenie dynamiky mikrotubulov.⁷³ U človeka sa vyskytujú 4 izoformy MARK rodiny (MARK 1–4), ktoré hrajú hlavnú úlohu v mnohých fyziologických procesoch, a zároveň sa bohato vyskytujú v ľudskom mozgu.^{74,75}

Súbor mikrotubulov zohráva dôležitú úlohu v mnohých procesoch prebiehajúcich v bunke ako je regulácia tvaru bunky, polarita buniek počas diferenciácie, delenie chromozómov pri mitóze, či intracelulárny transport. Počas týchto procesov prechádzajú mikrotubuly (MT) preskupením, ktoré zahŕňa rýchle prechody medzi stabilnými a dynamickými stavmi. Tento jav, nazývaný dynamická nestabilita, je vlastnosťou samotného polyméru a je modulovaný faktormi bunky. Patria sem MAP a vláknité proteíny, ktoré stabilizujú MT *in vitro* a v transfekovaných bunkách. Fosforylácia MAP interferuje s ich schopnosťou stabilizovať MT. MAP izolované z tkaniva alebo buniek vykazujú rôzne stupne fosforylácie, v mitotických bunkách vykazujú až niekoľkonásobne vyšší stupeň fosforylácie a dynamika MT sa zvyšuje približne 20-násobne. V neurónoch MAP modulujú organizáciu MT počas morfogénzy a procesu rastu, a dokonca aj v axónoch zreých neurónov sa preukázala dynamická povaha interakcií MAP s MT.⁷³

MARK kinázy zohrávajú kľúčovú rolu pri riadení polarity buniek a sú regulované fosforyláciou T-slučky treonínového zbytku. Kinázy MARK2 a 3 sú okrem treonínového zvyšku tiež fosforylované blízko zvyšku serínového, pričom práve fosforylácia zvyškov MARK kináz zohráva dôležitú úlohu pri regulácii aktivity.⁷⁶ Izoformy MARK 1–4 regulujú stabilitu MT, procesy diferenciácie, neurotický rast, delenie buniek a obchodovanie s organelami. MARK sú aktivované MARK kinázou (MARK2K), tisíc a jedna aminokyselinou (TAO) a serín/treonínovou proteínkinázou 11 (STK11) fosforyláciou

na Thr²⁰⁸. Vzhľadom k tomu, že aminokyselinové sekvencie aktivačnej slučky sú medzi izoformami MARK podobné, predpokladá sa rovnaká regulácia u všetkých izoformami.⁷⁷

Hlavné domény MARK zahŕňajú: (1) divergentnú N-terminálnu sekvenciu; (2) katalytickú doménu obsahujúcu bežné motívy proteínkinázy, ktorá sa ďalej delí na katalytickú slučku a P-slučku viažucu fosfát; (3) záporne nabitý linker, (4) doménu spojenú s ubikvitínom (UBA), (5) najvariabilnejšiu rozšírenú spacerovú oblasť charakterizovanú svojím vysoko zásaditým a výrazným hydrofilným charakterom, ktorá je nevyhnutná pre reguláciu aktivity; a (6) C-terminálnu doménu, ktorá je bázická, ale hydrofóbnejšia. Všetky izoformy majú podobné zloženie domén.^{71,73,78}

MARK kinázy sú aktivované fosforyláciou v T-slučke, ktorá obsahuje konzervovanú sekvenciu („LDTFCGSPP“). Následne tieto fosforylované MARK prenášajú fosfát na iné proteíny. V neaktívnom stave je T-slučka neusporiadaná a zložená do štrbiny, ktorá blokuje prístup substrátu a ATP. Fosforylačné miesta (Thr, Ser) sú však pre kinázy dostupné. Akonáhle sú aktivované fosfátom, T-slučka sa preorientuje a vysunie sa zo štrbiny, ktorá sa otvorí a umožní prístup ATP a substrátu. Katalytická doména MARK3 a MARK4 je veľmi podobná.⁷⁸

UBA doména MARK4 je malá, globulárna a pozostáva z troch krátkych hélíxov (α 1, 2, 3). Táto doména však nie je štrukturálne podobná iným proteínom spojeným s ubikvitínom a ani ho neviaže.⁷³ Analýza ľudského MARK1⁷⁹ a MARK3⁸⁰ a potkanieho MARK2⁷⁹ odhalila dôležitosť konzervovaného tyrozínového zvyšku v polohe 361 v hélíxe α 3. Tento zvyšok (Tyr³⁶⁴ u MARK4) je pravdepodobne zodpovedný za stabilitu MARK, pretože prispieva k hydrofóbnemu jadrú π - π interakciami s bočným reťazcom arginínu v polohe 331 (Arg³³⁴ u MARK4). Bolo pozorované, že UBA domény MARK1 a MARK2 majú inhibičný účinok na aktivitu kinázy aj po fosforylácii aktivátorom kinázy MARKK.⁷⁹

Doména UBA interaguje s N-terminálnym lalokom katalytickej domény a zamyká MARK v neaktívnej konformácii. Keďže UBA bráni väzbe substrátu a ATP uzamknutím kinázy v otvorenej konformácii, zvyšuje sa dostupnosť aktivačnej slučky pre aktiváciu a deaktiváciu kináz.^{79,80} Predpokladá sa, že doména zohráva niekoľko významných úloh ako inhibičná, aktivačná a stabilizačná v závislosti od stavu fosforylácie alebo interakcie kofaktora.⁸¹

Spacer doména je najvariabilnejšou oblasťou v izoformách MARK, ktorej veľkosť sa mení medzi 369 a 649 zvyškami v MARK4. Štrukturálna analýza naznačuje charakteristické znaky natívne rozvinutého proteínu, ktorý je nevyhnutný pre reguláciu. Sekvenčná analýza naopak poukazuje na tri fosforylačné miesta (Ser⁴²³, Ser⁴³⁸, Thr⁴⁴⁰), ktoré sú konzervované v MARK2. Fosforylácia na týchto miestach stimuluje transport MARK z bunkových membrán do cytoplazmy.⁷⁸

Homológia medzi MARK1 a MARK2 je vysoká v katalytickej doméne (95 %), doméne UBA (85 %) a C-terminálnej doméne (80 %). V spacerovej oblasti však výrazne klesá na 50 %.⁷³

MARK4 zdieľa približne 75 % celkovej homológie s MARK 1–3 kinázami a je prevažne exprimovaný v mozgu. Homológia je najvýraznejšia v katalytickej doméne, a tvorí okolo 90 %.^{75,82} Na rozdiel od zvyšných kináz, ktoré všetky vykazujú jednotnú cytoplazmatickú lokalizáciu, dochádza u MARK4 ku ko-lokalizácii s centrozómom a MT v kultivovaných bunkách.⁷⁸ MARK enzýmy zohrávajú viaceré úlohy v bunkových procesoch, pričom MARK4 sa pravdepodobne priamo podieľa na organizácii MT v neurónoch a prispieva tak ku patologickej fosforylácii tau.⁸²

2.2.1 MARK4

MARK4 sa líši od ostatných členov kódovaním dvoch alternatívne zostrihaných izoform MARK4L a MARK4S, ktoré sa líšia svojou oblasťou pri C- konci. Tieto izoformy sú v ľudských tkanivách vrátane centrálného nervového systému diferencovane regulované. MARK4L je 752 zvyškov dlhý polypeptid rozdelený do troch domén; domény proteínkinázy (59–314), domény spojennej s ubikvitínom (322–369) a domény spojennej s kinázou (703–752), ďalších 54 zvyškov (649–703) je zapojených do správneho skladania a fungovania enzýmu. Zvyšky 65–73 sú považované za väzbovú doménu ATP a Lys⁸⁸ je považovaný za jeho väzbové miesto. Asp¹⁸¹ bol navrhnutý ako aktívne miesto MARK4, ktoré je aktivované fosforyláciou bočného reťazca Thr²¹⁴. Izoforma MARK4S je nadmerne exprimovaná v normálnom mozgu a pravdepodobne sa podieľa na diferenciácii neurónov. Naopak MARK4L izoforma je upregulovaná v bunkách hepatokarcinómu a gliómoch, čo naznačuje jej zapojenie do bunkového cyklu. S MARK4 je spojených aj niekoľko biologických funkcií, vrátane tvorby zväzkov MT, vývoja nervového systému a pozitívnej regulácie programovanej bunkovej smrti. Z tohto dôvodu je MARK4 považovaný za najvhodnejší cieľ pre racionálny návrh liečiv založený na štruktúre.^{78,81}

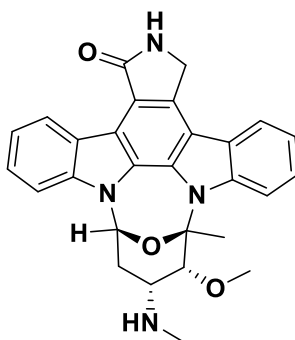
MARK4 sa využíva ako potenciálny terapeutický cieľ v prípade rakoviny, neurodegeneratívnych porúch a metabolických porúch, pričom sa zdôrazňuje jeho klinický význam. Mnoho štúdií popisovalo dôležitosť MARK4 pri obezite, cukrovke, Alzheimerovej chorobe a metastatických karcinómoch prsníka.^{83–85} Najvyššia expresia MARK4 sa nachádza v mozgu, obličkách a semenníkoch. Návrh a vývoj potenciálnych inhibítorov, ktoré sa viažu na aktívne miesto MARK4 a vykazujú významné protinádorové aktivity, predstavuje veľký význam práve pri liečbe rakoviny, cukrovky a AD.³

Progresia AD je spojená s hyperfosforylovaným tau proteínom v mozgu. Fosforylácia tau pomocou MARK4 v mieste Ser²⁶² vedie k oddeleniu tau od MT a následne umožňuje jeho fosforyláciu inými kinázami. Nadmerne exprimovaný MARK4 je priamo spojený s defektnými synapsami a dendritickými tŕňmi. Početné štúdie naznačujú potenciál MARK4 ako jedného z najlepších cieľov v terapii AD a iných ND, a uviedli inhibítory MARK4.³ Napriek významu MARK v patogenéze AD je známych len niekoľko malých molekúl majúcich anti-MARK aktivitu.⁷⁴

2.3 Inhibítory MARK enzýmov

Staurosporín (STS)

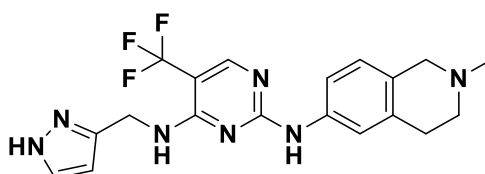
Staurosporín (obr. 9), patriaci do triedy pan-kinázových inhibítorov, indukuje apoptózu a zastavenie bunkového cyklu v G1 fáze u rôznych typov buniek. Hlavnou biologickou aktivitou staurosporínu je inhibícia proteínkináz prostredníctvom prevencie väzby ATP. STS je prototypom inhibítora ATP kompetitívnej kinázy v tom, že sa viaže na mnoho z nich s vysokou afinitou, ale nízkou selektivitou.⁸⁶ Okrem svojho účinku proteínkinázy C, A a G, mení STS expresiu inhibítorov CDK a opakujúcej sa kinázy 2 bohatej na leucín spojenej s Parkinsonovým ochorením v nanomolárnom rozsahu. Liečba pomocou STS má za následok rast neuritov v dopamerných neurónoch a zvyšuje cholin acetyltransferázovú aktivitu po bazálnej lézii predného mozgu v cholinergických neurónoch. Nedávna štúdia poukázala na STS ako inhibítor interakcie MARK-tau, čím sa znižuje tau fosforylácia na Ser²⁶² v myších embryonálnych 3T3 fibroblastových bunkách. Navyše nebol preukázaný žiaden efekt STS v prípade MARK2 enzýmu a na hladiny proteínu tau. Toxicita obmedzujúca množstvo dávky a slabá farmakokinetika však znižujú pravdepodobnosť voľby STS ako vhodného terapeutického činidla vo vývoji proti MARK enzýmom.⁷⁴



obr. 9- Chemická štruktúra staurosporínu (obrázok autor)

PCC0208017

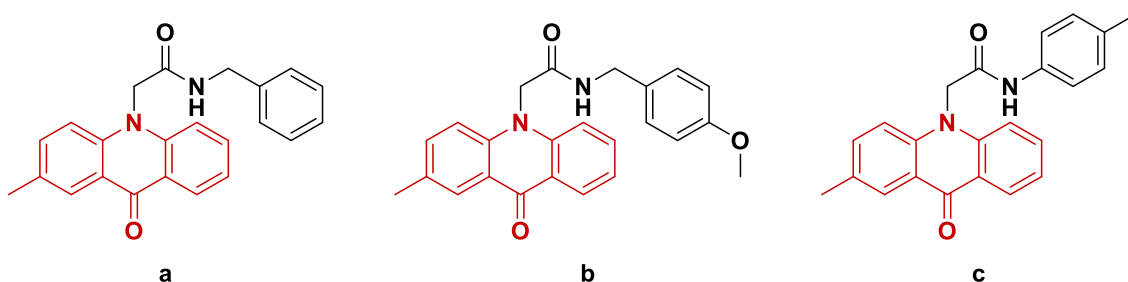
PCC0208017 (obr. 10) je nový duálny inhibítor MARK3 a MARK4, ktorý vykazuje robustnú aktivitu proti gliómu *in vitro* a *in vivo* s dobrou *in vivo* farmakokinetikou a priepustnosťou BBB. PCC0208017 silne inhibuje aktivitu kináz MARK3 a MARK4 s miernymi účinkami proti MARK1 a MARK2. Táto zlúčenina zoslabuje migráciu gliómových buniek, ich inváziu a angiogézu. Štúdie molekulárneho mechanizmu odhalili, že PCC0208017 znižuje fosforyláciu tau, narušuje dynamiku mikrotubulov a vyvoláva zastavenie bunkového cyklu vo fáze G2/S.⁷⁵



obr. 10- Chemická štruktúra PCC0208017 (obrázok autor)

N-substituované akridónové deriváty

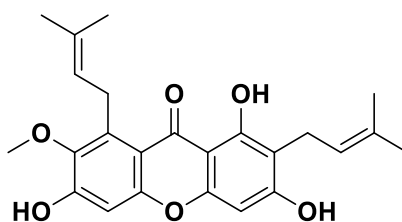
Pri hľadaní nových účinných inhibítorov MARK4 boli syntetizované niektoré akridónové deriváty (obr. 11), charakterizované a vyhodnotené na inhibičnú aktivitu proti MARK4. Zo všetkých syntetizovaných zlúčenín vykazovali 3 molekuly lepšiu väzbovú afinitu a aktivitu inhibície enzýmu v mikromolárnom rozsahu na základe fluorescenčného viazania, izotermickej titračnej kalorimetrie a kinázových laboratórnych postupov. Na základe *in vitro* testovania sa ukázalo, že zlúčeniny inhibujú bunkovú proliferáciu a prevažne indukujú apoptózu v bunkovej línii rakoviny prsníka MCF-7, s hodnotami IC_{50} $5,2 \pm 1,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (a); $6,3 \pm 1,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (b); $5,8 \pm 1,4 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (c). Tieto zlúčeniny navyše výrazne zvyšujú oxidačný stres v rakovinotvorných bunkách.⁸⁷



obr. 11- Chemická štruktúra N-substituovaných akridónových derivátov, akridónový skelet zvýraznený červenou (obrázok autor)

α -mangostín (α -M)

Filtrácia prirodzene sa vyskytujúcich zlúčenín v knižniciach pomocou vysokovýkonného skrínungu a enzýmového testu predstavuje látku α -M ako potenciálny inhibítor MARK4. Dokovanie na základe štruktúry a simulácia 100 ns molekulovej dynamiky odhalili, že väzba α -M stabilizuje štruktúru MARK4. Inhibičné a väzbové štúdie enzýmov ukázali na inhibíciu MARK4 v submikromolekulárnom rozsahu s IC_{50} $1,47 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a väzbovou konštantou (K_a) $5,2 \times 10^7 \text{ mol mol}^{-1}$. Štúdie na bunkách naznačovali inhibíciu životaschopnosti bunkovej línie rakoviny prsníka MCF-7 a bunkovej línie rakoviny pečene HepG2, indukciu apoptózy, zastavenie bunkového cyklu vo fáze G0/G1 a zníženie tau fosforylácie.⁸⁸



obr. 12- Chemická štruktúra α -mangostínu (obrázok autor)

2.4 Transport liečiv cez hematoencefalickú bariérou

Pre normálne fungovanie CNS je potrebné vysoko kontrolované mikroprostredie. Existencia biologickej bariéry na rozhraní krvi a mozgu, ktorá účinne oddeľuje mozog od zvyšnej časti tela, hrá rozhodujúcu úlohu pri kontrole transportu látok nevyhnutných pre metabolickú aktivitu mozgu a správnu funkciu neurónov. Tieto biologické bariéry sú stanovené rôznymi bunkami na troch kľúčových rozhraniach; hematoencefalická bariéra, hematoikvorová bariéra a arachnoidová bariéra.⁸⁹

Hematoencefalická bariéra je súčasťou neurovaskulárnej jednotky a je tvorená mikrovaskulárnymi endotelovými bunkami lemujúcimi mozgové kapiláry prenikajúce do mozgu a miechy. Je považovaná za najväčšie rozhranie medzi krvou a mozgom, sprostredkúva komunikáciu medzi CNS a perifériou. Bariéra oddeľuje cirkuláciu od mozgu, čím poskytuje ochranu a reguláciu transportu sérových faktorov a neurotoxínov. Zároveň sa nejedná len o fyzickú bariéru, a to vzhľadom na prítomnosť špecializovaných tesných spojov a iných zmien, ktoré zabraňujú neregulovanému úniku. Pôsobí tiež selektívnejšie ako transportné rozhranie so špecifickými transportérmi prítomnými na luminálnych a abluminálnych membránach, ďalej ako sekrečné teleso a metabolická bariéra, ktorá obsahuje a uvoľňuje určité enzýmy lokálne.^{89,90}

Tri hlavné modifikácie kapilárneho lôžka v mozgu zabraňujú tvorbe ultrafiltrátu plazmy v CNS. Tesné spojenia, ktoré spájajú endotelové bunky v mozgu a ktorú sú si vzájomne v apozícii; výrazne znížená rýchlosť pinocytózy a nedostatok intracelulárnej fenestrácie. Tieto modifikácie zabraňujú neregulovanému úniku sérových proteínov do CNS za normálnych podmienok. Látky sú stále schopné prejsť vaskulárnou BBB rôznymi mechanizmami.⁹¹

Väčšina látok sú malé molekuly, ktoré predchádzajú BBB transcelulárnou pasívnou difúziou. Navrhnuť molekuly, ktoré dokážu dosiahnuť optimálnu koncentráciu v požadovanom terapeutickom ciele v mozgu je hlavná výzva medicínskych chemikov zaoberajúcich sa CNS drug designom.⁹²

Faktory, ktoré určujú, koľko liečiva prechádzajú hematoencefalickou membránou, zahŕňajú fyzikálno-chemické vlastnosti činidla. Medzi to patrí rozpustnosť v tukoch, vodíkové väzby, molekulová hmotnosť, mozgový prietok krvi, metabolizmus, degradácia a klírens liečiva v krvnom obeh a väzbu na proteíny. Vysoký systémový klírens obmedzuje dostupnosť liečiva na penetráciu do CNS. Charakteristikou látok vhodných na prechod bariérou je preto vysoká lipofilita, malá veľkosť a molekulová hmotnosť a nízky potenciál vodíkových väzieb, to znamená, že liečivo je unionizované pri fyziologickom pH.⁹³

Aby sa splnili vyššie uvedené kritéria uľahčujúce vstup do mozgu, fyzikálno-chemické parametre zlúčenín musia byť v rámci určitých hraníc. Stredné hodnoty schválených liečiv predstavujú molekulovú hmotnosť ($M = 305$ Da), počet donorov vodíkovej väzby ($HBD = 1$), lipofilitu ($c \log P = 2,8$; $c \log D = 1,7$), väzbovú konštantu ($pK_a = 8,4$), rotačnú väzbu (4,5).^{94,95} Na základe týchto hodnôt a iných podobných analýz by sa vývoj liečiv mal zamerať na optimalizáciu zlúčenín s nasledujúcimi vlastnosťami: molekulová hmotnosť ($M < 450$)⁹⁶, vodíková väzba (donor $HBD < 3$, akceptor $HBA < 7$), lipofilita ($c \log P < 3-5$, $c \log D \sim 2-3$), pK_a (7,5–10,5), rotačné väzby (< 8) a topologická polárna plocha povrchu (60–70 Å).^{94,96-99}

Vysoká lipofilita často vedie k zlúčeninám s vysokým rýchlym metabolickým obratom a nízkou rozpustnosťou a slabou absorpciou. So zvyšujúcou sa lipofilitou existuje zvýšená pravdepodobnosť väzby na iné hydrofóbne proteínové ciele, a preto existuje väčší potenciál toxicity.⁹⁶

Dôležitým faktom je, že BBB nie je statická, ale dynamická. Interaguje so svojím miktoprostredím a reaguje na potreby CNS. Jeho priepustnosť je aspoň čiastočne riadená intra- a medzibunkovou signalizáciou medzi endotelovými bunkami a okolitými astrocytmi a neurónmi.⁹³ Všeobecne môžu cez BBB prechádzať len lipofilné molekuly s nízkou molekulovou hmotnosťou a s pozitívnym nábojom. Iné molekuly vyžadujú určité bunkové endogénne transportné systémy ako je transport sprostredkovaný nosičom,

receptorom alebo adsorpciou. Bežne existuje päť základných mechanizmov, ktorými sa molekuly rozpustenej látky pohybujú cez membrány.¹⁰⁰

Prvý mechanizmus, jednoduchá alebo pasívna difúzia, je spontánny proces v závislosti od veľkosti koncentračného gradientu. Niekoľko molekúl rozpustných v tukoch môže vstúpiť do bunkovej membrány a pasívne difundovať cez endotel do mozgu. Existuje korelácia medzi zvýšenou rozpustnosťou lipidov a rýchlosťou a rozsahom penetrácie do mozgu.^{100–102}

Druhým spôsobom sú nosiče rozpustených látok, ktoré predstavujú nadrodinu membránových transportných proteínov, ktoré uľahčujú obojsmerný pohyb rozpustených látok cez bunkovú membránu. Polárne molekuly môžu byť transportované cez membránu endotelových buniek. Na rozdiel od ABC transportérov (ATP-viažuce kazetové transportéry), nevyžadujú tieto nosiče ATP. Sú poháňané buď elektrochemickými gradientmi (Na^+ , H^+) alebo koncentračnými gradientmi, ktoré sú stanovené transportovanými rozpustenými látkami. Týmto transportérom sa tiež hovorí uľahčené alebo sekundárne aktívne transportéry.^{100,103}

Tretou cestou je eflux sprostredkovaný nosičom, efluxné transportéry. Predstavujú ďalší významný transportný mechanizmus cez BBB. Transportéry ABC majú širokú afinitu ku širokej škále rozpustných látok, a to najmä ku veľkým molekulám rozpustným v tukoch s vysokým podielom atómov dusíka a kyslíka. Transportéry ABC využívajú hydrolýzu ATP na pumpovanie molekúl cez membránu proti koncentračnému gradientu. Mnoho cytotoxických liekov je substrátmi, čo komplikuje liečbu mozgových nádorov a metastáz.^{100,104}

P-glykoproteín (P-gp) je najznámejší z ABC transportérov a bol ako prvý identifikovaný u ľudí, u ktorých hrá rozhodujúcu úlohu v rezistencii liečiv pri liečbe rakoviny. Vo všeobecnosti P-gp prednostne vytláča veľké hydrofóbne, kladne nabité molekuly. Podieľa sa na transporte určitých cytokínov, inhibícii apoptózy, či v patogenéze Alzheimerovej choroby priamou interakciou P-gp na amyloid- β 40 a amyloid- β 42, a ovplyvňovaním akumulácie týchto proteínov.^{104,105}

Transcytóza sprostredkovaná receptormi je štvrtou triedou transportného systému, ktorý využíva vezikulárny transportný systém endotelových buniek na transport substrátov na mozgovej strane bariéry. Transcytóza sprostredkovaná receptormi je bežne indukovaná väzbou veľkých molekúl, ako sú peptidy a proteíny, na receptory, ktoré sú silne exprimované na membráne endotelových buniek. Živiny ako železo, inzulín a leptín sa do mozgu obvykle transportujú práve touto cestou.^{100,106}

Piatou možnosťou je diapedéza mononukleárných leukocytov. Leukocyty môžu preniknúť cez hematoencefalickú membránu transendoteliálnou diapedézou a migrovať

priamo cez cytoplazmu endotelových buniek bez narušenia tesného spojenia. Akonáhle sú v mozgu, stanú sa mikrogliami, imunitne kompetentnými bunkami mozgu.^{100,107}

2.5 Bunkový cyklus

Bunkový cyklus je vysoko konzervovaný a prísne regulovaný biologický systém, ktorý riadi bunkovú proliferáciu a diferenciáciu. Regulačné proteíny bunkového cyklu, ktoré zahŕňajú cyklín dependentné kinázy, cyklíny a inhibítory, sú rozhodujúce pre správnu časovú a priestorovú reguláciu bunkovej proliferácie. Naopak, zmeny v regulačných proteínoch bunkového cyklu, ktoré vedú ku strate normálnej kontroly, sú charakteristickým znakom mnohých typov nádorov. Nadmerná expresia CDK a cyklínov a naopak strata CDK inhibítorov môžu mať za následok vznik nádorového bujenia.¹⁰⁸

Bunkový cyklus existuje v 4 fázach: G0/G1, syntéza (S), G2 a mitóza (M). Fáza G0/G1, syntéza DNA a fáza G2 spolu tvoria interfázu, teda obdobie medzi dvoma mitózami.¹⁰⁹ Mitóza (jadrové delenie) je najdramatickejším štádiom bunkového cyklu, ktoré zodpovedá za oddelenie dcérskych chromozómov a zvyčajne končí delením buniek (cytokinéza). Mitóza a cytokinéza trvajú len zlomok času, približne 95 % bunkového cyklu sa strávi v interfáze. Počas interfázy sú chromozómy dekondenzované a distribuované v celom jadre, čo navádza morfológicky jednotný efekt. Na molekulárnej úrovni je však interfáza časom, počas ktorého dochádza ku usporiadaniu bunkového rastu a replikácii v rámci prípravy na delenie buniek.¹¹⁰

2.6 Kontrola bunkového cyklu

Progresia cez tieto 4 fázy je regulovaná členmi rodiny CDK, ktorá zahŕňa CDK-1, 2, 4 a 6. Každá z týchto 4 CDK sa po aktivácii cyklínmi podieľa na regulácii prechodu z jednej fázy bunkového cyklu do druhej. CDK4/6 sa podieľajú na prechode z fázy G1 do fázy S. Cyklíny typu D (D1, D2, D3) sa viažu na CDK4/6. Cyklíny aktivujúce CDK sú negatívne regulované členmi rodiny INK4, ktoré sa viažu na CDK a tým ich inhibujú. V rámci bunkového cyklu teda existuje regulačná rovnováha medzi inhibíciou proteínmi INK4 a aktiváciou cyklínmi D, E, A alebo B. Tieto procesy sú ďalej riadené signálmi inhibujúcimi rast.¹⁰⁹

Fáza G1 bola pôvodne opísaná ako časové obdobie, ktoré nastáva pred nástupom syntézy DNA (fáza S). Normálne bunky zbavené rastových podmienok sa zastavia v G0 fáze fázy G1. V G0 fáze je bunka v zastavenom stave, ktorý môže byť buď trvalý, a to po starnutí alebo terminálnej diferenciácii, alebo pokojový. Po stimulácii mitogénymi signálmi začnú pokojové bunky postupovať smerom k hlavnému

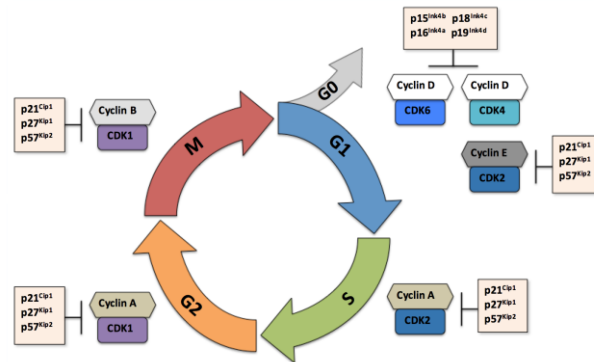
kontrolnému bodu G1, ktorý sa nazýva restričný bod (R). Bod R je regulovaný supresorovým génom retinoblastómu 1 (Rb1). Vo svojom hyperfosforylovanom stave sa Rb viaže na členov transkripčných faktorov z rodiny E2F, predovšetkým na E2F1.¹¹¹ Táto interakcia Rb/E2F potláča transkripciu kritických génov bunkového cyklu regulovaných E2F prostredníctvom enzýmov remodelujúcich chromaín ako sú histónacetylázy.^{58,108,111}

Včasná progresia G1 je riadená rodinou cyklínov D a ich katalytickými proteínmi CDK-4 a CDK-6. Expresia génu cyklínu D (CCND1) a množstvo proteínu sú v pokojových bunkách nízke a rýchlo indukované stimuláciou podmienkami podporujúcimi rast alebo aktivitu mnohých onkogénov. Cyklín D následne dimerizuje CDK4/6 za vzniku katalyticky aktívneho proteínového komplexu. Jedným z hlavných substrátov pre komplex cyklín D s CDK4/6 je Rb. Fosforylácia Rb cyklínovým komplexom D s CDK4/6 začína stochastickou inaktiváciou Rb a umožňuje bunkovému cyklu postupovať smerom k bodu R. Akonáhle bunky prejdú bodom R, postupujú do fázy S. Inaktivácia Rb zmierňuje inhibičný účinok na transkripčný faktor E2F, ktorý tým podporuje ďalšiu progresiu bunkovým cyklom.¹¹¹ E2F riadi syntézu cyklínu E a CDK-2, ktorá ďalej inaktivuje Rb. E2F reguluje expresiu rôznych génov, ktoré sprostredkujú replikáciu DNA, biosyntézu nukleotidov a opravy DNA, polymerázu A, tymidínkinázu, tymidylátsyntázu, ribonukleotidreduktázu a RAD51, eukaryotický gén nevyhnutný pri oprave zlomov dvojvláknových DNA (dsDNA).^{108,111,112}

Pre zachovanie správnej skorej regulácie G1 fázy je aktivita komplexu cyklínu D1 s CDK4/6 antagonizovaná inhibítormi rodiny INK4 (kinázové inhibítory CDK4/6). Členmi INK4 rodiny sú p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c}, a p19^{INK4d}, ktoré špecificky inhibujú katalytické podjednotky CDK4/6.¹¹³ Rovnako tak inhibítory p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, and p57^{Kip} rodiny CIP/KIP, sú účinnými voči cyklínom typu E a A a ich katalytickým partnerom CDK-2 a CDK-1, a do menšej miery aj voči komplexu CDK1/cyklín B vyskytujúcim sa v G2 fáze. Progresia neskorou G1 fázou a indukcia syntézy DNA v S fáze nastáva zvýšením množstva cyklínu typu E a výslednou asociáciou s CDK-2, primárnym katalytickým partnerom cyklínu E.¹⁰⁸ Aktivita komplexu cyklín E s CDK-2 je zosilnená Cdc6, nestabilným proteínom, ktorý sa rýchlo degraduje pri prechode z G1 fázy do fázy S a preto musí byť syntetizovaný *de novo* v každom bunkovom cykle.¹¹⁴ Tento komplex fosforyluje p27^{Kip1}, čo ďalej uľahčuje vstup buniek do S fázy.¹⁰⁸

CDK-2 tiež tvorí funkčný komplex s cyklínom A, hlavným cieľovým génom E2F. Komplex cyklín A s CDK-2 je nevyhnutný pre správnu replikáciu a syntézu DNA v S fáze. V neskorej G2 fáze a skorej S fáze sa cyklín A tiež asociuje s CDK-1, aby podporil vstup buniek do M fázy. K tomu čiastočne dochádza prostredníctvom aktivity CDK-7 a cyklínu H, ktoré tvoria regulačný komplex označovaný ako kináza aktivujúca

CDK. Progresia bunkového cyklu cez G2 do M fázy je nakoniec riadená komplexom cyklín B s CDK-1, prísne regulovaným komplexom. Ubikvitínom sprostredkovaná degradácia cyklínu B1 je potrebná na to, aby bunky správne postupovali mitózou.^{108,111}



obr. 13- Znáznomené komplexy cyklín-CDK a inhibítory v jednotlivých fázach bunkového cyklu¹¹⁵

Experimentálna časť

3 Materiál a metódy

3.1 Biologický materiál

CHKtid peptid	SignalChem	kat. č. – C10–58
Enzým CDK4/CycD3	Carna Biosciences, Inc.	kat. č. – 04-105
Enzým CDK4/CycD3	SignalChem	kat. č. – C31-18G-10
Enzým MARK1 kináza	Carna Biosciences, Inc.	kat. č. – 02-120
Enzým MARK2 kináza	Carna Biosciences, Inc.	kat. č. – 02-121
Enzým MARK3 kináza	Carna Biosciences, Inc.	kat. č. – 02-122
Histón H1 peptid	SignalChem	kat. č. – 02-123

3.2 Chemikálie

α -kyano-4-hydroxyškoricová kyselina (4-HCCA)	BRUKER	kat. č. – 8201344
2-[4-(2-hydroxyetyl) piperazín-1-yl] etánsulfónová kyselina (HEPES)	SIGMA-ALDRICH	kat. č. – H3375
Acetonitril (ACN)	SIGMA-ALDRICH	kat. č. – 75-05-8
Adenozín-3-fosfát (ATP)	SIGMA-ALDRICH	kat. č. – 34369-07-8
Ditiotreitol (DTT)	BIO-RAD	kat. č. – 1610611
Chlorid horečnatý ($MgCl_2$)	SIGMA-ALDRICH	kat. č. – M4880
Kyselina trifluóroctová (TFA)	Honeywell	kat. č. – 14264
Peptidový kalibračný štandard II	BRUKER	kat. č. – 8222570
Staurosporín (STS)	SIGMA-ALDRICH	kat. č. – 19-123-M

Látky 1–16 (Ústav organické chemie a chemické biochemie AV ČR, výskumná skupina profesora Michala Hocka, PhD. DSc)

3.3 Roztoky a ich príprava

PUFOR

- HEPES ($1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$), MgCl_2 ($2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$), DTT ($2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)
- pH pufru upravené na hodnotu 7,5
- roztok pufru prefiltrovaný cez filter ($0,25 \mu\text{m}$) do falkóny, uschovaný v chladničke pri teplote 4°C

ATP

- 1,1 mg ATP do 1 ml vody (roztok o koncentrácii – $2,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)
- 0,5 ml roztoku riedeného v 9,5 ml pufru (finálna koncentrácia – $108,5 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

ZÁSOBNÝ ROZTOK PRE PRÍPRAVU MATRICE

- 4-HCCA (10 mg) rozpustená v 1 ml pripraveného roztoku
ACN : TFA : H_2O v pomere 0,80 : 0,02 : 0,18

3.4 Prístroje a zariadenia

384-well LDV	low dead volume	Labcyte
1536-well LDV	low dead volume	Labcyte
Analytické váhy	Scaltec SBC21	LEMO21
Centrifúga	Centrifuge 5810R	Eppendorf
Centrifúga	miniSpin plus	Eppendorf
Dávkovač reagens	Multidrop™ Combi	Thermo Scientific™
Hmotnostný spektrometer	MALDI-TOF ultrafleXtreme	Bruker
Chladnička	Kombi	Liebherr
Liquid handler	Echo® 550	LABCYTE
Magnetická miešačka	VMS-C7	VWR ADVANCED
Mraznička	GN 3023 Comfort NoFrost	Liebherr
pH elektróda	HI 1131B	HANNA INSTRUMENTS
Termomixér	comfort 1,5 ml	Eppendorf
Ultrasonická kúpeľ	SONOREX	BANDELIN

3.5 Softvéry

ChemBioDraw Ultra 14.0	PerkinElmer
flexAnalysis 3.4	Bruker Daltonik GmbH
GraphPad Prism 9.3.1	
SwissADME	Swiss Institute of Bioinformatics

3.6 Experimentálne a vyhodnocovacie postupy

3.6.1 MALDI-TOF MS assay

Pre úvodné optimalizácie bola používaná reakčná zmes o objeme 7,5 μl , ktorá pozostávala z 2 μl pufru; 3,5 μl ATP ($108,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$); 1 μl enzýmu (MARK 1–3; $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 1 μl substrátu ($1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Pre meranie bol použitý CHKtid peptid (sekvencia „KKKVSRSGLYRSPSPENLNRPR“; molekulová hmotnosť 2701 Da).

Po optimalizačných krokoch bola reakčná zmes minimalizovaná na nižší objem, pri ktorom prebiehal screening so staurosporínom a testovanými látkami. Reakčná zmes pozostávala z 1,5 μl pufru; 1 μl ATP ($108,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$); 20 nl enzýmu (MARK 1–3; $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); 60 nl substrátu (CHKtid peptid; $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 12,5 nl inhibítora.

Pre overenie funkčnosti metodiky MALDI-TOF MS pre prácu so substrátom bola vykonaná detekcia CHKtid peptidu vo vode a následne v pufri. K uvedenej reakčnej zmesi bola pridaná matrica (HCCA) v pomere 1 : 1. Pripravená zmes bola napipetovaná na *malDI plate* (MTP AnchorChip 1536; obr. 14) a ponechaná voľne vykryštalizovať. Pripravené spoty pozostávajúce z peptidu, vody, matrice; resp. peptidu, pufru, matrice; boli zmerané hmotnostným spektrometrom MALDI-TOF a analyzované.



obr. 14- MALDI plate

Metodika bola založená na vysokovýkonnej kompatibilnej assay-i na priamu detekciu enzymatickej aktivity MARK pomocou bezkontaktného echoakustického prenosu (ECHO® 550) kvapaliny na doštičku MALDI a hmotnostného spektrometra MALDI-TOF. Napätie iónového zdroja 1 bolo 25,11 kV; iónového zdroja 2 22,6 kV; reflektora 1 26,5 kV; reflektora 2 13,7 kV a šošovky 8,02 kV. Detekcia iónov prebiehala v pozitívnom režime.

3.6.2 ECHO® 550

Popri optimalizácii sa pracovalo so zariadením Liquid handler – ECHO® 550. Zariadenie využíva zvukovú energiu, čím umožňuje dávkovať zlúčeniny alebo činidlá v množstvách nanolitrov z 384 a 1536 jamkových zdrojových doštičiek na 96, 384, 1536 a 3456 jamkové doštičky. Metóda znižuje množstvo potrebné pre jednotlivé experimenty a zároveň poskytuje bezpečnejší spôsob dávkovania zlúčenín s neznámym bezpečnostným profilom. Za pomoci ultrazvukovej akustickej energie zameranej na meniskus vzorky tekutiny dochádza ku prenosu protokolom definovaného množstva tekutiny z tzv. *source plate* na tzv. *destination plate*. *Source plate* je doska, z ktorej jamiek sú prenášané jednotlivé látky na *destination plate* umiestnenej v prístroji nad *source plate*.¹¹⁶

3.6.3 Optimalizácia assay-e

Optimalizácia pozostávala zo sledovania vplyvu množstva zložiek na fosforyláciu peptidu. Ako prvé bola enzymatická reakcia testovaná pri aplikácii vyšších objemov, čím bola overená funkčnosť reakcie. Následne boli použité nižšie objemy pri testovaní aktivity enzýmov. Paralelne boli testované koncentrácie jednotlivých reagensí. Pri týchto krokoch sa postupovalo automatizovane za využitia uvedených prístrojov (3.4 Prístroje a zariadenia). Pre stanovenie koncentrácie enzýmu (kapitola 4.2, graf 1, 2, 3) boli aplikované rôzne množstvá MARK 1–3 kináz pri stabilnej koncentrácii ATP ($46,40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a substrátu ($0,12 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) stanovených na základe metodiky pre MARK4 enzým⁷.

3.6.4 Koncentrácia enzýmov MARK 1–3

Do doštičky s označením 384 LDV, označovanú ako *source plate*, bol do určených jamiek napipetovaný peptid riedený v destilovanej vode ($10 \mu\text{l}$; $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Rovnako tak bol do iných jamiek napipetovaný enzým riedený v pufrí v pomere 1:1 ($5 \mu\text{l}$) v rozmedzí koncentrácií $0,01\text{--}1,77 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a doska bola vložená do centrifúgy (r.t., 1120 rpm, 60 s). Do doštičky s označením 1536 LDV, označovanú ako *destination*

plate, bol automatizovane za pomoci dávkovača reagens (Multidrop Combi Dispenser) napipetovaný pufoer o objeme 1,5 μl do príslušných jamiek. Na základe stanoveného protokolu bol zo *source plate* do *destination plate* prenesený substrát o objeme 60 nl, enzým (MARK 1–3) o objeme 22,5 nl; následne bol ku preneseným zložkám pomocou dávkovača reagens pridaný roztok ATP o objeme 1 μl .

Reakčná zmes bola inkubovaná pri laboratórnej teplote po dobu 1 hodiny a po uplynutí tejto doby bola zmes zmiešaná s matricou v pomere 1:1. Zmes s matricou bola umiestnená do centrifúgy (r.t., 1120 rpm, 60s) a následne opäť pomocou echoakustického prenosu bola reakčná zmes s matricou (50 μl) prenesená z *destination plate* na *maldi plate*. Zmes bola ponechaná voľne vykryštalizovať a následne bola umiestnená do hmotnostného spektrometra, kde bola meraná intenzita signálu nefosforylovanej a fosforylovanej formy substrátu a následne boli zanalyzované hodnoty fosforylácie. Hodnoty fosforylácie boli prevedené do grafov (graf 1, 2, 3), u ktorých na základe pomeru substrátu ku produktu 1:2 boli zvolené koncentrácie MARK 1–3.

3.6.5 Koncentrácia ATP, teplota, pH

Množstvo ATP bolo stanovené automatizovanou metódou ako v predchádzajúcom meraní, koncentrácia bola testovaná v rozmedzí 3,21–205,35 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Na základe výsledkov a z nich vytvoreného grafu (kapitola 4.3, graf 4, 5, 6) bola následne zvolená optimálna koncentrácia ATP.

Pre stanovenie miery fosforylácie v prípade zmeny teploty (kapitola 4.4, graf 7, 8, 9) bola reakčná zmes inkubovaná pri rôznych teplotných bodoch, a to 6°C, 21°C, 37°C, 60°C, 90°C. Po hodine inkubácie bola reakčná zmes napipetovaná na *maldi plate* v duplikátoch, ku ktorej bol pridaný rovnaký objem matrice. Doštička bola ponechaná na vykryštalizovanie, následne vložená do hmotnostného spektrometra a zanalyzovaná.

Pre optimalizáciu pH (kapitola 4.5, graf 10, 11, 12) boli pripravené roztoky pufov o uvedených hodnotách pH 2,8; 3,8; 5,6; 7,8; 9,3; 10,5; 11,7. Roztoky pufov boli napipetované do vopred označených mikroskúmaviiek, k pufru bol pridaný substrát, MARK 1–3 enzýmy a ATP. Po hodine inkubácie bola reakčná spolu s matricou analogicky ako v prípade teploty aplikovaná na doštičku. Po vykryštalizovaní bola doštička umiestnená do hmotnostného spektrometra a podrobená analýze.

3.6.6 Analýza dát

Dáta získané prostredníctvom MALDI-TOF boli zanalyzované pomocou flexAnalysis 3.4 softvéru. Analyzované signály intenzít substrátu (2701 m/z)

a fosforylovaného produktu (2781 m/z) boli exportované prostredníctvom flexAnalysis dávkovým spracovaním a zanalyzované Excelom a softvérom GraphPad Prism.

Pomer intenzít produktu (I_P) ku substrátu (I_S) poskytoval mieru konverzie nefosforylovaného peptidu na jeho fosforylovanú formu (kapitola 4.1, obr. 14).

$$\text{enzymatická aktivita [\%]} = 100 \cdot \frac{I_P}{I_S}$$

V prípade testovania inhibície MARK enzýmov bol použitý kinázový inhibítor, staurosporín, ktorý slúžil ako kontrola inhibície enzymovej aktivity. *Pomer konverzie v prítomnosti inhibítora (I_{Pi} / I_{Si}) bol porovnaný s pomerom kontrolnej reakcie bez pridaného inhibítora (I_{Pc} / I_{Sc}).*

$$\text{inhibícia [\%]} = 100 - \frac{I_{Pi}/I_{Si}}{I_{Pc}/I_{Sc}}$$

3.6.7 Screening látok

Optimalizovaná assay, s minimalizovaným objemom reakčnej zmesi, pre izoformy MARK 1–3 bola použitá pre screening 16 látok. Ako kontrola bol použitý staurosporín, ktorý bol meraný v rozmedzí koncentrácií 0,3 nmol·l⁻¹–0,5 μmol·l⁻¹. Štruktúra látok nie je uvedená, a to z dôvodu, že látky zatiaľ nie sú patentované. Všetko sú to modifikované nukleozidy, navrhované a syntetizované v skupine profesora Michala Hocka, PhD. DSc, Ústav organickej chémie a chemické biochemie AV ČR (ÚOCHB). Látky boli testované v rozmedzí koncentrácií 0,2 nmol·l⁻¹–50 μmol·l⁻¹ v štyroch opakovaníach. Na základe zanalyzovaných dát za boli za pomoci programu GraphPad Prism 9 zhotovené krivky závislosti inhibície od koncentrácie látok (kapitola 4.6, graf 13, 15, 16 pre staurosporín; príloha 1 pre testované látky) a vypočítané hodnoty IC₅₀ so štandardnými odchýlkami (kapitola 4.6 pre staurosporín; kapitola 4.7, tabuľka 1 pre enzýmy MARK 1–3).

3.6.8 Analýza farmakokinetických parametrov

Látky 1–16 boli po screeningu podrobené analýze farmakokinetických parametrov, a to za použitia programu SwissADME (Swiss Institute of Bioinformatics). SwissADME je od roku 2017 webovým nástrojom, ktorý poskytuje rýchle a robustné prediktívne modely pre fyzikálno-chemické vlastnosti, farmakokinetiku, či podobnosť s liekmi, medzi ktoré patria interné efektívne metódy ako sú BOILED-Egg, iLOGP (implicit log P) a radar biologickej dostupnosti. BOILED-Egg predstavuje intuitívnu

metódu na predpovedanie dvoch kľúčových parametrov ADME, pasívnej gastrointestinálnej absorpcie a priestupnosti hematoencefalickou bariérou. Je to zároveň prvý online nástroj umožňujúci výpočty súvisiace s ADME pre viaceré molekuly, čo umožňuje analýzu chemickej knižnice a efektívnu optimalizáciu tzv. *lead* molekuly.¹¹⁷ Jednotlivé dáta z analýzy pre MARK 1–3 sú uvedené vo výsledkoch (kapitola 4.8).

3.6.9 Vývoj metodiky pre CDK4/6

Súčasťou práce bol tiež vývoj metodiky pre CDK4/6. Pre meranie bol použitý peptid histón H1 (sekvencia „GGGPATP-KKAKKL-COOH“, molekulová hmotnosť 1252 Da) a funkčnosť metodiky bola overená prostredníctvom enzýmu MARK4. Prvým krokom bola detekcia peptidu, ktorého pík bol meraný prostredníctvom MALDI-TOF za prítomnosti nami zvolených podmienok, vždy v rovnakom pomere s matricou. Meranie pozostávalo zo 4 rôznych variantov, a to z:

- 1- detekcie peptidu v prítomnosti matrice v pomere 1:1.
- 2- detekcie peptidu o dvoch rozdielnych koncentráciách – **0,67 mg·ml⁻¹; 3,33 mg·ml⁻¹**
- 3- detekcie peptidu riedeného do reakčnej zmesi bez prítomnosti enzýmu. Reakčná zmes pozostávala z peptidu (**1 µl**), pufru (**3 µl**) a ATP (108,5 µmol·l⁻¹; **3,5 µl**). V tomto bode prebiehali dve merania, prvé meranie bolo za prítomnosti roztokov pufru a ATP, ktoré boli pripravené analogicky experimentom pre MARK 1–3, druhé meranie bolo bez prídavku DTT do reakčnej zmesi.
- 4- detekcie peptidu v reakčnej zmesi v prítomnosti enzýmu CDK4/CycD3.

Pre meranie variantu s enzýmom boli použité CDK4/CycD3 od dvoch rozdielnych dodávateľov. V prípade enzýmu od Cerna Biosciences, Inc. pozostávala reakčná zmes z enzýmu (**1 µl**), peptidu (**5 mg·ml⁻¹; 1 µl**), pufru bez DTT (**2 µl**) a ATP bez DTT (**3,5 µl**). V prípade enzýmu od SignalChem pozostávala reakčná zmes z enzýmu (**1,5 µl**), peptidu (**5 mg·ml⁻¹, 1 µl**), pufru bez DTT (**1,5 µl**) a ATP bez DTT (**3,5 µl**). V prítomnosti enzýmov bol pík detekovaný ihneď po príprave reakčnej zmesi a následne po inkubácii 60 a 120 minút. Dáta z MALDI-TOF boli vyhodnotené a spektrá sú uvedené vo výsledkoch (kapitola 4.9).

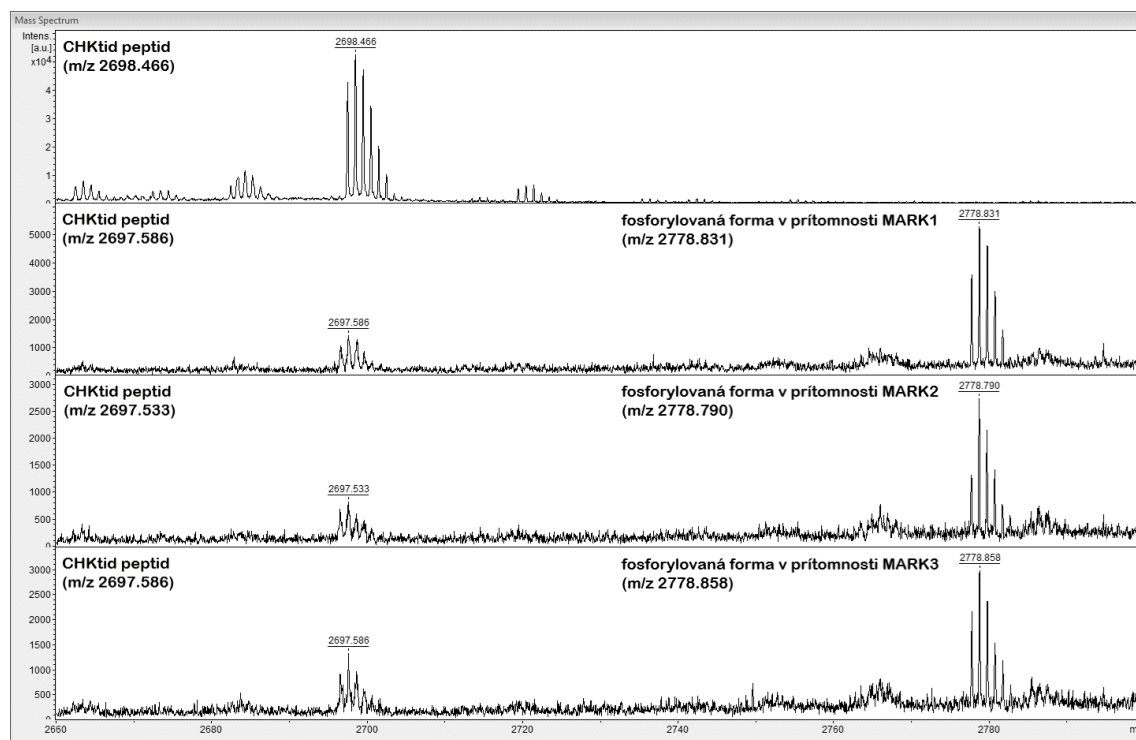
Po premeraní vyššie uvedených štyroch variantov, sa pokračovalo v optimalizácii reakčných podmienok pre detekciu píku v prítomnosti enzýmu. Experiment pozostával z enzýmu od SignalChem (3 µl), peptidu (1 mg·ml⁻¹, 5 mg·ml⁻¹; 1 µl) a ATP bez DTT (5,5 µl). Jednotlivé reakčné zmesi boli inkubované po dobu 60 minút a vyhodnotené (kapitola 4.9).

4 Výsledky

4.1 MARK assay

Assay bola založená na priamej detekcii peptidu, ktorého molekulová hmotnosť odpovedala **2701 Da**, a jeho fosforylovanej formy s molekulovou hmotnosťou **2781 Da**. Detekcia prebiehala pomocou MALDI-TOF MS.

Obr. 14 zobrazuje 4 hmotnostné spektrá, prvé spektrum predstavuje samotný peptid bez prítomnosti MARK enzýmov. Zvyšné tri spektrá zobrazujú peptid v prítomnosti MARK 1–3 enzýmov.



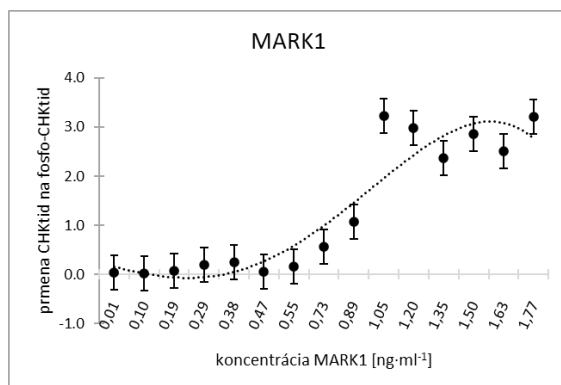
obr. 15- Hmotnostné spektrá – CHK2id peptid, CHK2id peptid v prítomnosti MARK 1–3

Nevyhnutným bodom assay-e bolo stanoviť optimálne podmienky pre MARK 1–3 enzýmy. Vývoj pozostával z optimalizácie koncentrácie enzýmov, koncentrácie ATP, teploty reakcie a pH pufru.

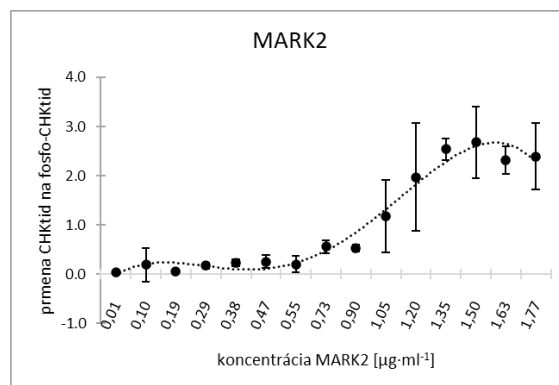
4.2 Optimalizácia koncentrácie enzýmov MARK 1–3

Prvým bodom optimalizácie assay-e bolo určiť vhodné hodnoty koncentrácií MARK enzýmov. Koncentrácie boli testované v rozmedzí **0,01–1,77 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$** . Koncentrácia ATP ($46,40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a substrátu ($0,12 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) boli stanovené podľa optimalizovanej metodiky pre MARK4 enzým.⁷ Podľa týchto hodnôt boli vyhodnotené **grafy 1–3**, ktoré zobrazujú mieru fosforylácie CHKtid peptidu na fosfo-CHKtid peptid pri rôznych koncentráciách enzýmov. Hodnoty boli zvolené nasledovne, a to na základe pomeru konverzie substrátu na produkt **1:2**.

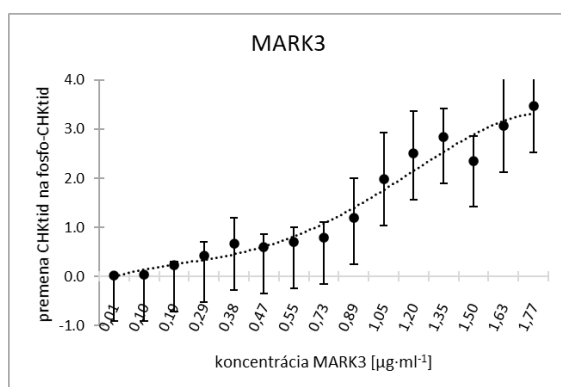
- c (MARK1) = **1,05 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$**
- c (MARK2) = **1,20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$**
- c (MARK3) = **1,20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$**



graf 1- fosforylácia CHKtid peptidu v závislosti na zmene koncentrácie enzýmu MARK1



graf 2- fosforylácia CHKtid peptidu v závislosti na zmene koncentrácie enzýmu MARK2



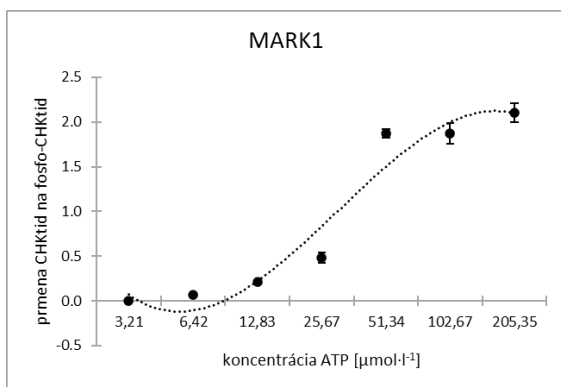
graf 3- fosforylácia CHKtid peptidu v závislosti na zmene koncentrácie enzýmu MARK3

Podľa zvolených hodnôt koncentrácií enzýmov MARK 1–3 bola v druhom bode optimalizovaná koncentrácia ATP.

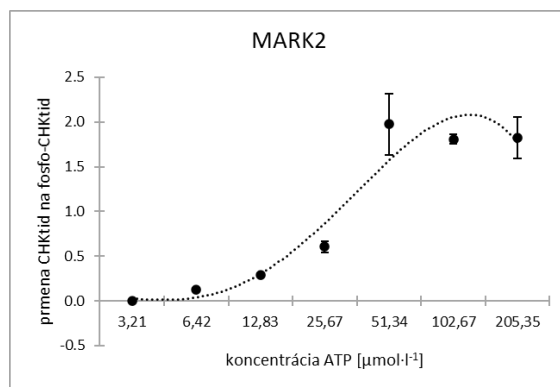
4.3 Optimalizácia koncentrácie ATP

Koncentrácia ATP bola testovaná v rozmedzí **3,21–205,35 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$** . Hodnoty koncentrácií enzýmov boli stanovené podľa predchádzajúceho experimentu, množstvo CHKtid peptidu ($0,12 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) bolo nastavené podľa metodiky pre MARK4 enzým.⁷ Na základe získaných hodnôt boli vytvorené **grafy 4–6**, ktoré ukazujú mieru konverzie peptidu na fosforylovanú formu v prítomnosti MARK 1–3 enzýmov pri rôznych hodnotách koncentrácie ATP roztoku. Ako optimálna koncentrácia ATP bola zvolená hodnota **51,34 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$** .

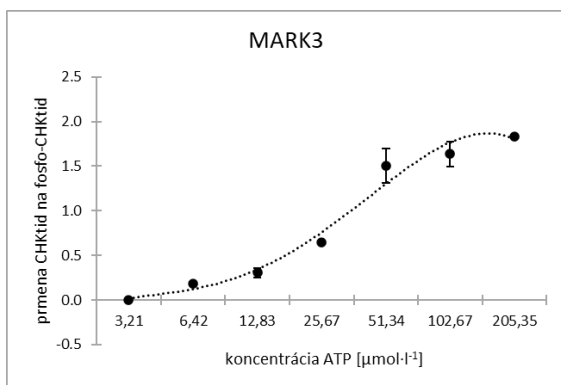
S narastajúcou koncentráciou ATP už nedochádzalo ku výraznému nárastu aktivity a fosforylácii, tým pádom sa zvolený koncentračný bod javil ako optimálny pre ďalšie experimenty. Popri optimalizácii ATP sme zistili, že nami zvolené hodnoty koncentrácií enzýmov odpovedajú zvolenej hodnote ATP. Z toho dôvodu nebolo nutné späťne pretestovať koncentrácie enzýmov, a to vzhľadom k tomu, že by boli nastavené rovnaké podmienky ako pri prvotnom testovaní. So stanovenými hodnotami koncentrácií enzýmov MARK 1–3 a ATP bola následne optimalizovaná teplota reakcie a pH pufru.



graf 4- fosforylácia CHKtid peptidu v závislosti na zmene koncentrácie ATP v prípade enzýmu MARK1



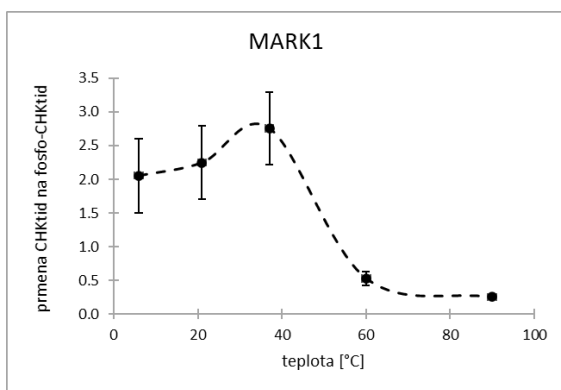
graf 5- fosforylácia CHKtid peptidu v závislosti na zmene koncentrácie ATP v prípade enzýmu MARK2



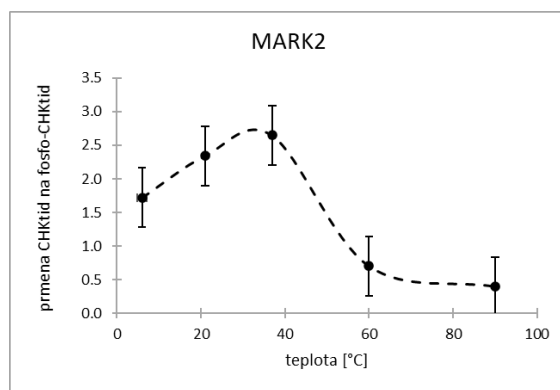
graf 6- fosforylácia CHKtid peptidu v závislosti na zmene koncentrácie ATP v prípade enzýmu MARK3

4.4 Optimalizácia teploty reakcie

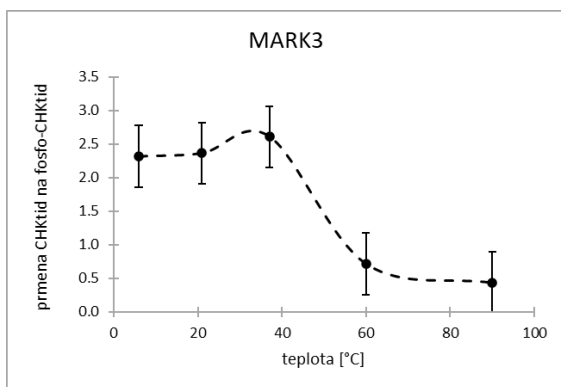
Tretím bodom optimalizácie metodiky bolo testovanie teploty reakcie pre každý enzým. Hodnoty teplôt boli nasledovné – **6°C, 21°C, 37°C, 60°C, 90°C**. Reakcia prebiehala za nami optimalizovaných koncentrácií enzýmov a ATP, koncentrácia peptidu ($0,12 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) bola zvolená na základe metodiky pre MARK 4 enzým. **Grafy 7–9** zobrazujú priebeh reakcie pri odlišných teplotách inkubácie reakcie. Ako optimálna teplota bola zvolená hodnota **21°C**, teda laboratórna teplota, pri ktorej prebiehali všetky experimenty. Teplota 37°C vykazovala minimálne zvýšenú aktivitu, pričom tento rozdiel nijako výrazne neovplyvňoval merania, a z toho dôvodu sme reakčné zmesi nechávali inkubovať pri laboratórnej teplote.



graf 7- fosforylácia CHKtid peptidu v závislosti na zmene teploty reakcie v prípade enzýmu MARK1



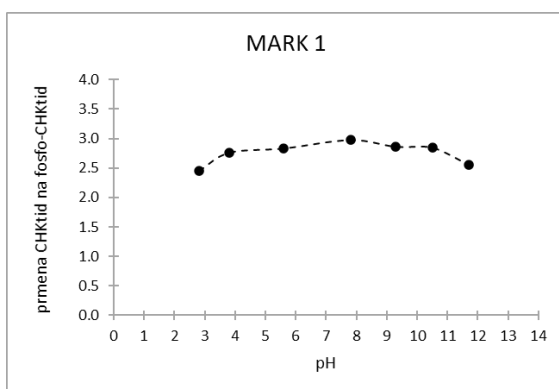
graf 8- fosforylácia CHKtid peptidu v závislosti na zmene teploty reakcie v prípade enzýmu MARK2



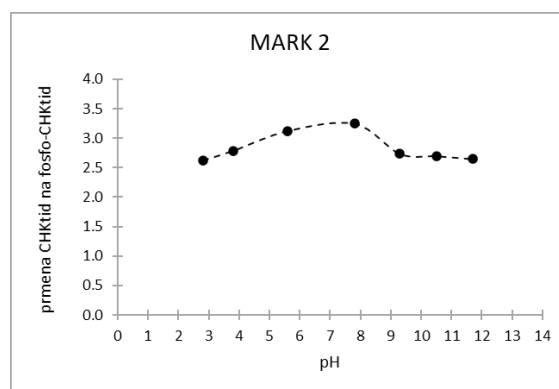
graf 9- fosforylácia CHKtid peptidu v závislosti na zmene teploty reakcie v prípade enzýmu MARK3

4.5 Optimalizácia pH reakcie

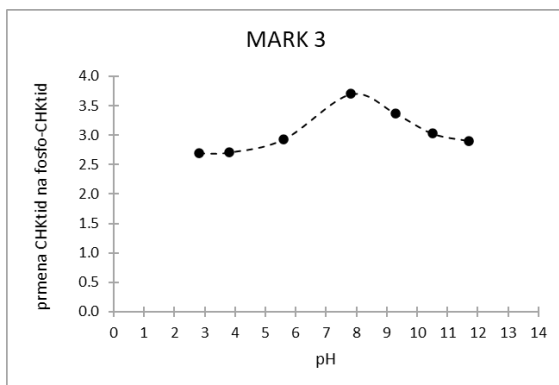
Posledným bodom optimalizácie metodiky bolo testovanie pH pufru – **2,8; 3,8; 5,6; 7,8; 9,3; 10,5; 11,7** s použitím nami stanovených hodnôt koncentrácií enzýmov, ATP a teploty reakcie. Množstvo peptidu ($0,12 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) bolo stanovené na základe metodiky pre MARK4.⁷ pH optimum bolo určené po vyhodnotení experimentu prevedeného do **grafov 10–12** pre jednotlivé enzýmy, a to ako hodnota **7,8**, ktorá vystupuje v grafoch ako optimálna.



graf 10- fosforylácia CHKtid peptidu v závislosti na zmene pH reakcie v prípade enzýmu MARK1



graf 11- fosforylácia CHKtid peptidu v závislosti na zmene pH reakcie v prípade enzýmu MARK2

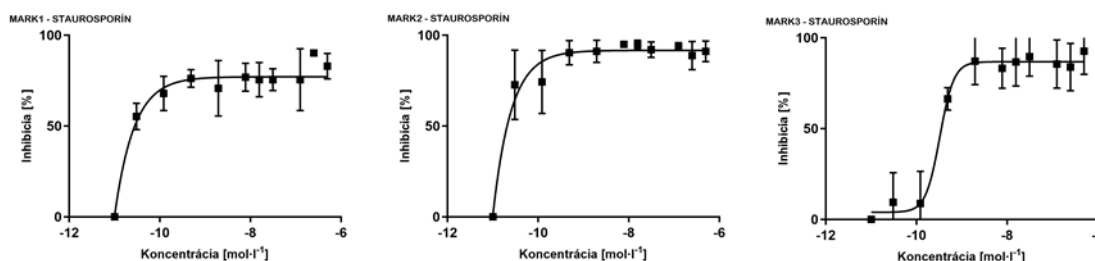


graf 12- fosforylácia CHKtid peptidu v závislosti na zmene pH reakcie v prípade enzýmu MARK3

4.6 Inhibícia enzýmovej aktivity

Po optimalizácii vyššie uvedených bodov bolo potrebné otestovať schopnosť assay-e detekovať inhibíciu enzymatickej aktivity. Ako kontrolný inhibítor bol použitý staurosporín, kinázový inhibítor, s ktorým sme vyhodnotili anti-MARK aktivitu v závislosti od množstva dávky, ktoré sa pohybovalo v rozmedzí **0,3 nmol·l⁻¹–0,5 μmol·l⁻¹**. Krivky závislosti inhibície od koncentrácie sú uvedené v **grafoch 13–15**. Staurosporín inhiboval všetky tri izoformy s nasledujúcimi hodnotami IC₅₀:

- staurosporín IC₅₀ (MARK1) = **0,180 nmol·l⁻¹ ± 0,018**
- staurosporín IC₅₀ (MARK2) = **0,052 nmol·l⁻¹ ± 0,001**
- staurosporín IC₅₀ (MARK3) = **0,490 nmol·l⁻¹ ± 0,015**



graf 13, 14, 15- inhibícia MARK 1–3 kinázovým inhibítorom staurosporínom za optimalizovaných podmienok

4.7 Screening látok knižnice UMTM

Screening pozostával z analýzy potenciálnej anti-MARK aktivity **16 látok**. Hodnoty IC_{50} sú uvedené v **tabuľke 1**, jednotlivé krivky závislosti inhibície od koncentrácie pre látky 1–16 v prítomnosti enzýmov MARK 1–3 sú uvedené v **prílohe 1**.

tabuľka 1- Hodnoty IC_{50} a štandardných odchýlok (SD) 16 testovaných látok proti MARK 1–3, $n = 4$

Látka	MARK1	SD	MARK2	SD	MARK3	SD
	$IC_{50} (\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1})$		$IC_{50} (\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1})$		$IC_{50} (\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1})$	
1	0,0121	0,1497	0,0172	0,1433	0,4178	0,1586
2	0,0084	0,1166	0,0006	0,1480	0,0048	0,1163
3	0,0102	0,0937	0,0019	0,1333	0,3491	0,1614
4	0,0110	0,1560	0,4416	0,1309	0,4539	0,1879
5	0,3776	0,1497	0,0710	0,1602	0,0098	0,1442
6	0,1683	0,1161	4,0458	0,1032	9,0573	0,1135
7	0,6281	0,1144	2,9174	0,1870	0,1486	0,1113
8	1,0495	0,1733	0,5957	0,1599	0,0940	0,1583
9	0,0982	0,1780	0,0376	0,2178	0,4498	0,1264
10	0,2388	0,1286	37,9315	0,1334	0,0005	0,1952
11	2,3878	0,1835	1,9320	0,2228	0,1837	0,1206
12	0,0004	0,2106	1,8707	0,1598	0,1954	0,1247
13	0,3373	0,1616	0,3388	0,1235	0,1538	0,1127
14	0,0714	0,1144	0,0157	0,1943	173,7801	0,1829
15	15,8125	0,1744	68,3912	0,1723	144,8772	0,2621
16	0,3055	0,1608	0,3524	0,1494	21,0378	0,1960

Všetkých 16 potenciálnych inhibítorov bolo testovaných v štyroch opakovaníach. Pre MARK 1–3 enzýmy sme identifikovali nasledujúce látky s výrazne nižšou hodnotou IC_{50} (**< 0,01 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$**) v porovnaní s ostatnými molekulami:

v prípade **MARK1**: IC_{50} (látka 2) = **0,0084 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$**
 IC_{50} (látka 12) = **0,0004 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$**

v prípade **MARK 2** IC_{50} (látka 2) = **0,0006 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$**
 IC_{50} (látka 3) = **0,0019 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$**

v prípade **MARK 3** IC_{50} (látka 2) = **0,0048 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$**
 IC_{50} (látka 5) = **0,0098 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$**
 IC_{50} (látka 10) = **0,0005 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$**

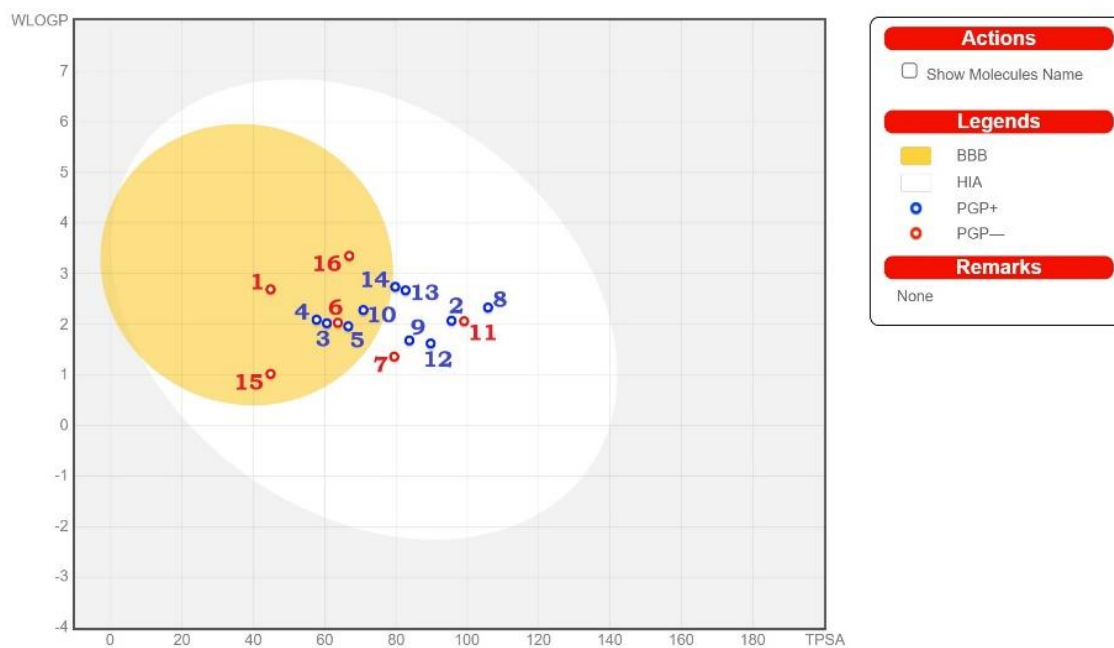
4.8 Analýza farmakokinetických parametrov látok

Látky 1–16 boli podrobené analýze farmakokinetických parametrov prostredníctvom SwissADME. Hodnoty sú uvedené v **tabuľke 2**, miera schopnosti látok prechádzať BBB je predpovedaná pomocou modelu BOILED-Egg (**obr. 15**). Žltá časť zobrazuje látky schopné prechádzať BBB, biela časť látky absorbované gastrointestinálnym traktom, šedá časť definuje látky s nízkou biologickou dostupnosťou.

tabuľka 2- Vybrané farmakokinetické parametre pre látky 1–16 vypočítané pomocou SwissADME

	M	RB	HBA	HBD	TPSA	log P	BBB	P-gp
1	238,29	2	2	1	44,81	2,48	✓	✗
2	231,28	2	3	2	95,55	1,55	✗	✓
3	227,27	2	2	2	60,60	1,61	✓	✓
4	239,28	2	3	1	57,70	1,75	✓	✓
5	214,22	2	3	2	66,59	1,60	✓	✓
6	226,23	2	4	1	63,69	1,73	✓	✗
7	215,21	2	4	2	79,48	1,12	✗	✗
8	257,31	2	3	2	105,78	1,77	✗	✓
9	254,29	2	3	2	83,72	1,39	✗	✓
10	253,30	2	2	2	70,83	1,94	✓	✓
11	353,30	3	7	2	99,08	2,02	✗	✗
12	241,25	2	4	2	89,71	1,36	✗	✓
13	230,29	2	2	2	82,66	2,04	✗	✓
14	242,30	2	3	1	79,76	2,19	✗	✓
15	162,19	1	2	1	44,81	1,04	✓	✗
16	241,31	2	2	1	66,87	2,94	✓	✗

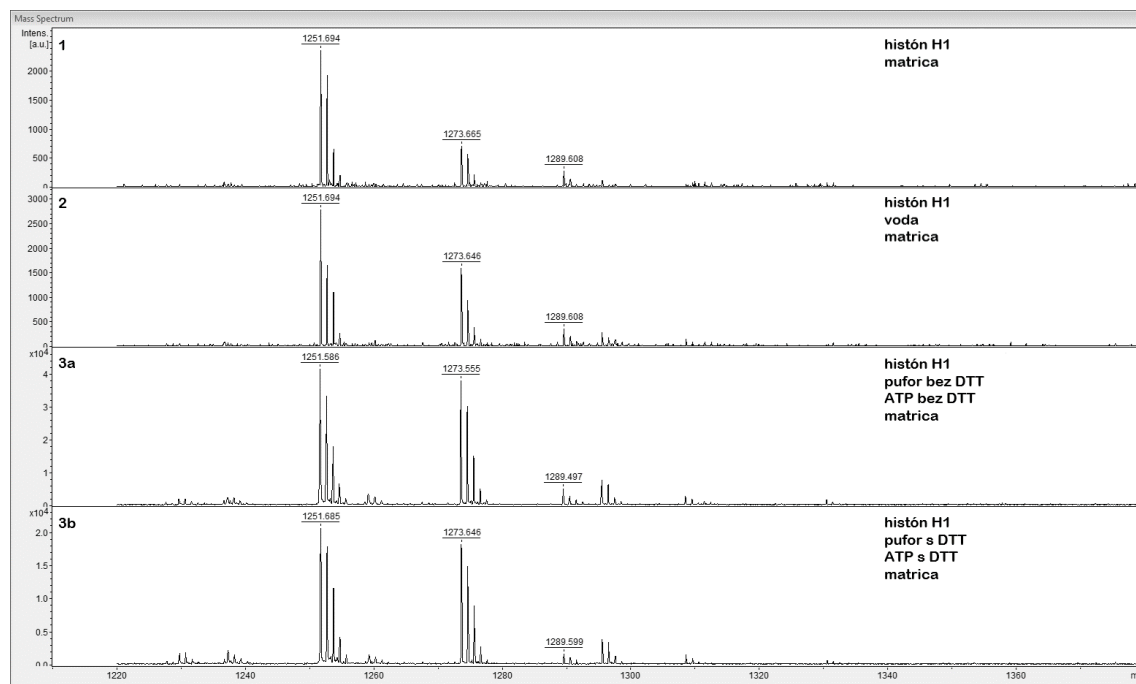
M ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)		molekulová hmotnosť
RB (№)		počet rotačných väzieb
HBA (№)		počet vodíkových akceptorov
HBD (№)		počet vodíkových donorov
TPSA ($\text{\AA}^2$)		topologická polárna plocha povrchu
log P		rozdeľovací koeficient oktanol/voda, lipofilita
BBB		priepustnosť cez hematoencefalickú bariéru
P-gp		substrát pre P-glykoproteín
✓/✗		symbol označujúci priepustnosť/nepriepustnosť BBB, symbol označujúci látku za substrát P-glykoproteínu



obr. 16- BOILED EGG – predikcia BBB permeácie a intestinálnej absorpcie látok 1–16

4.9 Metodika pre CDK4/CycD3

Vývoj metodiky pre CDK4/CycD3 pozostával z detekcie peptidu v nasledujúcich 4 variantoch. Spektrá pre prvé tri varianty peptidu môžeme vidieť na **obr. 16**. Molekulová hmotnosť histónu H1 odpovedá ~1252 Da.

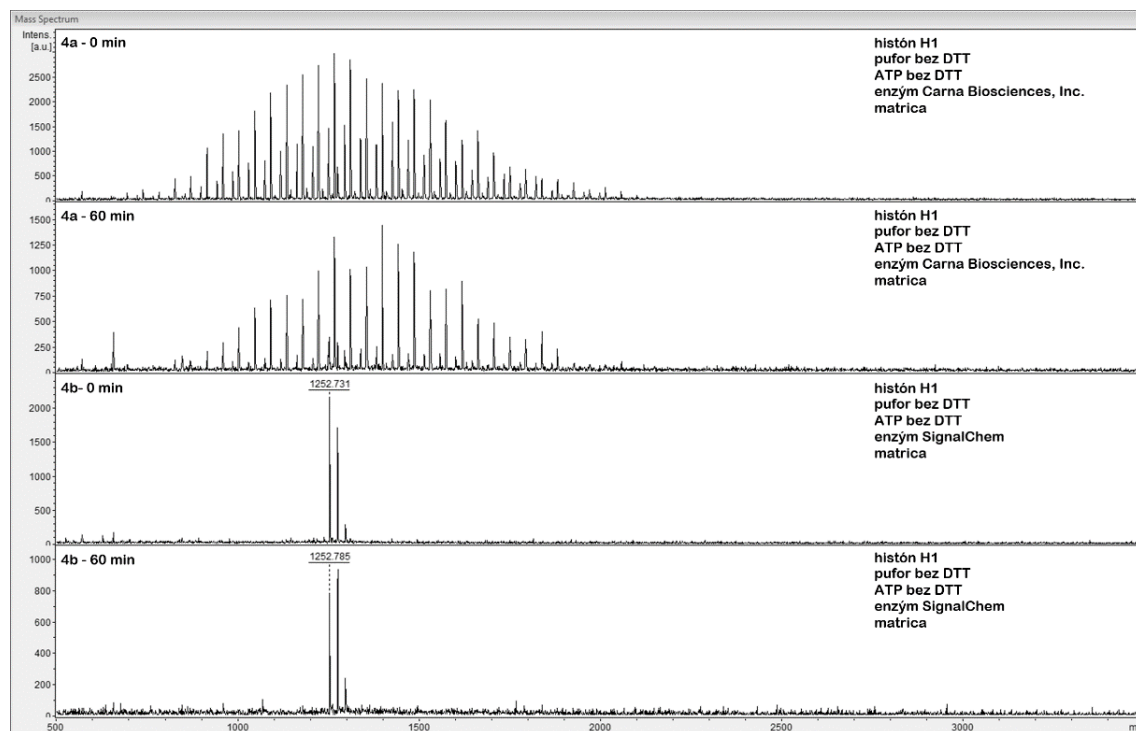


obr. 17- Hmotnostné spektrá: 1 peptid + matrica, 2 peptid v prítomnosti vody + matrica, 3a peptid v prítomnosti reakčnej zmesi bez DTT + matrica, 3b peptid v prítomnosti reakčnej zmesi s DTT + matrica

V prvých dvoch variantoch sme si overili detekciu peptidu o dvoch rozdielnych koncentráciách ($1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). V prvom variante sme testovali peptid v prítomnosti matrice v pomere 1:1, v druhom variante sme peptid riedili vo vode, vzorku sme testovali v prítomnosti matrice v pomere 1:1. Koncentrovanejšia forma peptidu sa javila ako lepšie detekovateľná, a z toho dôvodu sme vo variantoch 3 a 4 pokračovali už len s vyššou koncentráciou peptidu ($5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Na **spektrách 1, 2 (obr. 16)** môžeme pozorovať rovnaké správanie histónu H1 v prítomnosti vody a reakčnej zmesi. Vzhľadom ku absencii enzýmu nedochádza ku posunu píku.

Tretí variant slúžil na overenie správania sa látky DTT v reakčnej zmesi, a teda aby sme mohli vylúčiť pravdepodobnosť vzniku šumu, ktorý by mohol teoreticky vznikáť práve prítomným DTT. **Spektrá 3a, 3b (obr. 16)** poukazujú na rovnaké správanie enzýmu v reakčnej zmesi bez prídavku DTT a s prídavkom DTT. Môžeme pozorovať, že nedochádza ku žiadnej zmene, a teda DTT nie je látka, ktorá by ovplyvňovala detekciu píku.

Spektrá pre prvé štvrtý variant peptidu môžeme vidieť na **obr. 17**.



*obr. 18- Hmotnostné spektrá pre reakciu s enzýmom:
4a reakcia s enzýmom od Carna Bioscience, Inc. 0 min, 60 min po inkubácii
4b reakcia s enzýmom od SignalChem 0 min, 60 min po inkubácii*

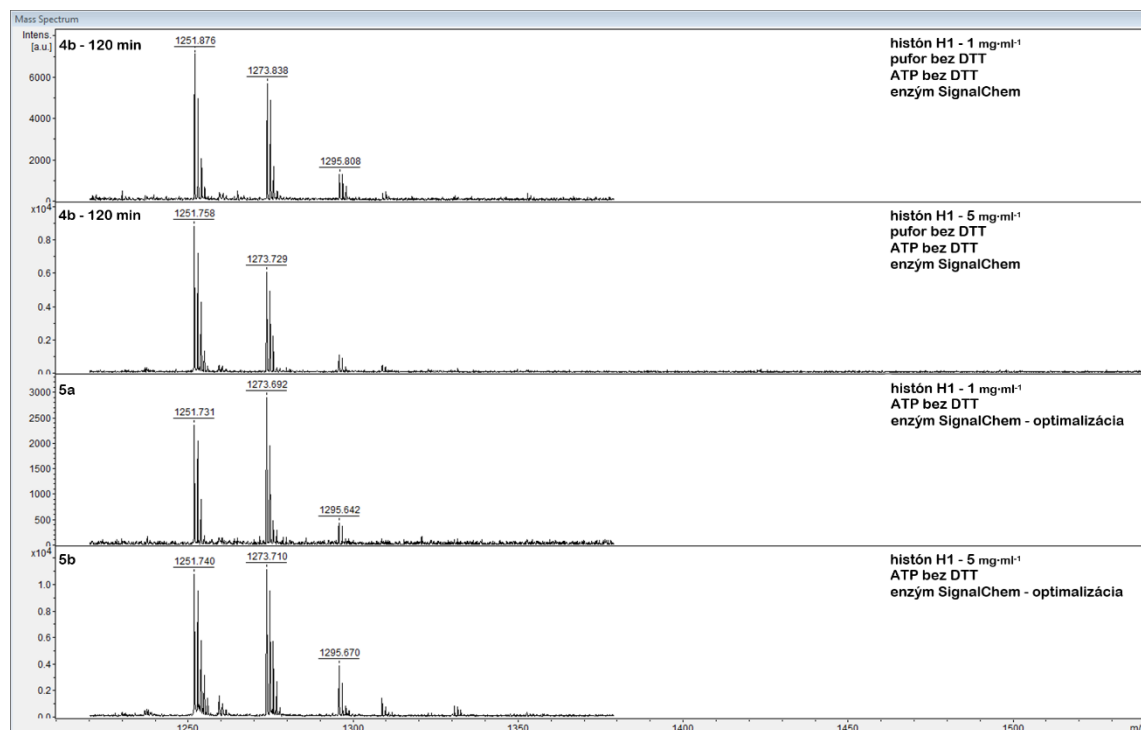
Variant 4 pozostával z detekcie peptidu ($5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) v prítomnosti enzýmu. Pre experiment boli použité dva typy CDK/CycD3 od rozdielnych dodávateľov. Meranie prebiehalo po príprave reakčnej zmesi a po 60 minútovej inkubácii pri laboratórnej teplote.

V prípade enzýmu od Carna Biosciences, Inc. (**spektrá 4a – 0, 60 min; obr. 17**) dochádzalo ku brzdeniu intenzity signálu, ktoré bolo spôsobené prítomnosťou detergentu Brij35, interferujúcou zložkou v skladovacom pufrí.

Enzým poskytovaný SignalChem neobsahoval v pufrí žiadnu zložku, ktorá by spôsobovala rušenie signálu, vďaka čomu bolo možné identifikovať nefosforylovanú formu peptidu. V spektrách **4b – 0 min (obr. 17)** získaných ihneď po príprave reakčnej zmesi sme nedetekovali fosforylovaný pík, a bohužiaľ tomu tak bolo aj po uplynutí 60 minút (**spektrum 4b – 60 min; obr. 17**). Počas inkubácie nedochádzalo ku fosforylácii a tým pádom nevznikala fosforylovaná forma peptidu, ktorú by sme mohli detekovať a analyzovať.

Z dôvodu nulového nárastu fosforylovaného píku sa reakčná zmes s enzýmom nechala inkubovať po dobu 120 minút, pričom boli použité obe koncentrácie peptidu ($1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Zároveň boli optimalizované koncentrácie enzýmov a zmes sa

zanalyzovala po 60 minútach inkubácie pri laboratórnej teplote. Jednotlivé spektrá optimalizovanej reakcie sú zobrazené na **obr. 18**, na ktorých môžeme sledovať nefosforylovanú formu peptidu bez prítomnosti fosforylovaného píku.



obr. 19- Hmotnostné spektrá po optimalizácii: 4b predĺžená inkubačná doba; 5 optimalizovaná koncentrácia enzýmu

5 Diskusia

Eukaryotické bunky sú štrukturálne podporované tromi rozsiahlymi cytoskeletálnymi sieťami, ktorých cytoskelet je tvorený na báze vlákien aktínových, intermediárnych, či mikrotubulárnych. Môžeme predpokladať, že práve tieto tri komplexné proteínové systémy musia byť presne koordinované a prísne regulované, aby sa zachovala bunková homeostáza na všetkých úrovniach.¹¹⁸ Pre bunkové procesy ako je regulácia tvaru buniek a polarita počas proliferácie, delenie chromozómov pri mitóze, intracelulárny transport organel, či neuronálna diferenciácia, sú to práve MT, ktoré predstavujú kľúčovú zložku pre ich správne fungovanie.⁷³ Počas týchto procesov prechádzajú MT preskupeniami, ktoré zahŕňajú rýchle prechody medzi stabilnými a dynamickými stavmi. MT sú regulované rôznymi faktormi a proteínmi, vrátane proteínov spojených s mikrotubulami. MAP/MARK kináza bola prvýkrát objavená v mozgu pre svoju úlohu pri fosforylácii tau proteínov.^{73,118}

Funkciou tau v neurónoch je stabilizovať MT a zabezpečiť axonálny transport pozdĺž MT. V degenerujúcich neurónoch je tau hyperfosforylovaný, oddeľuje sa od MT a agreguje do patologických filamentov. Ku zvýšenej fosforylácii dochádza v ranom štádiu AD, pričom výskum zameraný na identifikáciu kinázy zodpovednej za túto abnormalitu označil MARK enzýmy ako cieľové molekuly.¹¹⁹

Keďže ku regulácii interakcie medzi tau proteínmi a MT dochádza prostredníctvom fosforylácie, tak sa veľká časť výskumu venuje identifikácii kináz, ktoré katalyzujú prenos fosfátovej skupiny na tau. Tieto proteíny sú natívne nerozvinuté molekuly a ich posttranslačné modifikácie ovplyvňujú procesy oligomerizácie a agregácie. Tau proteíny disponujú veľkým počtom fosforylovateľných zvyškov, väčšinou Ser alebo Thr, ktoré môžu byť cieľom pre mnoho kináz.^{120,121} Z tohto dôvodu je komplikované posúdiť, ktorá kombinácia kinázy a fosforylačného miesta je zodpovedná za kritické zmeny v tau proteínoch. Výskum odhalil „KXGS“ opakujúce sa motívy v doméne tau obsahujúce aminokyselinu serín v polohách 262, 293, 324 a 356.^{77,119} Skorá fosforylácia neurónového tau práve na Ser²⁶² a Ser³⁵⁶ dramaticky reguluje mikrotubulovú väzbu, intracelulárnu lokalizáciu a interakcie proteín-proteín.^{73,82,119,121,122} U AD sú prostredníctvom MARK fosforylované iba serínové zvyšky v polohe 262 a 356.⁷⁷ Fosforylácia tau na Ser²⁶² hrá prevládajúcu úlohu pri stabilizácii tau, a to pokiaľ je aktivita MARK normálna. Fosforylácia na Ser³⁵⁶ začína prispievať k tomuto procesu, až keď je aktivita kinázy abnormálne zvýšená.^{123,124}

Z dôvodu podobnej aminokyselinovej sekvencie aktivačnej slučky medzi izoformami MARK 1–4 môžeme predpokladať, že všetky štyri kinázy sú regulované

podobne. Tieto údaje naznačujú, že vývoj inhibítorov MARK je nevyhnutný a kinázy predstavujú zaujímavý terapeutický cieľ.⁷⁷ Na základe vzťahu k fosforylácii tau v neurofibrilárnej patológii nás zaujímajú zlúčeniny s nízkou molekulovou hmotnosťou, ktorými možno modulovať aktivitu MARK.⁷¹ Hoci je známych mnoho zlúčenín majúcich anti-MARK aktivitu, ich premena na potenciálneho kandidáta na liečivo stále zaostáva.⁷⁴ Je zložitá predpokladať spôsob, akým bude malá molekula interagovať s nespočetným množstvom cieľov, ktoré riadia základné biologické postupy. Vysokovýkonné metódy (HTS), či drug design založený na štruktúre umožňujú identifikovať molekuly s väzbovými afinitami.⁸⁸

Podstatou nášho výskumu bolo zamerať sa na identifikáciu potenciálnych inhibítorov MARK 1–3, a to na základe optimalizovanej assay-e. V práci sme vychádzali z metodiky vyvinutej pre MARK4 enzým, ktorá je založená na vysokovýkonnej kompatibilnej assay-i na priamu detekciu enzymatickej aktivity MARK pomocou echoakustického prenosu a hmotnostného spektrometra MALDI-TOF. Použitie bezkontaktného prenosu umožnilo manipuláciu so vzorkami o nanolitrových objemoch, a zároveň predchádzalo zvýšenej kontaminácii vzoriek. Hodnotenie enzymatickej aktivity bolo založené na priamej detekcii substrátu a produktu, vďaka čomu nebolo nutné použiť chromogénne substráty, či značené rádionuklidy.⁷

MALDI-TOF MS sa v porovnaní s inými metódami osvedčil ako presvedčivý nástroj a bol aplikovaný pre veľké množstvo enzýmov, vrátane E3 ligáz, kináz, fosfatáz, β -sekretáz, histón demetyláz, acetylcholinesteráz, či cyklických guanozínmonofosfát-adenozínmonofosfát (GMP-AMP) syntáz.¹²⁵ Metódy založené na báze fluorescencie, chemoluminiscencie a na báze protilátok predstavujú síce robustné, citlivé a rýchle prístupy, majú však niekoľko nevýhod. Kvôli ch autofluorescencii alebo vlastnostiam zhášania signálu sú obzvlášť náchylné na falošné pozitíva a negatíva, a zároveň môžu tiež vyžadovať vývoj špecifických protilátok alebo značených substrátov.¹²⁶ Úspech MALDI-TOF MS závisí od viacerých faktorov.¹²⁵ Ako už bolo spomenuté, metóda obchádza nutnosť prítomnosti iných molekúl, čím si zachováva svoju vysokú citlivosť, rýchlosť, robustnosť signálu a vysokú priepustnosť. Zároveň je schopná priamo kvantifikovať širokú škálu komponentov assay-e, ktorými sú substráty a produkty enzymatických reakcií, čím eliminuje časovú náročnosť. Vyžaduje tiež minimálnu prípravu vzoriek v porovnaní so štandardnými technikami kvapalinovej chromatografie a má relatívne vysokú toleranciu voči kontaminantom.^{125–129}

Hlavnými výzvami v prípade použitia MALDI-TOF MS je úprava zloženia testovacieho pufru tak, aby zodpovedal kompatibilitu MS, pričom enzymatická aktivita zostáva nedotknutá. Druhým bodom je prispôbená integrácia do automatizovaného procesu manipulácie s kvapalinou so zameraním na náročný prenos na cieľovú maldi

doštičku. Pre tento prenos sú k dispozícii viaceré možnosti, medzi nimi aj nami používaný akustický manipulátor reagentií ECHO® 550.^{126,128}

Významnou výhodou analýzy založenej na MALDI-TOF MS je súčasná detekcia viacerých zložiek, a teda možnosť detekovať signály súčasne. Nevýhodou je brzdenie intenzity signálu spôsobené interferujúcimi zložkami v testovacom pufrí. Sú to najmä soli a detergenty, ktoré znižujú účinnosť ionizácie v rámci procesu MALDI-TOF. Z tohto dôvodu je nutná úprava použitých zložiek pufru a príslušných koncentrácií. Na druhú stranu sú detergenty nevyhnutné pre enzymatické testy, a to tým, že znižujú nešpecifickú väzbu, zvyšujú rozpustnosť enzýmov a bránia zrážaniu zlúčenín.^{126–128}

Väčšina peptidov dobre ionizuje pomocou MALDI-TOF, avšak v minulosti sa preukázalo, že účinnosť ionizácie závisí od zásaditosti peptidov v plynnej fáze. Peptidy bohaté na arginín a lyzín majú tendenciu mať lepšie odozvy, a z tohto dôvodu bol aj v našej práci použitý komerčne dostupný CHKtid peptid.¹³⁰

Použitie MALDI-TOF MS v kombinácii s echoakustickým prenosom má však aj svoje obmedzenia. Pre spoľahlivý akustický prenos existuje pomerne prísne obmedzenie prenášaného objemu.¹²⁸ Možnou nevýhodou je tiež fakt, že metóda je vhodná pre substráty s molekulovou hmotnosťou vyššou ako 500 Da, pričom pri nižších molekulových hmotnostiach môže dochádzať ku interferencii s molekulami matrice a inými aduktmi reakčného pufru.⁷

Optimalizácia assay-e založenej na MALDI-TOF MS pozostávala z úpravy koncentrácie MARK 1–3, koncentrácie ATP, pH pufru a teploty, pri ktorej sa nechala reakčná zmes inkubovať. Experimenty prebiehali analogicky pre každý enzým, jednotlivé body boli premerané v uvedenom rozmedzí (kapitola 4.2–4.5). Hodnoty boli stanovené nasledovne: koncentrácia MARK1 (**1,05 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$**), MARK2 (**1,20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$**), MARK3 (**1,05 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$**); koncentrácia ATP (**51,34 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$**); pH pufru (**7,8**); teplota (**21°C**). Po optimalizácii nasledoval experiment, ktorým bola overená schopnosť assay-e detekovať inhibíciu enzýmovej aktivity. Ako kontrola bol zvolený staurosporín, ATP-kompetetívny kinázový inhibítor, ktorý inhiboval všetky tri izoformy MARK s hodnotami IC_{50} : **0,13 $\pm$ nmol $\cdot\text{l}^{-1}$ $\pm$ 0,19** (MARK1), **0,04 nmol $\cdot\text{l}^{-1}$ $\pm$ 0,17** (MARK2), **0,56 nmol $\cdot\text{l}^{-1}$ $\pm$ 0,16** (MARK3).

Optimalizovaná metodika bola aplikovaná na 16 látok radených medzi potenciálne nukleozidové inhibítory.

Pre MARK1 sme identifikovali päť látok s hodnotou $\text{IC}_{50} < 0,02 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; a to látku **1 (0,0121 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)**, látku **2 (0,0084 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)**, látku **3 (0,0102 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)**, látku **4 (0,0110 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)** a látku **12 (0,0004 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)**.

Pre MARK2 sme identifikovali štyri látky s hodnotou $IC_{50} < 0,02 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; a to látku **1** (**$0,0172 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$**), látku **2** (**$0,0006 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$**), látku **3** (**$0,0019 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$**) a látku **14** (**$0,0157 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$**).

Pre MARK3 sme identifikovali tri látky s hodnotou $IC_{50} < 0,02 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; a to látku **2** (**$0,0048 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$**), látku **5** (**$0,0098 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$**) a látku **10** (**$0,0005 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$**).

V prípade MARK1 bola najaktívnejšia zlúčenina 12, u MARK2 sa jednalo o látku 2 a voči MARK3 to bola molekula 10. Látka 2 vykazovala určitú selektivitu ku všetkým 3 izoformám, a naopak najvyššie hodnoty IC_{50} voči všetkým enzýmom boli namerané u látky 15.

Molekuly 1 a 3 boli selektívne pre izoformy MARK1 a MARK2, pričom MARK3 hodnoty IC_{50} boli oproti MARK1 vyššie $\sim 34\times$, oproti MARK2 bola látka 1 $\sim 24\times$ vyššia a látka 3 až $184\times$ vyššia. Hodnota látky 4, selektívnej voči MARK1, bola v porovnaní s MARK2 a MARK3 $\sim 40\times$ vyššia. Látka 5 bola selektívnejšia voči izoforme MARK3, pričom v porovnaní s MARK1 bola aktivita $\sim 39\times$ nižšia, a v porovnaní s MARK2 $\sim 7\times$ nižšia. Látka 10 bola najselektívnejšia voči MARK3 enzýmu, hodnota pre MARK1 bola $\sim 478\times$ vyššia, hodnota pre MARK2 rádovo výrazne vyššia ($IC_{50} = 37,9315 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). V prípade látky 12, selektívnej voči MARK1, bola hodnota IC_{50} pre MARK2 rádovo výrazne vyššia ($IC_{50} = 1,8707 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), a pre MARK3 $\sim 489\times$ vyššia. V prípade látok 14 a 15 boli hodnoty IC_{50} voči MARK3 izoforme najvyššie, a značne odlišné od zvyšných hodnôt.

Vyššiu hodnotu sme namerali tiež v prípade látky 16 ($IC_{50} = 21,0378 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) voči MARK3. Mierne vyššiu hodnotu sme pozorovali u látky 11 ($IC_{50} = 2,3878 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) voči MARK1, u látky 6 ($IC_{50} = 4,0458 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a u látky 7 ($IC_{50} = 2,9174 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) voči MARK2, u látky 6 ($IC_{50} = 9,0573 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) voči MARK3 enzýmu. Pre látky 8 voči MARK1 a látky 11 a 12 voči MARK2 boli hodnoty v rozmedzí $1,0495\text{--}1,9320 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Ostatné látky sa pohybovali v rozmedzí hodnôt IC_{50} $0,0376\text{--}0,6281 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Pre úspešný vývoj nových liečiv je nevyhnutné správne porozumenie farmakokinetických (PK) a farmakodynamických (PD) vzťahov, a to na základe preklinických modelov ochorení. V prípade látok určených pre CNS je potrebné brať do úvahy existenciu BBB, ktorá spôsobuje, že klasické parametre sú nedostatočné na hodnotenie expozície látky a časových priebehov v mozgu. Na zmysluplné posúdenie kandidátov sú potrebné ďalšie údaje a sofistikovanejšie metódy.⁹² Na základe prediktívnych analýz by sa parametre vhodného kandidáta na CNS liečivo mali pohybovať v uvedených hodnotách, a to: molekulová hmotnosť ($< 450 \text{ Da}$), HBD < 3 , HBA < 7 , lipofilita ($c \log P < 5$, $c \log D \sim 2\text{--}3$), pK_a ($7,5\text{--}10,5$; neutrálne, bázické), rotačné väzby (< 8) a polárna plocha povrchu ($60\text{--}70 \text{ \AA}$).^{94,97–99}

Stredné hodnoty odvodené z analýzy predávaných liekov CNS ponúkajú taktiež užitočné usmernenie pri definovaní požadovaného profilu CNS kandidáta: MW = 305 Da; HBA = 1; $c \log P = 2,8$; $c \log D = 1,7$; $pK_a = 8,4$; RB = 4,5; TPSA = 44,8 Å. Je zrejmé, že tieto čísla sú strednými hodnotami a na trhu existuje veľa liekov s vlastnosťami na oboch koncoch rozsahu.^{94,95,98}

Prostredníctvom SwissADME boli vyhodnotené základné parametre a na základe nich bol zhotovený tzv. BOILED EGG diagram. Na základe tohto diagramu sú to látky 3, 4, 5 a 10, ktoré boli predurčené na prechádzanie cez BBB a zároveň sú to substráty P-glykoproteínu. Látky 1, 6, 15 a 16 prechádzajú BBB a nie sú substrátmi P-gp. U látok 2, 8, 9, 12, 13 a 14 sa predpokladá, že budú absorbované intestinálne, ale nebudú prechádzať BBB. Zvyšné dve látky, 7 a 11, boli zaradené ako molekuly, ktoré nebudú prechádzať BBB a zároveň ani nie sú substrátmi P-gp.

Všetkých 16 látok splňovalo podmienky molekulárnej hmotnosti, a teda aby ich veľkosť nebola vyššia ako 450 Da. Väčšina látok sa pohybovala v rozmedzí 214–257 Da, pričom molekulárna hmotnosť látky 15 bola výrazne nižšia – 162 Da, a látky 11 výrazne vyššia – 353 Da, oproti ostatným molekulám. U príliš malých molekúl môže dochádzať ku ich nešpecificite, a hoci sa takéto látky môžu javiť ako vysoko aktívne molekuly, problém môže nastať pri ich nešpecifickej blokácii v miestach, ktoré nie sú určené na inhibíciu. Maximálny počet rotačných väzieb u všetkých molekúl odpovedal trom väzbám, čo splňuje vyššie uvedené odporúčenie. Rovnako tak počet vodíkových akceptorov a donorov odpovedal počtu, ktorý je určený ako optimálny pre látky prechádzajúce BBB, okrem látky 11. U tejto molekuly bol počet vodíkových akceptorov 7, čo sa prejavilo aj na predpovedi látky prechádzať hematoencefalickou bariérou.

Zo 16 látok, na základe Swiss ADME predikcie, preukazujú štyri molekuly prechod cez hematoencefalickú bariérou a zároveň predstavujú substráty P-gp. Takéto látky sa budú aktívne transportovať z CNS priestoru pomocou P-glykoproteínu, efluxnej transmembránovej pumpy, a ich terapeutická koncentrácia bude výrazne znížená. Tým pádom vyradením funkcie P-gp sa zvýšia hladiny jednotlivých molekúl v mozgu. Z testovaných látok preukazovali molekuly 1, 6, 15 a 16 vyhovujúcu kombináciu; látky prechádzajú cez hematoencefalickú bariéru a zároveň nie sú substrátmi P-glykoproteínu. U látok s vyššou hodnotou topologického polárneho povrchu sa predpokladá vyššia pravdepodobnosť, že sa stanú substrátmi pre P-gp v porovnaní s látkami o nižšom TPSA.⁹² Zo spomínaných štyroch látok mali molekuly 1 a 15 hodnotu polárneho povrchu 44,81 Å; látka 6 hodnotu 63,69 Å a látka 16 hodnotu 66,87 Å.

Miera lipofilicity u látok sa pohybovala v rozmedzí 1,04–2,94. Najnižšia hodnota patrila látke 15, teda látke s najnižšou molekulárnou hmotnosťou, pričom táto pomerne malá veľkosť molekuly môže výrazne ovplyvňovať špecificitu. Naopak najvyššia hodnota

patrila látke 16, ktorá splňovala všetky vyššie uvedené parametre, a z testovaných látok sú to najmä molekuly 1, 6 a 16, ktoré by sa dali považovať za zaujímavé zlúčeniny na základe SwissAMDE predikcie.

Každá jedna uvedená hodnota je čisto prediktívna, pre overenie správania sa látok v ľudskom organizme sú potrebné experimenty, ktoré overia hodnoty získané prostredníctvom programu SwissADME na živých modeloch.

Vedľajším bodom našej práce bol vývoj metodiky pre CDK4/6 enzýmy. CDK podjednotka interaguje s regulačnou podjednotkou cyklínov a výsledný komplex slúži ako kontrolný bod v procese delenia a rastu buniek. Z tohto dôvodu sú komplexy mimoriadne dôležité počas prechodu bunkového cyklu u nádorových buniek.

Hlavným bodom metodiky je schopnosť detekovať histón H1 a jeho fosforylovanú formu v prítomnosti enzýmu CDK4/CycD. Detekcia prebiehala v 4 rôznych variantoch. Ako prvé bol sledovaný peptid s matricou v pomere 1:1, následne bol sledovaný peptid riedený vo vode a v takto zriedenej forme detekovaný s matricou v pomere 1:1. V treťom variante sme sledovali peptid pridaný do reakčnej zmesi, ktorá buď obsahovala alebo neobsahovala DTT. Dôvodom pre experiment s DTT a bez bolo overenie, či nedochádza pôsobením jeho prítomnosti v reakčnej zmesi ku narušeniu intenzity signálu a je možné detekovať samostatný pík peptidu. Reakčná zmes bola opäť aplikovaná na maldi doštičku s matricou v pomere 1:1. Detekcia píku v prítomnosti enzýmu bola o niečo komplikovanejšia. V prípade enzýmu od firmy Carna Biosciences, Inc., uchovávanom v pufri obsahujúcom Tris-HCl, NaCl, Brij35, DTT a glycerol, dochádzalo ku výraznému narušeniu signálu, a to práve z dôvodu prítomnosti detergentu Brij35. V predchádzajúcom kroku sme si overili, že prítomný DTT nie je zodpovedný za rušenie signálu a neovplyvňuje spektrum, a teda problém nastáva čisto z dôvodu detergentu Brij35. Z tohto dôvodu je v metodike nutné pracovať s alternatívnym enzýmom, ktorý je uchovávaný v inom pufri. Jednou z alternatív bola firma SignalChem, ktorá dodáva enzým uchovávaný v pufri bez interferujúcej zložky Brij35. Po pridaní tohto enzýmu do reakčnej zmesi bolo možné detekovať pík peptidu. Bohužiaľ ani v jednom prípade nebolo možné detekovať fosforylovanú formu peptidu. Z tohto dôvodu by metodika potrebovala ďalšiu optimalizáciu, ktorá presahuje časové možnosti diplomovej práce.

6 Záver

Hlavným cieľom diplomovej práce bola optimalizácia metodiky pre enzýmy MARK 1–3.

Metodika využíva bezkontaktné echoakustické zariadenie ECHO® 550, ktoré zabezpečuje manipuláciu so vzorkami o veľmi nízkych objemoch, rádovo v nL, čím zvyšuje precíznosť pri nanášaní reagentov a zároveň znižuje kontamináciu a nepresnosti, ktoré vznikajú ručným pipetovaním. Detekcia prebieha prostredníctvom hmotnostného spektrometra MALDI-TOF, ktoré nevyžaduje prítomnosť iných molekúl, čím je zachovaná citlivosť, rýchlosť detekcie, robustnosť signálu a priepustnosť. Spojenie zariadení umožňuje rýchlu analýzu veľkého počtu vzoriek za relatívne krátku dobu. Hodnotenie enzymatickej aktivity je založené na priamej detekcii substrátu a produktu a meraní intenzít. Pre detekciu nie je nutné použiť žiadne rádioaktívne značené nuklidy, chromogénne substráty ani iné molekuly.

V práci sa nám podarilo úspešne optimalizovať koncentráciu enzýmov MARK 1–3; koncentráciu ATP; teplotu, pri ktorej prebiehala inkubácia reakčnej zmesi a pH hodnotu pufru. Optimalizovaná metodika bola aplikovaná na 16 nukleozidových inhibítorov, z ktorých sme identifikovali 2 látky aktívne voči MARK1 enzýmu s hodnotami IC_{50} 0,0084 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (látka 2) a 0,0004 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (látka 12); 2 látky aktívne voči MARK2 enzýmu s hodnotami IC_{50} 0,0006 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (látka 2) a 0,0004 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (látka 3); 3 látky aktívne voči MARK3 enzýmu s hodnotami IC_{50} 0,0048 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (látka 2), 0,0098 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (látka 5) a 0,0005 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (látka 10). Na základe farmakokinetických vlastností, ktoré boli získané prostredníctvom SwissADME, sme identifikovali 3 látky (1, 6, 16), ktorých parametre odpovedali priemerným hodnotám stanoveným pre CNS liečivá.

V druhej časti práce sme sa zaoberali vývojom metodiky pre CDK4/6, pričom sa nám nepodarilo detekovať fosforylovanú formu peptidu a z toho dôvodu postupovať analogicky ako v prípade MARK 1–3 enzýmov. Táto časť práce si vyžaduje optimalizáciu, ktorá však presahuje časové možnosti diplomovej práce.

Zoznam obrázkov

obr. 1 – Sekundárna štruktúra enzýmov (prevzaté a upravené) ²⁷	17
obr. 2 – Aktivačná energia bez prítomnosti enzýmu, v prítomnosti enzýmu (obrázok autor)	20
obr. 3 – Tvorba ES komplexu (prevzaté a upravené) ⁴¹	21
obr. 4 – Vplyv teploty na aktivitu enzýmu (obrázok autor).....	22
obr. 5 – Vplyv pH na aktivitu enzýmu (obrázok autor).....	22
obr. 6 – Schéma kompetetívnej inhibície (a), nekompetetívnej inhibície (b), akompetetívnej inhibície (c) (prevzaté a upravené) ⁴⁸	23
obr. 7 – Michaelis-Menten enzýmová kinetika ²²	25
obr. 8 – Aktivácia CDK: A – T-slučka blokuje väzbové miesto pre ATP, CDK nulová aktivita; B – T-slučka uvoľňuje väzbové miesto pre ATP, väzba cyklínu na CDK, čiasť aktivita; C – fosforylácia komplexu CDK-cyklín pomocou CAK, P-T- slučka zlepšuje väzbu substrátu, úplná aktivita (prevzaté a upravené) ³⁹	28
obr. 9 – Chemická štruktúra staurosporínu (obrázok autor)	34
obr. 10 – Chemická štruktúra PCC0208017 (obrázok autor)	35
obr. 11 – Chemická štruktúra N-substituovaných akridónových derivátov, akridónový skelet zvýraznený červenou (obrázok autor)	35
obr. 12 – Chemická štruktúra α -mangostínu (obrázok autor)	36
obr. 13 – Znázornené komplexy cyklín–CDK a inhibítory v jednotlivých fázach bunkového cyklu ¹¹⁵	41
obr. 14 – MALDI plate	44
obr. 15 – Hmotnostné spektrá – CHKtid peptid, CHKtid peptid v prítomnosti MARK 1–3	49
obr. 16 – BOILED EGG – predikcia BBB permeácie a intestinálnej absorpcie látok 1–16	57
obr. 17 – Hmotnostné spektrá: 1 peptid + matrica, 2 peptid v prítomnosti vody + matrica, 3a peptid v prítomnosti reakčnej zmesi bez DTT + matrica, 3b peptid v prítomnosti reakčnej zmesi s DTT + matrica.....	58
obr. 18 – Hmotnostné spektrá pre reakciu s enzýmom: 4a reakcia s enzýmom od Carna Bioscience, Inc. 0 min, 60 min po inkubácii 4b reakcia s enzýmom od SignalChem 0 min, 60 min po inkubácii.....	59
obr. 19 – Hmotnostné spektrá po optimalizácii: 4b predĺžená inkubačná doba; 5 optimalizovaná koncentrácia enzýmu	60

Zoznam grafov

graf 1 – fosforylácia CHKtid peptidu v závislosti na zmene koncentrácie enzýmu MARK1.....	50
graf 2 – fosforylácia CHKtid peptidu v závislosti na zmene koncentrácie enzýmu MARK2.....	50
graf 3 – fosforylácia CHKtid peptidu v závislosti na zmene koncentrácie enzýmu MARK3.....	50
graf 4 – fosforylácia CHKtid peptidu v závislosti na zmene koncentrácie ATP v prípade enzýmu MARK1	52
graf 5 – fosforylácia CHKtid peptidu v závislosti na zmene koncentrácie ATP v prípade enzýmu MARK2	52
graf 6 – fosforylácia CHKtid peptidu v závislosti na zmene koncentrácie ATP v prípade enzýmu MARK3	52
graf 7 – fosforylácia CHKtid peptidu v závislosti na zmene teploty reakcie v prípade enzýmu MARK1	52
graf 8 – fosforylácia CHKtid peptidu v závislosti na zmene teploty reakcie v prípade enzýmu MARK2	52
graf 9 – fosforylácia CHKtid peptidu v závislosti na zmene teploty reakcie v prípade enzýmu MARK	52
graf 10 – fosforylácia CHKtid peptidu v závislosti na zmene pH reakcie v prípade enzýmu MARK1	54
graf 11 – fosforylácia CHKtid peptidu v závislosti na zmene pH reakcie v prípade enzýmu MARK2	54
graf 12 – fosforylácia CHKtid peptidu v závislosti na zmene pH reakcie v prípade enzýmu MARK3	54
graf 13, 14, 15 – inhibícia MARK 1–3 kinázovým inhibítorom staurosporínom za optimalizovaných podmienok	54

Referencie

- (1) Benn, C. L.; et al. *Front. Aging Neurosci.* **2020**, *12*, 242.
- (2) Jayapalan, S.; et al. *Genes Dis.* **2016**, *3*, 228–237.
- (3) Shamsi, A.; et al. *Biomolecules.* **2020**, *10*, 789.
- (4) Dementia
Získané (**2022**, apríl 13) na URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets>
- (5) How Is Alzheimer's Disease Treated
Získané (**2022**, apríl 13) na URL: <https://www.nia.nih.gov>
- (6) Savonenko, A. V.; Melnikova, T.; Li, T.; Price, D. L.; Wong, P. C. Chapter 21 - Alzheimer Disease. In *Neurobiology of Brain Disorders*; Zigmond, M. J., Rowland, L. P., Coyle, J. T., Eds.; Academic Press: San Diego, **2015**; pp 321–338.
- (7) Hrubá, L.; et al. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, *146*, 112549.
- (8) Ahmed, T.; et al. *Pharmacol. Res.* **2020**, *160*, 105090.
- (9) Robinson, P. K. *Essays Biochem.* **2015**, *59*, 1–41.
- (10) Patel, A. K.; Singhanía, R. R.; Pandey, A. Chapter 2 - Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes. In *Biotechnology of Microbial Enzymes*; Brahmachari, G., Ed.; Academic Press: India, **2017**; pp 13–41.
- (11) Bhatia, S. *Introduction to Pharmaceutical Biotechnology: Enzymes, proteins and bioinformatics*; IOP Publishing, **2018**; pp 1–29.
- (12) de la Peña, M.; et al. *Virus Res.* **2022**, *314*, 198757.
- (13) Blanco, A.; Blanco, G. Chapter 8 – Enzymes. In *Medical Biochemistry*; Blanco, A., Blanco, G., Eds.; Academic Press, **2017**; pp 153–175.
- (14) Cooper, G. M. *The Cell: A Molecular Approach (Second edition)*; Sinauer Associates: Sunderland, **2000**.
- (15) Otten, L. G.; et al. *Biomol. Eng.* **2005**, *22*, 1–9.
- (16) 11.1: Introduction to Chemical Equilibrium
Získané (**2022**, apríl 12) na URL: <https://chem.libretexts.org>
- (17) Hoffmann-Ostenhof, O.; et al. *Nature*, **1958**, *181*, 452–452.
- (18) Aszalos, A. A. Classification of Enzymes. In *Enzymes in Anesthesiology*; Foldes, F. F., Ed.; Springer: New York, **1978**; pp 71–88.

- (19) Younus, H. Oxidoreductases: Overview and Practical Applications. In *Biocatalysis: Enzymatic Basics and Applications*; Husain, Q., Ullah, M. F., Eds.; Springer International Publishing: Cham, **2019**; pp 39–55.
- (20) Enzyme Definition and Classification - Creative Enzymes
Získané (**2020**, november 17) na URL:
<https://www.creative-enzymes.com/resource.html/>
- (21) Enzyme Classification
Získané (**2020**, november 12) na URL:
<https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/rules.html>
- (22) Kodíček, M.; Valentová, O.; Hynek, R. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět (First Edition)*. VŠCHT: Praha, **2015**; pp 416.
- (23) Alcántara, A. R.; et al. 3.28 - Biocatalyzed Production of Fine Chemicals. In *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*; Moo-Young, M., Ed.; Academic Press: Burlington, **2011**; pp 309–331.
- (24) Ilyina, A.; et al. 3 - Magnetic Separation of Nanobiostructured Systems for Innovation of Biocatalytic Processes in Food Industry. In *Novel Approaches of Nanotechnology in Food*; Grumezescu, A. M., Ed.; Academic Press: Mexico, **2016**; pp 67–96.
- (25) Clark, D. P.; Pazdernik, N. J. Chapter E3 - DNA, RNA, and Protein. In *Molecular Biology (Second Edition)*; Clark, D. P., Pazdernik, N. J., Eds.; Academic Press: Boston, **2013**; pp e15–e19.
- (26) Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. *Biochemistry (Fifth edition)*. Freeman, W. H.: New York, **2002**.
- (27) Human Anatomy and Physiology I
Získané (**2020**, december 27) na URL: <https://slideplayer.com/slide/14088646/>
- (28) Protein structure: Primary, secondary, tertiary & quaternary
Získané (**2020**, december 28) na URL: <https://www.khanacademy.org>
- (29) Ouellette, R. J.; Rawn, J. D. 14 - Amino Acids, Peptides, and Proteins. In *Principles of Organic Chemistry*; Ouellette, R. J., Rawn, J. D., Eds.; Elsevier: Boston, **2015**; pp 371–396.
- (30) Bank, R. P. D. RCSB PDB: Homepage
Získané (**2021**, október 12) na URL: <https://www.rcsb.org>
- (31) PyMOL
Získané (**2021**, október 12) na URL: pymol.org <https://pymol.org/2/>
- (32) Slámová, K.; et al. *BBA*. **2017**, 1861, 2070–2087.

- (33) Hopmann, K. H.; Himo, F. 8.20 - Quantum Chemical Modeling of Enzymatic Reactions – Applications to Epoxide-Transforming Enzymes. In *Comprehensive Natural Products II*; Liu, H. W. (Ben), Mander, L., Eds.; Elsevier: Oxford, **2010**; pp 719–747.
- (34) Choi, J. M.; Kim, H.-S. Chapter Eight - Structure-Guided Rational Design of the Substrate Specificity and Catalytic Activity of an Enzyme. In *Methods in Enzymology*; Tawfik, D. S., Ed.; Academic Press: South Korea, **2020**; Vol. 643, pp 181–202.
- (35) Hashim, O. H.; et al. *Biochem. Educ.* **1994**, 22, 93–94.
- (36) Harris, E. D. Cofactors: Organic. In *Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition)*; Caballero, B., Ed.; Academic Press: Waltham, **2013**; pp 366–377.
- (37) Protein - Cofactors
Získané (**2021**, apríl 14) na URL: <https://www.britannica.com>
- (38) Palmer, T.; Bonner, P. L. 11 - The Chemical Nature of Enzyme Catalysis. In *Enzymes (Second Edition)*; Palmer, T., Bonner, P. L., Eds.; Woodhead Publishing: Nottingham, **2011**; pp 189–221.
- (39) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Morgan, D.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P.; Wilson, J.; Hunt, T. *Molecular Biology of the Cell (Sixth edition)*. W. W. Norton & Company: Boca Raton, **2017**.
- (40) Activation energy (article) | Enzymes
Získané (**2020**, december 12) na URL: <https://www.khanacademy.org>
- (41) Enzyme Substrate Complex
Získané (**2020**, december 13) na URL: <https://biologydictionary.net>
- (42) Temperature Effects (Introduction to Enzymes)
Získané (**2020**, december 15) na URL: <https://www.worthington-biochem.com>
- (43) Enzymes and the active site (article)
Získané (**2020**, december 13) na URL: <https://www.khanacademy.org>
- (44) Effects of pH (Introduction to Enzymes)
Získané (**2020**, december 15) na URL: <http://www.worthington-biochem.com>
- (45) 3.4: Regulation of Enzyme Activity - Biology LibreTexts
Získané (**2020**, december 15) na URL: <https://bio.libretexts.org>
- (46) Robertson, S.; Penzak, S. R.; Huang, S. M. Chapter 15 - Drug Interactions. In *Principles of Clinical Pharmacology (Third Edition)*; Atkinson, A. J., Huang, S.-M., Lertora, J. J. L., Markey, S. P., Eds.; Academic Press, **2012**; pp 239–257.
- (47) Palmer, T.; Bonner, P. L. 8 - Enzyme Inhibition. In *Enzymes (Second Edition)*; Palmer, T., Bonner, P. L., Eds.; Woodhead Publishing: Nottingham, **2011**; pp 126–152.

- (48) The difference between K_i , K_d , IC_{50} , and EC_{50} values
Získané (2020, december 21) na URL: <http://www.sciencesnail.com>
- (49) Helmstaedt, K.; et al. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2001**, 65, 404–421.
- (50) Yang, R.; Rodriguez-Fernandez, M.; St. John, P. C.; Doyle, F. J. 8 - Systems Biology. In *Modelling Methodology for Physiology and Medicine (Second Edition)*; Carson, E., Cobelli, C., Eds.; Elsevier: Oxford, **2014**; pp 159–187.
- (51) Eun, H.-M. 1 - Enzymes and Nucleic Acids: General Principles. In *Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology*; Eun, H.-M., Ed.; Academic Press: France, **1996**; pp 1–108.
- (52) kinase | Definition, Biology, & Function
Získané (2021, júl 23) na URL: <https://www.britannica.com>
- (53) Ardito, F.; et al. *Int. J. Mol. Med.* **2017**, 40, 271–280.
- (54) Cheek, S.; et al. *J. Mol. Biol.* **2002**, 320, 855–881.
- (55) Weber, T. J. 2.24 - Protein Kinases. In *Comprehensive Toxicology (Second Edition)*; McQueen, C. A., Ed.; Elsevier: Oxford, **2010**; pp 473–493.
- (56) Qausain, S.; Srinivasan, H.; Jamal, S.; Nasiruddin, M.; Khan, Md. K. A. Chapter 3 – Phosphorylation and Acetylation of Proteins as Posttranslational Modification: Implications in Human Health and Associated Diseases. In *Protein Modificomics*; Dar, T. A., Singh, L. R., Eds.; Academic Press: India, **2019**; pp 69–86.
- (57) Nishi, H.; et al. *Structure.* **2011**, 19, 1807–1815.
- (58) Shapiro, G. I. *JCO.* **2006**, 24, 1770–1783.
- (59) Li, A.; et al. *Nat. Cell. Biol.* **2001**, 3, E182–E184.
- (60) Pavletich, N. P. *J. Mol. Biol.* **1999**, 287, 821–828.
- (61) Ventura, E.; Giordano, A. *Life Sciences: Cell Cycle*; Elsevier, **2019**.
- (62) Colas, P. *Orphanet J. Rare Dis.* **2020**, 15, 203.
- (63) Fadaka, A. O.; et al. *Biotechnol. Rep.* **2021**, 29, e00602.
- (64) Zhang, M.; et al. *Am. J. Cancer Res.* **2021**, 11, 1913–1935
- (65) Du, Q.; et al. *J. Hematol. Oncol.* **2020**, 13, 41.
- (66) Wu, Y.; et al. *Cancer Manag. Res.* **2020**, 12, 3477–3487.
- (67) Klein, M. E.; et al. *Cancer Cell.* **2018**, 34, 9–20.
- (68) Goel, S.; et al. *Nature.* **2017**, 548, 471–475.
- (69) De Simone, M.; et al. *Immunity.* **2016**, 45, 1135–1147.
- (70) Zhang, J.; et al. *Nature.* **2018**, 553, 91–95.
- (71) Timm, T.; et al. *BMC Neurosci.* **2008**, 9, S9.
- (72) Biernat, J.; et al. *Mol. Biol. Cell.* **2002**, 13, 4013–4028.
- (73) Drewes, G.; et al. *Cell.* **1997**, 89, 297–308.
- (74) Annadurai, N.; et al. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, 74, 4159–4169.

- (75) Li, F.; et al. *Acta Pharm. Sin. B.* **2020**, *10*, 289–300.
- (76) Lizcano, J. M.; et al. *EMBO J.* **2004**, *23*, 833–843.
- (77) Martin, L.; et al. *Ageing Res. Rev.* **2013**, *12*, 289–309.
- (78) Naz, F.; et al. *Cell Biochem. Biophys.* **2013**, *67*, 485–499.
- (79) Panneerselvam, S.; et al. *Structure.* **2006**, *14*, 173–183.
- (80) Murphy, J. M.; et al. *PNAS.* **2007**, *104*, 14336–14341.
- (81) Marx, A.; et al. *FASEB J.* **2010**, *24*, 1637–1648.
- (82) Trinczek, B.; et al. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 5915–5923.
- (83) Tian, L.; et al. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, E1206.
- (84) Liu, Z.; et al. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 21382.
- (85) Pathak, G. A.; et al. *Alzheimers. Dement.* **2020**, *16*, 162–177.
- (86) Karaman, M. W.; et al. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 127–132.
- (87) Voura, M.; et al. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1676.
- (88) Khan, P.; et al. *J. Nat. Prod.* **2019**, *82*, 2252–2261.
- (89) Kadry, H.; et al. *Fluids Barriers CNS.* **2020**, *17*, 69.
- (90) Rhea, E. M.; et al. *Front. Neurosci.* **2019**, *13*, 521.
- (91) Banks, W. A. *BMC Neurol.* **2009**, *9*, S3.
- (92) Rankovic, Z. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2584–2608.
- (93) Warren, K. E. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 239.
- (94) Tsui, H.; Zeng, Q.; Chen, K.; Zhang, X. 7.10 - Inhibiting Kinases in the CNS. In *Comprehensive Medicinal Chemistry III*; Chackalamannil, S., Rotella, D., Ward, S. E., Eds.; Elsevier: Oxford, **2017**; pp 408–446.
- (95) Wager, T. T.; et al. *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, *1*, 420–434.
- (96) Pajouhesh, H.; et al. *NeuroRx.* **2005**, *2*, 541–553.
- (97) Zerroug, A.; et al. *J. King Saud Univ. Sci.* **2019**, *31*, 595–601.
- (98) Ghose, A. K.; et al. *ACS Chem. Neurosci.* **2011**, *3*, 50–68.
- (99) Kelder, J.; et al. *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 1514–1519.
- (99) Bellettato, C. M.; et al. *Ital. J. Pediatr.* **2018**, *44*, 131.
- (101) Belpaire, F. M.; Bogaert, M. G. 30 - THE FATE OF XENOBIOTICS IN LIVING ORGANISMS. In *The Practice of Medicinal Chemistry (Second Edition)*; Wermuth, C. G., Ed.; Academic Press: London, **2003**; pp 501–515.
- (102) Brodeur, J.; Tardif, R. Absorption. In *Encyclopedia of Toxicology (Second Edition)*; Wexler, P., Ed.; Elsevier: New York, **2005**; pp 1–6.
- (103) Boudker, O.; et al. *Trends Pharmacol. Sci.* **2010**, *31*, 418–426.
- (104) Golden, P. L.; et al. *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92*, 1739–1753.

- (105) de Lange, E. C. M. Multi Drug Resistance P Glycoprotein and Other Transporters. In *Encyclopedia of Stress (Second Edition)*; Fink, G., Ed.; Academic Press: New York, **2007**; pp 774–783.
- (106) Pulgar, V. M. *Front. Neurosci.* **2019**, *12*.
- (107) Lyck, R.; et al. *J. Vasc. Res.* **2012**, *49*, 497–509.
- (108) Mikhail, S.; et al. *Am. J. Pathol.* **2015**, *185*, 1185–1197.
- (109) Hajj, A. A. *JCPCR*. **2017**, *8*, 337–338.
- (110) Cooper, G. M.; et al. *The Cell: A Molecular Approach (Seventh edition)*; Sinauer Associates: Sunderland, **2015**.
- (111) Pestell, R. G.; et al. *Endocr. Rev.* **1999**, *20*, 501–534.
- (112) Baumann, P.; et al. *Trends Biochem. Sci.* **1998**, *23*, 247–251.
- (113) Sherr, C. J. *Cell*. **1994**, *79*, 551–555.
- (114) Calzada, A.; Bueno, A. Genes Involved in the Initiation of DNA Replication in Yeast. In *International Review of Cytology*; Jeon, K. W., Ed.; A Survey of Cell Biology; Academic Press, **2002**; Vol. 212, pp 133–207.
- (115) Cancer Genetics - CuboCube
Získané (**2021**, júl 29) na URL: <http://www.cubocube.com>
- (116) Echo 650 Liquid Handler - Beckman Coulter
Získané (**2022**, marec 23) na URL: <https://www.mybeckman.cz>
- (117) Daina, A.; et al. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42717.
- (118) Tang, E. I.; et al. *J. Endocrinol.* **2013**, *217*, R13–R23.
- (119) Timm, T.; et al. *Neurodegener. Dis.* **2006**, *3*, 207–217.
- (120) Ballatore, C.; et al. *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8*, 663–672.
- (121) Oba, T.; et al. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 17138–17147.
- (122) Gu, G. J.; et al. *Neuromolecular. Med.* **2013**, *15*, 458–469.
- (123) Ando, K.; et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *478*, 929–934.
- (124) Ando, K.; et al. *PLOS Genetics*. **2016**, *12*, e1005917.
- (125) De Cesare, V.; et al. *Nat. Protoc.* **2020**, *15*, 4034–4057.
- (126) Winter, M.; et al. *SLAS Discov.* **2018**, *23*, 561–573.
- (127) Chandler, J.; et al. *SLAS Discov.* **2017**, *22*, 1262–1269.
- (127) Beeman, K.; et al. *SLAS Discov.* **2017**, *22*, 1203–1210.
- (129) Haslam, C.; et al. *J. Biomol. Screen.* **2016**, *21*, 176–186.
- (130) Heap, R. E.; et al. *SLAS Discov.* **2017**, *22*, 1193–1202.

Prílohy

