

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

STUDIUM VLIVU INHIBITORŮ CYKLIN-DEPENDENTNÍCH KINAS  
NA EXPRESI VYBRANÝCH AKR A CBR ENZYMŮ  
V LIDSKÝCH BUNĚČNÝCH LINÍCH

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Eva Novotná, Ph.D.

Hradec Králové 2018

Bc. Etela Kouklíková

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

Souhlasím, aby tato práce byla půjčována ke studijním účelům a byla citována dle platných norem.

V Hradci Králové, dne 14. května 2018 .....

podpis

### **Poděkování**

Ráda bych tímto poděkovala paní RNDr. Evě Novotné, Ph.D. za ochotu při konzultacích a za její odbornou pomoc, cenné rady a připomínky při řešení této diplomové práce.

## **ABSTRAKT**

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Etela Kouklíková

Školitel: RNDr. Eva Novotná, Ph.D.

Název diplomové práce: Studium vlivu inhibitorů cyklin-dependentních kinas na expresi vybraných AKR a CBR enzymů v lidských buněčných liniích

Inhibitory cyklin-dependentních kinas (CDKi) jsou považovány za vhodnou léčbu zejména u pacientů se špatnou prognózou nebo s pokročilým stádiem rakoviny. Bylo zjištěno, že jedním z účinků některých CDKi je vliv na aktivitu enzymů patřících do nadrodiny aldo-keto reduktas (AKR) a dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR).

AKR a SDR enzymy patří do skupiny karbonyl redukujících enzymů. Tyto enzymy se podílejí na metabolismu endogenních látek i xenobiotik. Významnou skupinou xenobiotik, které metabolizují, jsou protinádorová léčiva antracykliny, ze kterých se poté stávají méně účinné látky.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda purvalanol A, roscovitin, dinaciclib, AZD5438 a R547 mohou ovlivnit expresi antracyklinreduktas (AKR1A1, AKR1B10, AKR1C3, AKR7A2 a CBR1) v lidských buněčných liniích HepG2 a HL-60.

Expresie antracyklinreduktas v buněčných liniích byla detekována na úrovni mRNA pomocí RT-qPCR a na úrovni proteinu pomocí metody Western blotting. Nejvýznamnější změny v expresi na úrovni mRNA byly v případě roscovitinu a purvalanolu A. Působením roscovitinu došlo ke statisticky významnému snížení mRNA u enzymů AKR1A1, AKR1B10, AKR7A2 a CBR1. V případě purvalanolu A bylo pozorováno snížení exprese mRNA u AKR1A1 a AKR7A2. Expresie na úrovni proteinu byla studována pouze u enzymu AKR1C3. Nezaznamenali jsme však žádné statisticky významné změny.

## **ABSTRACT**

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Etela Kouklíková

Supervisor: RNDr. Eva Novotná, Ph.D.

Title of diploma thesis: Study of the effect of cyclin-dependent kinase inhibitors on the expression of selected AKR and CBR enzymes in human cell lines

Cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKi) are considered as a suitable treatment especially in patients with wrong prognosis or advanced stage of cancer. It has only recently been discovered that CDKi are able to influence the activity of some enzymes from aldo-keto reductase (AKR) and short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamilies.

AKR and SDR enzymes belong to a group of carbonyl reducing enzymes that are involved in the metabolism of endobiotics and xenobiotics. An important group of drugs that are metabolized by these enzymes to less efficient compounds are anthracyclines.

The aim of this diploma thesis was to find out whether purvalanol A, roscovitin, dinaciclib, AZD5438 and R547 can affect the expression of the most important anthracycline reductases (AKR1A1, AKR1B10, AKR1C3, AKR7A2 and CBR1) in human HepG2 and HL-60 cell lines.

Expression of anthracycline reductases in cells exposed to CDKi was evaluated at mRNA level by RT-qPCR and at protein level by Western blotting. The most significant changes in mRNA expression were observed for roscovitin and purvalanol A. Roscovitin caused a statistically significant reduction in mRNA expression of the AKR1A1, AKR1B10, AKR7A2 and CBR1 enzymes. Decreased expression of AKR1A1 and AKR7A2 enzymes at mRNA level was detected also in the case of purvalanol A. Expression at protein level was evaluated only for AKR1C3. However, no statistically significant changes were observed.

# Obsah

Úvod .....	9
<b>1 Teoretická část .....</b>	<b>10</b>
1.1 Nádorová onemocnění .....	10
1.1.1 Antracykliny .....	10
1.1.1.1 Mechanismus účinku.....	11
1.1.1.2 Metabolismus .....	12
1.1.1.3 Kardiotoxicita.....	13
1.1.1.4 Rezistence .....	14
1.2 Karbonyl redukující enzymy a jejich úloha v nádorové terapii .....	14
1.2.1 Aldo-keto reductasy.....	15
1.2.1.1 AKR1A1 .....	16
1.2.1.2 AKR1B10.....	17
1.2.1.3 AKR1C3.....	17
1.2.1.4 AKR7A2 .....	18
1.2.2 Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR).....	19
1.2.2.1 CBR1.....	21
1.3 Cyklin-dependentní kinasy.....	21
1.3.1 Vliv CDK na buněčný cyklus .....	22
1.3.2 Inhibitory CDK .....	24
1.3.2.1 AZD5438.....	25
1.3.2.2 Dinaciclib .....	25
1.3.2.3 Purvalanol A.....	26
1.3.2.4 Roscovitin .....	27
1.3.2.5 R547 .....	28
<b>2 Cíl práce .....</b>	<b>29</b>
<b>3 Metodika.....</b>	<b>30</b>
3.1 Materiál a přístroje .....	30
3.1.1 Chemikálie .....	30
3.1.2 Materiál a pomůcky .....	31
3.1.3 Přístroje.....	32
3.1.4 Hmotnostní marker .....	32
3.1.5 Enzymy .....	32
3.1.6 Kity .....	32

3.1.7	Plazmidy .....	33
3.1.8	Primery.....	33
3.1.9	Protilátky a rekombinantní AKR1C3 .....	33
3.1.10	Chemikálie a roztoky pro SDS-PAGE elektroforézu a Western blotting.	34
3.1.11	Buněčné linie .....	37
3.2	Metodika .....	37
3.2.1	Práce s buněčnou linií HepG2 .....	37
3.2.2	Práce s buněčnou linií HL-60 .....	39
3.2.3	Izolace RNA .....	40
3.2.3.1	Fenol-chloroformová extrakce .....	40
3.2.3.2	Extrakce pomocí separačních kolonek.....	41
3.2.4	Odstranění genomové DNA.....	42
3.2.5	Reverzní transkripce .....	42
3.2.6	Stanovení integrity cDNA .....	43
3.2.7	Návrh primerů.....	44
3.2.8	Kalibrační řada.....	44
3.2.9	Kvantitativní PCR v reálném čase .....	45
3.2.10	SDS-PAGE elektroforéza .....	46
3.2.10.1	Příprava gelů .....	46
3.2.10.2	Příprava pozitivních kontrol a vzorků .....	47
3.2.10.3	Elektroforéza .....	47
3.2.11	Western blotting.....	48
3.2.11.1	Příprava blotu a blotování .....	48
3.2.11.2	Kontrola přenosu proteinů na membránu.....	49
3.2.11.3	Blokování membrány a navázání protilátek.....	49
3.2.11.4	Barvení gelů pomocí Coomassie Blue .....	50
3.2.11.5	Vizualizace.....	50
3.2.11.6	Stripování membrány .....	51
3.2.11.7	Statistická analýza, tvorba grafů a chemických vzorců .....	51
<b>4</b>	<b>Experimentální část.....</b>	<b>52</b>
4.1	Stanovení exprese na úrovni mRNA.....	52
4.1.1	Příprava vzorků.....	52
4.1.2	Integrita cDNA .....	54
4.1.3	Kvantitativní PCR v reálném čase .....	55

4.1.3.1	Ověření specifity primerů.....	55
4.1.3.2	Ověření validity výsledků .....	56
4.1.4	Vyhodnocení vlivu CDKi na expresi mRNA antracyklinreduktas.....	57
4.1.4.1	Vliv CDKi na expresi mRNA antracyklinreduktas u HepG2 buněčné linie	57
4.1.4.1.1	Vliv CDKi na expresi mRNA enzymu AKR1A1 .....	58
4.1.4.1.2	Vliv CDKi na expresi mRNA enzymu AKR1B10 .....	59
4.1.4.1.3	Vliv CDKi na expresi mRNA enzymu AKR1C3 .....	60
4.1.4.1.4	Vliv CDKi na expresi mRNA enzymu AKR7A2 .....	61
4.1.4.1.5	Vliv CDKi na expresi mRNA enzymu CBR1.....	62
4.1.4.2	Vliv CDKi na expresi mRNA antracyklinreduktas u HL-60 buněčné linie	63
4.2	Stanovení exprese na úrovni proteinu .....	64
4.2.1	Western blotting.....	64
4.2.2	Stanovení koncentrace proteinu.....	64
4.2.3	Stanovení exprese AKR1C3 na úrovni proteinu v HepG2 buňkách .....	65
4.2.3.1	Optimalizace detekce proteinu AKR1C3 v HepG2 buňkách.....	65
4.2.3.2	Stanovení vlivu CDKi na expresi proteinu AKR1C3 v HepG2 buňkách ...	68
4.2.3.3	Kvantifikace vlivu CDKi na expresi proteinu AKR1C3 v HepG2 buňkách	69
4.2.4	Stanovení exprese AKR1C3 na úrovni proteinu v HL-60 buňkách .....	70
<b>5</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>Seznam zkratk.....</b>	<b>76</b>
<b>8</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>78</b>
<b>9</b>	<b>Internetové zdroje .....</b>	<b>90</b>



## Úvod

Nejrůznější nádorová onemocnění jsou častou příčinou úmrtí obyvatelstva. Mezi nejvíce používaná protinádorová léčiva patří antracykliny, které byly izolovány z bakterií rodu *Streptomyces* (Fujiwara a kol. 2008). Nejpoužívanějšími zástupci této skupiny léků zůstávají i přes aktivní vědecký výzkum doxorubicin a daunorubicin, léčiva objevená v 60. letech minulého století (McGowan a kol. 2017).

Jednou z komplikací léčby pomocí antracyklinů je redukující účinek enzymů přítomných v organismu. Mezi nejaktivnější antracyklinreduktasy patří karbonyl redukující enzymy ze skupiny aldo-keto reduktas (AKR1A1, AKR1B10, AKR1C3, AKR7A2) a dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (CBR1) (Bains a kol. 2010). Tyto enzymy jsou schopné metabolizovat antracykliny na méně aktivní látky. Je tedy důležité najít způsob, jak vliv těchto redukujících enzymů v případě podávání antracyklinů minimalizovat.

Inhibitory cyklin-dependentních kinas jsou považovány za vhodnou léčbu zejména u pacientů se špatnou prognózou nemoci nebo s pokročilým stádiem rakoviny. Na katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty bylo zjištěno, že právě některé inhibitory cyklin-dependentních kinas jsou schopné snižovat aktivitu karbonyl redukujících enzymů. Inhibice však může být pouze jednou z možností, jak mohou být antracyklinreduktasy ovlivněny.

Hlavním cílem diplomové práce bylo zjistit, zda vybrané inhibitory cyklin-dependentních kinas (AZD5438, dinaclib, purvalanol A, roscovitin a R547) mohou ovlivnit expresi výše uvedených enzymů v buněčných liniích HepG2 a HL-60. Stanovení exprese antracyklinreduktas na úrovni mRNA bylo provedeno metodou RT-qPCR za využití fluorescenčního barviva SYBR Green I a na úrovni proteinu pomocí metody Western blotting.

# 1 Teoretická část

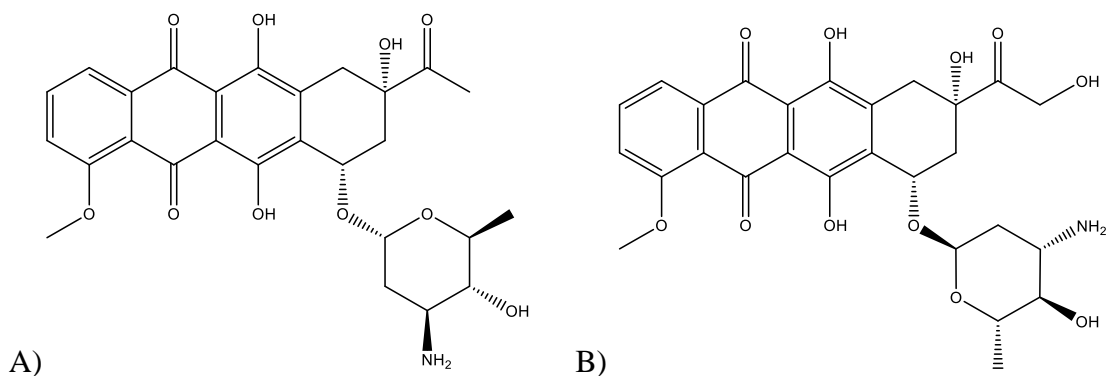
## 1.1 Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění jsou skupinou chorob, jejichž charakteristickou vlastností je nekontrolované buněčné dělení, abnormální růst a migrace do okolních tkání. Změněné buňky mohou tvořit solidní nádory, které jsou součástí infiltrované tkáně. Naopak při hematologických nádorech nedochází k tvorbě ložisek, ale nádorové buňky infiltrují kostní dřeň, lymfatické uzliny nebo volně kolují krví (Internet 1).

### 1.1.1 Antracykliny

Antracykliny se používají při chemoterapeutické léčbě rakoviny. Jsou to protinádorová léčiva, která byla získána z bakterií rodu *Streptomyces* (Fujiwara a kol. 2008). Patří mezi nejúčinnější protinádorové léky a jsou účinné vůči více druhům rakoviny. Používají se k léčbě rakoviny žaludku, plic, prsu, dělohy a vaječnicků, a také leukémií a lymfomů (Weiss 1992).

Antracykliny byly objeveny v 60. letech minulého století. Jako první byl objeven daunorubicin, který je přirozeně produkován druhem aktinobakterií *Streptomyces peucetius*. Doxorubicin byl izolován zanedlouho poté ze *Streptomyces peucetius var. caesi* (Arcamone 2000, Weiss 1992). V průběhu dalších 40 let došlo k vývoji asi 2000 analogů s cílem najít látky s lepším terapeutickým indexem, ale pouze několik jich bylo zavedeno do klinické praxe. Nejpoužívanějšími zůstávají daunorubicin a doxorubicin (Obr. 1). Jejich struktury se liší pouze přítomností hydroxylové skupiny na C-14 v molekule doxorubicinu. Přítomnost hydroxylové skupiny na C-14 má významný vliv na možnosti použití doxorubicinu. Zatímco daunorubicin je používán k terapii krevních malignit, použití doxorubicinu je mnohem širší, zahrnuje jak krevní malignity, tak i solidní nádory (Minotti a kol. 2004).



**Obrázek 1:** A) Daunorubicin B) Doxorubicin

### 1.1.1.1 Mechanismus účinku

Během výzkumu antracyklinů bylo objeveno několik možných mechanismů účinku. Jedním z předpokládaných mechanismů účinku je zastavení replikace nebo transkripce, ke kterému dochází interkalací antracyklinu mezi páry bází v molekule DNA/RNA (Minnoti a kol. 2004, Gewirtz 1999).

Za další možný účinek antracyklinů byl také považován vznik volných kyslíkových radikálů, které poškozují přítomné okolní biomolekuly. Avšak tyto účinky byly experimentálně prokázány pouze při použití supratherapeutických dávek antracyklinů (DeGraff a kol. 1994, Skladanowski a Konopa 1994).

V současné době je za hlavní mechanismus účinku antracyklinů považována jejich interakce s topoisomerasou II (Brunton a kol. 2010). Jedná se o tzv. topoisomerasové jedy. Inhibitory z této skupiny inhibují topoisomerasu II ve fázi tzv. štěpného komplexu. V tomto stádiu je enzym spojen s DNA. V molekule DNA je rozštěpeno 5 párů bází a konce DNA jsou navázány na tyrosinové zbytky topoisomerasy II. Tato fáze je stabilizována pomocí antracyklinů a nedojde k opětovnému spojení DNA. Pokud dojde ke kontaktu replikačních nebo transkripčních enzymů s tímto komplexem spustí se proteolýza, která způsobí degradaci topoisomerasy. Výsledkem je vznik dvojitého zlomu v molekule DNA a apoptosa nádorové buňky (Deweese a Osheroff 2009).

Mezi další mechanismy, které by mohly ovlivnit procesy nádorových buněk, patří vznik DNA aduktů (Blardi a kol. 2012). Některé studie také sledují působení antracyklinů na aktivaci apoptických cest pomocí molekul regulujících buněčný cyklus nebo expresi

specifických růstových faktorů. Zkoumána je například spojitost mezi antracykliny a proapoptickým faktorem p53 (Minotti a kol. 2014).

### ***1.1.1.2 Metabolismus***

Mechanismus vstupu antracyklinu do buněk není zcela znám, ale předpokládá se, že prochází plazmatickou membránou pasivní difuzí a do jádra buňky vazbou na proteasomy. U lidí je přibližně 50 % léčiva vyloučeno z těla v nezměněné podobě a zbytek je zpracován třemi hlavními metabolickými cestami. Metabolismus antracyklinů zahrnuje hydroxylaci, tvorbou semichinonu a tvorbu deoxyaglykonu. Vznikají tak metabolity, které buď zvyšují, nebo snižují protinádorové vlastnosti antracyklinů (Edwardson a kol. 2015).

Hydroxylace (redukce karbonylové skupiny C-13), vede k tvorbě sekundárních alkoholů, které se pravděpodobně podílejí na kardiotoxicitě antracyklinů (Minotti a kol. 2014). Tato hlavní cesta biotransformace antracyklinů je zprostředkována heterogenní skupinou cytosolických NADPH-dependentních karbonyl redukujících enzymů ze skupiny aldo-keto reduktas a karbonylreduktas. Bylo prokázáno, že tyto enzymy katalyzují tvorbu daunorubicinolu, doxorubicinolu a epirubicinolu z původních léčiv (Menna a kol. 2012).

Další přeměnou, která může přispívat k toxicitě antracyklinů je vznik semichinonových radikálů. Jedná se o přeměnu, na které se podílí NADPH:cytochrom P450 reduktasa, NADH-ubichinonreduktasa, xantinoxidasa a syntasa oxidu dusnatého. V přítomnosti kyslíku, tak dochází ke vzniku superoxidového anionu a peroxidu vodíku. Tyto volné kyslíkové radikály způsobují peroxidaci lipidů v buněčných membránách, agregaci proteinů a smrt buněk (Edwardson a kol. 2015, Luo a kol. 1997).

Mezi metabolické přeměny antracyklinů patří také deglykosylace. Dochází při ní k redukčnímu štěpení glykosidické vazby a karbonylové skupiny postranního řetězce, což vede k tvorbě 7-deoxyaglykonů a hydroxyaglykonů (Licata a kol. 2000).

### 1.1.1.3 Kardiotoxicita

Léčbu pomocí antracyklinů provází řada vedlejších účinků, mezi které patří například alopecie, anémie, leukopenie, nevolnost a únava. Jedním z nejzávažnějších nežádoucích účinků je však antracyklinová kardiotoxicita, která často limituje jejich použití (McGowan a kol. 2017).

Existuje celá řada hypotéz, které vysvětlují kardiotoxicitu antracyklinů. Jednou z teorií je jednoelektronová redukce antracyklinů při které dochází ke vzniku semichinonových struktur. Vznikají tak radikály, které jsou donorem volného elektronu a v přítomnosti kyslíku poté reagují za vzniku superoxidových radikálů (Šimůnek a kol. 2009).

Dalším možným mechanismem může být interakce s  $\text{Fe}^{3+}$ , který může být za přítomnosti NADH-cytochrom P450 reduktasy nebo glutationu redukován na  $\text{Fe}^{2+}$ . Ten může následně interagovat s kyslíkem za vzniku superoxidového radikálu (Tokarska-Schlattner a kol. 2006).

Antracykliny se také vyznačují vysokou afinitou ke kardiolipinu, což je fosfolipid vyskytující se na vnitřní mitochondriální membráně. Je známo, že kardiolipin má významnou roli v eukaryotickém energetickém metabolismu. Antracykliny interakcí s kardiolipinem negativně působí na dýchací řetězec a ovlivňují energetickou situaci buňky (Tokarska-Schlattner a kol. 2006).

Další teorie poukazují na spojitost antracyklinů s metabolismem  $\text{Ca}^{2+}$  (Solem a kol. 1994) a vliv na expresi významných srdečních proteinů (Boucek a kol. 1999).

Nejnovější hypotézou je však v současnosti inhibice topoisomerasy  $\text{II}\beta$ . Topoisomerasa II je zodpovědná za rozvíjení DNA řetězce v průběhu replikace a transkripce. U lidí existují dva druhy topoisomerasy II. Zatímco topoisomerasa  $\text{II}\alpha$  se vyskytuje převážně u proliferujících buněk, topoisomerasa  $\text{II}\beta$  se vyskytuje u všech buněk, včetně kardiomyocytů. Inhibice topoisomerasy  $\text{II}\beta$  pomocí antracyklinů vede ke vzniku dvojitých zlomů u DNA a k poškození kardiomyocytů (Pimprapa a kol. 2014).

Dalším faktorem, který se může podílet na kardiotoxicitě antracyklinů jsou jejich sekundární alkoholy (např. doxo- a daunorubicinol), jejichž vznik je katalyzován

antracyklinreduktasami. Je známo, že tyto metabolity se hromadí v srdeční tkáni více než parentní látky a pravděpodobně se tak podílí na kardiotoxicitě (Menna a kol. 2006).

#### **1.1.1.4 Rezistence**

Komplikací nádorové léčby a příčinou jejího selhání je velmi často zvýšená schopnost nádorových buněk odolat účinkům cytotoxických látek. Maligní buněčné populace mohou být přirozeně rezistentní nebo mohou rezistence dosáhnout až v průběhu léčby. Při ztrátě citlivosti k jednomu cytostatiku může být zachována citlivost k jiným léčivům. Pokud při ztrátě citlivosti k jednomu přípravku současně dojde i k rezistenci na jiné, většinou strukturně podobné cytostatikum, hovoříme o zkřížené rezistenci. Pokud se léčiva liší strukturně i svým mechanickým účinkem jedná se o mnohočetnou rezistenci (Nosková a kol. 2000).

Multirezistence může být způsobena například zvýšenou expresí ABC transportérů. Jedná se o proteiny, které snižují intracelulární koncentraci léčiv tím, že transportují tyto látky ven z buňky a snižují tak jejich terapeutickou koncentraci (Dönmez a Gündüz 2011, Cíhalová a kol. 2013).

Účinek léčby pomocí antracyklinů může být dále snížen zvýšenou metabolickou přeměnou. Zvýšená exprese karbonyl redukujících enzymů, které katalyzují redukci antracyklinů na jejich sekundární alkoholy byla zjištěna u mnoha typů nádorových onemocnění včetně akutní myeloidní leukemie (Khanim a kol. 2014, Matsunaga a kol. 2014, Varatharajan a kol. 2012). Antracyklinreduktasy jsou často ve zvýšené míře exprimovány u pacientů se špatnou prognózou nebo s pokročilým stádiem rakoviny. Uvažuje se také o zavedení těchto enzymů jako diagnostických biomarkerů (Matsunaga a kol. 2012).

## **1.2 Karbonyl redukující enzymy a jejich úloha v nádorové terapii**

Enzymy metabolizující karbonylové sloučeniny jsou tříděny do čtyř proteinových nadrodin: aldo-keto reduktasy (AKR), dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR), dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem (MDR) a chinon reduktasy (QR). Na redukci karbonylových sloučenin se podílí hlavně AKR, SDR a QR, zatímco MDR jsou zodpovědné spíše za oxidaci alkoholů na karbonylové sloučeniny (Oppermann a Maser 2000).

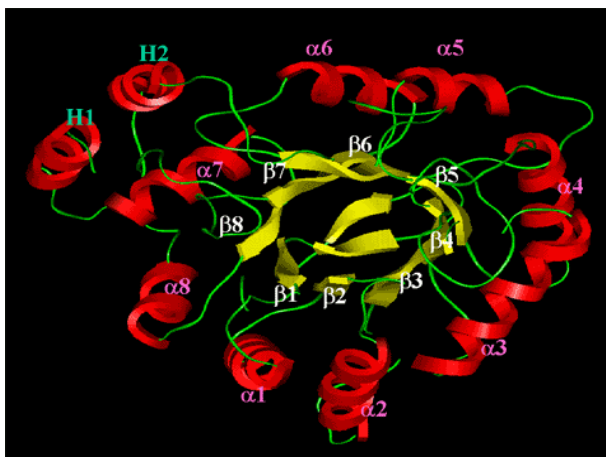
Karbonyl redukující enzymy jsou NADPH-dependentní enzymy, převážně monomerní, cytosolové enzymy s širokou substrátovou specificitou (Forrest a Gonzalez 2000). Účinná redukce karbonylové skupiny aldehydů, ketonů a chinonů na jejich hydroxyderiváty hraje významnou roli v metabolické přeměně endogenních (biogenních aldehydů, steroidů, prostaglandinů, reaktivních lipidových peroxidačních produktů) a xenobiotických karbonylových (farmakologických, karcinogenních, toxických) sloučenin, například chinonů odvozených z polycyklických aromatických uhlovodíků (Hoffmann a Maser 2008, Forrest a Gonzalez 2000).

Mezi významná léčiva, jejichž metabolická přeměna zahrnuje redukci karbonylové skupiny, patří například warfarin, boceprevir, tibolon, norethynodrel a nabumeton (Malatkova a kol. 2016, Skarydova a kol. 2013, Jin a kol. 2012, Ghosal a kol. 2011, Steckelbroeck a kol. 2006). Je také známo, že AKR a SDR enzymy katalyzují přeměnu antracyklinů na jejich sekundární alkoholy. Jak již bylo zmíněno výše, tyto metabolity vykazují nižší protinádorovou aktivitu, naopak se více hromadí v srdeční tkáni než parentní látky a jsou podezřelé z kardiotoxicity. Zvýšená exprese antracyklinreduktas byla zjištěna u mnoha typů nádorů, kde se mohou podílet na rezistenci vůči protinádorovým léčivům. Inhibitory těchto enzymů jsou tak považovány za nová potenciální terapeutika k léčbě rakoviny (Piska a kol. 2017).

Bylo prokázáno, že mezi nejvíce aktivní antracyklinreduktasy patří enzymy z nadrodiny aldo-keto reduktas (AKR1A1, AKR1B10, AKR1C3, AKR7A2) a dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (CBR1) (Bains a kol. 2013, Bains a kol. 2010).

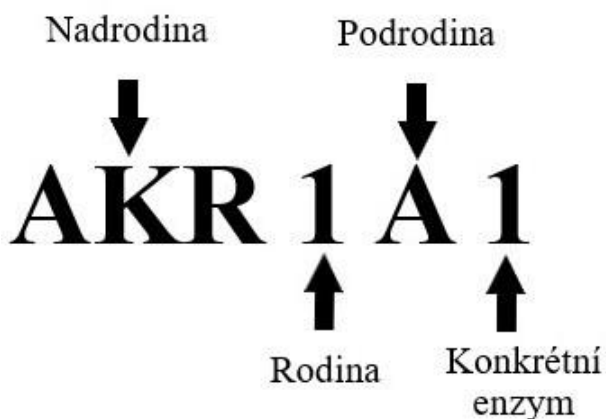
### **1.2.1 Aldo-keto reduktasy**

Aldo-keto reduktasy (AKR) jsou skupinou oxidoreduktas. Enzymy patřící do nadrodiny AKR jsou nejčastěji monomerní cytosolické proteiny o délce asi 320 aminokyselin se strukturou  $(\alpha/\beta)_8$ -soudku (Obr. 2). V aktivním místě se nachází tyrosin, lysin, aspartát a histidin. Charakteristickou vlastností AKR je široká substrátová specifita endogenních i xenobiotických sloučenin. K metabolizaci řady nejrůznějších substrátů potřebují kofaktor NADPH. AKR byly prokázány u obratlovců, bezobratlých, rostlin, prvoků, hub i archeobakterií, což naznačuje, že jde o velmi starou skupinu enzymů (Jez a Penning 2001).



**Obrázek 2:** Struktura  $(\alpha/\beta)_8$ -soudku AKR (Internet 2). Centrální část je tvořena osmi  $\beta$ -skládanými listy, které jsou obklopeny osmi  $\alpha$ -helixy.

Nomenklatura AKR nadrodiny je založená na sekvenci aminokyselin. Všechny enzymy spadající do této nadrodiny jsou označeny zkratkou „AKR“ arabským číslem, písmenem a druhým arabským číslem (Obr. 3). V popisu první arabské číslo udává číslo rodiny, do které enzym spadá. Tato rodina má maximální shodu s jinou rodinou menší než 40 % aminokyselin. Tedy v dané rodině musí být enzymy shodné ze 60 %. Písmeno označuje podrodinu, kde mají aminokyseliny alespoň ze 60 % shodnou identitu na úrovni aminokyselinové sekvence. Druhá číslice nám značí konkrétní enzym (Jez a Penning 2001).



**Obrázek 3:** Nomenklatura AKR nadrodiny

### 1.2.1.1 AKR1A1

Enzym AKR1A1 (aldehydreduktasa) vykazuje širokou substrátovou specifitu. Katalyzuje redukcí celé řady aromatických a alifatických aldehydů na jejich příslušné



alkoholy (Palackal a kol. 2001). Je přítomen v celé řadě tkání, například v mozku, plicích a prostatě (O'connor a kol. 1999). Mutace v genu pro AKR1A1 je spojována s non-Hodgkinovým lymfomem. Bylo zjištěno, že genetická změna významně zvyšuje riziko propuknutí tohoto onemocnění (Lan a kol. 2007).

Zvýšená exprese AKR1A1 byla objevena v radiorezistentních laryngeálních nádorových buňkách (Kim a kol. 2012). AKR1A1 patří společně s CBR1 mezi nejaktivnější antracyklinreduktasy (Bains a kol. 2010, Bains a kol. 2013).

### **1.2.1.2 AKR1B10**

Enzym AKR1B10 (aldosareduktasa tenkého střeva) redukuje alifatické a aromatické aldehydy. AKR1B10 je vysoce aktivní vůči *all-trans*-retinalu (Gallego a kol. 2007). Významná aktivita byla zaznamenána také vůči dolasetronu a oracinu (Martin a kol. 2006). Enzym je vysoce exprimován v tenkém střevě, tlustém střevě a také nadledvině (Kropotova a kol. 2010).

Bylo zjištěno, že AKR1B10 je zvýšeně exprimována u hepatocelulárního karcinomu (Murata a kol. 2016) a významně zvyšuje tvorbu metastáz u nádorového onemocnění prsu (Huang a kol. 2016). Nadměrná exprese AKR1B10 je prokázána ve většině dlaždicových buněk plicních karcinomů a u 29 % adenokarcinomů, z nichž oba nálezy jsou spojeny s kouřením. Zvýšená exprese AKR1B10 byla detekována u kuřáků se spinocelulární rakovinou plic více než u nekuřáků s tímto onemocněním nebo u kuřáků s adenokarcinomy. Jeho zvýšená exprese při karcinomech plic by mohla vést k zavedení AKR1B10 jako diagnostického biomarkeru (Matsunaga a kol. 2012, Fakumoto 2005).

### **1.2.1.3 AKR1C3**

Do rodiny AKR1C můžeme zařadit čtyři významné lidské enzymy. Jedná se o enzymy AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3 a AKR1C4, které mezi sebou vykazují 84 % homologii. Expresce těchto enzymů byla prokázána například v játrech, prostatě nebo mléčné žláze. Mezi jejich endogenní substráty patří steroidy a prostaglandiny. Enzymy vykazují vzájemně se překrývající aktivitu, ale odlišnou substrátovou specifitu. Nejvyšší aktivita vůči antracyklinům byla prokázána u enzymu AKR1C3 (Bains a kol. 2013, Bains a kol. 2010, Penning a kol. 2000).

Inhibitory AKR1C3 by mohly pomoci při léčbě hormonálně podmíněných i nepodmíněných nádorových onemocnění (Penning a Byrns 2009). AKR1C3 je známa jako prostagladnin-F-syntasa, účastní se metabolismu prostaglandinů a podporuje tak proliferaci nádorových buněk (Wang a kol. 2008). AKR1C3 má také jako 17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa (typ 5) významnou roli v metabolismu steroidních hormonů. Je známo, že redukuje  $\Delta^4$ -androsten-3,17-dion na testosteron a estron na 17 $\beta$ -estradiol. Zvýšená exprese AKR1C3 v hormonálně podmíněných rakovinách, mezi které patří rakovina prostaty, prsu a endometria může zvyšovat proliferaci nádorových buněk (Penning a Byrns 2009).

Vedle organismu vlastních substrátů se AKR1C3 též významně podílí na metabolismu xenobiotik, především významných léčiv (např. dolasetronu, naloxonu, oracinu, ketotifenu a haloperidolu) (Matsunaga a kol. 2006).

AKR1C3 je nadměrně exprimována při rakovině prostaty, kde přispívá k tvorbě androgenů a následné stimulaci androgenního receptoru (Doig a kol. 2016). Proto by mohla v budoucnu sloužit jako biomarker při progresi onemocnění (Tian a kol. 2014). Inhibice exprese AKR1C3 zabraňuje proliferaci lidské myeloidní leukémie (Liu a kol. 2008). AKR1C3 je důležitým regulátorem proliferace a diferenciací myeloidních buněk (Verna a kol. 2015).

Bylo prokázáno, že některé polymorfismy AKR1C3 zvyšují riziko vzniku dalších nádorových onemocnění, například rakoviny močového měchýře a B-buněčného lymfomu. Ukázalo se, že AKR1C3 se může podílet na rezistenci vůči protinádorovým lékům doxorubicinu, oracinu a cisplatině (Khamin a kol. 2014).

#### **1.2.1.4 AKR7A2**

AKR7A2 (sukcinátsemialdehydreduktasa) je protein, který je pravděpodobně lokalizován v Golgiho aparátu (Barski a kol. 2008). Fyziologicky katalyzuje NADPH-dependentní redukci sukcinátsemialdehydu na endogenní neuromodulátor  $\gamma$ -hydroxybutyrát. AKR7A2 také metabolizuje aflatoxin B1 (Barski a kol. 2008).

U AKR7A2 byla popsána i aktivita vůči aromatickým aldehydům a  $\alpha$ -dikarboonylovým sloučeninám. Aktivita byla prokázána také vůči daunorubicinu a etakrynové kyselině (Li a kol. 2016).

Bylo prokázáno, že AKR7A2 je na úrovni proteinu nejvíce exprimovaná antracyklinreduktasa v lidském srdci. Významné je toto zjištění zejména u jedinců s Downovým syndromem, u kterých lze z tohoto důvodu předpokládat zvýšenou kardiotoxicitu antracyklinů (Quiñones-Lombraña a kol. 2014). Dále bylo také zjištěno, že existuje souvislost mezi methylací DNA, expresí AKR7A2 a tvorbou kardiotoxického daunorubicinolu v lidském srdci (Hoefler a kol. 2016).

### **1.2.2 Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR)**

Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR) představují jednu z největších enzymových nadrodin. Enzymy SDR jsou přítomny od jednoduchých organismů až po vyšší eukaryota. Jejich všudypřítomnost zdůrazňuje jejich univerzálnost a zásadní význam pro metabolické procesy. Některé studie naznačují, že přibližně 25 % všech dehydrogenas patří do skupiny SDR (Person a kol. 2010).

Přestože jde o velmi heterogenní nadrodinu enzymů vzájemně mezi sebou sdílí několik charakteristických rysů. Typickým znakem je přítomnost Rossmanova záhybu tvořeného 6-7 paralelními  $\beta$ -skládanými listy, který z každé strany obklopují 2-3  $\alpha$ -helixy (Obr. 4). Kofaktor se váže na Rossmanův záhyb, který je umístěn na *N*-konci polypeptidového řetězce. Tato část řetězce se vyznačuje přítomností velkého množství glycinu (Tyr-Gly-X-X-X-Gly-X-Gly) na který se váže pyrofosfátová část kofaktoru. Aktivní místo enzymu je tvořeno tetradou Asn-Ser-Tyr-Lys (Person a kol. 2010, Kavanagh a kol. 2008).



### **1.2.2.1 CBR1**

Karboxylreduktasa 1 (CBR1, SDR21C1, prostaglandin 9-ketoreduktasa) je exprimována v celé řadě lidských tkání, jako jsou například játra, epidermis, žaludek, tenké střevo, ledviny, neuronální buňky a vlákna hladkého svalstva (Rashid a kol. 2010).

Mezi významné substráty CBR1 patří chinony, například ubichinon-1 a tokoferolchinon (Wermuth 1981). Vedle fyziologických chinonů CBR1 metabolizuje i mnoho toxických chinonů a léčiv, například antracyklinová cytostatika doxorubicin a daunorubicin (Wermuth 1986).

Změny v aktivitě lidské CBR1 se objevují často během tumorigeneze. Zvýšená exprese CBR1 byla prokázána například u nádorového onemocnění plic, tlustého střeva a prsu. Naopak snížení aktivity CBR1 bylo prokázáno u primárního karcinomu jater a rakoviny prostaty (Liu a kol. 2017). Snížení exprese CBR1 je dále spojováno se špatnou prognózou u rakoviny endometria a karcinomu děložního čípku (Murakami a kol. 2017). Studie také ukázaly, že snížená exprese CBR1 je spojena s metastázami do lymfatických uzlin a špatnou prognózou u rakoviny vaječnicků. Indukce exprese CBR1 u nádorů vaječnicků vede ke spontánnímu poklesu velikosti nádoru (Osawa a kol. 2015).

CBR1 patří mezi neaktivnější antracyklinreduktasy (Bains a kol. 2013, Bains a kol. 2010). Významně se podílí na rezistenci nádorových buněk vůči antracyklinům. V lidském srdci je CBR1 nejvíce exprimovanou antracyklinreduktasou na úrovni mRNA a lze tedy předpokládat její významný podíl na kardiotoxicitě antracyklinů (Quiñones-Lombraña a kol. 2014). Bylo například prokázáno, že CBR1 je klíčovým enzymem zodpovědným za rezistenci gastrointestinálních nádorových buněk vůči doxorubicinu (Matsunaga a kol. 2015). Také u akutní myeloidní leukémie (AML) bylo zjištěno, že zvýšená exprese CBR1 koreluje s množstvím daunorubicinolu v nádorových buňkách (Varatharajan a kol. 2012).

## **1.3 Cyklin-dependentní kinasy**

Kinasy řadíme do skupiny transferas. Jedná se o enzymy, které jsou schopny přenášet funkční skupinu z jedné molekuly (donoru) na cílovou molekulu (akceptor). Dle přenesené funkční skupiny lze rozdělit transferasy na methyltransferasy, kinasy a aminotransferasy. Významnou skupinou kinas jsou proteinkinasy, kterých je v lidském

genomu kódováno přibližně 518. Mezi ně se řadí cyklin-dependentní kinasy (CDK), které plní důležitou úlohu v procesu buněčného dělení (Adams 2001). Tyto hlavní regulátory byly objeveny v 70. a 80. letech minulého století Lelandem Hartwellem, Paulem Nursem a Timothy Huntem (Shapiro 2006).

### 1.3.1 Vliv CDK na buněčný cyklus

Buněčný cyklus je tvořen fázemi růstu, syntézy DNA a dělení. Délka a čas jednotlivých fází jsou řízeny externími a interními chemickými signály. Přejít mezi jednotlivými fázemi ( $G_1$ , S,  $G_2$  a M) je regulován v tzv. kontrolních bodech. Tyto kontrolní body jsou schopny zastavit posun do následující fáze cyklu, pokud není dokončen stěžejní krok – syntéza nebo oprava poškozené DNA. V případě splnění všech podmínek průchodu kontrolního bodu nastane další fáze buněčného cyklu. Klíčovými molekulami těchto kontrolních bodů mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu jsou cykliny a CDK (Snustad a kol. 2009).

CDK jsou relativně malé proteiny s molekulovou hmotností v rozmezí od 34 do 40 kDa, které fosforylují hydroxylové skupiny serinu a threoninu v polypeptidu cílové molekuly, takže jsou to serin-threonin kinasy (Morgan 2007). Jsou to katalyticky aktivní složky buněčného cyklu. Komplexy, které vytváří s cykliny, molekulami o velikosti 30–80 kDa, jsou důležitým bodem pro posun buněčného cyklu vpřed. CDK regulují aktivitu dalších proteinů přenosem fosfátové skupiny. Jejich fosforylační aktivita je však podmíněna přítomností cyklinů. Přítomné cykliny umožní vznik komplexu cyklin/CDK. V případě nepřítomnosti cyklinu nemůže komplex vzniknout a CDK nejsou aktivovány. Z tohoto důvodu je pro buněčný cyklus důležité střídavé sestavování a degradace komplexů cyklin/CDK (Snustad a kol. 2009).

CDK může být aktivována úplně nebo pouze částečně. Částečná aktivace kinasy probíhá navázáním cyklinu na CDK podjednotku. K úplné aktivaci dojde, pokud je komplex cyklin/CDK fosforylován pomocí aktivační kinasy (Meijer a kol. 1999).

Jedním z nejvýznamnějších kontrolních bodů buněčného cyklu je kontrolní bod nazývaný START, který nastává na konci  $G_1$  fáze. V tomto bodě buňka přijímá interní a externí signály, aby mohla vyhodnotit, kdy je správná doba na posun do S-fáze buněčného cyklu. Tento kontrolní bod reguluje komplex cyklin D/CDK4. Působením komplexu se buňka dostane z kontrolního bodu START a vstupuje do dalšího kola

replikace DNA, která předchází buněčnému dělení. V případě přítomnosti inhibičních proteinů v pozdní G<sub>1</sub>-fázi dojde k zastavení komplexu cyklin D/CDK4 a buňka nevstupuje do S-fáze. V případě nádorových buněk dochází k deregulaci kontrolních bodů. V nádorových buňkách se může objevit mutace v genech kódujících cykliny a CDK nebo proteiny, které odpovídají za vznik komplexu cyklin/CDK. Deregulace buněčného cyklu může být způsobena velkým množstvím nejrůznějších genetických chyb, které zapříčiní vznik nádorové masy (Snustad a kol. 2009).

Buňky s nefunkčním kontrolním bodem START jsou velmi citlivé k tomu, aby se staly nádorovými. Pokud se v buňce nachází poškozená DNA, je nutné zastavit posun buněčného cyklu do S-fáze cyklu. Normální buňky jsou naprogramovány k pozastavení v kontrolním bodě START, kde dojde k překontrolování opravené DNA, před zahájením replikace DNA. U buněk s poškozeným kontrolním bodem START dojde ke vstupu do S-fáze a během dalších buněčných cyklů dojde k akumulaci mutací, které jsou důsledkem poškozené DNA. Nashromážděné mutace v poškozeném kontrolním bodě mohou způsobit další deregulaci buněčného cyklu. Klony buněk s deregulovaným kontrolním bodem START se stávají velmi agresivními (Snustad a kol. 2009).

Další komplexy cyklin/CDK, které fosforylují různé substráty během jednotlivých fází buněčného cyklu nebo mají význam při jiných buněčných procesech jako je například apoptosa jsou uvedeny v tabulce 1. Některé z uvedených komplexů cyklin/CDK neregulují pouze fáze buněčného cyklu, ale působí i na nervové funkce a sestřih RNA. Z tohoto důvodu jsou také nazývány jako transkripční CDK (Rouchal 2011).

Expresí genů odpovědných za průběh buněčného cyklu je podmíněna fosforylací proteinů pomocí CDK. Jestliže dojde k expresi určité skupiny genů je buňka schopna posunu vpřed v buněčném cyklu (Meijer a kol. 1999). Doposud bylo objeveno minimálně 13 CDK a 25 typů cyklinů (Legraverend 2006).

Přítomnost inhibované nebo aktivní CDK v buňce může vest k regulaci proliferace a také k indukci diferenciaci. Významnou vlastností CDK je udržování rovnováhy mezi buněčnou proliferací a diferenciací buňky. Funkce některých CDK se liší v závislosti na typu buněk (Malgrange a kol. 2003).

**Tabulka 1:** Komplexy cyklin/CDK a jejich funkce v buněčném cyklu (upraveno dle Rouchal 2011)

Katalytická jednotka	Regulační jednotka	Funkce komplexu
CDK1	cyklin A1, A2, B1–B3	buněčný cyklus (G <sub>2</sub> –M), apoptosa
CDK 2	cyklin A1, A2, E1, E2	buněčný cyklus (G <sub>1</sub> –S), apoptosa
CDK3	cyklin A1, A2, E1, E2, C	buněčný cyklus (G <sub>0</sub> –G <sub>1</sub> –S)
CDK4	cyklin D1, D2, D3	buněčný cyklus (G <sub>1</sub> –S)
CDK5	cykliny typů D, E, G; proteiny p25, p35, p39	senescence, apoptosa, neuronové funkce
CDK6	cyklin D1, D2, D3	buněčný cyklus (G <sub>1</sub> –S)
CDK7	cyklin H	CDK-aktivující kinasa, transkripce
CDK8	cyklin C	transkripce
CDK9	cyklin T1, T2, K	transkripce
CDK10	cykliny typu L	transkripce, buněčný cyklus (G <sub>2</sub> – M), neuronové funkce
CDK11	cykliny typu L	transkripce, neuronové funkce, sestřih RNA
CDK12	cykliny typu L	sestřih RNA
CDK13	cykliny typu L	sestřih RNA

### 1.3.2 Inhibitory CDK

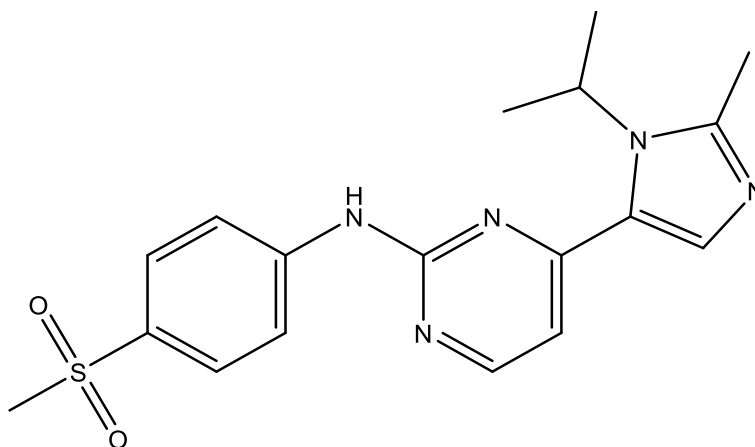
Inhibitory CDK (CDKi) jsou považovány za vhodnou léčbu zejména u pacientů se špatnou prognózou nebo s pokročilým stádiem rakoviny. Pacienti tuto léčbu přijímají mnohem lépe než klasickou chemoterapii, která vykazuje mnoho vedlejších účinků. Mechanismus CDKi je založen na principu zabránění proteinkinasám fosforylovat příslušné substráty. CDKi soutěží s ATP o vazbu v aktivním místě kinasy. Pro správnou funkci CDKi je nutné, aby vazba mezi aktivním místem a jednotlivými CDKi byla selektivní a vysoce efektivní, protože množství ATP v buňkách je mnohonásobně vyšší a proteiny k těmto molekulám vykazují vysokou afinitu (Grant 2009).



### 1.3.2.1 AZD5438

AZD5438 (4-[2-Methyl-1-(1methylethyl)-1*H*-imidazol-5-yl]-*N*-[4-(methylsulfonyl)fenyl]-2-pyrimidinamin) (Obr. 6) je silný inhibitor CDK1, CDK2 a CDK9 ( $IC_{50} = 16, 6, 20$  nM) (Boss a kol. 2010, Byth a kol. 2009).

Preklinické studie prokázaly slibný profil bezpečnosti a účinnosti AZD5438, což umožnilo provedení klinických studií s cílem stanovit toxicitu a optimální dávkování léčiva u lidských pacientů. Byly provedeny celkem tři studie, ve kterých bylo zařazeno 64 pacientů. V první studii byl AZD5438 podáván 4x denně, jednou za 7 dní, ve druhé studii po dobu 14 dnů, po kterých následovala sedmidenní přestávka a u pacientů s pokročilými solidními tumory byl AZD5438 dávkován kontinuálně. Nejčastějšími nežádoucími účinky byly nevolnost a zvracení. Při nepřetržitém dávkování bylo podáváno 40 mg čtyřikrát denně, což se ukázalo jako netolerovatelné. V průběhu týdenního rozvrhu byl AZD5438 obecně dobře tolerován (Boss a kol. 2010).



**Obrázek 6:** AZD5438

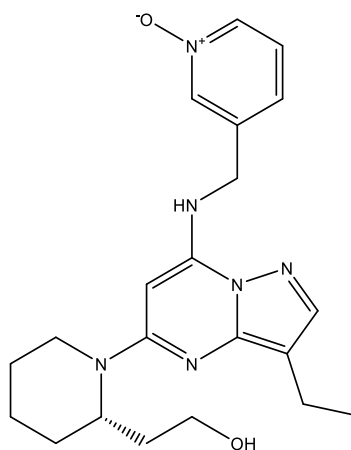
### 1.3.2.2 Dinaciclib

Dinaciclib (MK-7965, SCH-727965, 2-[(2*S*)-1-[3-ethyl-7-[(1-oxidopyridin-1-ium-3-yl)methylamin]pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-5-yl]piperidin-2-yl]etanol) (Obr. 7) inhibuje CDK1, CDK2, CDK5 a CDK9 ( $IC_{50} = 3, 1, 1$  a  $4$  nM) a je také inhibitorem CDK4, CDK6 a CDK7 ( $IC_{50} = 60-100$  nM) (Paruch a kol. 2010, Parry a kol. 2010).

Bylo zjištěno, že dinaciclib inhibuje také CDK12 ( $IC_{50} = 1$  nM) (Johnsons a kol. 2016). Dinaciclib vykazuje silnou protinádorovou aktivitu, inhibuje buněčný cyklus

a proliferaci u celé řady nádorových buněčných linií. V preklinických studiích byl dinaciclib účinný proti rakovině vaječníků (Chen a kol. 2015), štítné žlázy (Lin a kol. 2017) a prsu (Criscitello a kol. 2014, Johnsons a kol. 2016, Rajput a kol. 2016). Dinaciclib byl významně aktivní také u chronické lymfocytární leukémie (Johnson a kol. 2016) a akutní myeloidní leukémie s přestavbou MLL genu na dlouhém raménku 11 (Baker 2016).

V současné době je dinaciclib zahrnut v 17 klinických studiích, z nichž osm je aktivních nebo přijímá nové pacienty (Internet 4). Na základě výsledků prvních klinických studií bylo zjištěno, že dinaciclib vykazuje přijatelnou toxicitu a tolerovatelnost (Flynn a kol. 2015, Nemunaitis a kol. 2013). Na základě těchto studií byl dinaciclib zařazen do 3. fáze klinických studií jejichž výsledky potvrdily, že dinaciclib vykazuje významnou antileukemickou aktivitu (Ghia a kol. 2017).



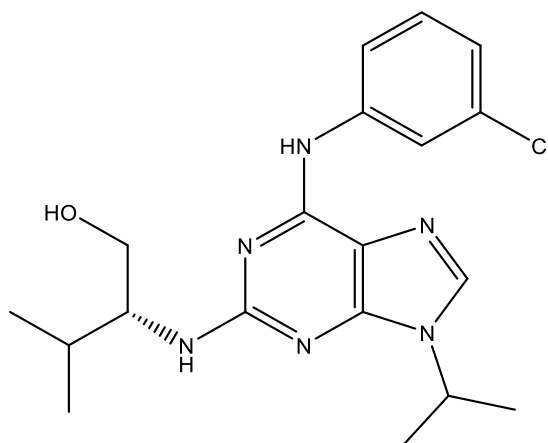
**Obrázek 7: Dinaciclib**

### **1.3.2.3 Purvalanol A**

Purvalanol A ((2*R*)-2-[[6-(3chloranilin)-9-propan-2-yl]purin-2-yl]amin]-3-methylbutan-1-ol) (Obr. 8) je označován jako silný apoptotický induktor, který způsobuje zastavení buněčného cyklu v různých typech nádorových buněk, například prostaty, prsu a střeva. Jedná se o inhibitor CDK1 a CDK2, který se selektivně a kompetitivně váže na vazebné místo pro ATP a tím zastavuje buněčný cyklus v M/G<sub>2</sub> fázi (Gürkan a kol. 2015).

Bylo prokázáno, že purvalanol A působí na různé typy buněčných linií (buňky rakoviny prsu, tlustého střeva, myší fibroblasty) a to na rozdíl od roscovitinu v menších

koncentracích (10  $\mu\text{M}$ ). Inkubace nádorových buněk s purvalanolem A vedla k reverzibilnímu zastavení buněčného cyklu a selektivní inhibici fosforylace několika substrátů CDK. U exponenciálně rostoucích buněk s dobou inkubace delší než 24 hodin v přítomnosti purvalanolu A došlo k trvalé inhibici proliferace a buněčné smrti (Villerbu a kol. 2001). Purvalanol A nebyl doposud zařazen do klinických studií (Internet 4).

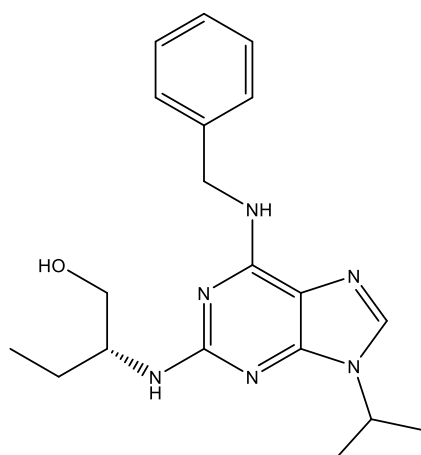


**Obrázek 8:** Purvalanol A

#### 1.3.2.4 Roscovitin

Roscovitin (Seliciclib, CYC 202, (2*R*)-2-[[6-(benzylamin)-9-isopropyl-9*H*-purin-2-yl] amin]-1-butanol) (Obr. 9) je inhibitor CDK1, CDK2, CDK5 a CDK9, který se váže v místě vazby ATP k CDK. Roscovitin je také slabým inhibitorem CDK4 a CDK6 (Blachly a Byrd 2013, Cicenas a kol. 2015).

Protinádorová aktivita roscovitinu byla prokázána u celé řady buněčných linií, například u rakoviny vaječníků, střeva, prsu, plic a u osteosarkomu (Hsieh a kol. 2009, Raynaud a kol. 2005). Vysoká účinnost roscovitinu byla zjištěna u chronické lymfocytární leukémie (CLL) (Blachly a Byrd 2013). Roscovitin je účinný také u nádorových buněk, které jsou rezistentní na doxorubicin (Raynaud a kol. 2005) a vykazuje synergistický účinek s daunorubicinem (Cihalova a kol. 2013). V současné době je roscovitin testován nejen jako potencionální léčivo k léčbě rakoviny, ale také k léčbě neurodegenerativních onemocnění, zánětu, virových infekcí, polycystických onemocnění ledvin a glomerulonefritidy (Cicenas a kol. 2015). Kromě klinických studií týkajících se protinádorového účinku je roscovitin zařazen také do klinických studií týkajících se Cushingovy choroby a cystické fibrózy (Internet 5, Internet 6).

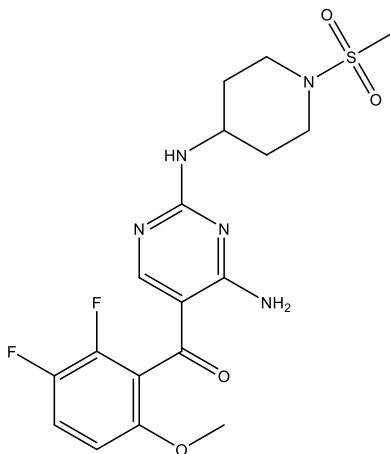


**Obrázek 9:** Roscovitin

#### 1.3.2.5 R547

R547 ([4-amino-2-[(1-methylsulfonylpiperidin-4-yl)amin]pyrimidin-5-yl]-(2,3-difluor-6-methoxyfenyl)methanon) (Obr. 10) je selektivním ATP-kompetitivním inhibitorem CDK1, CDK2 a CDK4 (Chu a kol. 2006).

R547 inhibuje cyklus nádorových buněk v G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub> fázi, což je spojeno s následnou apoptosou buňky. Protinádorová aktivita R547 byla prokázána u potkanů i u lidských xenoimplantátů myši. Bylo zjištěno, že R547 vykazuje stejnou účinnost při každodenním perorálním podání jako při intravenózním dávkování jednou týdně. Profil inhibice R547 naznačuje, že může být vhodný pro léčbu solidních nádorů. R547 je v současnosti hodnocen v klinických studiích fáze I (DePinto a kol. 2006).



**Obrázek 10:** R547

## 2 Cíl práce

Na katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové bylo zjištěno, že některé CDKi jsou schopné inhibovat karbonyl redukující enzymy. Screening vybraných CDKi vůči nejaktivnějším antracyklinreduktasám (AKR1A1, AKR1B10, AKR1C3, AKR7A2 a CBR1) prokázal významnou inhibici AKR1C3 u AZD5438 ( $IC_{50} = 9,6 \mu M$ ), dinaciclibu ( $IC_{50} = 0,2 \mu M$ ), purvalanolu A ( $IC_{50} = 6,6 \mu M$ ), roscovitinu ( $IC_{50} = 2,2 \mu M$ ) a R547 ( $IC_{50} = 43 \mu M$ ) (nepublikovaná data).

Ačkoliv inhibice antracyklinreduktas představuje jednu z možností, jak překonat antracyklinovou rezistenci u nádorových buněk, změny v expresi těchto enzymů mohou být dalším faktorem, který může významně ovlivnit rezistenci nádorových buněk vůči antracyklinům.

Hlavním cílem této diplomové práce bylo experimentální stanovení vlivu dinaciclibu, roscovitinu, purvalanolu A, AZD5438 a R547 na expresi CBR1, AKR1A1, AKR1B10, AKR1C3 a AKR7A2 u lidských buněčných nádorových linií. Práce byla rozdělena do několika dílčích kroků:

- Stanovení exprese enzymů na úrovni mRNA pomocí metody kvantitativní RT-PCR za využití fluorescenčního barviva SYBR Green I.  
Ke splnění tohoto cíle bylo zapotřebí izolovat RNA z ovlivněných buněk, odstranit nežádoucí genomovou DNA, přepsat mRNA do cDNA pomocí reverzní transkripce, ověřit integritu vzniklé cDNA a stanovit expresi pomocí kvantitativní RT-PCR.
- Stanovení exprese AKR1C3 na úrovni proteinu.  
Ke splnění tohoto cíle bylo zapotřebí izolovat protein z ovlivněných buněk, optimalizovat množství proteinu vhodného k detekci a detekovat expresi AKR1C3 pomocí Western blottingu s chemiluminiscenční detekcí.

## 3 Metodika

### 3.1 Materiál a přístroje

#### 3.1.1 Chemikálie

Název	Výrobce
2-merkaptoethanol	Sigma-Aldrich
Agarosa	Serva
Akrylamid (AA)	Sigma-Aldrich
AZD5438	Axon Medchen
Bis-AA	Lachema
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Bradford	Sigma-Aldrich
Bromfenolová modř (BFB)	Sigma-Aldrich
Coomassie brilliant blue G250	Fluka
DEPC voda	Sigma-Aldrich
Dihydrogenfosforečnan draselný	Penta
Dinaciclib	Applichem
DMEM	Lonza
DMSO	Sigma-Aldrich
DNase I pufr	Biolabs
dNTP mix 10 nM	Biolabs
DTT 0,1 M	Biolabs
Dodecylsírán sodný (SDS)	Lachema
Ethanol	PENTA
Ethanol LC-MS (100%)	VWR Chemicals
First-Strand Buffer	Biolabs
Fetální Bovinní Sérum	Sigma-Aldrich
Fomadon LQN	Foma
Fomafix	Foma
Glycin	Sigma-Aldrich
Glycerol	Lach-Ner
Hydrogenfosforečnan draselný	Penta
Chlorid sodný (NaCl)	PENTA

Chloroform	Serva
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	Sigma-Aldrich
Kyselina chlorovodíková	Lach-Ner
Kyselina octová	PENTA
Lihomethanol 96%	PENTA
<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Persíran amonný (APS)	Sigma-Aldrich
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Purvalanol A	Sigma-Aldrich
Roscovitin	Selleckchem
RPMI 1640	Lonza
R547	Axon Medchen
Ultračistá voda	
Tri-reagent	MRC
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	PENTA
Trypsin	Lonza
TWEEN 20	Sigma-Aldrich

### 3.1.2 Materiál a pomůcky

Název	Výrobce
Amersham ECL Prime Western blotting detection reagent	GE Healthcare Life Sciences
Blotovací papíry Blotting padd 707	VWR
Červená žárovka do fotokomory Narva (15 W/220 V)	Dr. Fischer
Nitroceluloseová blotovací membrána	GE Healthcare Life Sciences
X-Omat LS Film	Kodak

### 3.1.3 Přístroje

Název	Výrobce
Blotovací aparatura Trans-Blot Turbo	Bio-Rad
Centrifuga MiniSpin plus	Generi Biotech
Concentrator Plus	Eppendorf
Elektroforetická aparatura Mini-PROTEAN Tetra cell	Bio-Rad
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific
Osvitová kazeta Hypercassette	Amersham
QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR system	Applied biosystems
Termomixer Compact	Eppendorf
Thermal Cycler MJ Mini	Bio-Rad
Zdroj napětí Powerpac universal	Bio-Rad

### 3.1.4 Hmotnostní marker

Název	Výrobce
Presicion plus protein Standards, All blue	Bio-Rad

### 3.1.5 Enzymy

Název	Výrobce
DNasa I	Biolabs
SuperScript II reverzní transkriptasa	Biolabs

### 3.1.6 Kity

Název	Výrobce
qPCR Core kit for SYBR <sup>®</sup> Green I No ROX	Eurogentec
Direct-zol <sup>™</sup> RNA MiniPrep	Zymo Research, Irvine



### 3.1.7 Plazmidy

Název	Výrobce
pET-28b AKR1A1	KBV FaF UK
pET-28bAKR1B10	KBV FaF UK
pET-28bAKR1C3	KBV FaF UK
pET-28bAKR7A2	KBV FaF UK
pET-28bCBR1	KBV FaF UK

### 3.1.8 Primery

Název	Výrobce
Oligo(dT) 0,1 mM	Biolabs
GAPDH (5') Forward:5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'	Generi Biotech
GAPDH (5') Reverse: 5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'	Generi Biotech
GAPDH (3') Forward:5'-CTCCCACTCTTCCACCTTCG-3'	Generi Biotech
GAPDH (3') Reverse:5'-CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'	Generi Biotech
AKR1A1 Forward: 5'-GATCCTGATGAGCCTGTCCTG- 3'	Generi Biotech
AKR1A1 Reverse: 5'-AGATCGGCCATACTTTTCAGC- 3'	Generi Biotech
AKR1B10 Forward: 5'-ACAGGGATTCAAGTCTGGGG- 3'	Generi Biotech
AKR1B10Reverse: 5'-ACGTTGCTTTTCCACCGATG- 3'	Generi Biotech
AKR1C3 Forward: 5'-GCCAGGTGAGGAACTTTCAC- 3'	Generi Biotech
AKR1C3 Reverse: 5'-AGTTTGACACCCCAATGGAC- 3'	Generi Biotech
AKR7A2Forward: 5'-TCTACCTACACGCACCTGAC- 3'	Generi Biotech
AKR7A2Reverse: 5'-TACAGATCTCGGCCACTTCC- 3'	Generi Biotech
CBR1 Forward 1: 5'-AGCTGGACATCGACGATCTG- 3'	Generi Biotech
CBR1 Reverse 1: 5'-GTGTGGGATCAGCAACCTTG- 3'	Generi Biotech

### 3.1.9 Protilátky a rekombinantní AKR1C3

Název	Výrobce
Primární králičí protilátka proti AKR1C3, Ab 84327	Abcam
Primární myší protilátka proti $\beta$ -aktinu, Ab 8226	Abcam
Sekundární prasečí protilátka proti králičí protilátce, P0217	Dako
Sekundární králičí protilátka proti myší protilátce, P0260	Dako
rekombinantní AKR1C3, c=1,3 mg/ml	KBV FaF UK

### 3.1.10 Chemikálie a roztoky pro SDS-PAGE elektroforézu a Western blotting

Podrobné popisy přípravy chemikálií a pracovních roztoků pro SDS-PAGE elektroforézu a Western blotting jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tab. 2 a 3):

**Tabulka 2:** Chemikálie a pracovní roztoky pro SDS-PAGE elektroforézu

30% akrylamid (AA) + 0,8% bisakrylamid (bis-AA)	30 g AA 0,8 g bis-AA <u>100 ml ultračisté vody</u> uskladnit v ledničce
1,5 M Tris – HCl pufr pH 8,8	18,5 g Tris <u>75 ml ultračisté vody</u> upravit pH na 8,8 pomocí koncentrované HCl doplnit ultračistou vodou do 100 ml uskladnit v ledničce
0,5 M Tris – HCl pufr pH 6,8	6 g Tris <u>75 ml ultračisté vody</u> upravit pH na 6,8 pomocí koncentrované HCl doplnit ultračistou vodou do 100 ml uskladnit v ledničce
0,2 mM Draselno-fosfátový pufr pH 7,4	<b>Roztok A</b> (0,2 M $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 200ml: 5,5g dihydrogenfosforečnanu draselného <u>200ml ultračisté vody</u> <b>Roztok B</b> ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 200ml: 7g hydrogenfosforečnanu draselného <u>200 ml ultračisté vody</u> pH 7,4 získáme smícháním 80,2 ml roztoku A a 19,8 ml roztoku B
0,5% Bromfenolová modř	5 mg bromfenolové modři <u>10 ml ultračisté vody</u> uchovávat při laboratorní teplotě
10% SDS	10 g SDS 100 ml ultračisté vody uchovávat při laboratorní teplotě

10% APS	20 mg persíranu amonného 200 µl ultračisté vody vždy připravovat v čas spotřeby
5x elektrodový pufr pH 8,3	72 g glycinu 15g Tris 5g SDS <u>900 ml ultračisté vody</u> upravit pH na 8,3 pomocí koncentrované HCl doplnit ultračistou vodou do 1000 ml
5x zásobní vzorkový pufr	1,3 ml destilované vody 1,0 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 2,0 ml glycerolu 3,0 ml 10% SDS 0,6 ml 0,5% BFB

**Tabulka 3:** Chemikálie a pracovní roztoky pro Western blotting

10x zásobní TBS pufr	24 g Tris 88 g NaCl <u>900 ml ultračisté vody</u> upravit pH na 7,6 pomocí HCl doplnit do 1000 ml ultračistou vodou uskladnit při laboratorní teplotě
1x TBS-T pufr	<u>100 ml 10x zásobního TBS pufru</u> doplnit do 1000 ml ultračistou vodou <u>1,0 ml TWEEN 20</u> uskladnit při laboratorní teplotě
Blotovací pufr	1,51 g 25 mM Tris 7,21 g 192 mM glycin <u>100 ml 20% methanol</u> doplnit do 500 ml ultračistou vodou uskladnit v ledničce

5% blokovací pufr (5% BSA)	5 g BSA 100 ml TBS-T uskladnit v ledniče
3% blokovací pufr (3% BSA)	3 g BSA 100 ml TBS-T uskladnit v ledniče
Stripovací pufr	25 ml 0,5 MTris-Cl, pH 6,8 40 ml 10% SDS 1,6 ml 2-merkaptoethanol 135 ml ultračisté vody uskladnit v ledniče

#### Pracovní roztoky pro kontrolu přenosu proteinů

10% kyselina octová	10,1 ml kyseliny octové doplnit do 100 ml ultračistou vodou
1% kyselina octová	1 ml kyseliny octové doplnit do 100 ml ultračistou vodou
Barvicí roztok 0,1% Ponceau S	0,1 g Ponceau S 100 ml ultračisté vody uskladnit při laboratorní teplotě
0,25% Coomassie Blue	0,25 g CBBGdo 100 ml 10% kyseliny octové

#### Pracovní roztoky pro detekční systém

Detekční systém	roztok A smíchat s roztokem B v poměru 1:1 celkový objem vypočítat dle rovnice (ml): $\text{šířka membrány} \times \text{výška membrána} \times 0,05$
Vývojka	6 ml Fomadonu LQN <u>84 ml ultračisté vody</u> příprava v temné komoře uskladnit v ledniče
Ustalovač	15 ml Fomafixu <u>75 ml ultračisté vody</u> příprava v temné komoře uskladnit v ledniče

### 3.1.11 Buněčné linie

Buněčné linie HepG2 a HL-60 byly objednány od firmy ATCC. Stručná charakteristika buněčných linií uvedena v tabulce 4.

**Tabulka 4:** *Charakteristika buněk*

<b>HepG2</b>	Buňky lidského karcinomu jater od 15tiletého kavkazského muže 5. nejčastější typ rakoviny po celém světě Adherentní, epiteliální buňky Rostou jako monovrstvy v malých agregátech
<b>HL-60</b>	Leukocyty z periferní krve od 36tileté kavkazské ženy s akutní promyelocytární leukémií Kultivované buňky jsou převážně neutrofilní promyelocyty 10% buněk diferencuje do vyššího vývojového stádia

(Donato a kol. 2015, Costantini a kol. 2013, Collins a kol. 1978)

## 3.2 Metodika

K experimentální studii byly použity dva druhy buněčných linií. Jednalo se o adherentní buněčnou linii HepG2 (buňky jaterního karcinomu) a suspenzní buněčnou linii HL-60 (leukemické buňky).

### 3.2.1 Práce s buněčnou linií HepG2

Buňky lidského jaterního karcinomu byly kultivovány v inkubátoru o teplotě 37 °C v prostředí 5 % CO<sub>2</sub>. Jako kultivační médium byl použit DMEM s 10 % fetálního bovinního séra. Buňky byly pasážovány dvakrát týdně. Jelikož tato buněčná linie patří mezi adherentní, bylo při pasážování nutné použít trypsin k uvolnění buněk z povrchu kultivační lahve (75 cm<sup>2</sup>). Po odsátí kultivačního média byly buňky nejprve opláchnuty pomocí PBS (10 ml). Došlo tak k dokonalému odstranění média z buněčné kultury. Následně byly buňky uvolněny pomocí trypsinu (3 ml). Po uvolnění buněk byl trypsin inaktivován přidáním kultivačního média (10 ml). V případě pokračování kultivace byla část buněk přenesena do nové kultivační lahve (tak, aby výsledná koncentrace buněk v nové lahvi byla 100 000 buněk/ml), zbytek buněk byl použit na pokusy.

Na základě experimentů provedených již dříve na katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové byly u studovaných inhibitorů voleny takové koncentrace, které jsou klinicky dosažitelné v lidské plazmě (Benson a kol. 2007, Raynaud a kol. 2004, Nemunaitisa kol. 2013, Boss a kol. 2010, DePinto a kol. 2006) a zároveň pro danou buněčnou linii ještě pokud možno netoxické (nepublikovaná data). Koncentrace CDKi testované v rámci této diplomové práce jsou uvedeny v tabulce 5. U kontrolního vzorku, který neobsahoval CDKi byl místo inhibitoru pipetován dimethylsulfoxid (DMSO), což je látka, ve které jsou testované CDKi rozpuštěny.

**Tabulka 5:** *CDKi a jejich testované koncentrace*

	Testovaná koncentrace ( $\mu\text{M}$ )	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) HepG2 <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) HL-60 <sup>a</sup>	C <sub>max</sub> ( $\mu\text{M}$ ) v plazmě <sup>b</sup>
<b>Dinaciclib</b>	0,005	0,016	0,002	1,6
<b>AZD5438</b>	1	1,7	1,1	1,9
<b>Purvalanol A</b>	10	15	10	10
<b>Roscovitin</b>	10	17	11	10
<b>R547</b>	0,1	0,2	0,2	1

**Pozn.:** <sup>a</sup>nepublikovaná data; <sup>b</sup>c<sub>max</sub> = maximální koncentrace CDKi stanovená v lidské plazmě, pouze u purvalanolu A a R547 byla z nedostatku dat u lidských pacientů použita c<sub>max</sub> stanovená v pokusech se zvířaty.

Buňky pro izolaci RNA byly nasazeny na 12-jamkovou destičku. Do každé jamky destičky bylo pipetováno  $70 \times 10^4$  buněk ve 2 ml růstového media s FBS. Po 24 hodinách bylo médium odsáto a byla přidána testovaná látka (2,5  $\mu\text{l}$ ) rozpuštěná v růstovém médiu o celkovém objemu 1 ml. U kontrolního vzorku bez CDKi bylo místo inhibitoru do média (1 ml) pipetováno 2,5  $\mu\text{l}$  DMSO. Po dalších 24 hodinách bylo opět odsáto médium s testovou látkou a buňky byly lyzovány ve 300  $\mu\text{l}$  Tri-reagentu a přeneseny do 1,5 ml zkumavky.

Buňky pro izolaci proteinu byly nasazeny na 6-ti jamkovou destičku. Do každé jamky destičky byly napipetovány 4 ml růstového média s FBS ve kterých se nacházelo  $140 \times 10^4$  buněk. Po 24 hodinách bylo vyměněno kultivační médium za médium s testovanou látkou (5  $\mu\text{l}$ ) o celkovém objemu 2 ml. U kontrolního vzorku bez CDKi bylo místo inhibitoru do média (2 ml) pipetováno 5  $\mu\text{l}$  DMSO. Kultivace s testovanou látkou

probíhala 48 hodin. Po uplynutí této doby bylo odsáto kultivační médium s testovanou látkou. Pro dokonalé odstranění tohoto média byly buněčné kolonie opláchnuty PBS. Buňky z jamky destičky byly uvolněny pomocí 400  $\mu$ l trypsinu a trypsin byl následně inaktivován pomocí 1 ml růstového média. Celý obsah jamky byl napipetován do zkumavky o objemu 5 ml. Ze zkumavek stočených v centrifuzě při  $1700 \times g$  po dobu 10 minut byl odebrán supernatant. Peleta byla opláchnuta 2 ml PBS a byla provedena centrifugace za stejných podmínek jako v prvním kroku. Po centrifugaci byl opět odstraněn supernatant a ke každé peletě ve zkumavce bylo přidáno 300  $\mu$ l lyzačního pufru (složení: 50 nM Tris-HCl, 150 nM NaCl, 10 % glycerol, 1 % Triton X-100, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 40 mM  $\beta$ -glycerolfosfát, 50 mM fluorid sodný, 10 mM pyrofosfát sodný, 2 mM DTT, 200  $\mu$ M orthovanadát sodný, 100x zředěná směs inhibitorů proteas, pH 7,4). Celý proces lyzace probíhal po dobu 10 minut na ledu. Po skončení stanovené doby lyzace byly vzorky centrifugovány v centrifuzě rychlostí  $12000 \times g$  15 minut. V takto získaném supernatantu bylo změřeno množství proteinu metodou dle Bradfordové (Bradford 1976).

### 3.2.2 Práce s buněčnou linií HL-60

Buněčná linie HL-60 je odvozena od pacienta s akutní promyelocytární leukémií. Buňky HL-60 byly kultivovány za stejných podmínek jako buněčná linie HepG2 (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Jako kultivační médium však bylo použito RPMI 1640 s 10 % FBS. Buňky byly pasážovány 2x týdně. V případě pokračování kultivace byla část buněk přenesena do nové kultivační lahve (tak, aby výsledná koncentrace buněk v nové lahvi byla 100 000 buněk/ml), zbytek buněk byl použit na pokusy. V *in vitro* podmínkách jsou buňky volně suspendované v kultivačním médiu, a proto při přípravě buněk k pasážování a k přenosu do 12 a 6-jamkových destiček nebyl použit trypsin. Při kultivaci buněk pro extrakci mRNA bylo nasazeno  $40 \times 10^4$  buněk na jamku (12-jamková destička). Buňky pro izolaci proteinu byly kultivovány v množství  $80 \times 10^4$  na jamku (6-jamková destička).

Jelikož se jedná o suspenzní buněčnou linii, buňky musely být pipetovány v polovičním objemu, tzn.  $40 \times 10^4$  buněk v 1 ml v případě izolace RNA a  $80 \times 10^4$  buněk ve 2 ml v případě izolace proteinu. K buňkám na destičce bylo ihned pipetováno médium obsahující CDKi ve dvojnásobné koncentraci oproti koncentraci požadované (1 ml v případě izolace RNA, 2 ml v případě stanovení proteinu – smícháním s buňkami již nanesenými na destičce došlo k naředění koncentrace inhibitoru na koncentraci požadovanou).

Buňky pro izolaci RNA byly odebrány i s médiem po 24 hodinách do falkonky o objemu 15 ml, stočeny při  $1700 \times g$  po dobu 5 minut. Poté byl odebrán supernatant a k peletě bylo přidáno 300  $\mu$ l Tri-reagentu.

Odběr buněk pro protein byl též proveden do 15 ml falkonky. Proces získání proteinu z buněk HL-60 byl stejný jako získání proteinů z buněk HepG2 (Kap. 3.2.1).

### **3.2.3 Izolace RNA**

K izolaci RNA byly využity dvě metody fenol-chloroformová extrakce a metoda založená na separaci RNA pomocí kolonek.

#### **3.2.3.1 Fenol-chloroformová extrakce**

K zlyzovaným buňkám bylo přidáno 700  $\mu$ l Tri-reagentu a celkový objem tak byl doplněn na 1 ml. Tri-reagent obsahuje fenol a guanidium isothyokyanát, které stabilizují biologický materiál a zároveň denaturují proteiny přítomné ve vzorku. Následovně bylo přidáno 200  $\mu$ l chloroformu. Díky chloroformu dochází k rozdělení fází, kdy proteiny přechází do organické fáze, DNA zůstává na fázovém rozhraní a RNA se nachází ve vodné fázi (Rio a kol. 2010). Obsah zkumavky byl 15 s důkladně míchán. Po dokonalém promísení byla zkumavka ponechána za laboratorní teploty 2–3 minuty v klidu a nakonec stočena při  $4^\circ\text{C}$  po dobu 10 minut při  $12000 \times g$ .

Při centrifugaci byla oddělena vodná fáze obsahující mRNA. Vodná horní fáze byla přepipetována do sterilní mikrozkuavky a smísena s 500  $\mu$ l isopropanolu. Během inkubační doby trvající 10 minut při laboratorní teplotě došlo k vysrážení RNA. Poté následovala centrifugace za stejných podmínek jako v prvním kroku a ze zkumavky byl odstraněn supernatant.

Vzniklá peleta byla opláchnuta 75% ethanolem (500  $\mu$ l) a stočena v centrifuze jako v předcházejících krocích. Po odstranění horní vrstvy byla peleta přibližně 10 minut sušena a poté rozpuštěna v 15  $\mu$ l vody obsahující diethylpyrokarbonát (DEPC). Výsledná koncentrace RNA byla spektrofotometricky změřena na Nanodropu.



### 3.2.3.2 *Extrakce pomocí separačních kolonek*

K extrakci byl použit kit Direct-zol<sup>TM</sup>RNA MiniPrep (Zymo Research, Irvine). Balení obsahuje lyofilizovanou DNasu I. K aktivaci DNasy I je nutné přidat 275  $\mu$ l čisté vody (DNase/RNase – Free water). Aktivovaný enzym je nutné skladovat v mrazničce při -20 °C. V balení kitu se nachází dva pufrы označované výrobcem jako koncentrovaný Direct-zol<sup>TM</sup>RNA PreWash a RNA Wash Buffer. K pufru označovaném jako Direct-zol<sup>TM</sup> RNA PreWash bylo přidáno 40 ml 100% ethanolu a pufr RNA Wash byl naředěn 192 ml 100% ethanolu.

Do zkumavky ke zlyzovaným buňkám v 1 ml Tri-reagentu bylo dle návodu přidáno stejné množství 100% ethanolu. Postupně byla tato směs pipetována na extrakční kolonku zkumavky a pomocí centrifugace trvající 30 s při 13000  $\times$  g byly odstraněny odpadní látky do zkumavky. Tato zkumavka byla po centrifugaci vyměněna za novou čistou zkumavku. Na kolonku bylo pipetováno 400  $\mu$ l promývacího pufru (RNA Wash Buffer) a opět byla provedena centrifugace trvající 30 s při 13000  $\times$  g. Odpad ze zkumavky byl vylit. Na kolonu byl napipetován Master mix obsahující DNasu I a pufr (DNA Digestion pufr) připravený dle tabulky 6 o celkovém objemu 80  $\mu$ l. Vzorek na kolonce byl inkubován s DNasou I po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci za laboratorní teploty byla provedena centrifugace opět za stejných podmínek jako v předešlých krocích. Na kolonku bylo následně přidáno 400  $\mu$ l Direct-zol RNA PreWash pufru a byla provedena centrifugace. Odpad ze spodní části zkumavky byl odstraněn. Tento krok byl proveden dvakrát. Posledním krokem před elucí RNA bylo promytí kolony 700  $\mu$ l RNA Wash pufru. Centrifugace však probíhala za změněných podmínek oproti předešlým krokům, a to po dobu 2 minut při 13000  $\times$  g. Odpad po centrifugaci byl opět odstraněn. Posledním krokem extrakce byla eluce RNA do zkumavky o objemu 1,5 ml pomocí 30  $\mu$ l vody (DNase/RNase Free Water), který byl před centrifugací inkubován 2 minut při laboratorní teplotě. Centrifugace probíhala 30 s při 13000  $\times$  g. Ve výsledném produktu byla změřena koncentrace RNA pomocí Nanodropu. Navazujícím krokem byl přepis RNA na cDNA v procesu nazývaném reverzní transkripce popsaném v kapitole 3.2.5.

**Tabulka 6:** Master mix pro ošetření DNasou I v případě kolonek (80  $\mu$ l na 1 vzorek)

DNasa I	5 $\mu$ l
DNA Digestion pufr	75 $\mu$ l

### 3.2.4 Odstranění genomové DNA

Jelikož je DNasa I součástí kitu, který byl použit v případě extrakce RNA pomocí separačních kolonek, týká se tento krok pouze RNA získané pomocí fenol-chloroformové extrakce. Tento proces zahrnuje odstranění genomové DNA ve vzorku RNA, který byl získán v postupu popsaném v kapitole 3.2.3.1. Do mikrozkušavky byla napipetována reakční směs o celkovém objemu 20  $\mu$ l, která obsahovala 2  $\mu$ l DNasy I, 2  $\mu$ l reakčního pufru pro DNasu I, RNA (10000 ng) a vodu (DEPC).

Reakční směs byla inkubována 30 minut při 37 °C. Před koncem inkubace byl do reakční směsi přidán 1  $\mu$ l 5 nM EDTA a následovalo zvýšení teploty na 75 °C po dobu 10 minut. Při zvýšení teploty na 75 °C došlo k inaktivaci enzymu DNasy I. Přechištěný vzorek byl ponechán několik minut při laboratorní teplotě, aby došlo ke zchlazení. Výsledná koncentrace RNA byla opět změřena na Nanodropu.

### 3.2.5 Reverzní transkripce

Jedná se o proces, při kterém je RNA přepsaná pomocí reverzní transkriptázy do cDNA. Do mikrozkušavky byla nejprve napipetována reakční směs o celkovém objemu 20  $\mu$ l, která obsahovala 0,1mM Oligo (dT) a 4000 ng RNA.

Vytvořená reakční směs byla inkubována při 65 °C po dobu 5 minut. Následně byla zchlazena. K reakční směsi byl přidán Master mix obsahující dNTP a reverzní transkriptasu připravený dle tabulky 7. Následovala inkubace při 42 °C po dobu 50 minut. Pro inaktivaci enzymu SuperScript II reverzní transkriptázy byla směs zahřáta na 65 °C po dobu 20 minut. K získaným vzorkům bylo přidáno 200  $\mu$ l destilované vody a byla stanovena integrita cDNA.

**Tabulka 7:** Master mix pro reverzní transkripci (7,5  $\mu$ l na 1 vzorek)

5x First-Strand pufr	4 $\mu$ l
0,1 M DTT	2 $\mu$ l
10 nM dNTP mix	1 $\mu$ l
SuperScript II reverzní transkriptasa	0,5 $\mu$ l

### 3.2.6 Stanovení integrity cDNA

Pro stavení integrity cDNA byla použita metoda 3': 5' assay. Master mix pro 3'konec a zvlášť pro 5'konec byl připraven pomocí komerčního kitu qPCR (Core kit for SYBR<sup>®</sup> Green I No ROX, Eurogentec). Primery pro oba konce byly navrženy pro gen kódující glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasu (GAPDH) a jsou uvedeny v kapitole 3.1.8.

Do jednotlivých zkumavek stripu bylo napipetováno 16  $\mu$ l Master mixu pro 3'konec a zvlášť pro 5'konec (Tab. 8), pak byly do každé zkumavky přidány 4  $\mu$ l cDNA získané v kapitole 3.2.5. Strip byl uzavřen, promíchán a krátce stočen. Takto připravené vzorky byly vloženy do RT-PCR cykléru s teplotním programem uvedeném v tabulce 9. Měření bylo provedeno v triplikátech.

**Tabulka 8:** Master mix pro stanovení integrity cDNA (16  $\mu$ l na 1 vzorek)

Ultračistá voda	10,3 $\mu$ l
10x reakčního pufru	2,0 $\mu$ l
50 nM MgCl <sub>2</sub>	1,4 $\mu$ l
5 mM dNTP	0,8 $\mu$ l
Primer pro 3'konec / 5'konec (5 $\mu$ M)	0,8 $\mu$ l
SYBR Green I	0,6 $\mu$ l
Hotgoldstar polymerasa	0,1 $\mu$ l

**Tabulka 9:** Teplotní program pro PCR

95 °C	1 cyklus	10 minut
95 °C	40 cyklů	15 s
60 °C		20 s
72 °C		20 s
65 °C–95 °C	zvyšování o 0,3 °C každých 15 s	

### 3.2.7 Návrh primerů

Pro vybrané geny AKR1A1, AKR1B10, AKR1C3, AKR7A2 a CBR1 byly navrženy dvojice primerů pomocí online webových nástrojů.

K manipulaci s genovou sekvencí byl použit Attotron – Nucleid Acid Sequence Massager (Internet 7). Primery byly navrženy pomocí programu Primer3 (Internet 8). Nalezené primery i templát byly vloženy do BLASTu (Internet 9). Pravděpodobnost tvorby nežádoucích sekundárních struktur byla ověřena pomocí programu mFOLD (Internet 10). Pomocí uvedených programů byly navrženy primery, které by měly být specifické pouze pro hledaný gen. Tyto primery byly následně připraveny komerčně ve firmě GenериBiotech. Sekvence primerů jsou uvedeny v kapitole 3.1.8.

### 3.2.8 Kalibrační řada

Pro přípravu kalibrační řady všech enzymů byl použit plazmid pET-28b(+) se zaklonovanou sekvencí stanovovaného genu. Kalibrační řada se skládala z osmi bodů. Koncentrace lineárního plazmidu v nejvyšším bodu ( $10^8$  molekul) pro jednotlivé enzymy jsou uvedeny v tabulce 10. Ostatní kalibrační body byly získány ředěním desítkovou řadou až na hodnotu  $10^1$ . Kalibrační řada byla použita pro měření absolutní kvantifikace v kapitole 3.2.9.

**Tabulka 10:** *Koncentrace lineárního plazmidu v bodě 10<sup>8</sup>*

AKR1A1	0,06351 ng/μl
AKR1B10	0,06113 ng/μl
AKR1C3	0,06138 ng/μl
AKR7A2	0,07973 ng/μl
CBR1	0,06169 ng/μl

### 3.2.9 Kvantitativní PCR v reálném čase

Master mix (Tab. 11) byl připraven pomocí komerčně dostupného kitu qPCR Core kit for SYBR<sup>®</sup> Green I No ROX. Do PCR stripů o osmi zkumavkách bylo pipetováno 16 μl připraveného Master mixu. Použity byly primery uvedené v kapitole 3.1.8.

**Tabulka 11:** *Master mix pro qPCR (16 μl na 1 vzorek)*

Ultračistá voda	10,3 μl
10x reakčního pufru	2,0 μl
50 nM MgCl <sub>2</sub>	1,4 μl
5 mM dNTP	0,8 μl
Forward primer (5 μM)	0,4 μl
Reverse primer (5 μM)	0,4 μl
SYBR Green I	0,6 μl
Hotgoldstar polymerasa	0,1 μl

Do prvních 24 zkumavek byly následně přidány 4 μl osmibodové kalibrační řady v triplikátu. Do ostatních zkumavek byly pipetovány 4 μl cDNA získané v kapitole 3.2.5. Poslední tři zkumavky obsahovaly místo cDNA 4 μl ultračisté vody, která sloužila jako

negativní kontrola. PCR stripy byly uzavřeny, promíchány, krátce stočeny a následně vloženy do RT-PCR cykléru s nastaveným teplotním programem (Tab. 9).

Po skončení nastaveného programu RT-qPCR byly vyhodnoceny křivky tání, amplifikační křivky a hodnoty Ct.

### 3.2.10 SDS-PAGE elektroforéza

#### 3.2.10.1 Příprava gelů

Pro přípravu gelu je nutné vložit dvě skla: elektroforetické a krycí sklo do držáku a jejich spodní část zajistit parafilmem. Takto spojená skla byla vložena do nalévacího stojánku.

První byl připraven roztok pro separační gel (Tab. 12), který byl promíchán a ihned nalit mezi skla asi do  $\frac{3}{4}$  jejich výšky. Gel byl převrstven malým množstvím destilované vody a nechal se polymerovat alespoň 30 až 40 minut.

**Tabulka 12:** Návod na přípravu 0,75 mm separačního gelu (12,7%)

Ultračistá voda	1,6 $\mu$ l
1,5 M Tris – HCl, pH 8,8	1,25 $\mu$ l
10% SDS	50 $\mu$ l
30% roztok akrylamidu	2,1 $\mu$ l
10% APS	50 $\mu$ l
TEMED	2,5 $\mu$ l

Po zpolymerování gelu byla opatrně slita destilovaná voda. Prostor po slítí destilované vody byl osušen filtračním papírem. Následně byl připraven roztok zaostřovacího gelu (Tab. 13). Roztok byl promíchán a ihned nalit mezi skla, dokud hladina nedosáhla horního okraje krycího skla. Mezi skla do gelu byl vložen hřebínek. Polymerace zaostřovacího gelu trvala 90 minut.

**Tabulka 13:** Návod na přípravu 0,75 mm zaostřovacího gelu (4%)

Ultračistá voda	953 $\mu$ l
0,5 M Tris – HCl, pH 6,8	391 $\mu$ l
10% SDS	16 $\mu$ l
30% roztok akrylamidu	203 $\mu$ l
10% APS	32 $\mu$ l
TEMED	1,6 $\mu$ l

### **3.2.10.2 Příprava pozitivních kontrol a vzorků**

Jako vzorky byly použity lyzáty jednotlivých buněk s inhibitory v množství 20, 30, 50  $\mu$ g proteinu. Jako pozitivní kontrola byly použity 3  $\mu$ l AKR1C3 (zásobní koncentrace 1,3 mg/ml). Do první jamky bylo vždy napipetováno 5  $\mu$ l molekulového markeru.

Ke vzorkům byly přidány 3  $\mu$ l vzorkového pufru s 2-merkaptoethanolem a doplněny pomocí 0,2 mM draselno-fosfátového pufru tak, aby všechny vzorky měly stejný objem. Všechny vzorky byly následně vloženy do předehřátého termomixéru (95 °C), kde byly ponechány po dobu 3 minut. Před aplikací na gel byly krátce stočeny v centrifuze.

### **3.2.10.3 Elektroforéza**

Z gelu byl odstraněn hřebínek a parafilm. Skla s gelem byla vyjmuta z držáku a byly přendány do elektroforetické cely tak, aby krycí sklo směřovalo dovnitř. Vnitřní prostor cely byl naplněn zředěným elektrodoým pufrem (Tab. 2). Do první jamky bylo nanášeno 5  $\mu$ l molekulového markeru, dále vzorky a pozitivní kontrola. Prázdné jamky byly zaplněny elektrodoým pufrem. Cěla byla vložena do elektroforetické nádoby.

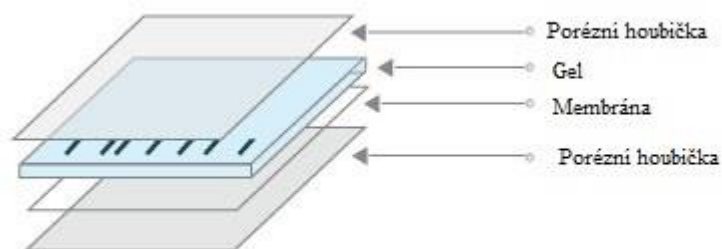
Do této nádoby byl nalit elektrodoý pufr po rysku. Elektrodoý pufr byl též doplněn do vnitřní cely a systém byl uzavřen víkem. Elektroforetická aparatura byla připojena ke zdroji stejnosměrného napětí. Nejdříve bylo na přístroji nastaveno

konstantní napětí 100 V po dobu 25 minut, vzorky během této doby doputovaly na okraj separačního gelu. Poté bylo napětí změněno na hodnotu 170 V po dobu cca 90 minut, vzorky se v tomto časovém úseku dostaly na konec separačního gelu. Po skončení elektroforézy byla vyjmuta cela s gelem, skla byla opatrně rozevřena tak, aby mohla být odstraněna vrstva zaostřovacího gelu. Elektrodotový pufr po skončení elektroforézy byl vrácen do zásobní lahve k opětovnému použití (na základě našich zkušeností jej lze použít až 5krát). Zhotovený gel byl namočen do blotovacího pufru.

### 3.2.11 Western blotting

#### 3.2.11.1 Příprava blotu a blotování

Blot se skládal ze 4 vrstev: 2krát porézní houbička, membrána a gel. Vrstvy byly skládány do speciální kazety v pořadí porézní houbička, membrána, gel a porézní houbička (Obr. 11).



**Obrázek 11:** Blotovací sendvič. Popis skládání blotu od katodového konce (horní díl) v pořadí: porézní houbička, gel, membrána, a porézní houbička (upraveno dle Internet 11).

Před skládáním blotu byly komponenty namočeny alespoň na 15 minut do blotovacího pufru. Velikost membrány a porézní houbičky musí odpovídat rozměrům gelu. S membránou bylo manipulováno pouze za pomoci pinzety s tupým koncem, aby nedošlo k jejímu poškrábání. Do kazety byla vložena porézní houbička, která byla uhlazena speciálním válečkem pro odstranění nadbytečného blotovacího pufru. Dále byla z blotovacího pufru přenesena blotovací membrána tak, aby pod membránou nebyly vzduchové bubliny. Na blotovací membránu byl přenesen gel, který byl též uhlazen válečkem z důvodu odstranění vzduchových bublin. Poslední vrstvou byla druhá porézní



houbička, která též byla uhlazena válečkem. Přebytečný blotovací pufr v kazetě byl odsán buničinou. Takto zhotovený sendvič byl v kazetě přiklopen víkem a vložen do blotovacího přístroje. Western blotting byl proveden při elektrickém napětí 25 V, konstantním proudem 1 A po dobu 30 minut.

Po 30 minutách byl blot vyjmut z přístroje a membrána byla přenesena do nádoby s TBS-T pufrem (Tab. 3) tak, aby ta část membrány, která se dotýkala gelu, byla nahoře. Tužkou byl označen molekulový marker na membráně. Kontrola přenesení proteinů z gelu na membránu byla detekována pomocí barvení 0,1% Ponceau S (Kap. 3.2.11.2).

Gel byl obarven pomocí Coomassie blue (Kap. 3.2.11.4).

### ***3.2.11.2 Kontrola přenosu proteinů na membránu***

Do nádoby s membránou byl nalit roztok 0,1% Ponceau S, který byl ponechán po dobu asi 30 sekund. Po uplynutí této doby se objevily růžové proužky. Barvicí roztok byl vrácen zpět do zásobní lahve pro další použití a membrána byla odbarvena 10% kyselinou octovou. Následně byla barva odstraněna důkladným opláchnutím membrány v TBS-T pufru.

### ***3.2.11.3 Blokování membrány a navázání protilátek***

Po oplachu membrány v TBS-T pufru byla membrána blokována pomocí 5% blokovacího pufru (5 g BSA ve 100 ml TBS-T) po dobu 90 min na orbitální třepačce (95 rpm) při laboratorní teplotě. Blokovací pufr byl vrácen zpět do zásobní láhve a membrána byla 2krát promyta TBS-T. Na membránu byl aplikován roztok primární protilátky (Tab. 14), který byl inkubován přes noc na orbitální třepačce (95 rpm) v chladicí místnosti. Primární protilátka byla vrácena zpět do zásobní nádoby, jelikož ji lze dle našich předchozích zkušeností použít až 5krát. Nutné je však takto zředěnou protilátku uchovat v mrazničce při -20 °C. Membrána byla následně 3krát opláchnuta pomocí TBS-T pufru a poté byla v tomto pufru ponechána 30 minut na orbitální třepačce. TBS-T pufr byl vždy po 10 minutách vyměněn za nový.

Následně byl aplikován roztok sekundární protilátky a membrána byla s touto protilátkou inkubována po dobu 90 minut na orbitální třepačce (95 rpm) při laboratorní teplotě. Nakonec byla membrána 3krát opláchnuta v TBS-T pufru a byla opět ponechána 30 minut na orbitální třepačce v TBS-T pufru, který byl měněn po 10 minutách.

**Tabulka 14: Příprava protilátek**

<b>AKR1C3</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Králičí <i>primární</i> protilátka proti AKR1C3</li></ul>
protilátka přidána do 3% BSA v poměru 1:5000 lze uskladnit při teplotě -20 °C
<ul style="list-style-type: none"><li>• Prasečí <i>sekundární</i> protilátka proti králičí primární protilátce</li></ul>
protilátka přidána do 3% BSA v poměru 1:5000 lze uskladnit při teplotě -20 °C
<b><math>\beta</math>-aktin</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Myší <i>primární</i> protilátka proti <math>\beta</math>-aktinu</li></ul>
protilátka přidána do 3% BSA v poměru 1:10000 lze uskladnit při teplotě -20 °C
<ul style="list-style-type: none"><li>• Králičí <i>sekundární</i> protilátka proti myší primární protilátce</li></ul>
protilátka přidána do 3% BSA v poměru 1:20000 lze uskladnit při teplotě -20 °C

#### **3.2.11.4 Barvení gelů pomocí Coomassie Blue**

Gel byl vložen do nádoby s 0,25% Coomassie Blue v 10% kyselině octové. Barvení probíhalo po dobu 20 minut za neustálého kývání (95 rpm) při laboratorní teplotě. Pro odbarvení gelů byla použita 10% kyselina octová. Poprvé byl gel jen rychle opláchnut od největšího množství modrého barviva, poté již byla pravidelně přibližně po 30 minutách měněna 10% kyselina octová za čistou a gel byl ponechán na kývačce (95 rpm) až do získání čistého pozadí.

Scan gelu byl pořízen na GelDocku (BioRad). Gel byl uchován pro případ další potřeby v 1% kyselině octové.

#### **3.2.11.5 Vizualizace**

Detekce probíhala v temné komoře při bezpečném světle. Byl namíchán detekční systém v poměru 1:1. Membrána byla osušena od TBS-T pufru a ponechána na

pracovním kartonu s folií. Na membránu byl aplikován detekční systém, který byl na membráně ponechán 5 minut. Následně byla membrána osušena od detekčního systému a vložena mezi dvě fólie. Membrána ve folii byla vložena do osvitové kazety a na aktivovanou stranu byl položen fotografický film ve stejné velikosti jako membrána. V osvitové kazetě byl fotografický film exponován po dobu 10 minut. Po uplynutí této doby byl fotografický film ponořen do vývojky a za lehkého kývání byl zde ponechán do doby, než se objevily pruhy. Poté byl fotografický film opláchnut v destilované vodě a přendán do ustalovače. Na závěr byl fotografický film důkladně opláchnut od ustalovače v destilované vodě. Po oplachu v destilované vodě byl ponechán několik minut na vzduchu k oschnutí.

#### **3.2.11.6 Stripování membrány**

Membrána byla opláchnuta ve 30 ml stripovacího pufru po dobu 30 minut za pokojové teploty na orbitální třepače (95 rpm). Po stripování byla membrána 3krát opláchnuta v TBS-T pufru, kdy došlo pravidelně po 10 minutách k výměně stripovacího pufru. Po ukončení stripovacího procesu následovalo vložení membrány na 1,5 hodiny do blokovacího pufru za stálého kývání na orbitální třepače (95 rpm) při laboratorní teplotě a na membránu byla aplikována primární protilátka proti  $\beta$ -aktinu. Dále bylo postupováno stejným způsobem jako při detekci AKR1C3.

#### **3.2.11.7 Statistická analýza, tvorba grafů a chemických vzorců**

Ke statistickému vyhodnocení získaných dat byl použit Studentův t-test. Statistická analýza byla provedena v programu GraphPad Prism 7.03 (GraphPad Software, Kalifornie USA). P-hodnota: \*\*p < 0,01, \*p < 0,05 (Internet 12).

Grafy v diplomové práci byly vytvořeny také pomocí programu GraphPad Prism 7.03 (GraphPad Software, Kalifornie USA).

Vzorce CDK<sub>i</sub> v teoretické části byly vytvořeny pomocí ChemBioOffice 2017 (CambridgeSoft, PerkinElmer).

## 4 Experimentální část

### 4.1 Stanovení exprese na úrovni mRNA

#### 4.1.1 Příprava vzorků

Pro stanovení exprese na úrovni mRNA byly HepG2 ( $70 \times 10^4$ ) a HL-60 ( $40 \times 10^4$ ) buňky nasazeny na 12-jamkovou destičku. Pro každý CDKi byly využity tři (izolace RNA pomocí fenol-chloroformové extrakce a první pokus izolace RNA pomocí kitu Direct-zol<sup>TM</sup>RNA MiniPrep) nebo dvě (druhá a třetí izolace RNA pomocí kitu Direct-zol<sup>TM</sup>RNA MiniPrep) jamky této destičky. Buňky ovlivněné stejným CDKi byly před vlastní izolací RNA spojeny, objem Tri-reagentu byl doplněn na celkový objem 1 ml a zpracovány jako jeden vzorek. V případě kontroly bez CDKi byl místo CDKi pipetován DMSO, což je látka, ve které jsou CDKi rozpuštěny.

RNA byla nejprve izolována ze všech připravených vzorků HepG2 a HL-60 buněk pomocí fenol-chloroformové extrakce. Po izolaci RNA bylo množství a čistota RNA změřena na Nanodropu. U všech vzorků byla čistota RNA ověřena porovnáním absorbance při 260 a 280 nm. V dalším kroku byla ze všech vzorků odstraněna genomová DNA pomocí DNasy I. Po odstranění genomové DNA, byla koncentrace a čistota RNA opět změřena.

Vzhledem k nízké koncentraci RNA získané pomocí fenol-chloroformové extrakce (Tab. 15) byl pro další izolaci RNA ze vzorků HepG2 a HL-60 buněk použit kit Direct-zol<sup>TM</sup> RNA MiniPrep. U třech pokusů s HepG2 buňkami a jednoho pokusu s HL-60 buňkami byla provedena izolace RNA a odstranění zbytků genomové DNA za použití kitu Direct-zol<sup>TM</sup> RNA MiniPrep. Následoval přepis do cDNA pomocí reverzní transkripce. Všechny vzorky připravené pomocí kitu Direct-zol<sup>TM</sup> RNA MiniPrep byly použity pro další měření (Tab. 16 a 17). Vzorky získané cDNA byly uchovány při  $-80^\circ\text{C}$ .

**Tabulka 15:** Koncentrace a čistota RNA získané z HepG2 a HL-60 buněk pomocí fenol-chloroformové extrakce. Výsledek udán jako průměr ze dvou opakování měření vzorku ± směrodatná odchylka.

		Koncentrace a čistota RNA po extrakci	
		A260/280	c (ng/μL)
HepG2	Kontrola bez CDKi	1,89 ± 0,07	13,2 ± 2,11
	Dinaciclíb (0,005 μM)	1,84 ± 0,05	33,5 ± 1,12
HL-60	Kontrola bez CDKi	1,94 ± 0,09	97,3 ± 2,19
	Dinaciclíb (0,005 μM)	1,91 ± 0,14	93,6 ± 4,57

**Tabulka 16:** Koncentrace a čistota RNA získané z HepG2 buněk pomocí kitu Direct-zol™ RNA MiniPrep. Výsledek udán jako průměr ze dvou opakování měření vzorku ± směrodatná odchylka.

HepG2	1. pokus		2. pokus		3. pokus	
	A260/280	c (ng/μL)	A260/280	c (ng/μL)	A260/280	c (ng/μL)
Kontrola bez CDKi	1,99 ± 0,08	547,5 ± 51,34	1,92 ± 0,03	153,6 ± 12,11	1,95 ± 0,19	82,8 ± 7,10
Purvalanol A (10 μM)	1,85 ± 0,14	630,9 ± 51,10	1,96 ± 0,14	455,7 ± 33,10	1,99 ± 0,11	479,8 ± 6,67
Roscovitin (10 μM)	1,84 ± 0,11	1641,0 ± 78,11	1,94 ± 0,17	723,6 ± 10,12	1,95 ± 0,15	718,2 ± 5,34
Dinaciclíb (0,005 μM)	1,96 ± 0,07	528,3 ± 22,10	1,98 ± 0,12	444,3 ± 23,12	1,98 ± 0,01	399,6 ± 22,10
AZD5438 (1 μM)	1,98 ± 0,02	469,2 ± 15,33	1,93 ± 0,11	228,0 ± 20,18	1,99 ± 0,02	205,9 ± 9,10
R547 (0,1 μM)	1,96 ± 0,13	902,1 ± 34,11	1,92 ± 0,11	108,9 ± 10,19	1,89 ± 0,08	191,2 ± 3,46

V prvním pokusu byly pro každý CDKi použity tři jamky 12-jamkové destičky, ve druhém a třetím pokusu pouze jamky dvě. Z tohoto důvodu je patrný rozdíl v koncentraci RNA mezi prvním a dalšími dvěma pokusy.

**Tabulka 17:** Koncentrace a čistota RNA získané z HL-60 buněk pomocí kitu Direct-zol<sup>TM</sup> RNA MiniPrep. Výsledek je udán jako průměr ze dvou opakování měření vzorku ± směrodatná odchylka.

HL- 60	1 pokus	
	A260/280	c (ng/μL)
<b>Kontrola bez CDKi</b>	1,92 ± 0,14	58,95 ± 2,10
<b>Purvalanol A (10 μM)</b>	1,92 ± 0,02	77,4 ± 8,10
<b>Roscovitin (10 μM)</b>	1,94 ± 0,03	103,5 ± 4,54
<b>Dinaciclíb (0,005 μM)</b>	1,99 ± 0,04	208,65 ± 10,01
<b>AZD5438 (1 μM)</b>	1,93 ± 0,06	45,9 ± 2,01
<b>R547 (0,1 μM)</b>	1,92 ± 0,02	90,3 ± 3,11

Při práci s buňkami HL-60 byly pro každý CDKi použity tři jamky 12-jamkové destičky. Pouze dinaciclíb byl nanesen do pěti jamek z důvodu očekávané vyšší toxicity vůči použité buněčné linii.

#### 4.1.2 Integrita cDNA

Integrita získané cDNA byla u všech vzorků stanovena pomocí metody 3': 5' assay. U této metody jsou za dostatečně kvalitní považovány vzorky s hodnotami v rozmezí 1-10. U všech zkoumaných vzorků byla tato podmínka splněna (Tab. 18 a 19), a proto mohly být použity pro RT-qPCR.

**Tabulka 18:** Výsledky měření integrity cDNA HepG2 buněk pomocí metody 3' : 5' assay. Výsledek udán jako průměr ze tří opakování měření vzorku ± směrodatná odchylka.

HepG2	1. pokus	2. pokus	3. pokus
	3' : 5' poměr		
Kontrola bez CDKi	5,40 ± 0,21	1,20 ± 0,03	5,18 ± 0,19
Purvalanol A (10 μM)	2,99 ± 0,15	3,08 ± 0,20	3,30 ± 0,28
Roscovitin (10 μM)	2,89 ± 0,21	1,51 ± 0,15	3,08 ± 0,13
Dinaciclilib(0,005 μM)	6,20 ± 0,45	6,64 ± 0,59	6,51 ± 0,51
AZD5438 (1 μM)	3,19 ± 0,31	1,11 ± 0,11	3,29 ± 0,10
R547 (0,1 μM)	8,77 ± 0,81	7,89 ± 0,10	8,12 ± 0,20

**Tabulka 19:** Výsledky měření integrity cDNA HL-60 buněk pomocí metody 3' : 5' assay. Výsledek udán jako průměr ze tří opakování měření vzorku ± směrodatná odchylka.

HL-60	1. pokus
	3':5' poměr
Kontrola bez CDKi	6,10 ± 0,58
Purvalanol A (10 μM)	6,29 ± 0,33
Roscovitin (10 μM)	7,23 ± 0,34
Dinaciclilib (0,005 μM)	4,44 ± 0,21
AZD5438 (1 μM)	4,14 ± 0,39
R547 (0,1 μM)	5,28 ± 0,24

#### 4.1.3 Kvantitativní PCR v reálném čase

Stanovení exprese mRNA enzymů AKR1A1, AKR1B10, AKR1C3, AKR7A2 a CBR1 byla stanovena pomocí kvantitativní PCR v reálném čase (RT-qPCR). Jako fluorescenční barvivo byl použit SYBR GREEN I, který je součástí kitu pro PCR (Eurogentec). Pro každý enzym byla nejprve ověřena specifita primerů. Měření jednotlivých vzorků probíhalo v triplicátech.

##### 4.1.3.1 Ověření specifity primerů

U enzymů AKR1A1, AKR1B10, AKR1C3, AKR7A2 a CBR1 byla specifita navržených primerů ověřena pomocí analýzy křivek tání měřených vzorků. V případě

přítomnosti specifického produktu je zaznamenám u křivky tání pouze jeden pík, který značí přítomnost tvorby jednoho specifického produktu.

Křivka tání u všech vzorků s použitím navržených primerů disponovala pouze jedním vrcholem. Tím byla v jednotlivých měřeních dokázána přítomnost jen jednoho produktu. Teploty tání jsou uvedeny v tabulce 20.

**Tabulka 20:** Rozmezí  $T_m$  jednotlivých produktů enzymů

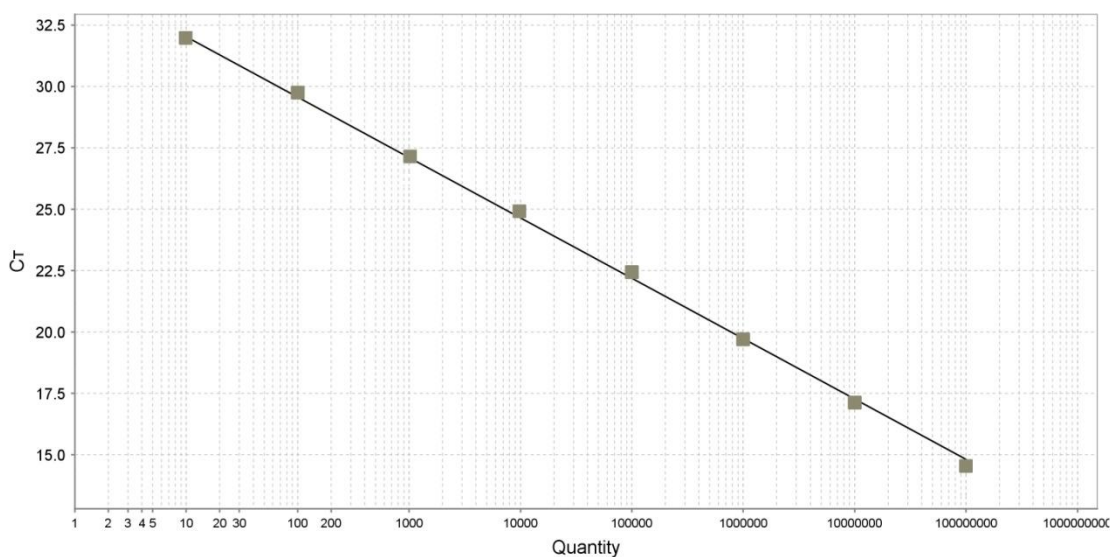
	<b><math>T_m</math> (°C)</b>
<b>AKR1A1</b>	82–83
<b>AKR1B10</b>	79–80
<b>AKR1C3</b>	81–82
<b>AKR7A2</b>	88–89
<b>CBR1</b>	88–89

#### 4.1.3.2 *Ověření validity výsledků*

Ověření validity výsledků proběhlo po každém měření analýzou kalibrační křivky. U každé kalibrační křivky byl posouzen korelační koeficient a byla ověřena efektivita reakce.

Efektivita správně provedené reakce by se měla pohybovat v rozmezí 90–110 %. Kalibrační křivka by měla být lineární a absolutní hodnota korelačního koeficientu by měla být v rozmezí 0,98–1. Jako příklad je na obrázku 12 uvedena kalibrační křivka enzymu AKR1C3. Všechny výsledky zařazené do vyhodnocení exprese mRNA jednotlivých enzymů byly získány z měření s efektivitou v daném rozmezí s lineární kalibrační křivkou a s korelačním koeficientem v odpovídajícím rozmezí.





**Obrázek 12:** Kalibrační křivka znázorňující závislost Ct hodnot na množství kopií mRNA enzymu AKR1C3. Korelační koeficient je 0,990 a efektivita 110 %.

#### 4.1.4 Vyhodnocení vlivu CDKi na expresi mRNA antracyklinreduktas

Vliv CDKi na expresi mRNA antracyklinreduktas byl vyhodnocen metodou absolutní kvantifikace. Z každého měření byly vyhodnoceny hodnoty Ct, které odpovídaly množství kopií mRNA enzymů AKR1A1, AKR1B10, AKR1C3, AKR7A2 a CBR1. Hodnoty Ct (cycle of treshold, cyklus prahu) vzorků byly přepočteny na množství kopií mRNA daného enzymu na 1 ng celkové RNA dle kalibrační přímky sestavené z osmi bodů.

##### 4.1.4.1 Vliv CDKi na expresi mRNA antracyklinreduktas u HepG2 buněčné linie

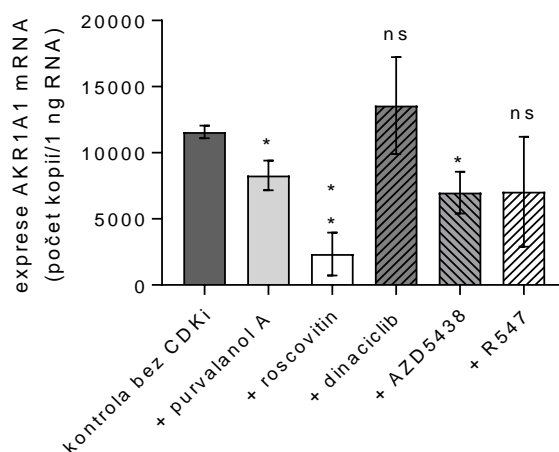
Vliv studovaných CDKi (dinacliclibu, AZD5438, roscovitinu, purvalanolu A a R547) na expresi mRNA enzymů AKR1A1, AKR1B10, AKR1C3, AKR7A2 a CBR1 byl nejprve vyhodnocen u HepG2 buněčné linie.

#### 4.1.4.1.1 Vliv CDKi na expresi mRNA enzymu AKR1A1

Expresie mRNA enzymu AKR1A1 u HepG2 buněk ovlivněných působením CDKi byla porovnána s expresí mRNA enzymu AKR1A1 v kontrolním vzorku, kde byl místo CDKi použit čistý DMSO. Statisticky významný pokles exprese AKR1A1 byl zaznamenán u purvalanolu A a roscovitinu (Tab. 21, Obr. 13).

**Tabulka 21:** Vliv CDKi na expresi enzymu AKR1A1 na úrovni mRNA

HepG2	Počet kopií AKR1A1 / 1 ng celkové RNA			
	1. pokus	2. pokus	3. pokus	průměr ze tří pokusů ± SD
<b>Kontrola bez CDKi</b>	11163 ± 933	11465 ± 768	12096 ± 825	11575 ± 476
<b>Purvalanol A (10 μM)</b>	8704 ± 825	7015 ± 245	9136 ± 659	8285 ± 1121
<b>Roscovitin (10 μM)</b>	1442 ± 691	4228 ± 242	1381 ± 536	2350 ± 1626
<b>Dinaciclíb (0,005 μM)</b>	17162 ± 441	9835 ± 616	13721 ± 886	13572 ± 3665
<b>AZD5438 (1 μM)</b>	8697 ± 198	5571 ± 918	6717 ± 328	6995 ± 1581
<b>R547 (0,1 μM)</b>	11361 ± 457	3073 ± 244	6792 ± 622	7054 ± 4153



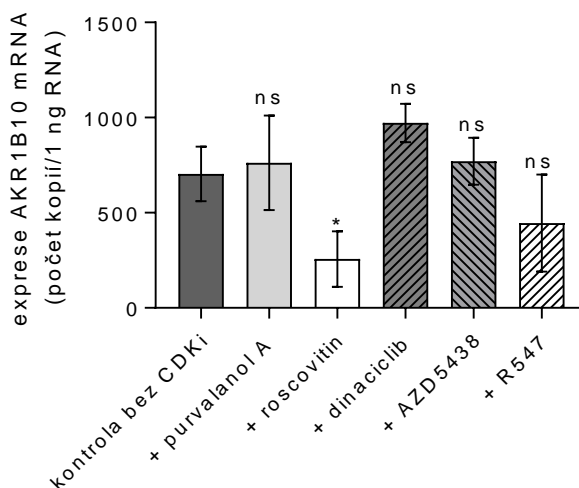
**Obrázek 13:** Graf znázorňující vliv CDKi na expresi mRNA enzymu AKR1A1. Statistická významnost byla hodnocena pomocí Studentova *t*-testu, \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ , ns: statisticky nevýznamné (not significant)

#### 4.1.4.1.2 Vliv CDKi na expresi mRNA enzymu AKR1B10

Expres mRNA enzymu AKR1B10 u HepG2 buněk ovlivněných působením CDKi byla porovnána s expresí mRNA AKR1B10 v kontrolním vzorku, kde byl místo CDKi použit čistý DMSO. Ke statisticky významnému poklesu exprese AKR1B10 došlo pouze v přítomnosti roscovitinu (Tab. 22, Obr. 14).

**Tabulka 22:** Vliv CDKi na expresi enzymu AKR1B10 na úrovni mRNA

HepG2	Počet kopií AKR1B10 / 1 ng celkové RNA			
	1. pokus	2. pokus	3. pokus	průměr ze tří pokusů ± SD
<b>Kontrola bez CDKi</b>	730 ± 102	549 ± 21	832 ± 75	704 ± 143
<b>Purvalanol A (10 μM)</b>	912 ± 12	476 ± 4,1	900 ± 93	763 ± 248
<b>Roscovitin (10 μM)</b>	107 ± 18	397 ± 112	266 ± 64	257 ± 145
<b>Dinaciclíb (0,005 μM)</b>	961 ± 84	1077 ± 42	877 ± 72	972 ± 100
<b>AZD5438 (1 μM)</b>	908 ± 160	738 ± 25	668 ± 48	771 ± 123
<b>R547 (0,1 μM)</b>	673 ± 178	169 ± 6	495 ± 145	446 ± 256



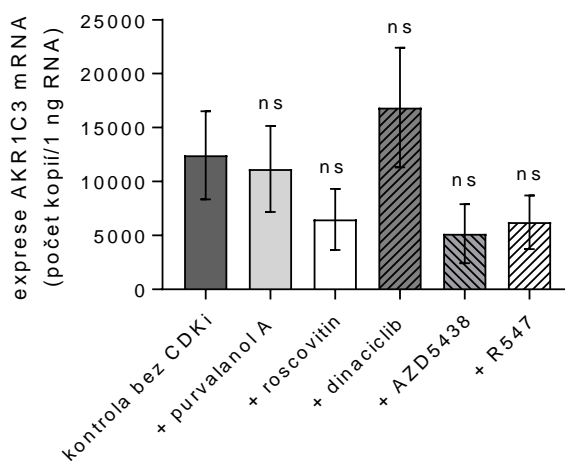
**Obrázek 14:** Graf znázorňující vliv CDKi na expresi mRNA enzymu AKR1B10. Statistická významnost byla hodnocena pomocí Studentova *t*-testu, \**p* < 0,05, ns: statisticky nevýznamné (not significant)

#### 4.1.4.1.3 Vliv CDKi na expresi mRNA enzymu AKR1C3

Expresie mRNA enzymu AKR1C3 u HepG2 buněk ovlivněných působením CDKi byla porovnána s expresí mRNA AKR1C3 v kontrolním vzorku, kde byl místo CDKi použit čistý DMSO. V případě AKR1C3 nebyla zaznamenána statisticky významná změna (Tab. 23, Obr. 15).

**Tabulka 23:** Vliv CDKi na expresi enzymu AKR1C3 na úrovni mRNA

HepG2	Počet kopií AKR1C3 / 1 ng celkové RNA			
	1. pokus	2. pokus	3. pokus	průměr ze tří pokusů ± SD
<b>Kontrola bez CDKi</b>	8349 ± 621	16493 ± 1244	12456 ± 77	12433 ± 4072
<b>Purvalanol A (10 μM)</b>	14966 ± 966	11493 ± 1759	7028 ± 272	11162 ± 3979
<b>Roscovitin (10 μM)</b>	8328 ± 367	7926 ± 1759	3233 ± 245	6496 ± 2833
<b>Dinaciclíb (0,005 μM)</b>	20834 ± 966	10526 ± 1759	19202 ± 272	16854 ± 5541
<b>AZD5438 (1 μM)</b>	8328 ± 645	3352 ± 41	3817 ± 248	5166 ± 2748
<b>R547 (0,1 μM)</b>	4055 ± 389	8939 ± 828	5689 ± 244	6228 ± 2485



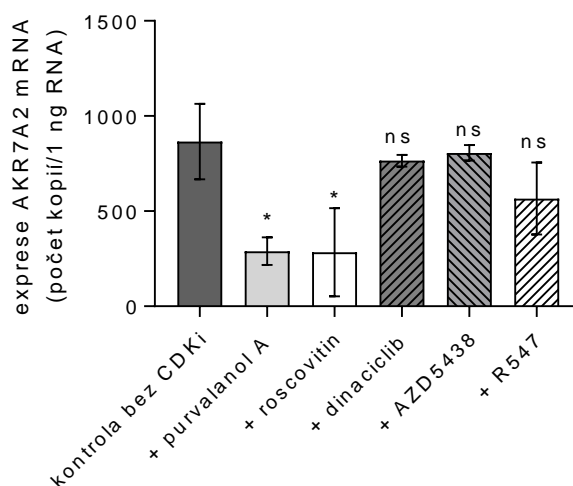
**Obrázek 15:** Graf znázorňující vliv CDKi na expresi mRNA enzymu AKR1C3. Statistická významnost byla hodnocena pomocí Studentova t-testu, ns: statisticky nevýznamné (not significant)

#### 4.1.4.1.4 Vliv CDKi na expresi mRNA enzymu AKR7A2

Expresi mRNA enzymu AKR7A2 u HepG2 buněk ovlivněných působením CDKi byla porovnána s expresí mRNA AKR7A2 v kontrolním vzorku, kde byl místo CDKi použit čistý DMSO. V případě AKR7A2 byl zjištěn statisticky významný pokles při použití purvalanolu A a roscovitinu (Tab. 24, Obr. 16).

**Tabulka 24:** Vliv CDKi na expresi enzymu AKR7A2 na úrovni mRNA

HepG2	Počet kopií AKR7A2 / 1 ng celkové RNA			
	1. pokus	2. pokus	3. pokus	průměr ze tří pokusů ± SD
<b>Kontrola bez CDKi</b>	638 ± 63	993 ± 25	968 ± 56	866 ± 198
<b>Purvalanol A (10 μM)</b>	372 ± 33	234 ± 29	263 ± 88	290 ± 73
<b>Roscovitin (10 μM)</b>	54 ± 14	518 ± 12	280 ± 45	284 ± 232
<b>Dinaciclíb (0,005 μM)</b>	758 ± 17	739 ± 58	798 ± 39	765 ± 30
<b>AZD5438 (1 μM)</b>	760 ± 88	823 ± 14	837 ± 86	807 ± 41
<b>R547 (0,1 μM)</b>	744 ± 45	367 ± 21	588 ± 53	566 ± 189



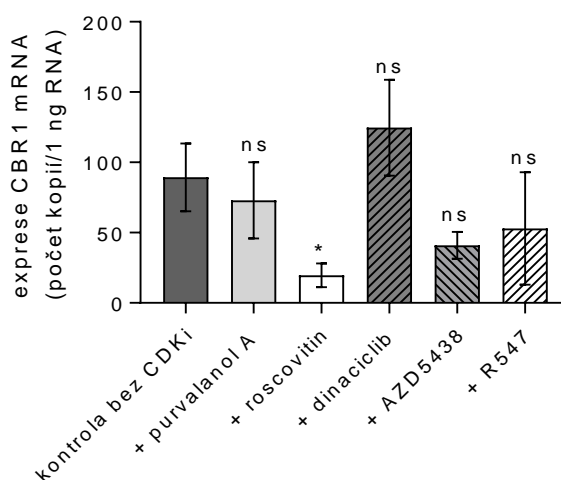
**Obrázek 16:** Graf znázorňující vliv CDKi na expresi mRNA enzymu AKR7A2. Statistická významnost byla hodnocena pomocí Studentova t-testu, \* $p < 0,05$ , ns: statisticky nevýznamné (not significant)

#### 4.1.4.1.5 Vliv CDKi na expresi mRNA enzymu CBR1

Expresie mRNA enzymu CBR1 u HepG2 buněk ovlivněných působením CDKi byla porovnána s expresí mRNA CBR1 v kontrolním vzorku, kde byl místo CDKi použit čistý DMSO. V případě CBR1 byl statisticky významný pokles zjištěn pouze v případě použití roscovitinu (Tab. 25, Obr. 17).

**Tabulka 25:** Vliv CDKi na expresi enzymu CBR1 na úrovni mRNA

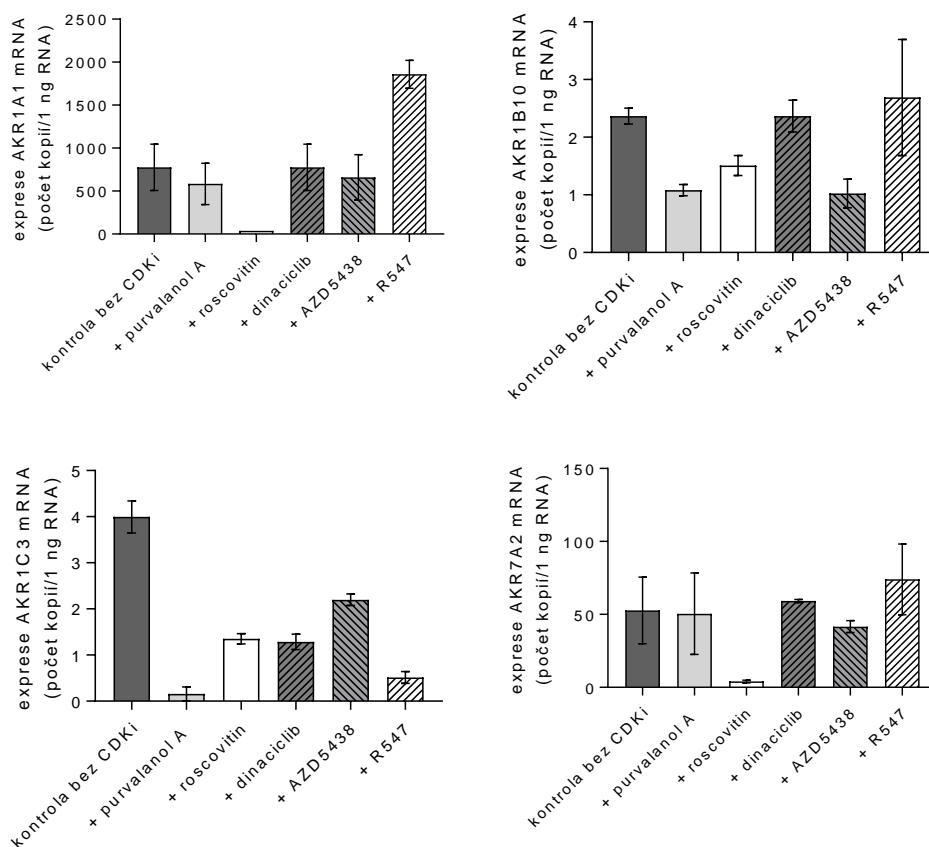
HepG2	Počet kopií CBR1 / 1 ng celkové RNA			
	1. pokus	2. pokus	3. pokus	průměr ze tří pokusů ± SD
Kontrola bez CDKi	114 ± 2	66 ± 2	88 ± 12	89 ± 24
Purvalanol A (10 μM)	98 ± 6	44 ± 15	77 ± 8	73 ± 27
Roscovitin (10 μM)	11 ± 2	28 ± 2	20 ± 5	20 ± 9
Dinaciclilb (0,005 μM)	164 ± 1	103 ± 7	107 ± 31	125 ± 34
AZD5438 (1 μM)	51 ± 2	32 ± 1	40 ± 6	41 ± 10
R547 (0,1 μM)	93 ± 1	13 ± 1	53 ± 4	53 ± 40



**Obrázek 17:** Graf znázorňující vliv CDKi na expresi mRNA enzymu CBR1. Statistická významnost byla hodnocena pomocí Studentova *t*-testu, \**p* < 0,05, ns: statisticky nevýznamné (not significant)

#### 4.1.4.2 Vliv CDKi na expresi mRNA antracyklinreduktas u HL-60 buněčné linie

Vliv CDKi na expresi mRNA enzymů AKR1A1, AKR1B10, AKR1C3 a AKR7A2 byl hodnocen dále u HL-60 buněčné linie. Pomocí RT-qPCR bylo zjištěno, že buněčná linie HL-60 exprimuje velmi malé množství těchto aldo-keto reduktas (Obr. 18). Vyšší exprese byla patrná pouze u AKR1A1. Stanovení vlivu CDKi na expresi antracyklinreduktas na úrovni mRNA bylo tedy provedeno pouze jedenkrát a pokus nebyl opakován. Z důvodu, že se jednalo pouze o jeden pokus, nebyla provedena ani statistická analýza. Nízkou expresi potvrdilo následně stanovení exprese AKR1C3 na úrovni proteinu metodou Western blotting (Kap. 4.2.4). Z důvodu nedostatečného množství vzorečků bohužel nebylo možné provést stanovení exprese enzymu CBR1.



**Obrázek 18:** Graf znázorňující vliv CDKi na expresi mRNA antracyklinreduktas u HL-60 buněčné linie. Z důvodu nedostatečného množství vzorečků nebylo provedeno stanovení exprese enzymu CBR1. Hodnoty jsou získány pouze z jednoho pokusu.

## 4.2 Stanovení exprese na úrovni proteinu

### 4.2.1 Western blotting

Expresi enzymů na úrovni proteinu byla stanovena pomocí metody Western blotting s chemiluminiscenční detekcí. Jako vzorky byly použity proteiny z HepG2 a HL-60 buněk ovlivněných CDKi. Pro stanovení exprese na úrovni proteinu byly HepG2 ( $140 \times 10^4$ ) a HL-60 ( $80 \times 10^4$ ) buňky nasazeny na 6-jamkovou destičku. Pro každý CDKi byly využity dvě jamky této destičky. Buňky ovlivněné stejným CDKi byly před vlastní izolací RNA spojeny a zpracovány jako jeden vzorek. V případě třetího pokusu byly vzorečky zakoncentrovány. V případě kontroly bez CDKi byl místo CDKi pipetován DMSO, což je látka, ve které jsou CDKi rozpuštěny. Vzorky byly dále zpracovány podle metodiky popsané v kapitole 3.2.1 a 3.2.2. U vzorků byla změřena koncentrace a následně byly použity pro stanovení exprese antracyklinreduktas na úrovni proteinu.

Homogenní vzorky proteinu byly nejprve rozděleny pomocí SDS-PAGE elektroforézy a následně byl proveden přenos na blotovací membránu. Kontrola správnosti přenosu proteinů na membránu byla ověřena obarvením blotovací membrány pomocí Ponceau S. Správnost navázání protilátky byla ověřena pomocí pozitivní kontroly, kterou byla rekombinantně připravená AKR1C3. V případě AKR1C3 lze na gelu a na blotu očekávat proužek přibližně ve velikosti 37 kDa (Matsunaga a kol. 2006). V případě rekombinantní AKR1C3 ještě z důvodu histidinového tagu o 1 kDa více. Velikost  $\beta$ -aktinu je přibližně 42 kDa (Yao a kol. 2006).

### 4.2.2 Stanovení koncentrace proteinu

Koncentrace proteinu u jednotlivých pokusů s buněčnými kulturami byla stanovena metodou dle Bradfordové (Bradford 1976). Získané koncentrace proteinů z buněk HepG2 a HL-60 jsou uvedeny v tabulce 26 a 27.



*Tabulka 26: Koncentrace proteinu u jednotlivých vzorků HepG2 buněk*

HepG2	1. pokus	2. pokus	3. pokus
	Koncentrace (mg/ml)		
Kontrola bez CDKi	3,09	5,15	23,93
Purvalanol A (10 $\mu$ M)	3,73	3,28	25,01
Roscovitin (10 $\mu$ M)	6,36	1,90	18,49
Dinaciclib (0,005 $\mu$ M)	4,89	4,55	22,46
AZD5438 (1 $\mu$ M)	3,77	0,72	31,79
R547 (0,1 $\mu$ M)	5,30	2,32	20,47

*Tabulka 27: Koncentrace proteinu u jednotlivých vzorků HL-60 buněk*

HL-60	1 pokus
	Koncentrace (mg/ml)
Kontrola bez CDKi	1,80
Purvalanol A (10 $\mu$ M)	1,19
Roscovitin (10 $\mu$ M)	2,35
Dinaciclib (0,005 $\mu$ M)	1,63
AZD5438 (1 $\mu$ M)	2,64
R547 (0,1 $\mu$ M)	2,85

### 4.2.3 Stanovení exprese AKR1C3 na úrovni proteinu v HepG2 buňkách

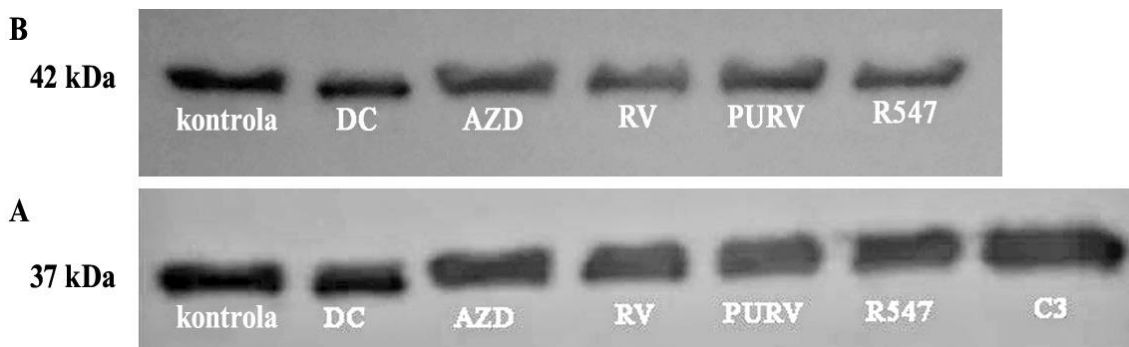
#### 4.2.3.1 Optimalizace detekce proteinu AKR1C3 v HepG2 buňkách

Nejprve bylo optimalizováno množství nanášeného proteinu na jamku separačního gelu.

Lyzáty získané z HepG2 buněk byly nanášeny ve třech různých množstvích 50  $\mu$ g, 30  $\mu$ g a 20  $\mu$ g na jamku gelu. Jako primární protilátka proti AKR1C3 byla použita králičí protilátka v ředění 1:5000 v 3% BSA. Sekundární protilátka byla zvolena prasečí protilátka proti králičí protilátce s ředěním 1:5000 v 3% BSA. Ředění protilátek bylo zvoleno dle doporučení výrobce protilátek.

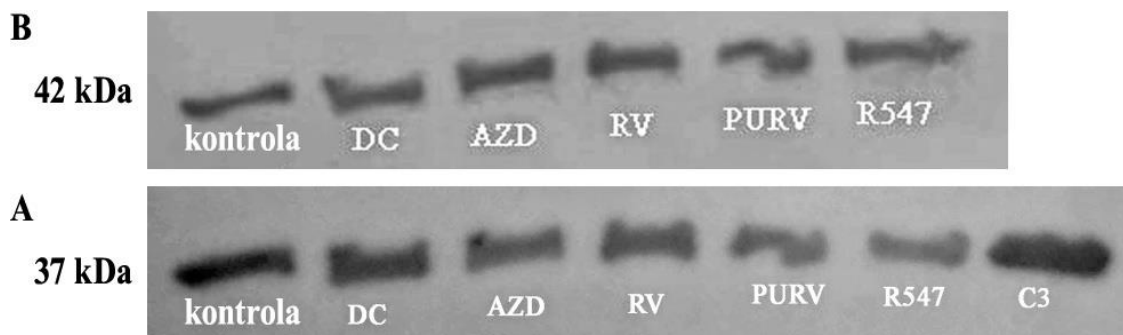
Z důvodu použití sekundární protilátky s konjugovanou křenovou peroxidasou byl pro detekci zvolen Amersham ECL Prime Western blotting detection reagent. Detekční systém se skládá ze dvou roztoků – A (luminolu) a B (peroxidu) (Tab. 3). Tyto dvě činidla byla smíchána v poměru 1:1, směs byla nanášena na membránu a vzniklá chemiluminiscence byla zachycena fotografický film. Detekce probíhala v temné komoře v prostředí osvětleném bezpečným světlem.

Ke stanovení optimálního množství proteinu byly použity nejprve HepG2 buňky ovlivněné CDKi z prvního pokusu v množství 50  $\mu\text{g}$  proteinu na jamku (Obr. 19). Jako kontrola, že do každé jamky bylo nanášeno stejné množství lyzátu byl použit  $\beta$ -aktin. Jedná se o strukturální protein, který je produktem tzv. house-keeping genu, tedy genu, jehož exprese by měla být u všech vzorků stejná. Tento  $\beta$ -aktin umožňuje zároveň kvantifikaci stanovovaných proteinů. Před nanášením primární protilátky proti  $\beta$ -aktinu byla membrána nejprve ostripována (Kap. 3.2.11.6). Po ostripování membrány a blokaci v 5% BSA, byla membrána inkubována přes noc v chladu s myší primární protilátkou proti  $\beta$ -aktinu v ředění 1:10000 v 3% BSA. Sekundární protilátkou proti primární myší protilátce byla králičí protilátka v ředění 1:10000 v 3% BSA. Inkubace se sekundární protilátkou probíhala 90 minut při pokojové teplotě. Detekce proběhla za stejných podmínek jako vizualizace v průkazu přítomnosti AKR1C3 (Obr. 19).



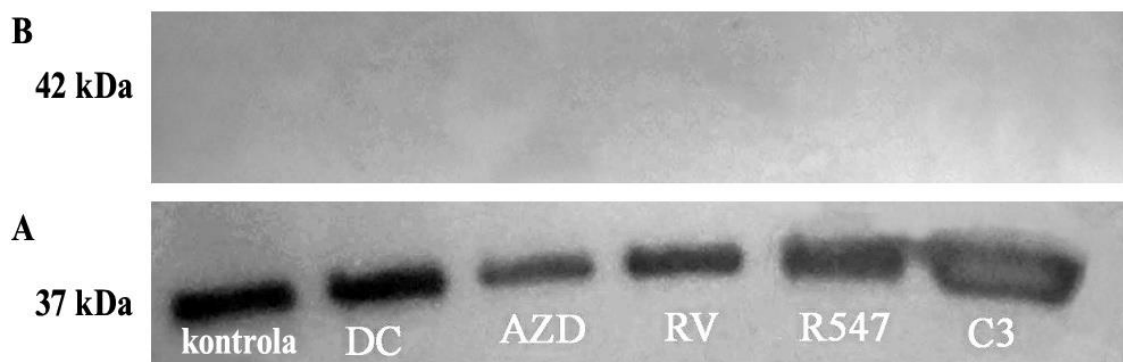
**Obrázek 19:** Expresa proteinu AKR1C3 v HepG2 buňkách (A). Detekce  $\beta$ -aktinu (B). Lyzáty HepG2 buněk byly nanášeny v množství 50  $\mu\text{g}$  proteinu na jamku. Před aplikací primární protilátky proti  $\beta$ -aktinu bylo provedeno stripování membrány. **Kontrola** – kontrola bez CDKi, **DC** – Dinaciclib (0,005 $\mu\text{M}$ ), **AZD** – AZD5438(1  $\mu\text{M}$ ), **RV** – Roscovitin (10  $\mu\text{M}$ ), **PURV** – Purvalanol A (10  $\mu\text{M}$ ), **R547** (0,1 $\mu\text{M}$ ), **C3** – Pozitivní kontrola – rekombinantní AKR1C3 (3  $\mu\text{l}$ )

Intenzita jednotlivých proužků při nanášení 50  $\mu\text{g}$  proteinu na jamku se zdála příliš vysoká. Z tohoto důvodu bylo množství proteinu sníženo na 30  $\mu\text{g}$  (Obr. 20). Před nanášením primární protilátky proti  $\beta$ -aktinu byla membrána opět ostripována (Obr. 20).



**Obrázek 20:** Expresa proteinu AKR1C3 v HepG2 buňkách (A). Detekce  $\beta$ -aktinu (B). Lyzáty HepG2 buněk byly nanášeny v množství 30  $\mu$ g proteinu na jamku. Před aplikací primární protilátky proti  $\beta$ -aktinu bylo provedeno stripování membrány. **Kontrola** – kontrola bez CDKi, **DC** – Dinaciclib (0,005 $\mu$ M), **AZD** – AZD5438 (1  $\mu$ M), **RV** – Roscovitin (10  $\mu$ M), **PURV** – Purvalanol A (10  $\mu$ M), **R547** (0,1 $\mu$ M), **C3** – Pozitivní kontrola – rekombinantní AKR1C3 (3  $\mu$ l)

Též při nanášení 30  $\mu$ g proteinu na jamku byla intenzita získaných proužků poměrně vysoká. Množství nanášeného proteinu proto bylo sníženo na 20  $\mu$ g (Obr. 21). Před nanesením primární protilátky proti  $\beta$ -aktinu bylo provedeno stripování membrány (Obr. 21).

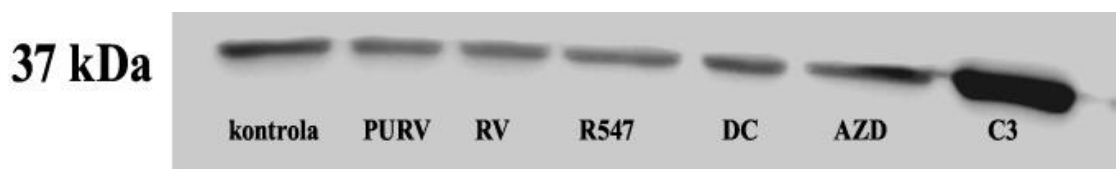


**Obrázek 21:** Expresa proteinu AKR1C3 v HepG2 buňkách (A). Detekce  $\beta$ -aktinu (B). Lyzáty HepG2 buněk byly nanášeny v množství 20  $\mu$ g proteinu na jamku. Před aplikací primární protilátky proti  $\beta$ -aktinu bylo provedeno stripování membrány. **Kontrola** – kontrola bez CDKi, **DC** – Dinaciclib (0,005 $\mu$ M), **AZD** – AZD5438 (1  $\mu$ M), **RV** – Roscovitin (10  $\mu$ M), **PURV** – Purvalanol A (10  $\mu$ M), **R547** (0,1 $\mu$ M), **C3** – Pozitivní kontrola – rekombinantní AKR1C3 (3  $\mu$ l)

Z obrázku 21 je patrné, že v případě nanášení 20  $\mu$ g bílkoviny na jamku došlo během stripování membrány nejen k odmytí primární a sekundární protilátky použitých k průkazu exprese AKR1C3, ale též k vymytí ostatních bílkovin přenesených na blotovací membránu. Z tohoto důvodu bylo upuštěno od stripování membrány před detekcí  $\beta$ -aktinu.

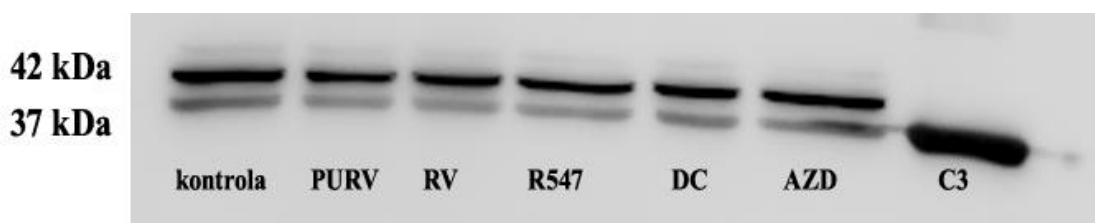
#### 4.2.3.2 Stanovení vlivu CDKi na expresi proteinu AKR1C3 v HepG2 buňkách

Stanovení vlivu CDKi na expresi enzymu AKR1C3 v HepG2 buňkách bylo provedeno pro tři nezávislé pokusy. Na obrázku 22 a 23 jsou uvedeny bloty ze třetího nezávislého pokusu. Před průkazem  $\beta$ -aktinu nebyla membrána stripována. Před aplikací primární protilátky proti  $\beta$ -aktinu byla provedena detekce chemiluminiscence expozicí na fotografický film (Obr. 22).



**Obrázek 22:** Exprese proteinu AKR1C3 v HepG2 buňkách v množství 20  $\mu$ g bílkoviny na jamku. **Kontrola** – kontrola bez CDKi, **PURV** – Purvalanol A (10  $\mu$ M), **RV** – Roscovitin (10  $\mu$ M), **R547** (0,1 $\mu$ M), **DC** – Dinaciclib (0,005 $\mu$ M), **AZD** – AZD5438 (1  $\mu$ M), **C3** – Pozitivní kontrola – rekombinantní AKR1C3 (3  $\mu$ l)

Místo stripování byla membrána pouze 3x opláchnuta v TBS-T pufru a na 90 minut ponořena do 5% BSA. Membrána byla následně 2x promyta TBS-T puftrem a na membránu byla aplikována primární a sekundární protilátka proti  $\beta$ -aktinu. Po aplikaci sekundární protilátky proti  $\beta$ -aktinu byla opět provedena detekce chemiluminiscence expozicí na fotografický film (Obr. 23). Jak je patrné z obrázku 23, na membráně bylo po tomto kroku možné prokázat AKR1C3 i  $\beta$ -aktin zároveň.



**Obrázek 23:** Exprese proteinu AKR1C3 a  $\beta$ -aktinu v HepG2 buňkách. Lyzáty HepG2 buněk byly nanášeny v množství 20  $\mu$ g proteinu na jamku. Před aplikací primární protilátky proti  $\beta$ -aktinu nebylo provedeno stripování membrány. **Kontrola** – kontrola bez CDKi, **PURV** – Purvalanol A (10  $\mu$ M), **RV** – Roscovitin (10  $\mu$ M), **R547** (0,1 $\mu$ M), **DC** – Dinaciclib (0,005 $\mu$ M), **AZD** – AZD5438 (1  $\mu$ M), **C3** – Pozitivní kontrola – rekombinantní AKR1C3 (3  $\mu$ l)

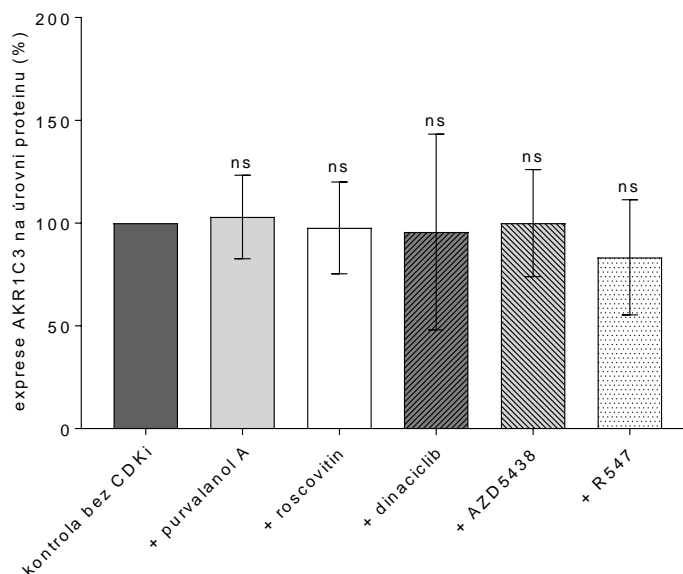
#### 4.2.3.3 Kvantifikace vlivu CDKi na expresi proteinu AKR1C3 v HepG2 buňkách

K relativní kvantifikaci byly využity bloty získané ze tří nezávislých pokusů. Lyzáty byly nanášeny na gel v množství 20 µg na jamku gelu.

Množství proteinu bylo stanoveno s využitím volně dostupného softwaru Image Studio Lite (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) porovnáním intenzity proužků na fotografických filmech (Internet 13). Expres proteinu AKR1C3 v HepG2 buňkách ovlivněných CDKi byla porovnána s kontrolním vzorkem bez CDKi (Tab. 28, Obr. 24). K normalizaci exprese byl využit  $\beta$ -aktin.

**Tabulka 28:** Vliv CDKi na expresi proteinu AKR1C3 u HepG2 buněčné linie

HepG2	Relativní exprese proteinu AKR1C3 (%)			
	1. pokus	2. pokus	3. pokus	průměr ze tří pokusů ± SD
Kontrola bez CDKi	100	100	100	100
Purvalanol A (10 µM)	85	125	99	103 ± 20
Roscovitin (10 µM)	81	123	89	98 ± 22
Dinaciclilb (0,005 µM)	61	77	150	96 ± 48
AZD5438 (1 µM)	75	98	127	100 ± 26
R547 (0,1 µM)	56	82	112	83 ± 28



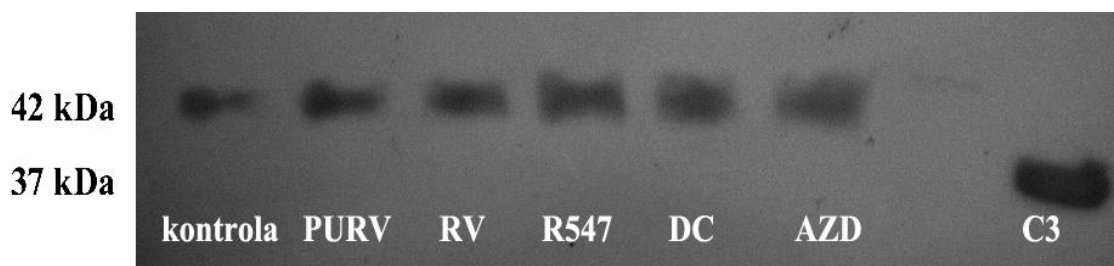
**Obrázek 24:** Graf znázorňující vliv CDKi na expresi proteinu AKR1C3 u HepG2 buněčné linie. Statistická významnost byla hodnocena pomocí Studentova t-testu, ns: statisticky nevýznamné (not significant)

#### 4.2.4 Stanovení exprese AKR1C3 na úrovni proteinu v HL-60 buňkách

Stanovení vlivu CDKi na expresi AKR1C3 na úrovni proteinu bylo s buněčnou linií HL-60 provedeno pouze jednou. Lyzáty HL-60 buněk byly nanášeny v množství 50 µg proteinu na jamku. Toto množství bylo zvoleno na základě výsledků RT-qPCR. Správnost detekce byla ověřena průkazem pozitivní kontroly, kterou byla rekombinantně připravená AKR1C3. Před aplikací primární protilátky proti  $\beta$ -aktinu nebylo provedeno stripování membrány (Obr. 25).



**Obrázek 25:** Expresa proteinu AKR1C3 v HL-60 buňkách. Lyzáty HL-60 buněk byly nanášeny v množství 50 µg proteinu na jamku. C3 – Pozitivní kontrola – rekombinantní AKR1C3 (3 µl)



**Obrázek 26:** *Expresa  $\beta$ -aktinu v HL-60 buněčné linii. Lyzáty HL-60 buněk byly nanášeny v množství 50  $\mu$ g proteinu na jamku. Před aplikací primární protilátky proti  $\beta$ -aktinu nebylo provedeno stripování membrány. **Kontrola** – kontrola bez CDKi, **PURV** – Purvalanol A (10  $\mu$ M), **RV** – Roscovitin (10  $\mu$ M), **R547** (0,1 $\mu$ M), **DC** – Dinaciclib (0,005  $\mu$ M), **AZD** – AZD5438 (1  $\mu$ M), **C3** – Pozitivní kontrola – rekombinantní AKR1C3 (3  $\mu$ l)*

Jak je vidět na obrázcích 25 a 26, exprese AKR1C3 je u HL-60 buněčné linie velmi nízká a protein nebyl detekován ani v jednom ze vzorků. Vzhledem k průkazu  $\beta$ -aktinu a výrazné pozitivní kontrole lze usoudit, že samotný Western blotting proběhl v pořádku, pouze exprese AKR1C3 v HL-60 buněčné linii je natolik nízká, že ji nelze zachytit na fotografický film.

## 5 Diskuze

Na redukci karbonylových endogenních sloučenin a xenobiotik se podílí enzymy z nadrodiu AKR a SDR (Oppermann a Maser 2000). Některé z těchto enzymů můžeme nazývat antracyklinreduktasami, jelikož dokáží metabolizovat protinádorová léčiva doxorubicin a daunorubicin na sekundární alkoholy doxorubicinol a daunorubicinol, které mají snížené cytotoxické účinky na nádorové linie a jsou podezřelé ze zvýšené kardiotoxicity (Piska a kol. 2017). Mezi nejaktivnější antracyklinreduktasy patří AKR1A1, AKR1B10, AKR1C3, AKR7A2 a CBR1 (Bains a kol. 2010). Souvislost mezi intracelulární koncentrací daunorubicinolu a expresí antracyklinreduktas byla prokázána například u akutní myeloidní leukémie. Zvýšená exprese antracyklinreduktas vede ke snížení citlivosti nádorových buněk vůči antracyklinům (Varatharajan a kol. 2012). Dalším významným vlivem antracyklinreduktasy AKR1C3 je ovlivnění syntézy prostanglandinů a tím i proliferace nádorových buněk (Nagata a kol. 2011, Barski a kol. 2008). Proto je důležité najít vhodné inhibitory antracyklinreduktas a tím eliminovat rezistenci vůči protinádorovým lékům (Piska a kol. 2017).

Inhibitory CDKi vykazují dvojitý účinek na nádorové buněčné linie. Kromě vlastní protinádorové aktivity ovlivňují metabolismus antracyklinů, a tím i rezistenci buněčných linií. Léčbu inhibitory CDK můžeme pokládat za vhodnou u pacientů vykazujících rezistenci na klasická chemoterapeutika, jelikož působí cíleně. Díky specifickému účinku lze očekávat také menší množství nežádoucích vedlejších účinků oproti konvenční nádorové terapii. Jako příklad lze uvést dinaciclíb, který ovlivňuje ABC transportéry a karbonyl redukující enzymy. Inhibice ABC transportérů a karbonyl redukujících enzymů vede ke zvýšení citlivosti antracyklin rezistentních nádorových buněk vůči daunorubicinu (Cihalova a kol. 2015, Cihalova a kol. 2013, Hofman a kol. 2014).

Na katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové bylo zjištěno, že některé CDKi jsou schopné inhibovat karbonyl redukující enzymy. Screening vybraných CDKi vůči nejaktivnějším antracyklinreduktasám (CBR1, AKR1A1, AKR1B10, AKR1C3 a AKR7A2) prokázal významnou inhibici AKR1C3 u AZD5438 ( $IC_{50} = 9,6 \mu M$ ), dinaciclíbu ( $IC_{50} = 0,2 \mu M$ ), purvalanolu A ( $IC_{50} = 6,6 \mu M$ ), roscovitinu ( $IC_{50} = 2,2 \mu M$ ) a R547 ( $IC_{50} = 43 \mu M$ ) (nepublikovaná data).



Ačkoliv inhibice antracyklinreduktas představuje jednu z možností, jak překonat antracyklinovou rezistenci u nádorových buněk, změny v expresi těchto enzymů mohou být dalším faktorem, který může významně ovlivnit rezistenci nádorových buněk vůči antracyklinům.

Hlavním cílem této diplomové práce bylo experimentální stanovení vlivu AZD5438, dinacielibu, purvalanolu A, roscovitinu a R547 na expresi AKR1A1, AKR1B10, AKR1C3, AKR7A2 a CBR1 u lidských buněčných nádorových linií. Zkoumán byl vliv CDKi na expresi všech těchto pěti antracyklinreduktas u nádorových buněk na úrovni mRNA. Vliv CDKi na expresi antracyklinreduktas na úrovni proteinu byl zkoumán pouze pro enzym AKR1C3, tedy enzym, který je dle našich předchozích dat těmito CDKi inhibován.

Ke zkoumání vlivu CDKi na expresi antracyklinreduktas byly vybrány buněčné linie HepG2 a HL-60. HepG2 buněčná linie jsou buňky hepatocelulárního karcinomu jater. Jedná se o pátý nejčastější typ rakoviny po celém světě. V *in vitro* podmínkách rostou jako monovrstvy v malých agregátech. Buněčná linie HL-60 jsou převážně neutrofilní promyelocyty. Jedná se o buňky získané z periferní krve od pacientky s akutní promyelocytární leukémií (Donato a kol. 2015, Costantini a kol. 2013, Collins a kol. 1978).

Při volbě testované koncentrace studovaných CDKi jsme vycházeli z údajů o maximální koncentraci těchto látek v plazmě ( $C_{max}$ ) a z jejich cytotoxicity vůči HepG2 a HL-60 buněčné linii. Zvoleny byly takové koncentrace, které jsou klinicky dosažitelné v lidské plazmě a zároveň nejsou pro danou buněčnou linii příliš toxické. V případě purvalanolu A a R547 jsme kvůli nedostatku dat u lidských pacientů vycházeli z  $C_{max}$  stanovené v pokusech se zvířaty.

U HepG2 buněk jsme zaznamenali statisticky významnou změnu v expresi mRNA antracyklinreduktas zejména v případě purvalanolu A a roscovitinu. Ke snížení exprese AKR1A1 a AKR7A2 došlo použitím purvalanolu A a roscovitinu. Roscovitin v našich pokusech snižoval i expresi mRNA enzymů CBR1 a AKR1B10. Roscovitin a purvalanol A patří mezi deriváty purinu. Mají tedy podobnou strukturu. Jejich schopnost působit na expresi antracyklinreduktas by mohla pomoci při překonávání antracyklinové rezistence způsobené zvýšenou expresí těchto enzymů. Mohla by však pomoci i při řešení

antracyklinové kardiotoxicity, ze které jsou podezřelé metabolity těchto léčiv (dauno- a doxorubicinol). Bylo popsáno, že v lidském srdci je CBR1 nejvíce exprimovanou antracyklinreduktasou na úrovni mRNA a AKR7A2 na úrovni proteinu. CBR1 a AKR1A1 jsou zároveň nejvíce aktivními antracyklinreduktasami. Před vyvozením závěrů je však nutné potvrdit výsledky exprese i na úrovni proteinu.

Také v případě AKR1C3 byl zaznamenán pokles u mRNA působením purvalanolu A a roscovitinu. Tento pokles však nebyl při použití Studentova t-testu vyhodnocen jako statisticky významný. Vliv CDKi na expresi AKR1C3 byl hodnocen i na úrovni proteinu pomocí metody Western blotting a ani zde nebyla prokázána statisticky významná změna.

Vliv CDKi na expresi mRNA enzymů AKR1A1, AKR1B10, AKR1C3 a AKR7A2 byl studován také u buněčné linie HL-60. Pomocí RT-qPCR bylo zjištěno, že buněčná linie HL-60 exprimuje velmi malé množství aldo-keto reduktas. Vyšší exprese byla patrná pouze u AKR1A1. Stanovení vlivu CDKi na expresi antracyklinreduktas na úrovni mRNA bylo tedy provedeno pouze jedenkrát, pokus nebyl opakován a nebyla provedena ani statistická analýza. Nízkou expresi u AKR1C3 potvrdilo následně stanovení exprese na úrovni proteinu. Z důvodu nedostatečného množství vzorečků bohužel nebylo možné provést stanovení exprese enzymu CBR1.

Také Desmond a kol. (2003) zaznamenali nízkou expresi AKR1C3 u HL-60 buněčné linie, ačkoliv byli na rozdíl od nás schopni detekovat tuto velmi slabou expresi pomocí Western blottingu. V našem případě by pro studium vlivu CDKi na expresi antracyklinreduktas bylo vhodnější použít jinou leukemickou buněčnou linii než HL-60. Jednou z možností je například buněčná linie K562, u které byla exprese AKR1C3 prokázána (Birtwistle a kol. 2009).

Celou naši studii by bylo vhodné rozšířit o stanovení exprese enzymů AKR1A1, AKR1B10, AKR7A2 a CBR1 na úrovni proteinu u buněčné linie HepG2. Dále by bylo vhodné nalézt jinou leukemickou buněčnou linii, v které by se dal zhodnotit vliv CDKi na námi zkoumané antracyklinreduktasy, jak na úrovni mRNA, tak na úrovni proteinu.

## 6 Závěr

V teoretické části diplomové práce byly popsány antracykliny – jejich mechanismus účinku, metabolismus, kardiotoxicita a rezistence. Byly také představeny zkoumané antracyklinreduktasy z nadrodin AKR a SDR. Dále byla vysvětlena funkce cyklin-dependentních kinas v buněčném cyklu a vliv jejich inhibitorů na nádorová onemocnění.

Z praktické části diplomové práce lze vyvodit následující poznatky:

- Vhodnou metodou pro izolaci RNA z buněčných linií je extrakce pomocí separačních kolonek s použitím kitu Direct-zol<sup>TM</sup> RNA MiniPrep. Izolací pomocí kolonek lze získat vyšší výtěžek než při použití fenol-chloroformové extrakce.
- U lidské buněčné linie HepG2 došlo ke statisticky významnému snížení exprese antracyklinreduktas na úrovni mRNA vlivem roscovitinu (10  $\mu$ M) a purvalanolu A (10  $\mu$ M).
  - Roscovitin statisticky významně snížil expresi mRNA enzymů AKR1A1, AKR1B10, AKR7A2 a CBR1.
  - Purvalanol A statisticky významně snížil expresi mRNA enzymů AKR1A1 a AKR7A2.
- U lidské buněčné linie HL-60 byla exprese na úrovni mRNA hodnocena pouze pro aldo-keto reduktasy. Bylo zjištěno, že buněčná linie HL-60 exprimuje velmi malá množství těchto enzymů. Významnější exprese byla zaznamenána pouze u AKR1A1.
- Na úrovni proteinu byl u obou buněčných linií zkoumán vliv CDKi pouze na expresi AKR1C3.
  - Buněčná linie HepG2 nevykazovala statisticky významné změny v expresi AKR1C3 pod vlivem použitých CDKi.
  - U buněčné linie HL-60 byla potvrzena nízká exprese AKR1C3.

Závěrem lze říci, že tato diplomová práce přinesla nové poznatky o vlivu inhibitorů cyklin-dependentních kinas na expresi nejvíce aktivních antracyklinreduktas. Tyto poznatky by mohly pomoci při dalším výzkumu těchto inhibitorů i při hledání dalších látek potenciálně účinných vůči antracyklinreduktasám.

## 7 Seznam zkratek

AA	Akrylamid
AKR	Aldo-keto reduktasa
AKR1A1	Aldo-keto reduktasa rodina 1A člen 1
AKR1B10	Aldo-keto reduktasa rodina 1B člen 10
AKR1C3	Aldo-keto reduktasa rodina 1C člen 3
AKR7A2	Aldo-keto reduktasa rodina 7A člen 2
AML	Akutní myeloidní leukémie
ATP	Adenosintrifosfát
APS	Persíran amonný
BFB	Bromfenolová modř
BSA	Bovine Serum Albumin
CBBG	Coomassie brilliant blue G250
CBR1	Karbonylreduktasa 1
CDK	Cyklin-dependentní kinasy
CDKi	Inhibitory cyklin-dependentních kinas
CLL	Chronická lymfocytární leukémie
Ct	Cycle of treshold
DEPC	Diethylpyrokarbonát
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DTT	Dichlorodifenyltrichloroetan
EDTA	Kyselinu ethylendiamintetraoctovou
EGTA	Kyselina ethylenglykol bis(2-aminoethylether)tetraacetát
FBS	Fetální Bovinní Sérum
HMM	Hidden Markovovo pravidlo
GAPDH	Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa
NADPH	Nikotinadeninukleotid fosfát redukovaný
MDR	Dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem
ME	2-merkptoethanol
MLL gen	Myloid/lymfoid gen
PBS	Phosphate Buffered Saline

PCR	Polymerásova řetězová reakce
P-gp	P-glykoprotein
p53	Protein 53
RNA	Ribonukleová kyselina
RPMI1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
RT-qPCR	Kvantitativní polymerasová řetězová reakce v reálném čase
SDR	Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem
SDS	Dodecylsírán sodný
TBS	Tris Buffered Saline
TBS-T	Tris Buffered Saline, Tween 20
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
QR	Chinonreduktasa

## 8 Literatura

**Adams J. A.** (2001) Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chemical Reviews*, 101 (8), 2271–2290.

**Arcamone F., Cassinelli G., Fantini G., Grein A., Orezzi P., Pol C., Spalla C.** (2000) Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnology and bioengineering*, 67 (6), 704–713.

**Bains O. S., Grigliatti T. A., Reid R. E., Riggs K. W.** (2010) Naturally occurring variants of human aldo-keto reductases with reduced in vitro metabolism of daunorubicin and doxorubicin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 335 (3), 533–545.

**Bains O. S., Szeitz A., Lubieniecka J. M., Cragg G. E., Grigliatti T. A., Riggs K. W., Reid R. E.** (2013) A correlation between cytotoxicity and reductase-mediated metabolism in cell lines treated with doxorubicin and daunorubicin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 347 (2), 375–387.

**Baker A., Gregory G. P., Verbrugge I., Kats L. Hilton J. J., Vidacs E., Lee E. M., Lock R.B., Zuber J., Shortt J., Johnstone R.W.** (2016) The CDK9 inhibitor dinaciclib exerts potent apoptic and antitumor effects in preclinical models of MLL-rearranged acute myeloid leukemia. *Cancer Research*, 76, 1158–69.

**Barski O. A., Tipparaju S. M., Bhatnagar A.** (2008) The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug Metabolism Reviews*, 40(4), 553–624.

**Benson C., White J., De Bono J., O'Donnell A., Raynaud F., Cruickshank C., McGrath H., Walton M., Workman P., Kaye S., Cassidy J., Gianella-Borradori A., Judson I., Twelves C.** (2007) A phase I trial of the selective oral cyclin-dependent kinase inhibitor seliciclib (CYC202; R-Roscovitine), administered twice daily for 7 days every 21 days. *British Journal Cancer*, 96 (1), 29–37.

**Bilardi R. A., Kimura K. I., Phillips D. R., Cutts S. M.** (2012) Processing of anthracycline-DNA adducts via DNA replication and interstrand crosslink repair pathways. *Biochemical Pharmacology*, 83 (9), 1241–1250.

**Birwistle J., Hayden R. J., Khanim F. L., Green R. M., Pearce C., Davies N. J., Wake N., Schrewe H., Ride J. P., Chipman J. K. Bunce C. M.** (2009) The aldo-keto reductase AKR1C3 contributes to 7,12-dimethylben(a)anthracene-3,4-dihydrodio mediated oxidative DNA damage in myeloid cells: Implications for leukemogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 662 (1-2), 67–74.

**Blachly J. S., Byrd J. C.** (2013) Emerging drug profile: cyclin-dependent kinase inhibitors. *Leukemia & Lymphoma*, 54 (10), 2133–2143.

**Boss D. S., Schwartz G. K., Middleton M. R., Amakye D. D., Swaisland H., Midgley R. S., Ranson M., Danson S., Calvert H., Plummer R., Morris C., Carvajal R. D., Chirieac L. R., Schellens J. H. M., Shapiro G. I.** (2010) Safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of the oral cyclin-dependent kinase inhibitor AZD5438 when administered at intermittent and continuous dosing schedules in patients with advanced solid tumours. *Annals of Oncology*, 21 (4), 884–894.

**Boucek R. J. Jr., Miracle A., Anderson M., Engelman R., Atkinson J., Dodd D. A.** (1999) Persistent effects of doxorubicin on cardiac gene expression. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 31 (8), 1435–1446.

**Bradford M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1–2), 248–254.

**Brunton L., Chabner B., Knollman B.** (2010) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Twelfth Edition, *McGraw-Hill Professional*

**Byth K. F., Thomas A., Hughes G., Forder C., McGregor A., Geh C., Oakes S., Green C., Walker M., Newcombe N., Green S., Growcott J., Barker A., Wilkinson RW.** (2009) AZD5438, a potent oral inhibitor of cyclin-dependent kinases 1, 2, and 9, leads pharmacodynamic changes and potent antitumor effects in human tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(7), 1856–1866.

**Cicenas J., Kalyan K., Sorokinas A., Stankunas E., Levy J., Meskinyte I., Stankevicius V., Kaupinis A., Valius M.** (2015) Roscovitine in cancer and other diseases. *Annals of Translational Medicine*, 3(10), 135.

**Cihalova D., Ceckova M., Kucera R., Klimes J., Staud F.** (2015) Dinaciclib, a cyclin-dependent kinase inhibitor, is a substrate of human ABCB1 and ABCG2 and an inhibitor of human ABCC1 in vitro. *Biochemical Pharmacology*, 98(3), 465–72.

**Cihalova D., Hofman J., Ceckova M., Staud F.** (2013) Purvalanol A, Olomoucine II and Roscovitine inhibit ABCB1 transporter and synergistically potentiate cytotoxic effects of Daunorubicin in vitro. *Public Library of Science*, 8 (12), e83467.

**Coker-Gürkan A., Damla E., Pınar A., Kübra O., Özbey A. U., Palavan-Unsal N.** (2015) Purvalanol induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis and autophagy in a time-dependent manner in HCT116 colon cancer cells. *Oncology Reports*, 33 (6), 2761–2770.

- Collins S. J., Ruscetti F. W., Gallagher R. E., Gallo R. C.** (1978) Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proceeding of the National Academy of Science U S A*, 75 (5), 2458–2462.
- Costantini S., Di Bernardo G., Cammarota M., Castello G., Colonna G.** (2013) Gene expression signature of human HepG2 cell line. *Gene*, 518 (2), 335–45.
- Criscitiello C., Viale G., Esposito A., Curigliano G.** (2014) Dinaciclib for the treatment of breast cancer. *Expert Opinion Investigational Drugs*, 23, 1305–1312.
- DeGraff W., Hahn S. M., Mitchell J. B., Krishna M. C.** (1994) Free radical modes of cytotoxicity of adriamycin and streptonigrin. *Biochemical Pharmacology*, 48 (7), 1427–1435.
- DePinto W., Chu X. J., Yin X., Smith M., Packman K., Goelzer P., Lovey A., Chen Y., Qian H., Hamid R., Xiang Q., Tovar Ch., Blain R., Nevins T., Higgins B., Luistro L., Kolinsky K., Felix B., Hussain S., Heimbrook D.** (2006) *In vitro* and *in vivo* activity of R547: a potent and selective cyclin-dependent kinase inhibitor currently in phase I clinical trials. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5 (11).
- Deweese J. E., Osheroff N.** (2009) The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing. *Nucleic Acids Research*, 37 (3), 738–748.
- Doig C. L., Battaglia S., Khanim F. L., Bunce C. M., Campbell M. J.** (2016) Knockdown of AKR1C3 exposes a potential epigenetic susceptibility in prostate cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 155, 47–55.
- Donato M. T., Tolosa L., Gómez-Lechón M.J.** (2015) Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Methods in Molecular Biology*, 1250, 77–93.
- Dönmez Y., Gündüz U.** (2011) Reversal of multidrug resistance by small interfering RNA (siRNA) in doxorubicin-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 65 (2), 85–89.
- Edwardson D. W., Narendrula R., Chewchuk S., Mispel-Beyer K., Mapletoft J. P. J., Parissenti A. M.** (2015) Role of drug metabolism in the cytotoxicity and clinical efficacy of anthracyclines. *Current Drug Metabolism*, 16 (6), 412–426.
- Flynn J., Jones J., Johnson A. J.** (2015) Dinaciclib is a novel cyclin dependent kinase inhibitor with significant clinical activity in relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 29, 1524–1529.
- Forrest G. L., Gonzalez B.** (2000) Carbonyl reductase. *Chemico-Biological Interactions*, 129 (1-2), 21–40.



**Fujiwara A., Hoshino T., Westley J. W.** (2008) Anthracycline antibiotics. *Critical Reviews in Biotechnology*, 3, 133–157.

**Fukumoto S., Yamauchi N., Hisashi M., Hippo Y., Watanabe A.** (2005) Overexpression of the aldo-keto reductase family protein AKR1B10 is highly correlated with smokers' non-small cell lung carcinomas. *Clinical Cancer Research*, 11 (5).

**Gallego O., Ruiz F. X., Ardèvol A., Domínguez M., Alvarez R., R. de Lera A., Rovira C., Farrés J., Fita I., Parés X.** (2007) Structural basis for the high *all-trans*-retinaldehyde reductase activity of the tumor marker AKR1B10. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 104 (52), 20764–20769.

**Gewirtz D. A.** (1999) A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*, 57 (7), 727–741.

**Ghia P., Scarfo L., Pathiraja K., Derosier M., Small K., Patton N.** (2015) A phase 3 study to evaluate the efficacy and safety of dinaciclib compared to fatumumab in patients with refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 12, 4171.

**Ghosal A., Yuan Y., Tong W., Su A. D., Gu Ch., Chowdhury S. K., Kishnani N. S., Alton K. B.** (2011) Characterization of human liver enzymes involved in the biotransformation of boceprevir, a hepatitis C virus protease inhibitor. *Drug Metabolism and Disposition*, 39 (3), 510–521.

**Grant S. K.** (2009) Therapeutic protein kinase inhibitors. *Cellular and Molecular Life Science*, 66 (7), 1163–1177.

**Hoefer C. C., Quiñones-Lombraña A., Blair R. H., Blanco J. G.** (2016) Role of DNA methylation on the expression of the anthracycline metabolizing enzyme AKR7A2 in human heart. *Cardiovascular Toxicology*, 16(2), 182–192.

**Hofman J., Malcekova B., Skarka A., Novotna E., Wsol V.** (2014) Anthracycline resistance mediated by reductive metabolism in cancer cells: the role of aldo-keto reductase 1C3. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 278 (3), 238–48.

**Hoffmann F., Maser E.** (2008) Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Drug Metabolism Reviews*, 39 (1), 87–144.

**Hsieh W. S., Soo R., Peh B. K., Loh T., Dong D., Soh D., Wong L. S., Green S., Chiao J., Cui C. Y., Lai Y. F., Lee S. C., Mow B., Soong R., Salto-Tellez M., Goh B.C.** (2009) Pharmacodynamic effects of seliciclib, an orally administered cell cycle modulator, in undifferentiated nasopharyngeal cancer. *Clinical Cancer Research*, 15(4) 1435–42.

**Huang C., Verhulst S., Shen Y., Bu Y., Cao Y., He Y., Wang Y., Huang D., Cai C., Rao K., Liao D. F., Jin J., Cao D.** (2016) AKR1B10 promotes breast cancer metastasis through integrin  $\alpha 5/\delta$ -catenin mediated FAK/Src/Rac1 signaling pathway. *Oncotarget*, 7 (28), 43779–43791.

**Chen X. X., Xie F. F., Zhu X. J. a kol.** (2015) Cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib potently synergizes with cisplatin in preclinical models of ovarian cancer. *Oncotarget*, 6, 14926–39.

**Chu X. J., DePinto W., Bartkovitz D., So S. S., Vu B. T., Packman K., Lukacs Ch., Ding Q., Jiang N., Wang K., Goelzer P., Yin X., Smith M. A., Higgins B. X., Chen Y., Xiang Q., Moliterni J., Kaplan G., Graves B., Lovey A., Fotouhi N.** (2006) Discovery of [4-amino-2-(1-methanesulfonylpiperidin-4-ylamino)pyrimidin-5-yl](2,3-difluoro-6-methoxyphenyl)methanone (R547), a potent and selective cyclin-dependent kinase inhibitor with significant in vivo antitumor activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49 (22), 6549–6560.

**Jez J. M., Penning T. M.** (2001) The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update. *Chemico-Biological Interactions*, 130–132 (1-3), 499–525.

**Jin Y., Duan L., Chen M., Penning T. M., Kloosterboer H. J.** (2012) Metabolism of the synthetic progestogen norethynodrel by human ketosteroid reductases of the aldo-keto reductase superfamily. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 129 (3-5), 139–44.

**Johnson S. F., Cruz C., Greifenberg A. K., Dust S., Stover D. G., Chi D., Primack B. Cao S., Bernhardt A. J., Coulson R., Lazaro J. B., Kochupurakkal B., Sun H., Unitt C., Moreau L. A., Sarosiek K. A., Scaltriti M., Juric D., Baselga J., Richardson A. L., Rodig S. J., D'Andrea A. D., Balmaña J., Johnson N., Geyer M., Serra V, Lim E., Shapiro G. I.** (2016) CDK12 inhibition reverses de novo and acquired PARP inhibitor resistance in BRCA wild-type and mutated models of triple-negative breast cancer. *Cell Reports*, 17, 2367–2381.

**Kavanagh K. L., Jörnvall H., Persson B., Oppermann U.** (2008) Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. *Cellular and Molecular Life Science*, 65 (24), 3895–3906.

**Khanim F., Davies N., Veliça P., Hayden R., Ride J., Pararasa C., Chong M. G., Gunther U., Veerapen N., Winn P., Farmer R., Trivier E, Rigoreau L., Drayson M., Bunce C** (2014) Selective AKR1C3 inhibitors do not recapitulate the anti-leukaemic activities of the pan-AKR1C inhibitor medroxyprogesterone acetate. *British Journal of Cancer*, 110(6), 1506–1516.

**Kim J. S., Chang J. W., Park J. K., Hwang S. G.** (2012) Increased aldehyde reductase expression mediates acquired radioresistance of laryngeal cancer cells via modulating p53. *Cancer Biology & Therapy*, 13(8), 638–46.

**Kropotova E. S., Tychko R. A., Zinov'eva O. L., Zyranova A. F., Khankin S. L., Cherkes V. L., Aliev V. A., Beresten S. F. Oparina N. Yu, Mashkova T. D.** (2010) Downregulation of AKR1B10 expression in colorectal cancer. *Molecular Biology*, 44(2), 216–222.

**Lan Q., Zheng T., Shen M., Zhang Y., Wang S. S., Zahm S. H., Holford T. R., Leaderer B., Boyle P., Chanock S.** (2007) Genetic polymorphisms in the oxidative stress pathway and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. *Human Genetics*, 121 (2), 161–168.

**Legraverend M., Grierson D. S.** (2006) The purines: potent and versatile small molecule inhibitors and modulators of key biological targets. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 3987–4006.

**Li X., Zou S., Li Z., Cai G., Chen B., Wang P., Dong W.** (2016) The identification of human aldo-keto reductase AKR7A2 as a novel cytoglobin-binding partner. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 21, 25.

**Licata S., Saponiero A., Mordente A., Minotti G.** (2000) Doxorubicin metabolism and toxicity in human myocardium: role of cytoplasmic deglycosidation and carbonyl reduction. *Chemical Research in Toxicology*, 13(5), 414–420.

**Lin S. F., Lin J. D., Hsueh C., Chou T. C., Wong R. J.** (2017) A cyclin-dependent kinase inhibitor, dinaciclib in preclinical treatment models of thyroid cancer. *PLoS ONE*, 12, e0172315.

**Liu A., Liang Z., Zhang J.** (2017) hsa-miR- 574-5p down regulates the expression of CBR1 in A549 cells and enhances their invasive ability. *Lawarence press*, 7 (4).

**Liu Ch., Hsu Y., Pan P., Wu M., Ho Ch., Su L., Xu X., Li Y., Christiani D. C.** (2008) Maternal and offspring genetic variants of *AKR1C3* and the risk of childhood leukemia. *Carcinogenesis*, 29 (5), 984–990.

**Luo X., Evrovsky Y., Cole D., Trines J., Benson L. N., Lehotay D.C.** (1997) Doxorubicin-induced acute changes in cytotoxic aldehydes, antioxidant status and cardiac function in the rat. *Biochimica & Biophysica Acta*, 1360 (1), 45–52.

**Malátková P., Sokolová S., Chocholoušová Havlíková L., Wsól V.** (2016) Carbonyl reduction of warfarin: Identification and characterization of human warfarin reductases. *Biochemical Pharmacology*, 109, 83–90.

**Malgrange B., Knockaert M., Belachew S., Nguyen L., Moonen G., Meijer L., Lefebvre P. P.** (2003) Inhibition of cyclin-dependent kinases induces differentiation of supernumerary hair cells and deiters' cells in the delopingorgan of corti. *TheFederation of American Societies for Experimental BiologyJournal*, 17, 2136–2138.

- Martin H. J., Breyer-Pfaff U., Wsol V., Venz S., Block S., Maser E.** (2006) Purification and characterization of akr1b10 from human liver: role in carbonyl reduction of xenobiotics. *Drug Metabolism and Disposition*, 34 (3), 464–470.
- Matsunaga T., Kezuka C., Morikawa Y., Suzuki A., Endo S., Iguchi K., Miura T., Nishinaka T., Terada T., El-Kabbani O., Hara A., Ikari A.** (2015) Up-regulation of carbonyl reductase 1 renders development of doxorubicin resistance in human gastrointestinal cancers. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 8 (9), 1309–1319.
- Matsunaga T., Shintani S., Hara A.** (2006) Multiplicity of Mammalian Reductases for Xenobiotic Carbonyl Compounds. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 21 (1), 1–18.
- Matsunaga T., Wada Y., Endo S., Soda M., El-Kabbani O., Hara A.** (2012) Aldo-keto reductase 1B10 and its role in proliferation capacity of drug-resistant cancers. *Pharmacology*, 3, 5.
- Matsunaga T., Yamaguchi A., Morikawa Y., Kezuka C., Takazawa H., Endo S., El-Kabbani O., Tajima K., Ikari A., Hara A.** (2014) Induction of aldo-keto reductases (AKR1C1 and AKR1C3) abolishes the efficacy of daunorubicin chemotherapy for leukemic U937 cells. *Anticancer Drugs*, 25(8), 868–77.
- McGowan J. V., Chung R., Maulik A., Piotrowska I., Walker J. M., Yellon D. M.** (2017) Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 31(1), 63–75.
- Meijer L., Leclerc S., Leost M.** (1999) Properties and potential applications of chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Pharmacology & Therapeutics*, 82(2-3), 279–284.
- Menna P., Minotti G., Salvatorelli E.** (2006) *In vitro* modeling of the structure-activity determinants of anthracycline cardiotoxicity. *Cell Biology and Toxicology*, 23 (1), 49–62.
- Menna P., Paz O. G., Chello M., Covino E., Salvatorelli E., Minotti G.** (2012) Anthracycline cardiotoxicity. *Expert Opinion on Drug Safety*, 1, 21–36.
- Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L.** (2004) Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 56 (2), 185–229.
- Morgan D. O.** (2007) *The cell cycle: principles of control*, Sunderland, MA: Distributed inside North America by Sinauer Associates ISBN 978-0-87893-508-6.

**Murakami A., Yakabe K., Yoshidomi K., Sueoka K., Nawata S., Yokoyama Y., Tsuchida S., Al-Mulla F., Sugino N.** (2012) Decreased carbonyl reductase 1 expression promotes malignant behaviours by induction of epithelial mesenchymal transition and its clinical significance. *Cancer Letters*, 323 (1), 69–76.

**Murata A., Genda T., Ichida T., Amano N., Sato S., Tsuzura H., Sato S., Narita Y., Kanemitsu Y., Shimada Y., Hirano K., Iijima K., Wada R., Nagahara A., Watanabe S.** (2016) Pretreatment AKR1B10 expression predicts the risk of hepatocellular carcinoma development after hepatitis C virus eradication. *World Journal of Gastroenterology*, 22 (33), 7569–7578.

**Nagata N., Kusakari Y., Fukunishi Y., Inoue T., Urade Y.** (2011) Catalytic mechanism of the primary human prostaglandin  $F_{2\alpha}$  synthase, aldo-keto reductase 1B1 – prostaglandin  $D_2$  synthase activity in the absence of NADP(H). *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 278 (8), 1288–1298.

**Nemunaitis J. J., Small K. A., Kirschmeier P., Zhang D., Zhu Y., Jou Y.M., Statkevich P., Yao S.L., Bannerji R.** (2013) A first-in-human, phase 1, dose-escalation study of dinaciclib, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, administered weekly in subjects with advanced malignancies. *Journal of Translational Medicine*, 11, 259.

**Nosková V., Hajdúch M., Mihál V., Cwiertka K.** (2000) Mechanizmy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi I. typická MDR, *Klinická onkologie*, Zvláštní číslo 2, 4–9.

**O'connor T., Ireland L. S., Harrison D. J., Hayes J. D.** (1999) Major differences exist in the function and tissue-specific expression of human aflatoxin B1 aldehyde reductase and the principal human aldo-keto reductase AKR1 family members. *Biochemistry Journal*, 343 (2), 487–504.

**Oppermann U. C. T., Maser E.** (2000) Molecular and structural aspects of xenobiotic carbonyl metabolizing enzymes. Role of reductases and dehydrogenases in xenobiotic phase I reactions. *Toxicology*, 144 (1-3), 71–81.

**Orchard S., Penning T. M., Thornton J. M., Adamski J., Oppermann U.** (2010) The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chemico – Biological Interactions*, 178 (1-3), 94–98.

**Osawa Y., Yokoyama Y., Shigeto T., Futagami M., Mizunuma H.** (2015) Decreased expression of carbonyl reductase 1 promotes ovarian cancer growth and proliferation. *International Journal of Oncology*, 46 (3), 1252–1258.

**Palackal N. T., Burczynski M. E., Harvey R. G., Penning T. M.** (2001) Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiols by ubiquitously expressed aldehyde reductase (AKR1A1). *Chemico-Biological Interactions* 130-132 (1-3), 815-824.

**Parry D., Guzi T., Shanahan F., Davis N. Prabhavalkar D., Wiswell D., Seghezzi W., Paruch K., Dwyer M. P., Doll R., Nomeir A., Windsor W., Fischmann T., Wang Y., Oft M., Chen T., Kirschmeier P., Lees E. M.** (2010) Dinaciclib (SCH 727965), a novel and potent cyclin-dependent kinase inhibitor. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9, 2344–2353.

**Paruch K., Dwyer M. P., Alvarez C., Brown C., Chan T. Y., Doll R. J., Keertikar K., Knutson C., McKittrick B., Rivera J., Rossman R., Tucker G., Fischmann T., Hruza A., Madison V., Nomeir A. A., Wang Y., Kirschmeier P., Lees E., Parry D., Sgambellone N., Seghezzi W., Schultz L., Shanahan F., Wiswell D., Xu X., Zhou Q., James R. A., Paradkar V. M., Park H., Rokosz L. R., Stauffer T. M., Guzi J. T.** (2010) Discovery of dinaciclib (SCH 727965): a potent and selective inhibitor of cyclin-dependent kinases. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 1, 204–208.

**Penning T. M., Burczynski M. E., Jez J. M., Hung C. F., Lin H. K., Ma H., Moore M., Palackal N., Ratnam K.** (2000) Human 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. *Biochemical Journal*, 351(1), 67–77.

**Penning T. M., Byrns A. C.** (2009) Steroid Hormone Transforming Aldo-Keto Reductases and Cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1155, 33–42.

**Persson B., Bray J. E., Bruford E., Dellaporta S. L., Favia A. D., Duarte R. G., Jörnvall H., Kallberg Y., Kavanagh K. L., Kedishvili N., Kisiela M., Maser E., Mindnich R., Orchard S., Penning T. M., Thornton J. M., Adamski J., Oppermann U.** (2010) The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chemico – Biological Interactions*, 178 (1-3), 94–98.

**Persson B., Kallberg Y.** (2013) Classification and nomenclature of the superfamily of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chemico-Biological Interactions*, 202 (1–3), 111–115.

**Pimprapa V. M. D., Edward T. H., Yeh M. D.** (2014) Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity: Challenges and opportunities. *Journal of the American College of Cardiology*, 64 (9), 938–945.

**Piska K., Koczurkiewicz P., Bucki A., Wójcik-Pszczola K., Kołaczowski M., Pękala E.** (2017) Metabolic carbonyl reduction of anthracyclines — role in cardiotoxicity and cancer resistance. Reducing enzymes as putative targets for novel cardioprotective and chemosensitizing agents. *Investigational New Drugs*, 35 (3), 375–385.

**Quiñonen-Lombraña A., Ferguson D., Hageman Blair R., Kalabus J. L., Redzematovic A., Blanco J. G.** (2014) Interindividual variability in the cardiac expression of anthracycline reductases in donors with and without Down syndrome. *Pharmaceutical Research*, 31 (7), 1644–1655.

**Rajput S., Khera N., Guo Z., Hoog J., Li S., Ma C. X.** (2016) Inhibition of cyclin dependent kinase 9 by dinaciclib suppresses cyclin B1 expression and tumor growth in triple negative breast cancer. *Oncotarget*, 7, 56864–56875.

**Rashid M. A., Lee S., Tak E., Lee J., Choi T. G., Lee J., Kim J. B., Youn J. H., Kang I., Ha J., Kim S. S.** (2010) Carbonyl reductase 1 protects pancreatic  $\beta$ -cells against oxidative stress-induced apoptosis in glucotoxicity and glucolipotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine*, 49 (10), 1522–1533.

**Raynaud F. I., Fischer P. M., Nutley B. P., Goddard P. M., Lane D. P., Workman P.** (2004) Cassette dosing pharmacokinetics of a library of 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase 2 inhibitors prepared by parallel synthesis. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3 (3), 353–62.

**Raynaud R. I., Whittaker S. R., Fischer P. M., McClue S., Walton M. I., Barrie S. E., Garrett M. D., Rogers P., Clarke S. J., Kelland L. R., Valenti M., Brunton L., Eccles S., Lane D. P., Workman P.** (2005) *In vitro* and *In vivo* Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationships for the Trisubstituted Aminopurine Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors Olomoucine, Bohemine and CYC202. *Cancer Therapy*, 11 (13), 4875–4887.

**Rouchal M.** (2011) Cílená modifikace biologicky aktivních látek. Disertační práce. Fakulta technologická Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, str. 13-17.

**Shapiro, G. I.** (2006) Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *Journal of Clinical Oncology*, 24 (11), 1770–83.

**Skarydova L., Nobilis M., Wsól V.** (2013) Role of carbonyl reducing enzymes in the phase I biotransformation of the non-steroidal anti-inflammatory drug nabumetone in vitro. *Xenobiotica*, 43 (4), 346–54.

**Skálová, L., Boušová I.** (2011) Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik, Karolinum, Praha, 162 stran. ISBN 978-80-246-1917-0.

**Skladanowski A., Konopa J.** (1994) Relevance of interstrand DNA crosslinking induced by anthracyclines for their biological activity. *Biochemical Pharmacology*, 47 (12), 2279–2287.

**Snustad D., Simmons M., Simmons P.** (2009) Genetika, Masarykova univerzita, Brno. ISBN 978-802-1048-522.

**Solem L. E., Henry T. R., Wallace K. B.** (1994) Disruption of mitochondrial calcium homeostasis following chronic doxorubicin administration. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 129 (2), 214–222.

**Steckelbroeck S., Oyesanmi B., Jin Y., Lee S. H., Kloosterboer H. J., Penning T. M.** (2006) Tibolone metabolism in human liver is catalyzed by 3 $\alpha$ /3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activities of the four isoforms of the aldo-keto reductase (AKR)1C subfamily. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 316 (3), 1300–1309.

**Šimůnek T., Štěrbá M., Popelová O., Adamcová M., Hrdina R., Geršl V.** (2009) Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacological Reports*, 61, 154–171.

**Tian Y., Zhao L., Zhang H., Liu X., Zhao L., Zhao X., Li Y., Li J.** (2014) AKR1C3 overexpression may serve as a promising biomarker for prostate cancer progression. *Diagnostics Pathology*, 9, 42.

**Tokarska-Schlattner M., Zaugg M., Zuppinger Ch., Wallimann T., Schlattner U.** (2006) New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: The critical role of cellular energetics. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 41 (3), 389–405.

**Varatharajan S., Abraham A., Zhang W., Shaji R. V., Ahmed R., Abraham A., George B., Srivastava A., Chandy M., Mathews V., Balasubramanian P.** (2012) Carbonyl reductase 1 expression influences daunorubicin metabolism in acute myeloid leukemia. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 68 (12), 1577–1586.

**Verma K., Zhang T., Penning T., Trippier P.** (2015) Design, synthesis, and antineoplastic evaluation of isoform selective inhibitors of AKR1C3. Conference: ACS, Denver

**Villerbu N., Gaben A. M., Redeuilh G., Mester J.** (2001) Cellular effects of purvalanol A: A specific inhibitor of cyclin-dependent kinase activities. *International Journal of Cancer*, 97 (6), 761–769.

**Wang S., Yang Q., Fung K. M., Lin H. K.** (2008) AKR1C2 and AKR1C3 mediated prostaglandin D2 metabolism augments the PI3K/Akt proliferative signaling pathway in human prostate cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 289 (1-2), 60–66.

**Weiss R. B.** (1992) The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin?. *Seminars in Oncology*, 19 (6), 670–686.

**Wermuth B.** (1981) Purification and properties of an NADPH-dependent carbonyl reductase from human brain. Relationship to prostaglandin 9-ketoreductase and xenobiotic ketone reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, 256 (3), 1206–13.

**Wermuth B., Platts K. L., Seidel A., Oesch F.** (1986) Carbonyl reductase provides the enzymatic basis of quinone detoxication in man. *Biochemical Pharmacology*, 35 (8), 1277–82.



**Yao J., Sasaki Y., Wen Z., Bassell G. J., Zheng1 J. Q.** (2006) An essential role for  $\beta$ -actin mRNA localization and translation in  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent growth cone guidance. *Nature Neuroscience*, 9, 1265–1273.

## 9 Internetové zdroje

- Internet 1.** *National Cancer Institut.* Online, poslední revize 09. 01. 2015 [cit. 2018-01-11]. Dostupné z: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>>
- Internet 2.** *Hyndman D., Penning T. M. – AKR Superfamily.* Online [cit. 2018-01-30]. Dostupné z: <[https://www.med.upenn.edu/akr/akr\\_graphic.html](https://www.med.upenn.edu/akr/akr_graphic.html)>
- Internet 3.** *SDR – SDR (short-chain dehydrogenases/reductases).* Online [cit. 2018-04-25]. Dostupné z: <<http://www.sdr-enzymes.org/>>
- Internet 4.** *ClinicalTrials.gov, U.S. National Library of Medicine.* Online [cit. 2018-03-17]. Dostupné z: <<https://clinicaltrials.gov/>>
- Internet 5.** *ClinicalTrials.gov, U.S. National Library of Medicine.* Online [cit. 2018-03-17]. Dostupné z: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00999401>>
- Internet 6.** *ClinicalTrials.gov, U.S. National Library of Medicine.* Online [cit. 2018-03-17]. Dostupné z: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02160730>>
- Internet 7.** *Nucleic Acid Sequence Massager.* Online [cit. 2018-04-10]. Dostupné z: <<http://www.attotron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm>>
- Internet 8.** *Primer3.* Online [cit. 2018-04-10]. Dostupné z: <<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>>
- Internet 9.** *Primer-Blast.* Online [cit. 2018-04-10]. Dostupné z: <[https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)>
- Internet 10.** *The mfold Web Server.* Online [cit. 2018-04-10]. Dostupné z: <<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>>
- Internet 11.** *Merck – Water for Western Blotting.* Online [cit. 2018-04-15]. Dostupné z: <<http://www.merckmillipore.com/CZ/cs/water-purification/learning-centers/applications/proteins/western-blotting/6MOB.qB.w.IAAAFANOCENFtx.nav?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.cz%2F>>
- Internet 12.** *Graphpad.* Online [cit. 2018-04-18]. Dostupné z: <[https://www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/index.htm?extremely\\_significant\\_results.htm](https://www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/index.htm?extremely_significant_results.htm)>
- Internet 13.** *Analyzing western blots with Image Studio Lite.* Online [cit. 2018-04-20]. Dostupné z: <<http://lukemiller.org/index.php/2013/02/analyzing-western-blots-with-image-studio-lite>>